

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL**

**Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas**



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctora en Ciencias Biológicas

**“El enclave evolutivo de la síntesis de carbohidratos de reserva en bacterias: Caracterización de nucleósido-difosfo-azúcar pirofosforilasas y glucosil-transferasas”**

Lic. María Victoria Ferretti

Director: Dr. Matías D. Asención Diez

Co-director: Dr. Carlos M. Figueroa

Laboratorio de Enzimología Molecular  
Instituto de Agrobiotecnología del Litoral

**- Año 2024 -**

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, quiero agradecer a las instituciones que hicieron posible el desarrollo de esta Tesis doctoral. A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) por la Beca Inicial de Doctorado y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por la Beca de Finalización de Doctorado otorgada, sin las cuales no habría sido posible desarrollar este trabajo y poder alcanzar este grado académico. A la ANPCyT, Agencia Santafesina de Ciencia, Tecnología e Innovación de la provincia de Santa Fe (ASaCTeI), CONICET y Universidad Nacional del Litoral, por el financiamiento brindado. A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral, por haberme permitido formarme profesionalmente.

Al Instituto de Agrobiotecnología del Litoral por brindarme el espacio para llevar a cabo esta etapa de formación; en particular a su directora, Dra. Raquel Chan, por su amabilidad y predisposición; a Emilio, por preocuparse siempre y brindarnos un excelente asesoramiento.

Agradecer al Dr. Alberto A. Iglesias por darme la oportunidad de ser parte de su grupo de trabajo, por sus comentarios, sugerencias y aportes que ayudaron al desarrollo de este trabajo. A mis directores, Dr. Matías D. Asención Diez y Dr. Carlos M. Figueroa, por dirigir este trabajo de Tesis, por transmitirme sus conocimientos, por sus consejos y por todos sus aportes durante mi formación doctoral que me ayudaron a crecer profesionalmente.

También quiero agradecer a todos los integrantes del Laboratorio de Enzimología Molecular, el LEM. A los que me recibieron cuando comencé y me hicieron sentir muy cómoda, brindándome su amistad. Algunos ya no forman parte del LEM, se extrañan mucho en el lab y en el día a día, pero seguimos en contacto y, cuando coincidimos, nos reencontramos en algún barcito. A los actuales/nuevos con los que compartimos horas de trabajo y festejamos todos los logros alcanzados. Gracias a todos por acompañarme durante estos años, por las horas de trabajo compartidas, por sus consejos, las charlas de distensión y por los lindos momentos que compartimos. Por más reuniones anuales de los *Old LEM*.

Gracias a todos mis amigos de Camilo: mis amigas “las de siempre”, mis amigas desde peques, mis amigos de la escuela, a todos; porque me acompañaron en todo momento, se interesaban en saber cómo avanzaba en mi Tesis y me esperaban en Camilo para compartir lindos momentos; gracias por bancarme a la distancia y por su amistad de años que sigue intacta.

Gracias a mis amigas de la fbioyf. Con las que compartí toda mi carrera de grado, muchas horas de estudio, lindos momentos, viajes, muchas charlas y salidas anecdóticas. En poquito tiempo se convirtieron en grandes amigas y hasta el día de hoy nos seguimos reencontrando o hablando diariamente, a pesar de que cada una está en distintos lugares del mundo.

Agradecerle también a mi compañero incondicional, Augusto. Él me acompañó en el último tramo de esta Tesis, estuvo en los buenos y malos momentos; festejó junto a mí los logros

alcanzados, se interesó siempre por cómo venía con la Tesis y me contuvo demasiado. Gracias mi amor, por estar día a día, por escucharme, acompañarme, protegerme, por siempre estar ahí cuando lo necesito, por todos los momentos que vivimos juntos. Gracias también a toda su familia, por hacerme sentir una más de la flia y por el apoyo brindado desde el primer día.

Finalmente, quiero agradecer a lo más importante que tengo: mi familia. A los que me dieron la vida, Ma y Pa: gracias por todo lo que me brindaron desde chiquita, por su amor, por los valores inculcados, por ayudarme a crecer en todos los aspectos, por enseñarme a enfrentar la vida y por todos los sabios consejos; gracias también por apoyarme en todas mis decisiones. Gracias a mi hermana Lauri, mi compañera desde que nací, gracias por todo el cariño, por preocuparte y acompañarme siempre. Gracias a mi cuñado, Tatán, por estar siempre y por los dos sobrinos hermosos que me dieron. Gracias Agu y Valen, mis sobris, que siempre entendieron que la tía Toy vivía lejos y me esperaban cada finde con un abrazo enorme y un beso. Agradecer también a mis tías, tíos y primos, por preocuparse e interesarse siempre. Un gracias gigante a mi querida Lela María Rosa, quien siempre celebró mis logros, se preocupó e interesó por mi trabajo. Gracias Lela por tus velitas encendidas, por las golosinas y cosas ricas con las que siempre me esperas. También le quiero dar las gracias a mi Lelo Roberto, mi Nono Luis y mi Nona Elena que, aunque no estén físicamente, siempre los recuerdo, los tengo presentes en mi vida y sé que estarían muy orgullosos.

¡Los quiero mucho y siempre les voy a estar agradecida!

## **APORTES CIENTÍFICOS Y TECNOLÓGICOS**

Parte de los resultados de esta Tesis fueron publicados en:

- Ferretti, M.V., Hussien, R.A., Ballicora, M.A., Iglesias, A.A., Figueroa, C.M. and Asencion Diez, M.D. “*The ADP-glucose pyrophosphorylase from Melainabacteria: a comparative study between photosynthetic and non-photosynthetic bacterial sources*”. Biochimie, 2022. Vol. 192: 30-37. doi: 10.1016/j.biochi.2021.09.011.

# ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS .....	1
APORTES CIENTÍFICOS Y TECNOLÓGICOS .....	3
ÍNDICE .....	4
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	9
RESUMEN.....	11
ABSTRACT .....	16
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>20</b>
1.1. Promiscuidad, evolución y adaptabilidad.....	20
1.2. Hidratos de carbono .....	23
1.2.1. Conceptos generales .....	23
1.2.2. Activación de la glucosa .....	25
1.2.3. Las moléculas de UDP-Glc y ADP-Glc .....	27
1.3. Glucógeno: su estructura y función.....	28
1.3.1. El rol del glucógeno en bacterias .....	30
1.3.2. Enzimas involucradas en la síntesis de glucógeno .....	31
1.3.3. Las NDP-azúcar PPasas, características generales.....	33
1.3.4. La ADP-Glc PPasa: regulación, estructura y propiedades .....	34
1.3.5. Las glucógeno sintasas .....	41
1.4. Sacarosa.....	43
1.4.1. Enzimas involucradas en el metabolismo de la Suc.....	43
1.4.2. Síntesis de Suc en bacterias.....	47
1.5. Organismos procariotas ocupando posiciones evolutivas claves .....	48
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>50</b>
2.1. Objetivos generales .....	50
2.2. Objetivos específicos.....	50
2.2.1. La ocurrencia de la ADP-Glc PPasa en cianobacterias no fotosintéticas.....	50
2.2.2. Estudio de isoformas de GSasa en bacterias: el caso de <i>B. japonicum</i> .....	50

2.2.3.	Metabolismo de la Suc en <i>N. europaea</i> : análisis de las enzimas responsables de la síntesis del disacárido .....	51
<b>3.</b>	<b>CAPÍTULO 1: “La ocurrencia de la ADP-Glc PPasa en cianobacterias no fotosintéticas” .....</b>	<b>52</b>
<b>3.1.</b>	<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>52</b>
<b>3.2.</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>54</b>
<b>3.3.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>55</b>
3.3.1.	Reactivos químicos y materiales .....	55
3.3.2.	Cepas bacterianas .....	55
3.3.3.	Medios de cultivo y antibióticos .....	55
3.3.4.	Plásmidos .....	56
3.3.5.	Obtención de genes sintéticos .....	56
3.3.6.	Digestión con enzimas de restricción .....	56
3.3.7.	Precipitación de ADN .....	56
3.3.8.	Electroforesis en geles de agarosa.....	57
3.3.9.	Purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa .....	57
3.3.10.	Ligación de fragmentos de ADN.....	57
3.3.11.	Transformación de células de <i>E. coli</i> competentes .....	57
3.3.12.	Minipreparación de ADN plasmídico .....	58
3.3.13.	Secuenciación de ADN .....	58
3.3.14.	Creación de un banco de células .....	58
3.3.15.	Optimización de condiciones de expresión .....	59
3.3.16.	Expresión y purificación de las proteínas recombinantes .....	59
3.3.17.	Cromatografía de afinidad por metal inmovilizado.....	59
3.3.18.	Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	60
3.3.19.	Cambio de medios y concentración de proteínas .....	61
3.3.20.	Cuantificación de proteínas .....	61
3.3.21.	Cromatografía de filtración por geles: Determinación de la masa molecular .....	61
3.3.22.	Ensayos de actividad enzimática.....	61
3.3.22.1.	Determinación de la actividad de la ADP-Glc PPasa: Método colorimétrico .....	62

3.3.22.2.	Determinación de la actividad de la ADP-Glc PPasa: Método cinético con enzimas acopladas.....	62
3.3.22.3.	Determinación de los parámetros cinéticos.....	63
3.3.23.	Tratamiento informático.....	64
3.3.23.1.	Análisis de secuencias.....	64
3.3.23.2.	Construcción de árbol filogenético .....	64
3.3.23.3.	Modelado molecular.....	64
<b>3.4.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>65</b>
3.4.1.	Análisis filogenético.....	65
3.4.2.	Identificación de genes <i>glgC</i> .....	68
3.4.3.	Obtención de las ADP-Glc PPasas de <i>Melainabacteria</i> y de <i>Anabaena</i> en forma recombinante .....	68
3.4.4.	Determinación de la estructura cuaternaria de las ADP-Glc PPasas de <i>Melainabacteria</i> .....	71
3.4.5.	Caracterización cinética de las ADP-Glc PPasas de <i>Melainabacteria</i> y <i>Anabaena</i> .	72
3.4.6.	Caracterización regulatoria de <i>inMelGlgC</i> , <i>fIMelGlgC</i> y <i>AnaGlgC</i> .....	74
3.4.7.	Cinéticas de los sustratos en presencia de los efectores .....	80
3.4.8.	Análisis de las estructuras proteicas <i>in silico</i> .....	83
<b>3.5.</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>89</b>
<b>4.</b>	<b>CAPÍTULO 2: “Estudio de isoformas de GSasa en bacterias: el caso de <i>B. japonicum</i>” .</b>	<b>94</b>
<b>4.1.</b>	<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>94</b>
<b>4.2.</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>96</b>
<b>4.3.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>97</b>
4.3.1.	Cepas bacterianas .....	97
4.3.2.	Medios de cultivo y antibióticos .....	97
4.3.3.	Plásmidos .....	98
4.3.4.	Obtención de genes sintéticos .....	98
4.3.5.	Expresión y purificación de las proteínas recombinantes .....	98
4.3.6.	Cromatografía de afinidad por metal inmovilizado.....	99
4.3.7.	Métodos bioquímicos generales .....	99

4.3.8.	Ensayos de actividad enzimática.....	99
4.3.8.1.	Determinación de la actividad de la GSasa: Método cinético con enzimas acopladas ...	99
4.3.9.	Tratamiento informático.....	100
<b>4.4.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>101</b>
4.4.1.	Identificación de genes <i>glgA</i> .....	101
4.4.2.	Clonado y expresión recombinante de las putativas GSasas.....	101
4.4.3.	Caracterización estructural de las GSasas recombinantes.....	102
4.4.4.	Caracterización cinética de las GSasas recombinantes .....	103
4.4.5.	Actividad GSasa en presencia de sustratos alternativos.....	106
4.4.6.	Análisis filogenético de las GSasas de <i>B. japonicum</i> .....	107
4.4.7.	Análisis de la actividad en función de la síntesis de Mal-1P .....	110
4.4.8.	Análisis de las estructuras proteicas de las GSasas <i>in silico</i> .....	111
<b>4.5.</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>115</b>
4.5.1.	Análisis de los genes involucrados en la síntesis y degradación del glucógeno	115
4.5.2.	Evaluación comparativa de las GlgAs de <i>B. japonicum</i> .....	119
<b>5.</b>	<b>CAPÍTULO 3: “Metabolismo de la Suc en <i>N. europaea</i>: análisis de las enzimas responsables de la síntesis del disacárido” .....</b>	<b>124</b>
<b>5.1.</b>	<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>124</b>
<b>5.2.</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>126</b>
<b>5.3.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>127</b>
5.3.1.	Cepas bacterianas .....	127
5.3.2.	Medios de cultivo y antibióticos .....	127
5.3.3.	Plásmidos .....	128
5.3.4.	Obtención de genes sintéticos .....	128
5.3.5.	Extracción de ADN genómico de <i>N. europaea</i> .....	128
5.3.6.	Oligonucleótidos .....	129
5.3.7.	Reacción en cadena de la polimerasa .....	129
5.3.8.	Expresión y purificación de las proteínas recombinantes .....	130
5.3.9.	Cromatografía de exclusión molecular.....	130

5.3.10.	Métodos bioquímicos generales .....	130
5.3.11.	Electrotransferencia seguida de inmunodetección .....	131
5.3.12.	Ensayos de actividad enzimática.....	131
5.3.13.	Cuantificación de azúcares solubles.....	132
5.3.14.	Tratamiento informático.....	132
<b>5.4.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>133</b>
5.4.1.	<i>N. europaea</i> , cultivos y almacenamiento .....	133
5.4.2.	Curvas de crecimiento .....	134
5.4.3.	Síntesis de sacarosa .....	137
5.4.4.	Caracterización <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> de la SucPSasa de tipo II.....	138
5.4.4.1.	Clonado y expresión recombinante de la <i>Neu</i> SucPSasa-II .....	138
5.4.4.2.	Caracterización cinética de la <i>Neu</i> SucPSasa-II recombinante.....	141
5.4.4.3.	Análisis de actividad de SucPSasa-II en extractos de <i>N. europaea</i> .....	145
5.4.4.4.	Rol fisiológico de la <i>Neu</i> SucPSasa-II en condiciones heterótrofas .....	145
5.4.4.5.	Análisis de la <i>Neu</i> SucPSasa-II en células crecidas en condiciones quimiolitautotróficas.....	148
5.4.5.	Regulación de la <i>Neu</i> SucPSasa-II .....	150
5.4.5.1.	Ensayos de proteólisis sobre <i>Neu</i> SucPSasa-II .....	152
5.4.6.	Análisis de la estructura proteica de la <i>Neu</i> SucPSasa-II <i>in silico</i> .....	153
<b>5.5.</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>156</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>165</b>
<b>7.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>168</b>
<b>8.</b>	<b>MATERIAL SUPLEMENTARIO.....</b>	<b>196</b>
8.1.	Figuras Suplementarias .....	196
8.2.	Tablas Suplementarias.....	199

**ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS**

$\beta$ -ME	$\beta$ -mercaptoetanol
xg	fuerza centrífuga relativa
°C	grados Celsius
$\mu$ g	microgramo
$\mu$ l	microlitro
3-PGA	ácido 3-fosfoglicérico
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADP	adenosina-5'-difosfato
ADP-Glc	adenosina-5'-difosfo-glucosa
ADP-Glc PPasa	adenosina-5'-difosfo-glucosa pirofosforilasa
AMP	adenosina-5'-monofosfato
ARN	ácido ribonucleico
ATP	adenosina-5'-trifosfato
BSA	albúmina sérica bovina
CO <sub>2</sub>	dióxido de carbono
DAB	diaminobencidina
DMSO	dimetilsulfóxido
dNTPs	mezcla equimolar de desoxinucleótidos
DO	densidad óptica
DTT	ditiotreitól
EC	<i>Enzyme Commission</i>
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
Fru	fructosa
Fru-1,6-P <sub>2</sub>	fructosa-1,6-bisfosfato
Fru-6P	fructosa-6-fosfato
Glc	glucosa
Glc-1P	glucosa-1-fosfato
Glc-6P	glucosa-6-fosfato
h	hora
HEPES	N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-2-etano-sulfónico
IMAC	cromatografía de afinidad por metal inmovilizado
IPTG	isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido
$k_{cat}$	constante catalítica
kDa	kilodalton
kg	kilogramo

$K_m$	constante de Michaelis-Menten
L	litro
LB	medio <i>Lysogeny Broth</i>
M	molar
Man-6P	manosa-6-P
mg	miligramo
min	minuto
ml	mililitro
MM	masa molecular
mM	milimolar
MOPS	ácido 3-morfolinopropano-1-sulfónico
NAD(P) <sup>+</sup>	nicotinamida adenina dinucleótido (fosfato)
NAD(P)H	nicotinamida adenina dinucleótido (fosfato) reducida
p/v	peso en volumen
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PDB	código de <i>Protein Data Bank</i>
PEP	fosfoenolpiruvato
Pi	ortofosfato inorgánico
PPi	pirofosfato inorgánico
Pyr	piruvato
RMSD	<i>Root-Mean-Square Deviation</i>
rpm	revoluciones por minuto
s	segundo
SDS	dodecil sulfato de sodio
Suc	sacarosa
SucPasa	sacarosa-6-fosfatasa
SucPSasa	sacarosa-6-fosfato sintasa
TAE	solución Tris-acético-EDTA
TBS	solución Tris salino
Tris	2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol
U	unidades internacionales de actividad enzimática
UDP	uridina-5'-difosfato
UDP-Glc	uridina-5'-difosfo glucosa
v/v	volumen en volumen
$V_{max}$	velocidad máxima

## RESUMEN

A finales del siglo XX, Luis F. Leloir y sus colaboradores descubrieron los NDP-azúcares, siendo los derivados que contienen Glc (NDP-Glc) los cuantitativamente más importantes. En diversas células, estos derivados son los dadores glucosídicos que permiten la síntesis de  $\alpha$ -1,4-glucanos y distintos disacáridos, como la trehalosa (Tre) y la sacarosa (Suc). La biosíntesis de glucanos es una estrategia empleada por numerosos organismos para almacenar reservas intracelulares de energía y carbono. Los animales, los hongos, las eubacterias y las arqueobacterias acumulan glucógeno, mientras que las plantas sintetizan almidón.

La ADP-Glc pirofosforilasa (ADP-Glc PPasa, EC 2.7.7.27) es una enzima crucial en la síntesis de glucógeno y almidón en bacterias y plantas, respectivamente. Esta enzima utiliza Glc-1P y ATP para producir ADP-Glc, el cual actúa como dador de residuos glucosilos en la síntesis de glucógeno y almidón. La actividad de la ADP-Glc PPasa es modulada alostéricamente por diversos metabolitos que reflejan los niveles de energía dentro de la célula, lo que hace que la reacción catalizada por esta enzima sea el punto de regulación en la biosíntesis de poliglucanos de reserva. Las ADP-Glc PPasas de bacterias heterotróficas son activadas por intermediarios glucolíticos tales como Glc-6P, Fru-6P, Fru-1,6-P<sub>2</sub> o Pyr. A su vez, estas enzimas son inhibidas por AMP, ADP y/o Pi. Por otro lado, la ADP-Glc PPasa proveniente de organismos que realizan fotosíntesis oxigénica es regulada principalmente por 3-PGA (activador) y por Pi (inhibidor).

La segunda reacción en la vía de síntesis de un  $\alpha$ -1,4-glucano de reserva comprende la transferencia del residuo glucosilo desde el NDP-Glc a una cadena de  $\alpha$ -1,4-(Glc)<sub>n</sub> para alargar el polímero en una unidad por el extremo no reductor. Esta reacción es catalizada por una enzima del tipo  $\alpha$ -1,4-glucano glucosiltransferasa (EC 2.4.1.-), denominada glucógeno sintasa (GSasa). En el caso de un polisacárido de reserva ramificado, como el glucógeno, que posee ramificaciones  $\alpha$ -1,6, se requiere una enzima ramificante para catalizar la reacción específica y producir el  $\alpha$ -1,4- $\alpha$ -1,6-glucano ramificado. La GSasa de hongos y mamíferos (EC 2.4.1.11) utiliza preferentemente UDP-Glc como sustrato y pertenece a la familia GT3. A su vez, la GSasa de bacterias y vegetales (EC 2.4.1.21, también conocida como almidón sintasa) utiliza ADP-Glc y se agrupa dentro de la familia GT5. Desde una perspectiva evolutiva se presenta un escenario donde la caracterización de NDP-Glc PPasas y de GSasas de diferentes organismos es de utilidad para realizar comparaciones y análisis que permitan establecer relaciones de estructura proteica a función y regulación. Es así que en este trabajo de Tesis se planteó profundizar la caracterización y el análisis de estructura a función de este tipo de enzimas. Para esto, se seleccionaron específicamente algunas de ellas provenientes de organismos que ocupan posiciones evolutivas distintivas. Concretamente, los estudios se realizaron sobre la enzima ADP-Glc PPasa de bacterias pertenecientes a un grupo de cianobacterias no fotosintéticas, denominadas *Melainobacteria*, y de una cianobacteria fotosintética, *Anabaena* PCC 7120. Además, se estudió la enzima GSasa de

otro microorganismo, *Bradyrhizobium japonicum*, el cual fue seleccionado por tener duplicados los genes que codifican para dicha enzima.

Históricamente, en el filo de las cianobacterias sólo se incluían miembros capaces de realizar fotosíntesis oxigénica. Esto cambió con el descubrimiento de *Melainabacteria*, un grupo de cianobacterias no fotosintéticas. Para llevar a cabo un estudio sobre las enzimas involucradas en las rutas metabólicas de estas cianobacterias no fotosintéticas, se clonaron los genes que codifican para la ADP-Glc PPasa de *Melainabacteria* proveniente de dos fuentes, una intestinal y otra de vida libre, como así también el gen codificante para la ADP-Glc PPasa de *Anabaena* PCC 7120, para realizar estudios comparativos. Estos genes se expresaron en células de *Escherichia coli* y luego se llevó a cabo la purificación de las enzimas recombinantes correspondientes, obteniéndose enzimas solubles, activas, con elevado grado de pureza y estables. Por primera vez, se determinó la estructura cuaternaria de una ADP-Glc PPasa proveniente de una cianobacteria no fotosintética, la cual resultó ser homotetramérica, coincidiendo con la estructura de la enzima de *Anabaena* (y de otras fuentes procariontas). Se caracterizaron cinética y regulatoriamente las enzimas de ambos organismos cianobacterianos. Las proteínas recombinantes purificadas de ambas especies de *Melainabacteria* mostraron valores de  $V_{\max}$  de 2,3 (vida libre) y 7,1 U/mg (intestinal), mientras que la enzima de *Anabaena* presentó un valor de  $V_{\max}$  de 0,31 U/mg. A su vez, las enzimas mostraron valores similares de  $S_{0,5}$  para el ATP (~0,3 mM), mientras que la ADP-Glc PPasa de origen intestinal exhibió una afinidad 6 veces mayor hacia la Glc-1P en comparación con la de vida libre. Respecto a las propiedades regulatorias, ambas enzimas de *Melainabacteria* fueron activadas por Glc-6P, Fru-6P y Man-6P, e inhibidas por ADP y Pi. Un resultado destacable es que el 3-PGA, principal activador de las ADP-Glc PPasas de cianobacterias caracterizadas hasta el momento, no produjo ningún efecto sobre las enzimas de *Melainabacteria*. Además, se realizó un análisis filogenético de varias ADP-Glc PPasas provenientes de diferentes fuentes. A partir de este análisis, se pudo demostrar que las enzimas de *Melainabacteria* se ubican en el mismo clado que las de Proteobacteria, particularmente cercanas al *phylum* Actinobacteria. Por otra parte, las enzimas provenientes de cianobacterias fotosintéticas, como *Anabaena*, forman un clado separado que diverge de las proteínas de plantas. En este sentido, los resultados obtenidos en esta Tesis constituyen el primer informe bioquímico sobre enzimas involucradas en las rutas metabólicas de cianobacterias no fotosintéticas, lo que contribuye en gran medida a una mejor comprensión de la evolución de la regulación alostérica en la familia de las ADP-Glc PPasas. Además, estos resultados aportan nuevos conocimientos sobre un tema candente relacionado con la posición filogenética de *Melainabacteria*.

En cuanto a *B. japonicum*, una bacteria que se encuentra en el suelo y es conocida por su capacidad para establecer una relación simbiótica con ciertas especies de plantas leguminosas, se identificaron y se clonaron los genes que codifican para dos GSasas putativas. Los mismos fueron expresados de manera recombinante en células de *E. coli* para su posterior purificación. Las

proteínas purificadas se denominaron GSasa471 y GSasa482, según la cantidad de aminoácidos que presentan en su secuencia. La caracterización de ambas enzimas demostró que son capaces de catalizar la elongación del  $\alpha$ -1,4-glucano, con una  $V_{\max}$  de 0,41 y 53,1 U/mg para la GSasa471 y la GSasa482, respectivamente. Los valores de afinidad para ambos sustratos se encuentran en el mismo orden de magnitud en las dos enzimas. A su vez, tanto la GSasa471 como la GSasa482 fueron específicas por el dador glucosídico ADP-Glc. En cuanto a la especificidad por el sustrato aceptor de estas GSasas, encontramos que distintos tipos de glucógeno actúan como sustrato para ambas enzimas. Particularmente, el glucógeno de ostra, que posee una estructura heterogénea y una mayor proporción de ramificaciones cortas. Se determinó que la  $V_{\max}$  para la GSasa471 con este sustrato (1,2 U/mg) fue 3 veces mayor que la actividad determinada con glucógeno de hígado de conejo, por lo cual la GSasa471 resulta más eficiente cuando utiliza glucanos con cadenas cortas. Sucede lo contrario con la enzima GSasa482, la cual presenta una eficiencia catalítica 4 veces mayor cuando el sustrato es glucógeno de hígado de conejo. Por otra parte, se determinaron las estructuras cuaternarias de las dos enzimas, presentando ambas una estructura monomérica, lo cual es coincidente con lo informado para la GSasa de *E. coli*. Recientemente, se ha reportado que en micobacterias la enzima GSasa es capaz de producir Mal-1P a partir de Glc-1P y ADP-Glc. Además, se ha descubierto una ruta alternativa de síntesis de glucógeno en algunas bacterias, llamada GlgE, cuya enzima principal es la que le da el nombre y puede alargar al glucano en dos unidades de Glc utilizando Mal-1P como sustrato. Curiosamente, *B. japonicum* también posee los genes que codifican las proteínas de la vía GlgE. Al evaluar la actividad de formación de Mal-1P por parte de ambas GSasas de *B. japonicum*, ninguna fue capaz de utilizar la Glc-1P como sustrato. En conjunto, estos resultados proporcionan información sobre la duplicación de genes en organismos procariontes y cómo esto se relaciona con la producción de glucógeno, la principal molécula de almacenamiento de carbohidratos. Además, los resultados presentados en esta Tesis demuestran que en *B. japonicum* la síntesis del glucógeno se lleva a cabo a través de dos GSasas, capaces de elongar el  $\alpha$ -1,4-glucano en una unidad de Glc. A su vez, se evidencia que estas enzimas carecen de la capacidad de sintetizar Mal-1P, lo cual parece ser una actividad limitada a las GSasas de tipo GT4. Estos resultados son el primer informe de dos GSasas procariontes que elongan  $\alpha$ -1,4-glucanos de manera concurrente.

La Suc es uno de los productos principales de la fotosíntesis que se acumula principalmente en organismos fototróficos como plantas, algas unicelulares y cianobacterias. En dichos organismos, la biosíntesis de la Suc ocurre principalmente a través de las enzimas Suc-6P sintasa (SucPSasa, EC 2.4.1.14) y Suc-6P fosfatasa (SucPasa, EC 3.1.3.24). Se ha demostrado que ciertas bacterias metilotróficas pueden acumular Suc en respuesta al aumento de la salinidad en los medios de crecimiento. En nuestro laboratorio detectamos que *Nitrosomonas europaea*, un organismo quimiolitautótrofo, conserva genes relacionados con el metabolismo del glucógeno y de la Suc. Debido a la escasa información acerca de las enzimas que catalizan la síntesis de este

disacárido en procariotas no fotosintéticos, se realizó el análisis de la enzima SucPSasa de tipo II de *N. europaea* (*NeuSucPSasa-II*). Esta enzima presenta dos dominios catalíticos: SucPSasa en el N-terminal y SucPasa en el C-terminal. Los resultados presentados en esta Tesis demuestran que la *NeuSucPSasa-II* no posee actividad enzimática en su forma completa, pero sí la tiene cuando sus dominios se expresan por separado. En particular, el dominio *NeuSucPSasa* puede utilizar ADP-Glc y UDP-Glc como sustratos, mientras que el dominio *NeuSucPasa* es específico por el disacárido fosforilado Suc-6P. Además, se llevó a cabo un análisis del crecimiento de *N. europaea* en condiciones de cultivo autotróficas y heterotróficas, observando un aumento significativo de biomasa en condiciones mixotróficas, es decir, en presencia de CO<sub>2</sub> y de 2% de Fru. A su vez, se logró aumentar el porcentaje de células crecidas en condiciones quimiolitautótrofas con el desarrollo de un dispositivo mediante el cual se suministra un constante burbujeo de aire a las células en crecimiento. Cuando se realizó el análisis de las enzimas asociadas a la síntesis de Suc en extractos proteicos de *N. europaea* se observó que, en condiciones heterotróficas, la proteína *NeuSucPSasa-II* se expresa en su forma completa de ~80 kDa, mayormente inactiva. Por el contrario, en condiciones quimiolitautótrofas, se pudo detectar el dominio *NeuSucPasa* individual, lo cual estaría indicando que la enzima *NeuSucPSasa-II* podría regularse post-traduccionalmente por un mecanismo de proteólisis, dando lugar a ambos dominios activos. A raíz de esto, mediante análisis informático, se indagó sobre la posible proteólisis y se detectó una peptidasa putativa perteneciente a la familia S8 que cortaría la proteína de interés en el *linker* que une los dominios SucPSasa y SucPasa. Para dilucidar este proceso realizamos ensayos combinando extractos proteicos de *N. europaea* con la proteína completa recombinante *NeuSucPSasa-II*. Los resultados obtenidos mostraron que la enzima recombinante se escinde con extractos provenientes de condiciones quimiolitautótrofas; mientras que con los extractos de condiciones heterótrofas no se observó proteólisis, permaneciendo la enzima en su forma completa e inactiva. A su vez, estos resultados se condicen con las medidas de actividad realizadas sobre extractos crudos de *N. europaea* en cada una de las condiciones antes mencionadas. Los resultados presentados en esta Tesis respaldan la hipótesis donde la síntesis de Suc vía *NeuSucPSasa-II* se encuentra regulada por proteólisis, un mecanismo de regulación eficaz frente a cambios ambientales bruscos. Los resultados sientan las bases para profundizar sobre este mecanismo en el metabolismo de la Suc en organismos quimiolitautótrofos.

Desde una perspectiva global, los conocimientos generados en este trabajo de Tesis, a partir de la caracterización *in vitro* de diferentes enzimas, nos acercan a un entendimiento de la partición del carbono y la síntesis de compuestos de reserva en organismos procariotas ubicados en posiciones evolutivas distintas. Asimismo, se presenta la puesta a punto y la generación de nuevas herramientas para el crecimiento, la manipulación y el estudio de la bacteria quimiolitautótrofa *N. europaea*. En conjunto, el conocimiento desarrollado sobre *N. europaea* será relevante para profundizar acerca de la partición de la Glc producida por quimiosíntesis en

este organismo autótrofo. A su vez, una mejor comprensión de la síntesis de oligo y polisacáridos por organismos quimiolitautotróficos permitiría, en una posterior instancia, plantear el uso de los mismos como biorrefinerías para convertir compuestos inorgánicos en biomateriales de interés biotecnológico.

## ABSTRACT

NDP-sugars were discovered about 70 years ago by Luis F. Leloir and coworkers. The derivatives containing Glc (NDP-Glc) are quantitatively the most important, being in several cells the glucosyl donors for the synthesis of  $\alpha$ -1,4-glucans and disaccharides such as trehalose (Tre) and sucrose (Suc). The biosynthesis of glucans is a strategy used by many organisms to store intracellular energy and carbon reserves. Animals, fungi, eubacteria, and archaea accumulate glycogen, while plants synthesize starch.

ADP-Glc pyrophosphorylase (ADP-Glc PPase, EC 2.7.7.27) plays a fundamental role in glycogen and starch biosynthesis in bacteria and plants, respectively. The enzyme uses Glc-1P and ATP as substrates to produce ADP-Glc, the glucosyl donor for glycogen and starch synthesis. The activity of ADP-Glc PPase is allosterically modulated by metabolites indicating the intracellular energy level. Therefore, the ADP-Glc PPase reaction is the main regulatory step in the glycogen and starch biosynthetic processes. Several enzymes from heterotrophic bacteria are activated by glycolytic intermediates such as Glc-6P, Fru-6P, Fru-1,6-P<sub>2</sub>, and/or Pyr, while they are inhibited by AMP, ADP, and/or Pi. On the other hand, ADP-Glc PPases from organisms performing oxygenic photosynthesis are (mainly) regulated by 3-PGA (activator) and Pi (inhibitor).

The second reaction in the  $\alpha$ -1,4-glucan synthetic pathway involves the transfer of the glucosyl residue from NDP-Glc to an  $\alpha$ -1,4-(Glc)<sub>n</sub> chain to extend the polymer in one unit. This reaction is catalyzed by an  $\alpha$ -1,4-glucan glucosyltransferase (EC 2.4.1.-) called glycogen synthase (GSase). The enzyme from fungi and mammals (EC 2.4.1.11) uses UDP-Glc as substrate and belongs to the GT3 family, whereas the GSase from bacteria and plants (EC 2.4.1.21, also known as starch synthase) uses ADP-Glc and belongs to the GT5 family. The evolutionary scenario shows that characterization of NDP-Glc pyrophosphorylases and GSases from different organisms would be useful to conduct comparative analyses to establish relationships between protein structure, function, and regulation. In this Thesis, we aimed to characterize enzymes from organisms located at particular evolutionary positions. Specifically, studies were performed on the ADP-Glc PPase from bacteria belonging to a group of non-photosynthetic cyanobacteria called *Melainobacteria* and from a photosynthetic cyanobacterium, *Anabaena* PCC 7120. In addition, two GSases from *B. japonicum* were studied because we detected a duplication of the genes encoding these enzymes.

Historically, the group of cyanobacteria only included representatives capable to performing oxygenic photosynthesis. This changed recently with the discovery of *Melainobacteria*, a group of non-photosynthetic cyanobacteria. We explored their genomes and identified several genes related to carbohydrate metabolism. Thus, the genes encoding ADP-Glc PPase from intestinal and free-living *Melainobacteria* were cloned, as well as the gene coding for ADP-Glc PPase from

*Anabaena* PCC 7120. All genes were expressed in *E. coli* cells and the corresponding proteins were purified to near homogeneity. In this way, soluble, active, and stable enzymes were obtained. The enzymes from *Melainabacteria* displayed a homotetrameric quaternary structure, as previously reported for other cyanobacterial ADP-Glc PPases, such as the one from *Anabaena*. The recombinant ADP-Glc PPases from *Melainabacteria* showed  $V_{\max}$  values of 2.3 (free-living) and 7.1 U/mg (intestinal), while that for the *Anabaena* enzyme was 0.31 U/mg. Both enzymes showed similar  $S_{0.5}$  values for ATP (~0.3 mM), whereas the enzyme from intestinal source exhibited a six-fold higher affinity for Glc-1P than the enzyme from the free-living source. Regarding their regulatory properties, both *Melainabacteria* enzymes were activated by Glc-6P, Fru-6P, and Man-6P, and inhibited by ADP and Pi. On the other hand, 3-PGA had no effect on any of the *Melainabacteria* enzymes, despite being the main activator of ADP-Glc PPases from all cyanobacterial enzymes characterized so far. After a phylogenetic analysis, the *Melainabacteria* ADP-Glc PPases were located in the same clade than those from Proteobacteria and close to the Actinobacteria phylum. Conversely, the *Anabaena* ADP-Glc PPase was located in an independent group together with individuals from other photosynthetic cyanobacteria. Our findings constitute the first biochemical report on enzymes participating in non-photosynthetic cyanobacterial metabolic pathways, contributing to a better understanding of allosteric regulation in the ADP-Glc PPase family. Furthermore, the results could provide additional insights on a current hot topic regarding the phylogenetic position of *Melainabacteria*.

We also found a gene duplication case in *B. japonicum*, a soil-occurring bacterium known for its ability to form symbiotic relationships with certain legume species. The two genes encoding putative GSases were cloned and recombinantly expressed in *E. coli* cells, and the corresponding proteins were purified to near homogeneity. Both enzymes were designated GSase471 and GSase482, according to the number of amino acids in their sequence. We determined their quaternary structures and both showed a monomeric conformation, consistent with that reported for the *E. coli* enzyme. Kinetic characterization showed that both are capable of catalyzing the elongation of a preformed  $\alpha$ -1,4-glucan, with a  $V_{\max}$  of 0.41 and 53.1 U/mg for GSase471 and GSase482, respectively, being specific for the glucosyl donor ADP-Glc. The affinity values for each substrate were of the same order of magnitude for both enzymes. To test the specificity of the acceptor aglycon of these GSases, we analyzed different types of glucans finding that oyster glycogen was used as substrate by both enzymes. Oyster glycogen has a heterogeneous structure and is characterized by a high ratio of short branches. With this substrate, GSase471 depicted three times higher activity compared to rabbit liver glycogen, thus being more efficient to elongate short branches. On the other hand, GSase482 has a 4-fold higher catalytic efficiency when the substrate is rabbit liver glycogen than oyster glycogen. Recently, it was described that an Actinobacterial GSase-type enzyme is able to produce Mal-1P, the glucosyl donor for glycogen elongation via the novel GlgE pathway. Since we found a gene encoding the maltosyl-transferase

GlgE in the *B. japonicum* genome, we analyzed both GSase471 and GSase482 for this activity. Assessment of the Mal-1P formation activity by both *B. japonicum* enzymes revealed that neither was able to use Glc-1P as substrate in the presence of 10 mM NDP-Glc. Taken together, the results produced in this Thesis provide new information regarding bacterial gene duplication in prokaryotic organisms and their relationship with glycogen synthesis, a major carbohydrate storage molecule. Indeed, both GSases from *B. japonicum* were able to elongate glycogen in one Glc unit. This work is the first report of two simultaneous prokaryotic GSases, although their metabolic redundancy remains to be determined.

Suc is a major photosynthetic product that accumulates in phototrophic organisms such as plants, unicellular algae, and cyanobacteria. In these organisms, Suc biosynthesis mainly occurs by the concerted activities of Suc-6P synthase (SucPSase, EC 2.4.1.14) and Suc-6P phosphatase (SucPase, EC 3.1.3.24). The ability of certain methylotrophic bacteria to accumulate Suc in response to high salinity in growth media has recently been established. In this context, the chemolithoautotrophic organism *N. europaea* was found to possess genes related to glycogen and Suc metabolisms. Given the scarce of kinetic information regarding enzymes linked to metabolism in non-photosynthetic prokaryotes, we focused on the type II SucPSase enzyme from *N. europaea* (*Neu*SucPSase-II). The protein has two catalytic domains, SucPSase and SucPase, located at the N- and C-terminus, respectively. We demonstrated that *Neu*SucPSase-II has no enzymatic activity in its complete form. However, when each domain is independently expressed, the enzymes obtained have their respective activities. Specifically, the *Neu*SucPSase domain uses both ADP-Glc and UDP-Glc as substrates, whereas the *Neu*SucPase domain is specific for Suc-6P. In addition, we analyzed *N. europaea* growth under different culture conditions. We observed higher biomass recovery at mixotrophic conditions. We also developed a device to insulate air into the medium under chemolithoautotrophic conditions, which worked better than cultures grown under orbital shaking. We then comparatively analyzed the presence of *Neu*SucPSase in the different culture conditions: under heterotrophic conditions the complete, low-active form of *Neu*SucPSase-II protein was produced. Conversely, we detected the single *Neu*SucPase domain under chemolithoautotrophic conditions. Thus, our results suggest that the *Neu*SucPSase-II protein might be regulated by proteolysis to obtain both kinetically active domains. Reinforcing this hypothesis, a computational analysis showed the presence of a putative cleavage site for a peptidase from the S8 family between both domains. We then treated the complete, recombinant *Neu*SucPSase-II protein with crude extracts from cells grown in chemolithoautotrophic conditions, and the single *Neu*SucPase domain was immunodetected. Remarkably, the same treatment with a protein extract from heterotrophic conditions did not produce the proteolytic cleavage, detecting *Neu*SucPSase-II as the inactive, complete form. These results strongly support the hypothesis that Suc synthesis via *Neu*SucPSase-II would be

post-translationally regulated by proteolysis. However, further research is needed to elucidate this mechanism and fully understand the Suc metabolism in chemolithoautotrophic organisms.

In a whole view, knowledge generated in this Thesis, by means of *in vitro* kinetic characterization of key enzymes, paved the way to a better understanding of carbon partition in prokaryotic organisms located in different evolutionary positions. Furthermore, we developed several tools to study *in vivo* features of the chemoautotrophic bacterium *N. europaea* to complement our enzymatic results. The gained knowledge regarding *N. europaea* metabolism will be relevant to use these autotrophic organisms as biorefineries for chemosynthesis to convert inorganic compounds into biomaterials of biotechnological interest.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. PROMISCUIDAD, EVOLUCIÓN Y ADAPTABILIDAD

Dentro de una célula, una multitud de reacciones químicas ocurren en forma simultánea siguiendo ciertas pautas que las organizan en procesos coherentes, funcionando de manera secuencial para producir uno o varios productos específicos. El metabolismo puede definirse como la suma de todas las transformaciones químicas que ocurren en una célula u organismo, lo cual está dado en forma rigurosamente regulada por una serie de reacciones, catalizadas por las enzimas que componen las vías metabólicas (1). Prácticamente todas las reacciones químicas en una célula ocurren a una velocidad significativa sólo por la presencia de enzimas, biocatalizadores que, como todos los demás catalizadores, aceleran la velocidad de una reacción química sin consumirse en el proceso. Como resultado, las reacciones catalizadas por enzimas suelen ocurrir  $10^{12}$  veces más rápido que las reacciones no catalizadas (1). Estos catalizadores celulares son proteínas, excepto por algún caso particular. En general, se asume que cada enzima cataliza una reacción específica y cada reacción en una célula es catalizada por una enzima diferente. Por lo tanto, cada célula requiere miles de enzimas diferentes. La multiplicidad de enzimas, su especificidad, capacidad de discriminar entre reactivos, y su susceptibilidad a la regulación dan a las células la capacidad de reducir las barreras de activación de forma selectiva. Esta selectividad es crucial para la regulación eficaz de los procesos celulares. La característica fundamental de las enzimas es que no modifican el  $\Delta G$  de la reacción, pero sí aceleran su velocidad en forma altamente específica y regulable (1). Por lo anterior, resulta comprensible que las enzimas participen en la mayoría de los procesos celulares y que la catálisis sea sustantiva en las definiciones operativas de la vida.

Como se mencionó, se sabe que gran parte de las enzimas son específicas y catalizan reacciones individuales a alta velocidad. Sin embargo, en los últimos años, el análisis de la promiscuidad de las enzimas ha tomado mayor peso. La promiscuidad enzimática se define como la capacidad de las enzimas para catalizar sustratos alternativos (promiscuidad de sustratos) o catalizar reacciones aparte de su actividad enzimática relevante nativa (promiscuidad catalítica) (2). La investigación sobre la posibilidad de que las enzimas catalicen diferentes reacciones ha dado lugar a ideas de importancia tanto desde el punto de vista evolutivo como así también en un aspecto industrial. A pesar de su eficiencia, especificidad y robustez las enzimas exhiben una notable capacidad de adaptación evolutiva. De esta manera, resulta importante la comprensión de la promiscuidad ya que, desde una perspectiva teórica, permite un mejor entendimiento de la bioquímica de los sistemas vivos, debido a que la noción de la capacidad de utilizar sustratos alternativos se correlaciona con la del reconocimiento molecular (3). Estas actividades promiscuas generalmente suelen tener una baja eficiencia catalítica y se consideran poco útiles en el metabolismo (4). Sin embargo, estas reacciones secundarias se vuelven esenciales bajo

perturbaciones ambientales o genéticas, en las que sirven como precursores para el desarrollo de nuevas actividades enzimáticas (5).

Entonces surge el interrogante, ¿de dónde proviene la flexibilidad y plasticidad de las rutas metabólicas y las nuevas actividades enzimáticas? Estudios previos se han centrado en el nivel de las vías o enzimas y la variabilidad de las enzimas en su química de reacción (6–8). Sin embargo, también se debe considerar la variabilidad del sustrato y del producto. Muchos aspectos de los sistemas biológicos son comprensibles en el marco de la evolución estructural o de las actividades enzimáticas. Comprender cómo surgen nuevas vías metabólicas durante la adaptación a los cambios ambientales sigue siendo un tema central en la biología evolutiva. La hipótesis predominante es que las enzimas a menudo exhiben actividades promiscuas, y la evolución explota estas actividades débiles preexistentes para generar novedades metabólicas (9–13). La promiscuidad de las enzimas se ha relacionado de manera prominente con eventos de mutación temprana, donde las mutaciones que mejoran las actividades secundarias pueden dar como resultado mejoras fenotípicas significativas y nuevas capacidades (10).

El análisis sistemático de los datos genómicos ha revelado la influencia de múltiples factores en la evolución de las proteínas (14), debido a la selección de la función, la estructura y el plegamiento de las mismas, como así también a efectos producidos por la propia estructura del genoma, lo que determina las tasas de mutación y recombinación (15). El interés emergente en la promiscuidad enzimática se deriva de los descubrimientos sobre el papel central que desempeña la promiscuidad en la evolución de las enzimas y, por lo tanto, es una propiedad útil para la ingeniería metabólica y de proteínas (2). Las actividades promiscuas no contribuyen a la aptitud del organismo, a menos que los cambios ambientales o genómicos, como mutaciones o amplificación de genes, creen una nueva ventaja selectiva para la actividad y una oportunidad para reclutar la actividad en una nueva vía metabólica como función biológica (2).

A medida que evolucionan las especies, la tasa de sustitución de aminoácidos en las proteínas varía considerablemente entre las diferentes familias de proteínas (16). Esta variabilidad es común a todas las especies vivas y refleja diferentes intensidades y tipos de presiones selectivas ejercidas sobre la síntesis, localización y función de proteínas (17). Los análisis de la evolución de las proteínas proporcionan una herramienta única para investigar temas como la evolución de la especiación, la senescencia y el estilo de vida social (18,19); a su vez, facilitan la identificación de sitios funcionalmente importantes, por ejemplo para ser utilizados en el diseño de proteínas (20), péptidos que están involucrados en enfermedades genéticas humanas (21), dianas farmacológicas (22) o proteínas que interactúan entre sí para descubrir la especificidad de la interacción (23).

Ycas (24) y Jensen (9) propusieron que el metabolismo tal cual como se lo conoce actualmente evolucionó a partir de la duplicación de genes que codificaban enzimas primordiales de amplia especificidad (promiscuas), permitiendo así que la selección natural optimice

independientemente la especificidad, la eficiencia y la regulación de cada enzima (25). A partir de esto, varios estudios han profundizado el concepto mediante la caracterización de actividades promiscuas, la determinación de la base estructural y química de la promiscuidad, y el uso de enzimas promiscuas en la ingeniería de proteínas para examinar los mecanismos de evolución de las enzimas (26–31). Cuatro modelos sobre la evolución de enzimas se derivaron a partir de estas ideas (2). A su vez, se incorporó la transferencia horizontal de genes en estos modelos con el fin de explicar la evolución de la diversidad metabólica en los procariotas, donde esta transferencia constituye una fuerza evolutiva significativa (2). Estos cuatro modelos pretenden explicar la evolución de las nuevas funciones enzimáticas: neofuncionalización; subfuncionalización por duplicación, degeneración y complementación; subfuncionalización a través de la especialización o escape del conflicto adaptativo; e innovación-amplificación-divergencia (2). Para comprender completamente la evolución de las enzimas, también se debe describir la capacidad de las redes metabólicas para integrar estas nuevas actividades. Dentro de las redes metabólicas, algunos metabolitos son compartidos por múltiples vías, otros compuestos son subproductos de reacciones promiscuas y no se utilizan, algunas reacciones no están catalizadas, o enzimas promiscuas y de amplia especificidad pueden unir vías separadas. D'Ari y Casadesús crearon el término “*underground metabolism*” para referirse a la utilización de metabolitos endógenos por parte de las enzimas promiscuas. Así, las reacciones secundarias podrían contribuir a la evolución de las vías metabólicas al reemplazar antiguas rutas por otras alternativas, o al integrar subproductos no utilizados de enzimas promiscuas en las redes metabólicas (2,4). El reclutamiento de enzimas de amplia especificidad o promiscuas de diferentes vías metabólicas para reconfigurar o expandir las redes metabólicas se ha descrito como ensamblaje en mosaico (32–34).

La aparición y evolución de las rutas metabólicas representan pasos cruciales en la evolución molecular y celular. De hecho, el agotamiento del suministro prebiótico de aminoácidos y otros compuestos que pueden haber estado presentes en el entorno ancestral, ejerció una presión selectiva significativa a favor de las células heterótrofas que se volvieron capaces de sintetizar estas moléculas. Así, la aparición de rutas metabólicas permitió que los organismos primitivos fueran cada vez menos dependientes de compuestos orgánicos exógenos. El análisis comparativo de los genes y genomas de organismos pertenecientes a arqueas, bacterias y eucariotas sugiere que diferentes fuerzas y mecanismos moleculares podrían haber impulsado la aparición de nuevas capacidades metabólicas durante la evolución (35).

En este trabajo de Tesis, se intenta obtener una comprensión más amplia de la actividad de las enzimas estudiadas, las cuales fueron seleccionadas dado que ocupan posiciones evolutivas distintivas. Se busca explorar y comparar la relación entre las enzimas, según su origen, y con las propiedades de las proteínas equivalentes que se encuentran en otros organismos. Estos estudios sobre las relaciones de estructura a función de las proteínas y las relaciones regulatorias intentan comprender cambios evolutivos operados en las rutas de síntesis de carbohidratos de reserva en

organismos procariontes. Los carbohidratos no catalizan reacciones químicas complejas como lo hacen las proteínas, ni se replican como lo hacen los ácidos nucleicos. Sin embargo, el glucógeno, un hidrato de carbono de reserva, es una macromolécula con una función específica que se produce con gran precisión y se construye a partir de un gran número de copias de un sólo tipo (36).

## 1.2. HIDRATOS DE CARBONO

### 1.2.1. Conceptos generales

Los hidratos de carbono, carbohidratos, glúcidos o sacáridos (del griego: *sakcharon*, azúcar) son las moléculas biológicas más abundantes de la Tierra, compuestas por átomos de carbono, hidrógeno y oxígeno (37). Cada año la fotosíntesis convierte más de 100 mil millones de toneladas métricas de CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O en celulosa, almidón y otros carbohidratos. Algunos hidratos de carbono, como la Suc y el almidón, son los principales componentes en la dieta humana, y la oxidación de éstos es la principal vía de obtención de energía en la mayoría de las células no fotosintéticas (1).

Químicamente, los carbohidratos son polihidroxi-aldehídos o polihidroxicetonas, o sustancias que producen tales compuestos por hidrólisis. Estos se pueden presentar como distintos estereoisómeros, susceptibles de combinarse entre sí y/o con otros tipos de grupos funcionales, originando una gran variedad de compuestos. Muchos (pero no todos) de los carbohidratos tienen la fórmula empírica (CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>; algunos también contienen nitrógeno, fósforo o azufre (1). Esta riqueza combinatoria radica tanto en la diversidad de los monosacáridos como en los múltiples enlaces posibles que los mismos pueden formar entre sí (37). Debido a esta amplia combinación, los polisacáridos tienden a ser mucho más heterogéneos, tanto en tamaño como en composición, que otras moléculas biológicas (36).

Los carbohidratos, según su complejidad, se dividen en tres categorías principales: monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos. Los monosacáridos, o azúcares simples, consisten en una sola unidad de polihidroxialdehído o -cetona. A su vez, estos pueden clasificarse según el número de átomos de carbono en triosas, tetrasas, pentosas, hexosas o heptosas. El monosacárido más abundante en la naturaleza es el azúcar de seis carbonos, la D-glucosa (D-Glc) (1). Por otro lado, los oligosacáridos, consisten en cadenas cortas de unidades de monosacáridos (entre 3 y 9) unidos por enlaces característicos denominados enlaces glicosídicos, cuando un grupo hidroxilo de un monosacárido reacciona con el carbono anomérico del otro, o ambos carbonos anoméricos reaccionan entre sí. Entre ellos, los más abundantes son los disacáridos, compuestos por dos unidades de monosacáridos unidos por un enlace *o*-glicosídico. El disacárido más abundante es la Suc, la principal forma en que se transportan los carbohidratos en plantas. El nombre sistemático de la Suc,  $\alpha$ -D-glucopiranosil-1,2- $\beta$ -D-fructofuranósido, indica que los carbonos anoméricos de cada azúcar, C<sub>1</sub> de la Glc y C<sub>2</sub> de la Fru, participan en el enlace

glicosídico y, por lo tanto, la Suc no es un azúcar reductor (38). Por su parte, los polisacáridos contienen 20 o más unidades de monosacáridos; incluso, algunos tienen cientos o miles de unidades. Algunos de ellos, como la celulosa, contienen cadenas lineales; otros, como el glucógeno, están ramificados. Tanto la celulosa como el glucógeno consisten en unidades recurrentes de D-Glc, pero difieren en el tipo de enlace glucosídico y, en consecuencia, tienen propiedades y funciones biológicas sustancialmente diferentes (1).

Los monosacáridos son aldehídos o cetonas con dos o más grupos hidroxilo, constituidos por 3 a 7 carbonos. Dentro de los más importantes figuran la Glc y la Fru. A menudo, son sus derivados fosforilados los que intervienen en los pasos de síntesis y metabolismo. La fosforilación es la que mantiene dentro de la célula a un monosacárido y lo activa para posteriores transformaciones químicas mediadas por enzimas, haciendo más eficientes los procesos en los que intervienen estos azúcares-P. La Glc-1P, la Glc-6P y el 3-PGA son ejemplos de monosacáridos esenciales en el metabolismo celular (1,39). Cuando los monosacáridos no son necesarios para la célula en forma inmediata son convertidos en otros compuestos, frecuentemente en polisacáridos (37).

La mayoría de los carbohidratos que se encuentran en la naturaleza se presentan como polisacáridos, polímeros de alta masa molecular. Estos polisacáridos difieren entre sí por las unidades de monosacáridos que los componen, el largo de sus cadenas, el tipo de enlaces que los unen y también por el grado de ramificación. Según la homogeneidad del monosacárido constituyente, se los puede clasificar en homo o heteropolisacáridos (38). Se los denomina homopolisacáridos cuando se componen de un sólo tipo de residuos; mientras que cuando las unidades que lo componen son de más de un tipo se los denomina heteropolisacáridos. Los homopolisacáridos de D-Glc, denominados glucanos, son los polisacáridos más abundantes en la naturaleza, siendo el glucógeno, el almidón y la celulosa los cuantitativamente más importantes. A pesar de estar constituidos por las mismas unidades monosacáridas, los distintos enlaces glucosídicos que presentan determinan diferencias estructurales biológicamente importantes. El glucógeno y el almidón, con enlaces tipo  $\alpha$ -glucosídicos, adquieren una estructura tridimensional en forma de hélice. Esta conformación es muy útil para la función de almacenaje de carbono y energía que estos desempeñan. En cambio, los enlaces del tipo  $\beta$ -glucosídicos de la celulosa permiten formar cadenas lineales paralelas que interaccionan entre sí a través de puentes de hidrógeno. La celulosa es el principal componente estructural de las paredes celulares de las plantas y representa más de la mitad del carbono en la biosfera (se estima que cada año se sintetizan y degradan  $\sim 10^{15}$  kg de celulosa). Las plantas tienen paredes celulares rígidas que pueden soportar diferencias de presión osmótica entre los espacios extracelular e intracelular (38).

Los polisacáridos de almacenamiento de carbono y energía más importantes son el almidón, en las células vegetales, y el glucógeno, en bacterias, levaduras y células animales. En éstos los residuos de D-Glc están conectados a través de enlaces glucosídicos  $\alpha$ -1,4 y  $\alpha$ -1,6. Ambos

polisacáridos se encuentran intracelularmente como gránulos. Además, las moléculas de almidón y glucógeno están muy bien hidratadas, ya que contienen muchos grupos hidroxilos expuestos, disponibles para formar puentes de hidrogeno con el agua (1). Si bien tanto el glucógeno como el almidón son químicamente idénticos, las principales diferencias en sus propiedades fisicoquímicas están relacionadas con la organización molecular de las cadenas de glucano dentro de las moléculas (40). El almidón contiene dos tipos de polímeros de Glc, la amilosa y la amilopectina. La amilosa consta de cadenas largas no ramificadas de residuos de D-Glc, conectados por enlaces  $\alpha$ -1,4. La amilopectina posee también un alto peso molecular pero, a diferencia de la amilosa, está muy ramificada (1). En el almidón los puntos de ramificación se agrupan, en contraste con el glucógeno, lo que da como resultado cadenas de glucano lineales más largas que pueden formar dobles hélices y por ende el agua es excluida. La organización de las dobles hélices dentro de la amilopectina da como resultado principalmente a dos alomorfos cristalinos (tipos A y B) (41,42). Como consecuencia general, el glucógeno y el almidón difieren en su solubilidad en agua. El glucógeno es principalmente soluble en agua; por el contrario, el almidón consta de amilopectina semi cristalina, ramificada e insoluble en agua, y de amilosa casi lineal, la cual probablemente se intercala dentro de las regiones amorfas de la amilopectina (43,44).

### 1.2.2. Activación de la glucosa

La Glc, libre o combinada, es el compuesto orgánico más abundante de la naturaleza y es la fuente primaria de energía de las células mediante su oxidación catabólica en las vías glucolíticas (1), tanto en condiciones anaeróbicas, como aeróbicas. Las rutas glucolíticas, como la vía de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP o glucólisis clásica) o la vía de Entner-Doudoroff (ED), forman parte de las rutas metabólicas consideradas centrales, junto con el camino oxidativo de las pentosas-P y el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA). Las vías metabólicas centrales son responsables de la producción de energía biológica (ATP) y de los precursores metabólicos, que sirven como esqueletos carbonados para la biosíntesis de componentes esenciales de todas las células vivas (37). Esta serie de reacciones y sus variantes, se dan en todas las ramas del árbol filogenético que agrupa a los organismos vivos. Curiosamente, la glucólisis es una vía estructuralmente simple, que funciona independientemente del suministro de oxígeno, por lo cual se ajusta al entorno de los primeros organismos de la Tierra (39). La vía EMP fue la primera vía metabólica en ser completamente dilucidada y su estudio contribuyó al desarrollo experimental y conceptual de la bioquímica moderna (39). Dicha ruta metabólica se encuentra en casi todos los organismos y tiene la característica de poder funcionar en forma inversa y producir hexosas-P a partir de compuestos energéticos y de bajo peso molecular (ATP), en un proceso llamado gluconeogénesis. Es decir, son los mismos pasos enzimáticos de la vía glucolítica que funcionan en el sentido inverso, excepto por ciertos puntos de control que requieren enzimas accesorias (45).

Como se mencionó anteriormente, debido a su amplia distribución en diferentes organismos, se piensa que el origen de esta vía es anterior a la divergencia de los diferentes dominios de la vida (46). Incluso, algunos estudios sugieren que el papel original de la vía glucolítica en bacterias ancestrales era la gluconeogénesis, debido a que en las mismas la principal forma de degradación de azúcares ocurre por la vía de ED (46).

Los organismos autótrofos, como las plantas, sintetizan Glc a partir de compuestos inorgánicos como el agua y el CO<sub>2</sub> durante la fotosíntesis. En cambio, los organismos heterótrofos no pueden realizar este proceso, por lo que deben incorporar la Glc (u otros compuestos orgánicos) a partir de otros seres vivos. La Glc se puede sintetizar a partir de otros azúcares, como Fru o galactosa (Gal). Otra posibilidad es que sea producida a partir de la gluconeogénesis, donde varias moléculas (como el lactato, el oxaloacetato y el glicerol) pueden servir como precursores para su síntesis. Aunque las reacciones de la gluconeogénesis son las mismas en todos los organismos, su regulación y el contexto metabólico no sólo difieren entre los distintos organismos, sino también entre los diferentes tejidos (1,39).

Además de su papel fundamental en la vía glucolítica para la obtención de energía a través de su oxidación, la Glc también participa en otros procesos celulares claves: es el componente principal de polímeros estructuralmente importantes (como la celulosa) y de polímeros de almacenamiento de energía (como el almidón y el glucógeno) (1). También es clave para la síntesis de componentes de la pared celular que participan en las interacciones célula-célula y en el metabolismo de las glicoproteínas (39). Por lo tanto, la utilización de la Glc es una actividad metabólica central en los diferentes organismos, y la partición del azúcar hacia distintos destinos intracelulares determina la producción de compuestos con diferentes funciones celulares. En este proceso, la Glc-1P desempeña un papel esencial, siendo un metabolito presente en bajas concentraciones intracelulares. Además, actúa como sustrato para diversas nucleósido-difosfo-Glc pirofosforilasas (NDP-Glc PPasas), las cuales pueden canalizar el azúcar hacia distintas rutas metabólicas. En bacterias hay dos enzimas principales que, en este sentido, utilizan la Glc-1P: la UDP-Glc pirofosforilasa (UDP-Glc PPasa) y la ADP-Glc pirofosforilasa (ADP-Glc PPasa). De esta forma, el metabolito es incorporado a la producción de glucógeno, vía ADP-Glc, o a la producción de oligo- y polisacáridos estructurales, vía UDP-Glc (39).

Aunque los intermediarios en la glucólisis y la gluconeogénesis son los azúcares-P, muchas reacciones que convierten o polimerizan las hexosas involucran un tipo diferente de grupo activador: el nucleósido-difosfato al que se une el azúcar (NDP-azúcar). Los NDP-azúcares funcionan como dadores de azúcares activados y son los principales precursores de la síntesis de glicanos, ya que poseen enlaces de alta energía con un alto potencial de transferencia de grupo, que se utiliza para formar un enlace glicosídico (47). Los NDP-azúcares son los dadores de fracciones de carbohidratos en la síntesis de diversas moléculas, incluidos oligo- y polisacáridos, metabolitos secundarios glicosilados (como antibióticos), glicoproteínas y glicolípidos (47,48).

En bacterias, se han identificado alrededor de 70 NDP-azúcares diferentes. Se ha informado que la UDP-Glc es producida por casi todos los organismos (49), pero la ADP-Glc se limita a bacterias, algas verdes y plantas (50,51). Ambos están contruidos a partir de Glc-1P por las NDP-Glc PPasas correspondientes, dependiendo de la disponibilidad de carbono en la célula. Por lo tanto, la cantidad relativa de hexosa-P que sea dirigida a una ruta de NDP-azúcar particular dependerá de los requisitos celulares. Las señales reguladoras y la fluctuación en las concentraciones relativas de hexosas-P activan el flujo hacia la ADP-Glc PPasa, UDP-Glc PPasa u otras NDP-azúcar PPasas (52). Luis F. Leloir y sus colegas fueron los primeros en aislar y caracterizar la UDP-Glc a principios de la década de 1950. Posteriormente, se aislaron diversos NDP-azúcares de bacterias, levaduras y plantas; y a su vez, se identificaron algunas de las enzimas involucradas en su síntesis (47,53). El descubrimiento de los NDP-azúcares por Leloir resolvió el desafiante problema de dilucidar las rutas metabólicas para la síntesis de oligo- y polisacáridos en diferentes organismos (51). El trabajo pionero de Leloir en células de mamíferos demostró de manera concluyente que el catabolismo y el anabolismo del glucógeno implican reacciones distintas (51), lo cual le valió el Premio Nobel en Química del año 1970 (53,54).

### **1.2.3. Las moléculas de UDP-Glc y ADP-Glc**

La molécula de UDP-Glc se usa comúnmente en todos los organismos como precursor para la interconversión entre diferentes azúcares, así como para las reacciones de transferencia de grupos glucosilos durante la formación de oligo- y polisacáridos, y glicoconjugados (55). Es por esto que este compuesto tiene un papel fundamental en el metabolismo de los carbohidratos y en la fisiología celular (56). En eucariotas, la UDP-Glc es un sustrato para diferentes glicosiltransferasas y actúa como dador glucosilo en la síntesis de polisacáridos de reserva como el glucógeno, en animales y levaduras, y de polisacáridos estructurales como la celulosa, en plantas y algunas bacterias. A su vez, también es utilizada para la síntesis de glicanos en glicolípidos y glicoproteínas, y de los disacáridos Tre y Suc (57–59). También posee un rol importante en la interconversión de Gal a Glc a través de la vía de Leloir (60–62), en la regulación de la fuerza osmótica en el citoplasma y en la formación de flagelos (58,63,64). En bacterias, la UDP-Glc participa en la biosíntesis de lipopolisacáridos, polisacáridos estructurales y capsulares, y oligosacáridos derivados de membrana (52,59,65,66). Además, otros NDP-azúcares, como la UDP-xilosa, el UDP-glucuronato y la UDP-Gal derivan de la UDP-Glc (67). En procariontes, algunos de estos azúcares activados se utilizan para construir la cápsula bacteriana, compuesta por polisacáridos, que a menudo representa factores importantes para la virulencia (59).

Originalmente, se informó que la incorporación de Glc al  $\alpha$ -poliglucano para la síntesis de almidón a partir de extractos de plantas utilizaba UDP-Glc como sustrato (53,68), pero estudios posteriores sobre la especificidad de NDP-azúcares demostraron que la ADP-Glc es un mejor sustrato para la biosíntesis que ocurre en plantas vasculares (69). Luego, se identificó por primera

vez una enzima involucrada en la síntesis de ADP-Glc, la ADP-Glc PPasa (70), consistente con el posterior aislamiento del metabolito a partir de extractos de maíz (71). Hoy en día, se conoce que para la síntesis de almidón en organismos fotosintéticos (algas verdes y plantas vasculares) y de glucógeno en bacterias (incluidas las cianobacterias), se utiliza como dador del grupo glucosilo a la ADP-Glc (50,51,72).

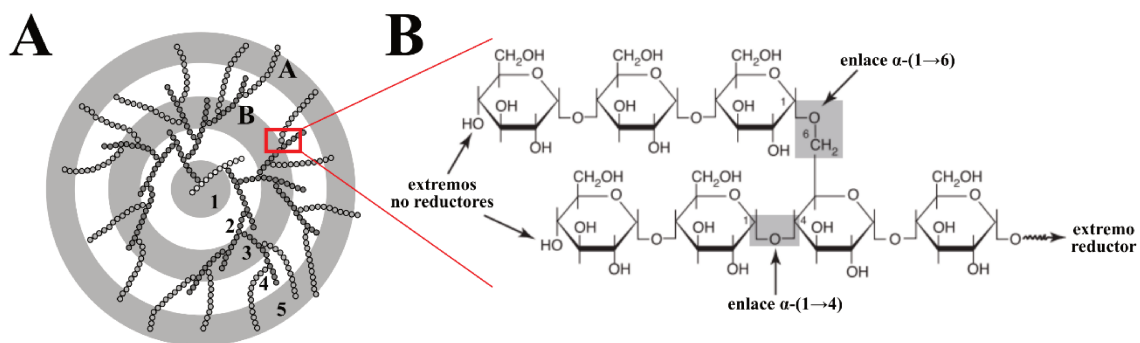
### 1.3. GLUCÓGENO: SU ESTRUCTURA Y FUNCIÓN

El glucógeno, un polímero ramificado de Glc, actúa como una molécula osmóticamente compatible para almacenar reservas del monosacárido en las células durante períodos de abundancia nutricional, para su posterior utilización cuando sea necesario (73). Dicho polisacárido está presente en una amplia gama de organismos, desde bacterias y arqueas hasta diferentes eucariotas heterótrofos, incluyendo al ser humano (73,74). Por su parte, las plantas sintetizan polímeros de reserva de Glc en forma de almidón, como se mencionó anteriormente. De esta manera, la polimerización de la Glc puede considerarse como un mecanismo universal para el almacenamiento de carbono y energía en la naturaleza. Esta idea se encuentra reforzada por la conservación de la estructura del glucógeno, que se mantiene desde bacterias hasta mamíferos, pasando incluso por las levaduras. Desde el descubrimiento del glucógeno por parte de Claude Bernard en el siglo XIX, quedó claro que se trataba de un metabolito para almacenar Glc y, por lo tanto, debía consistir principalmente en moléculas de Glc unidas entre sí. Sin embargo, la estructura de la Glc permite muchas formas diferentes de unir moléculas para formar polímeros (36). A su vez, el glucógeno tiene una estructura optimizada para su función metabólica ya que resulta accesible tanto para la incorporación de moléculas de Glc, como para la liberación de las que se encuentran almacenadas, en fases de síntesis y degradación, respectivamente (75). Esta relación estructura-función prácticamente óptima ha llevado a definir al glucógeno como la “molécula perfecta” (36).

Debido a los enlaces 1→4 y 1→6 presente en el glucógeno, se puede apreciar que el carbono 1 se utiliza en cada enlace. Por ende, dentro de la estructura del glucógeno hay un gran número de arreglos lineales de varias unidades de Glc conectadas por enlaces  $\alpha$ -1→4, que se dividen en dos tipos, llamados cadenas A y cadenas B. Estas últimas son ramificadas y sus ramas son producidas por enlaces  $\alpha$ -1→6, cada uno de los cuales forma el comienzo de una cadena A; mientras que las de tipo A no están ramificadas (Figura 1) (36). De acuerdo con el modelo actualmente aceptado, las ramas de las cadenas B se distribuyen uniformemente, con dos ramas por cadena B, lo que genera más cadenas A que B. La partícula se considera esférica y está organizada en 12 niveles concéntricos, con cada cadena A ubicada en el nivel más externo. Este patrón de ramificación permite el crecimiento esférico de la partícula, que conduce a una estructura progresivamente más empaquetada hacia la periferia. La adición de un nivel 13 en la partícula de glucógeno no dejaría el espacio necesario para que las enzimas procesen el polisacárido (36,76,77). Por lo tanto, el

tamaño y la densidad de la partícula del mismo son autolimitados. Entonces, una partícula de glucógeno de tamaño completo contiene ~55.000 unidades de Glc distribuidas en 12 niveles, alcanzando un diámetro de ~44 nm con una masa molecular estimada de  $\sim 10^7$  Da. La estructura que se genera es una molécula esférica de tamaño reducido altamente soluble en agua (36,73,75,76,78).

El glucógeno aislado de fuentes biológicas existe como una población de moléculas de diferentes tamaños. En la mayoría de las bacterias, la longitud promedio de las cadenas es de 8 a 12 unidades de Glc y se ha estimado que el tamaño molecular del poliglucano es de aproximadamente  $10^7$  a  $10^8$  Da. Aunque hay algunas excepciones, como el caso del género *Bacillus*, donde se encontró que la longitud promedio de la cadena del glucano es de 21 residuos de Glc, lo que indica que tiene propiedades intermedias entre la amilopectina y el glucógeno de hígado de conejo (79). En organismos eucariotas, el polímero tiene una longitud de 12 a 14 residuos (73,80).



**Figura 1:** Estructura del glucógeno. (A) Esquema de la macromolécula de glucógeno, donde se observan los tipos de cadena de unidades de Glc: A y B; (B) Molécula donde se muestran los enlaces  $\alpha$ -(1→4) y  $\alpha$ -(1→6)-glucosídicos.

La estructura del polisacárido tuvo que ser optimizada muy temprano en la historia de los organismos y de la evolución de las vías metabólicas ya que, mientras el poliglucano es prácticamente igual en todos los organismos, las enzimas involucradas en su metabolismo, tanto en la síntesis como en la degradación, experimentaron modificaciones evolutivas, mostrando marcadas diferencias en los aspectos cinéticos, regulatorios y estructurales. Esto implica que la estructura funcional óptima del polímero se conserva independientemente del contexto metabólico diferente de cada célula (81). Muchos organismos acumulan carbono y reservas de energía para hacerle frente a condiciones temporarias de inanición presentes en el ambiente. Las ventajas en el uso de polisacáridos como compuestos de reserva son sus propiedades físicas y su masa molecular elevada, las cuales minimizan el efecto de la acumulación sobre la presión osmótica intracelular (50).

### 1.3.1. El rol del glucógeno en bacterias

Se ha descrito la presencia de glucógeno en numerosas especies bacterianas, incluyendo Gram-negativas, Gram-positivas, arqueobacterias y bacterias fotosintéticas, como una población de partículas citoplasmáticas intracelulares discretas, en su mayoría esféricas, de tamaños variables de 20 a 50 nm (73,82–84). En general, el polisacárido se acumula cuando existe un exceso de carbono en el medio, es decir, cuando el crecimiento se ve limitado por falta de algún otro nutriente distinto del carbono. La concentración de este poliglucano dentro de la célula depende del contenido de nutrientes en el medio, así como de la fase de crecimiento en que se encuentre el organismo (85). Aunque en mamíferos el glucógeno funciona como una molécula de almacenamiento que permite el suministro y regulación de los niveles de Glc en la sangre y en el tejido muscular para proporcionar ATP a través de la glucólisis (1), el rol preciso del polisacárido en bacterias no está completamente esclarecido. Experimentos bioquímicos en diferentes microorganismos han demostrado que la acumulación y degradación del glucógeno tiene un papel clave en la biología de los procariontes. Esta función tiene implicancias en la supervivencia frente a condiciones de reducción de la fuente de carbono y energía; además, proporcionaría ventajas de adaptación bajo ciertos tipos de estrés o participaría en procesos de diferenciación celular (50,80,85). Se ha establecido la importancia del polisacárido en situaciones fisiológicas específicas de diversos microorganismos. Por ejemplo, en varios patógenos importantes como *E. coli* (86), *Salmonella enteritidis* (87), *Mycobacterium tuberculosis* (88) y *Vibrio cholerae* (89), la acumulación de glucógeno está asociada con la colonización y/o la patogenicidad (90). Por otra parte, varios estudios respaldan el rol del glucógeno en las interacciones huésped-patógeno (91). Sin embargo, la función principal del mismo en las bacterias es almacenar energía, lo cual ha sido demostrado ya que promueve la supervivencia ambiental bacteriana en condiciones de inanición (92). A su vez, la acumulación de glucógeno también facilita la viabilidad bacteriana en condiciones de estrés abiótico, como baja temperatura, desecación y presión osmótica (93–95). Un estudio sobre *V. cholerae* demostró que la acumulación de glucógeno intracelular facilita la persistencia en el medio y la transmisión de *V. cholerae* entre el medio acuático y los huéspedes. Mientras tanto, este patógeno rico en glucógeno es más virulento que sus especies deficientes en el mismo (89). Por lo tanto, el glucógeno como reserva energética también puede contribuir a la evolución de la virulencia bacteriana. En *Streptococcus mutans*, la acumulación del polisacárido, conocido como IPS (de las siglas en inglés “*internal polysaccharide*”), cumple la función de factor de virulencia, ya que la capacidad de producir caries depende directamente de la acumulación del mismo (96,97).

Los gránulos de glucógeno se acumulan en la mayoría de las bacterias principalmente durante la fase estacionaria, cuando hay un exceso de fuente de carbono y en condiciones ambientales de crecimiento lento o nulo (74,98,99). Sin embargo, en *M. tuberculosis* y *Mycobacterium*

*smegmatis*, la acumulación del mismo fue atribuida al crecimiento en medios con nitrógeno limitante durante la fase post-exponencial, sugiriendo que el polisacárido podría ser relevante para la viabilidad de las micobacterias luego de períodos de hipobiosis (100–102). A su vez, en *M. tuberculosis* la producción de glucógeno es un requisito fisiológico esencial del bacilo tuberculoso (88). Por otro lado, otras especies bacterianas incapaces de sintetizar glucógeno debido a la falta de enzimas biosintéticas clave pueden propagarse, lo que sugiere que el polisacárido no es necesario para el crecimiento en estas bacterias (103,104). Sin embargo, se observó una tasa de supervivencia más prolongada en células que acumulan polisacáridos en comparación con mutantes sin glucógeno (89,92,105). Estos resultados sugieren que, en ausencia de una fuente de carbono, el glucógeno se puede utilizar para mantener la integridad celular, proporcionando la energía que necesitan las bacterias para su mantenimiento (106). En bacterias como *Bacillus subtilis* y *Streptomyces coelicolor*, la síntesis de glucógeno se ha asociado con la esporulación y el suministro de los recursos necesarios para impulsar la diferenciación (107–109).

### 1.3.2. Enzimas involucradas en la síntesis de glucógeno

El metabolismo del glucógeno ha sido estudiado en una variedad de bacterias y se ha demostrado que constituye una red sofisticada de interacciones y regulación que involucra distintos genes y vías (74). La ruta metabólica para la síntesis de este poliglucano se estableció tras el descubrimiento de los NDP-azúcares por Luis F. Leloir en la década de 1950 (53). Como se mencionó más arriba, la investigación realizada por Leloir y sus colegas determinó que la síntesis y degradación del glucógeno se produce a través de dos vías distintas, donde su formación requiere la síntesis de una unidad de Glc “activada”, que se trata de UDP-Glc en células de mamíferos, hongos y organismos heterotróficos eucariotas, y de ADP-Glc en bacterias y eucariotas fotosintéticos (50,51,110).

Entre los genes involucrados en el metabolismo del glucógeno se encuentran *glgC*, que codifica la ADP-Glc PPasa (EC 2.7.7.27); *glgA*, responsable de codificar la glucógeno sintasa (GSasa, EC 2.4.1.21); *glgB*, que codifica para la enzima ramificante del glucógeno (GlgB, EC 2.4.1.18.); *glgP*, el cual codifica para la glucógeno fosforilasa (GlgP, EC 2.4.1.1); y *glgX*, que codifica una enzima desramificante del glucógeno (GlgX, EC 3.2.1.33) (111). En particular, la ADP-Glc PPasa, la GSasa y la GlgB son responsables de la biosíntesis del glucógeno, mientras que la GlgP y la GlgX contribuyen a la degradación del mismo (99).

La vía clásica de síntesis de glucógeno bacteriano (conocida como GlgCA), se produce mediante la utilización del dador glucosídico ADP-Glc para elongar la cadena glucosídica  $\alpha$ -1,4 en un único residuo glucosídico, y consta de una secuencia de tres reacciones (50,110):

- i.  $ATP + \alpha\text{-D-Glc-1P} \rightarrow ADP\text{-Glc} + PPi$
- ii.  $ADP\text{-Glc} + (\alpha\text{-1,4-glucano})_n \leftrightarrow (\alpha\text{-1,4-glucano})_{n+1} + ADP$
- iii.  $(\alpha\text{-1,4-glucano})_{\text{lineal}} \leftrightarrow (\alpha\text{-1,4-glucano})_{\alpha\text{-1,6 ramificado}}$

La primera reacción es catalizada por la ADP-Glc PPasa. En una segunda reacción se produce la transferencia del residuo de Glc activado a un polímero de  $\alpha$ -1,4 preformado, para alargar el polímero en una unidad por el extremo no reductor, reacción que es llevada a cabo por la GSasa. En un último paso, la enzima ramificante GlgB es responsable de la formación de las uniones  $\alpha$ -1,6 glucosídicas. En procariotas, algas verdes y plantas, la vía biosintética es modulada en la etapa de formación del dador glucosídico, es decir, en la reacción catalizada por la ADP-Glc PPasa. La reacción de esta última se lleva a cabo en presencia de  $Mg^{2+}$  y es reversible *in vitro*. Sin embargo, *in vivo* resulta prácticamente irreversible debido tanto a la utilización del NDP-azúcar en la síntesis del poliglucano como por la hidrólisis del PPi por la pirofosfatasa inorgánica (50,51,82,99,110). De esta forma, se observa un enclave evolutivo importante respecto al camino específico por el cual la Glc-1P es derivada hacia la biosíntesis de oligo- y polisacáridos estructurales o los  $\alpha$ -1,4-glucanos de reserva.

Recientemente, se ha establecido una nueva ruta de síntesis de glucógeno a partir de Tre, en donde el primer paso consta de la conversión de Tre a maltosa por la enzima trehalosa sintasa (TreS, EC 5.4.99.16), la cual es posteriormente activada a maltosa-1P (Mal-1P) por la maltoquinasa (MalK, EC 2.7.1.175) (112–115). El paso siguiente es catalizado por la  $\alpha$ -1,4-glucano:maltosa-1P maltosiltransferasa (GlgE, EC 2.4.99.16) que transfiere un residuo maltosilo a un glucano en crecimiento (112). El último paso de esta ruta es catalizado por la enzima ramificante, GlgB, la cual es compartida con la vía clásica (GlgCA) de síntesis del polisacárido (116,117).

Aún más recientemente, se ha reportado la actividad de la enzima micobacteriana GlgM (EC 2.4.1.342), la cual cataliza la síntesis de Mal-1P. En esta reacción, la Glc-1P es el aceptor de un residuo glucosídico aportado por la ADP-Glc (112). Además, la enzima ha sido cristalizada, sentando las bases para un mejor entendimiento de su relación estructura a función (118). Anteriormente, a GlgM se la referenciaba como GlgA debido a encontrarse en el operón *glg* de estas actinobacterias y poseer un alto grado de identidad, según las predicciones, con glucógeno sintasas “canónicas” caracterizadas. GlgM es miembro de la familia GT4 y no GT5, como lo son las GSasas bacterianas caracterizadas hasta el momento (118). Incluso, las “GlgA” de *M. tuberculosis* y *S. coelicolor* habían sido caracterizadas en nuestro grupo respecto a su capacidad de elongar glucógeno (119,120), aunque la actividad con el glucano como aceptor es entre dos a tres órdenes de magnitud menor respecto a la transferencia de Glc a partir de ADP-Glc a Glc-1P (121). Consecuentemente, se especula que la síntesis de glucógeno en bacterias capaces de producir Mal-1P se daría a partir de la actividad de GlgE en lugar de utilizar la ruta clásica GlgAC (116,117). De todas formas, hay que destacar el solapamiento del producto de las actividades de MalK y GlgM para la síntesis de Mal-1P y que, al momento de esta presentación, se desconocen mecanismos regulatorios que operen entre MalK, GlgM y GlgE. Un análisis *in silico* muestra que los genes pertenecientes a las rutas alternativas de la síntesis de glucógeno

(TreS-GlgE y/o GlgM-GlgE) se encontrarían también en bacterias Gram-negativas, incluyendo numerosas  $\alpha$ -proteobacterias (como *Rhizobium*, *Rhodobacter*, *Agrobacterium*),  $\beta$ -proteobacterias (*Burkholderia*, *Bordetella*) y algunas especies de  $\gamma$ - y  $\delta$ -proteobacterias (113). Dada la relativamente reciente descripción de esta vía, es poco lo que se conoce respecto a la regulación de las enzimas que forman parte de la misma y la interconexión con otras ramas del metabolismo. GlgE ha sido propuesta como blanco para drogas antituberculosas, ya que su inhibición produce una acumulación letal de Mal-1P (122). Recientemente, GlgE se ha caracterizado bioquímicamente en *Chlamydia* (123), mientras que, en análisis transcriptómicos, se ha observado que GlgE se sobreexpresa en *Xanthomonas campestris* infectando plantas como respuesta a glucosinolatos, aumentando la producción de exo-polisacáridos (124).

El metabolismo del glucógeno se completa con las enzimas responsables de la degradación del poliglucano. La GlgP libera Glc-1P a partir de los extremos no reductores de las cadenas del glucógeno en presencia de Pi, aunque no puede romper las ramificaciones  $\alpha$ -1,6, lo que se conoce como “dextrina límite”. El otro paso catalítico responsable de la degradación del polímero se da por la enzima desramificante GlgX, de la clase de las isoamilasas, la cual es específica por las cadenas del polisacárido previamente degradadas por la GlgP. En bacterias, la GlgX transfiere cuatro residuos de Glc de la ramificación a una cadena lineal  $\alpha$ -1,4 para que la GlgP pueda continuar funcionando (99).

### 1.3.3. Características generales de las NDP-azúcar PPasas

La biosíntesis de los glicósidos suele comenzar con un derivado químico de la condensación de la Glc-1P (u otro azúcar-1P) y un nucleósido fosfato (a partir de su respectivo nucleósido trifosfato, NTP). Esta reacción, que suele depender de metales divalentes, está catalizada por una NDP-azúcar PPasa y procede con la pérdida simultánea de P<sub>Pi</sub> (125). Se han resuelto las estructuras tridimensionales de muchas de estas enzimas, incluidas timidililtransferasas (EC 2.7.7.24, (126–128)); uridililtransferasas (UDP-Glc PPasas, EC 2.7.7.9, (64,129,130)); UDP-N-acetil-glucosamina pirofosforilasas (UDP-GlcNAc PPasas, EC 2.7.7.23, (131–133)); citidililtransferasas (CDP-Glc PPasas, EC 2.7.7.33, (134,135)); guanililtransferasa (EC 2.7.7.22, (136)) y ADP-Glc PPasas (137–140).

Aún con una gran diversidad a nivel de estructura primaria (miembros de la familia con identidad de secuencia relativamente baja) y cuaternaria (se han descrito conformaciones mono-, di-, tetra-, hexa- y octaméricas), las nucleotidiltransferasas comparten características estructurales comunes, ya que poseen un dominio catalítico N-terminal conservado y exhiben un plegamiento del tipo GT-A, el cual consiste en una estructura de tipo Rossmann (125). En cambio, el dominio C-terminal presenta variaciones significativas. En algunas enzimas, este dominio C-terminal tiene una segunda actividad enzimática además de la actividad de nucleotidiltransferasa (141,142). A su vez, el dominio C-terminal también puede regular la actividad de la PPasa al mediar la

oligomerización enzimática (143) y/o al unirse a reguladores alostéricos (137,144). Por lo general, el sitio activo se encuentra en una hendidura profunda formada por una lámina  $\beta$  central y dos hélices  $\alpha$  (51,125). Dentro de este sitio activo, se encuentran residuos conservados entre las enzimas de la familia que interactúan de manera similar con sus respectivos sustratos (56,135–137). En general, utilizan como cofactor esencial un metal divalente,  $Mg^{2+}$ , el cual es requerido para llevar a cabo la catálisis. Se ha postulado que el catión juega un papel en la estabilización del estado de transición/orientación y activación del grupo PPi saliente durante la reacción (128,145).

#### **1.3.4. Regulación, estructura y propiedades de la ADP-Glc PPasa**

La ADP-Glc PPasa cataliza la síntesis del ADP-Glc, constituyendo el primer paso y el limitante de la velocidad de las vías de síntesis de glucógeno en bacterias y de almidón en plantas. La enzima está sujeta a la regulación alostérica por intermediarios claves del camino principal de asimilación y distribución del carbono en el respectivo organismo (50,51,99,110). Así, por ejemplo, la ADP-Glc PPasa de *E. coli* se activa principalmente por el metabolito clave de la vía de EMP, la Fru-1,6-P<sub>2</sub>. A su vez, la Fru-6P y el Pyr son los principales activadores de la enzima de *Agrobacterium tumefaciens*, en donde la principal vía glucolítica es la de ED (Tabla 1) (146–150). De manera similar, las ADP-Glc PPasas de organismos que realizan fotosíntesis oxigénica, como cianobacterias, algas verdes y plantas vasculares, tienen al 3-PGA y al Pi como principales activador e inhibidor, respectivamente (51,110,151–153). Globalmente, el análisis racional de las propiedades regulatorias de la ADP-Glc PPasa, sumado al hecho de que el ATP es uno de sus sustratos, indica que la síntesis de polisacáridos de reserva en bacterias y plantas es máxima cuando hay un exceso de carbono y/o energía en la célula, y viceversa. Este contexto está de acuerdo con los mecanismos generales de regulación del metabolismo celular, de forma que una ruta metabólica está regulada en su etapa inicial específica, generalmente irreversible (1,50). Teniendo en cuenta la especificidad para los activadores e inhibidores, se han propuesto nueve clases diferentes para agrupar a las ADP-Glc PPasas (Tabla 1) (50,110).

**Tabla 1:** Relaciones entre el metabolismo del carbono y las propiedades regulatorias y estructurales de las ADP-Glc PPasas de diferentes organismos

Organismo	Utilización principal del carbono	Clase	ADP-Glc PPasa		Estructura cuaternaria
			Regulador Allostérico Activador	Inhibidor	
<b>Procariontes: acumulan glucógeno</b>					
<i>E. coli</i> <i>Salmonella entérica</i>		I	Fru-1,6-P <sub>2</sub>	AMP	Homotetrámero ( $\alpha_4$ )
<i>Aeromonas fornicans</i> <i>M. smegmatis</i>	Vía de EMP (glucólisis)	II	Fru-1,6-P <sub>2</sub> , Fru-6P	AMP, ADP	
<i>Serratia marcescens</i> <i>Enterobacter hafniae</i>		III	-	AMP	
<i>A. tumefaciens</i> <i>Rhodobacter capsulata</i>	Vía de ED	IV	Pyr, Fru-6P	AMP, ADP	Homotetrámero ( $\alpha_4$ )
<i>Rhodobacter gelatinosa</i> <i>Rhodobacter sphaeroides</i> <i>Rhodocyclus purpureus</i>	Glucólisis y vía de ED	V	Pyr, Fru-6P, Fru-1,6-P <sub>2</sub>	AMP, Pi	Homotetrámero ( $\alpha_4$ )
<i>Rhodospirillum rubrum</i> <i>Rhodospirillum tenue</i>	Ciclos de TCA y TCA reductivo	VI	Pyr	-	
<i>B. subtilis</i> <i>Geobacillus stearothermophilus</i>	Ciclo de TCA durante la esporulación	VII	-	-	Heterotetrámero ( $\alpha_2\delta_2$ )
<b>Cianobacterias</b>					
<i>Synechococcus</i> PCC6301 <i>Synechocystis</i> PCC6803 <i>Anabaena</i> PCC7120	Fijan CO <sub>2</sub> a través del ciclo de Calvin	VIII	3-PGA	Pi	Homotetrámero ( $\alpha_4$ )
<b>Eucariotas: acumulan almidón</b>					
<b>Algas verdes</b>					
<i>Chlorella fusca</i> <i>Chlorella vulgaris</i> <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Fijan CO <sub>2</sub> a través del ciclo de Calvin	VIII	3-PGA	Pi	Heterotetrámero ( $\alpha_2\beta_2$ )
<b>Plantas vasculares</b>					
<b>Tejidos fotosintéticos</b>					
Hojas de espinaca, trigo, <i>Arabidopsis</i> , maíz, arroz	Fijan CO <sub>2</sub> a través del ciclo de Calvin	VIII	3-PGA	Pi	Heterotetrámero ( $\alpha_2\beta_2$ )
<b>Tejidos no fotosintéticos</b>					
Tubérculo de papa	Metabolizan la Suc importada de los tejidos fotosintéticos	VIII	3-PGA	Pi	Heterotetrámero ( $\alpha_2\beta_2$ )
Endosperma de maíz, cebada y trigo		IX	Ninguno directamente, 3-PGA y Fru6-P revierten inhibición	Pi, ADP, Fru-1,6-P <sub>2</sub>	Heterotetrámero ( $\alpha_2\beta_2$ )

Como se presenta en la Tabla 1, las clases I, II y III incluyen bacterias que realizan la glucólisis clásica (a través de la vía EMP) y que poseen ADP-Glc PPasas reguladas por metabolitos intermediarios de esta vía de oxidación de Glc. En la clase I se encuentran las enzimas bacterianas intestinales, que son activadas por Fru-1,6-P<sub>2</sub> e inhibidas por AMP. Las ADP-Glc PPasas activadas por Fru-1,6-P<sub>2</sub> y Fru-6P, e inhibidas por AMP y ADP están agrupadas

en la clase II. La clase III representa una variante, ya que las enzimas agrupadas aquí son insensibles a los activadores y sólo las inhibe el AMP. Otro caso son los organismos que utilizan principalmente la vía ED (clase IV), cuya ADP-Glc PPasa es activada por Fru-6P y Pyr, mientras que el AMP, ADP y Pi son sus inhibidores. Los organismos que utilizan tanto la glucólisis clásica como la vía ED (clase V) tienen tres activadores principales (Fru-1,6-P<sub>2</sub>, Fru-6P y Pyr) (50). La clase VI incluye ADP-Glc PPasas de bacterias anaerobias, capaces de crecer en condiciones heterotróficas en la oscuridad o ser autótrofas en la luz realizando fotosíntesis anóxica. Estos microorganismos no pueden metabolizar Glc, pero utilizan Pyr y los intermediarios del TCA como fuentes de carbono y equivalentes de reducción. Por lo tanto, las enzimas son específicamente activadas por Pyr (Tabla 1).

El grupo de ADP-Glc PPasas de cianobacterias, procariotas que llevan a cabo la fotosíntesis oxigénica, se clasifica en la clase VIII junto con las algas verdes y las plantas vasculares, debido a que comparten propiedades regulatorias. Estas enzimas tienen al 3-PGA y al Pi como principal activador e inhibidor, respectivamente (Tabla 1); aunque también exhiben una sensibilidad significativa a la activación por hexosas-P (Fru-1,6-P<sub>2</sub>, Glc-6P y Fru-6P) (154–156). Tanto el 3-PGA como el Pi juegan un papel central en la asimilación de carbono y energía en los organismos que realizan fotosíntesis oxigénica, dado que el 3-PGA es el primer producto de la fijación de CO<sub>2</sub> por el ciclo de Calvin-Benson, mientras que el Pi es el sustrato para la síntesis de ATP por fotofosforilación (50,51,110). Se ha evidenciado que la actividad enzimática vegetal está finamente modulada por la relación entre 3-PGA y Pi. Los estudios cinéticos realizados con ADP-Glc PPasas de cianobacterias en condiciones de *crowding* molecular (imitando el entorno intracelular) señalaron que la interacción entre los efectores alostéricos conduce a un comportamiento ultrasensible, es decir, pequeños cambios en el rango del estímulo inducen una respuesta amplificada. Con estas características, se han identificado cuatro patrones regulatorios distintos por parte de los efectores alostéricos sobre estas enzimas de clase VIII (51,110). Respecto a las ADP-Glc PPasas de tejidos no fotosintéticos de plantas, se distinguen dos tipos: un caso es la enzima de tubérculo de papa (clase VIII), la cual es activada por 3-PGA e inhibida por Pi. En cambio, la clase IX comprende ADP-Glc PPasas de endosperma de maíz, cebada y trigo; las mismas son insensibles al 3-PGA (en ausencia de otros efectores) e inhibidas por Pi, ADP y Fru-1,6-P<sub>2</sub>. Tal inhibición puede ser revertida por el 3-PGA y la Fru-6P (Tabla 1) (50,110).

En cuanto a las propiedades de regulación alostérica, la Tabla 1 muestra una notoria excepción, dada por la ADP-Glc PPasa de *G. stearothermophilus* que, al ser caracterizada, se encontró que la misma es insensible a efectores alostéricos (157). En nuestro grupo de trabajo, se avanzó en la caracterización de ADP-Glc PPasas heteroméricas pertenecientes a otros grupos dentro de los Firmicutes. Se estudió la enzima de *S. mutans*, una bacteria perteneciente al grupo de los Lactobacillales dentro de los Firmicutes (96). La ADP-Glc PPasa de este organismo también está codificada por dos genes, por lo que es heterotetramérica, pero difiere de la de

*G. stearothermophilus*. En primer lugar, la enzima de *S. mutans* es sensible a la regulación alostérica y, en segundo lugar, la subunidad GlgD es importante en el comportamiento general de la enzima (96). Recientemente, en nuestro grupo de trabajo también se caracterizó la ADP-Glc PPasa de *Ruminococcus albus*, bacteria perteneciente al grupo de los Clostridiales, el tercer gran grupo de los Firmicutes (158). Se demostró que las formas homo- y heterotetramérica de la ADP-Glc PPasa de *R. albus* presenta propiedades distintivas respecto a la enzima de *G. stearothermophilus* y *S. mutans* (96,157,158). Como se mencionó anteriormente, la ADP-Glc PPasa se regula de forma alostérica, y los estudios sobre la enzima de *R. albus* confirman esto, ya que la misma se regula alostéricamente por metabolitos pertenecientes a la vía glucolítica de EMP (158). A su vez, la regulación de esta enzima depende de la conformación estructural adoptada, destacando el rol modulador central de GlgD en la actividad y regulación de esta enzima heteromérica (158). Estas enzimas se han agrupado en el grupo VII de la clasificación presentada (Tabla 1) (50,110).

Al momento de la clasificación de las ADP-Glc PPasas presentadas en la Tabla 1, los ejemplos con la enzima procedente de bacterias Gram-positivas eran escasos y se limitaban a la excepción de la enzima de *G. stearothermophilus* (50). Dentro de los Gram-positivos, el *phylum* Actinobacteria contiene aquellos organismos con alto contenido de GC en su genoma. En estas bacterias se encontró que diferentes glicanos son decisivos para la diferenciación celular y para proporcionar los esqueletos de carbono necesarios para la síntesis de antibióticos. Se ha establecido que el metabolismo de la Tre y el glucógeno tienen una interacción compleja con la diferenciación y que las hexosas-P son metabolitos críticos para el metabolismo secundario en *S. coelicolor* (120,159). En nuestro grupo, se identificaron propiedades específicas con respecto a la regulación de la vía clásica de síntesis de glucógeno en bacterias Gram-positivas (96,119,120,160). Característicamente, la Glc-6P es el principal activador de las ADP-Glc PPasas de actinobacterias, mientras que el NADPH es un inhibidor crítico de esta enzima (119,120,160). Además, se demostró que las enzimas de *Rhodococcus jostii* y *S. coelicolor* presentan cierta promiscuidad regulatoria, siendo activadas por Glc-6P, Fru-6P, Man-6P, ribosa-5P y PEP (120,160,161). Curiosamente, la ADP-Glc PPasa de *M. tuberculosis*, un organismo filogenéticamente relacionado a los antes mencionados, no presenta tal diversidad de efectores (119). En estos organismos, la oxidación de la Glc-6P se produce principalmente a través de la vía EMP y la vía oxidativa de las pentosas-P, dejando disponible para la célula ATP o NADPH, así como intermediarios útiles para la biosíntesis de metabolitos secundarios (162–164). Por lo tanto, una observación de la activación de la ADP-Glc PPasa por los efectores antes mencionados, concuerda con el hecho de que la síntesis de glucógeno se mantiene cuando los niveles altos de intermediarios respaldan el funcionamiento de las vías oxidativas, proporcionando ATP y NADPH para el anabolismo. Por su parte, la inhibición observada en la enzima de *S. coelicolor* por NADPH podría interpretarse como un mecanismo para dirigir los esqueletos de carbono

principalmente para sintetizar antibióticos, en lugar de acumular glucógeno, cuando el poder reductor está disponible (120). Estas propiedades regulatorias, distintivas respecto a las demás ADP-Glc PPasas, no se encuentran agrupadas en una clase particular de la Tabla 1.

Además, la Tabla 1 detalla la relación entre las ADP-Glc PPasas y las estructuras cuaternarias en diferentes tipos de organismos. La ADP-Glc PPasa se ha purificado a partir de *E. coli* (165–167) y *Salmonella typhimurium* (168,169), y tiene una estructura cuaternaria homotetramérica con subunidades de ~50 kDa (50,99,165). En cambio, las ADP-Glc PPasas de organismos pertenecientes a los Firmicutes (96,107,157,158) contienen dos genes, *glgC* y *glgD*, que codifican dos ADP-Glc PPasas homólogas en secuencia de aminoácidos a otras enzimas procarióticas. La proteína GlgC de *G. stearothermophilus* tiene una longitud de 387 aminoácidos, con una masa molecular de 43,3 kDa y muestra una identidad de 42-70% con otras ADP-Glc PPasas bacterianas. Por su parte, la proteína GlgD del mismo organismo (de 343 aminoácidos, con una masa molecular predicha de 38,9 kDa) tiene un menor grado de identidad (20-30%) (157). La expresión de *glgC* de *G. stearothermophilus* produce una enzima recombinante activa, pero GlgD muestra una actividad insignificante. Sin embargo, cuando los genes *glgC* y *glgD* se co-expresan el resultado muestra que la proteína GlgC/GlgD tiene una mayor afinidad por el sustrato y una  $V_{max}$  dos veces mayor que la de GlgC sola (157). De igual manera, con la enzima de *R. albus* se observó que la GlgD es un monómero inactivo cuando se expresa solo, pero aumenta la eficiencia catalítica del heterotetrámero (GlgC/GlgD) en comparación con el homotetrámero (GlgC) (158). Lo mismo sucede con la enzima de *S. mutans*, un organismo que induce la cariogénesis (96). En base a estos hallazgos, se puede generalizar que la presencia de las subunidades GlgD incrementa la actividad y la afinidad hacia los sustratos en todos los heterotetrámeros de Firmicutes. Recientemente, estudios de transcriptómica en *S. mutans* revelaron cambios en los niveles de GlgD según la fuente de carbono proporcionada en el medio de cultivo (170). Esto sugiere que puede haber una expresión diferencial de la subunidad GlgD, que condiciona la formación del heterotetrámero GlgC/GlgD, el cual exhibe diferentes propiedades cinéticas y regulatorias en comparación al homotetrámero GlgC, conduciendo así a una plasticidad cinética-regulatoria de la ADP-Glc PPasa de Firmicutes. Asimismo, se evidenció que la regulación alostérica parece ser una regla y no una excepción para la ADP-Glc PPasa de Firmicutes, presentando así a la enzima de *G. stearothermophilus*, perteneciente al grupo de Bacillales, como una particularidad dentro de este filo bacteriano (96,157,158).

La ADP-Glc PPasa de cianobacterias difiere en su estructura cuaternaria de aquellas encontradas en algas y plantas (51,110), ya que la misma posee una estructura cuaternaria de homotetrámero (como es el caso de la enzima de la mayoría de las bacterias); mientras que, en algas verdes y plantas la enzima está compuesta por dos subunidades,  $\alpha$  y  $\beta$ , que en conjunto forman una estructura heterotetramérica  $\alpha_2\beta_2$ . Se ha descrito que la subunidad denominada pequeña ( $\alpha$  o S de *small*, 50-54 kDa) posee actividad catalítica, mientras que la llamada subunidad

grande ( $\beta$  o L de *large*, 54-60 kDa) modula la actividad de la subunidad  $\alpha$  (51,110). Diferentes mecanismos fueron identificados en cuanto a la modulación de la actividad de las ADP-Glc PPasas provenientes de organismos fotosintéticos, incluyendo moléculas pequeñas como reguladores alostéricos y modificaciones químicas post-traduccionales (110,171). La subunidad  $\beta$ , que se encuentra en los eucariotas fotosintéticos, altera la sensibilidad de la subunidad  $\alpha$  hacia los efectores alostéricos, posiblemente a través de interacciones proteína-proteína. Esto tendría relevancia fisiológica, ya que de esta manera, la expresión de diferentes subunidades  $\beta$  en diversos tejidos podría conferir propiedades alostéricas específicas a la enzima, adecuadas a las necesidades de la síntesis de almidón (172–174). En estudios recientes de nuestro grupo de trabajo, se produjeron y caracterizaron enzimas híbridas obtenidas a partir de una combinación entre las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de ADP-Glc PPasas de endosperma de trigo y de tubérculo de papa. A partir de estos ensayos, se demostró que la subunidad grande o  $\beta$  juega un papel clave en conferirle propiedades regulatorias a las enzimas vegetales (175). A la vez, el análisis de las secuencias de ADP-Glc PPasas de diferentes fuentes reveló que la subunidad pequeña está altamente conservada (80-85% de identidad), mientras que la subunidad grande es menos conservada (50-60%) (176,177).

La estructura tridimensional de las ADP-Glc PPasas no estuvo clara durante mucho tiempo, hasta que se determinó la estructura cristalina de un homotetrámero ( $\alpha_4$ ) de tubérculo de papa (137). Luego de la resolución de esta estructura también se resolvieron otras estructuras bacterianas de fuentes heterótrofas, como *A. tumefaciens* (138) y *E. coli* (139). A partir de esto, se evidenciaron dos dominios: el N-terminal, que es catalítico y se asemeja a un pliegue de Rossmann de unión a dinucleótidos; y el C-terminal, el cual está involucrado en la regulación alostérica cooperativa y la oligomerización (37,137,178,179). Recientemente, se ha obtenido la estructura cristalina de la enzima de *A. tumefaciens* con el activador alostérico Pyr unido (140). A lo largo de todos estos años de investigación sobre ADP-Glc PPasas de diferentes fuentes, se han identificado los aminoácidos involucrados en la catálisis y regulación de la enzima. Estudios realizados utilizando diferentes enfoques experimentales, como modificación química, mutagénesis aleatoria y sitio dirigida, han demostrado la existencia de una interacción entre ambos dominios (146,180–183).

Del análisis de los datos experimentales, sumado a modelos estructurales de la enzima, surge la idea de que las ADP-Glc PPasas y otras NDP-azúcar PPasas derivan de un ancestro común, siendo que todas exhiben el mismo plegamiento en su dominio catalítico (126,131,176). La diferencia principal es que las ADP-Glc PPasas son enzimas alostéricas y las subunidades son de mayor tamaño, ya que el extremo C-terminal se ha extendido entre 120 y 150 aminoácidos, y el N-terminal unos 10 a 40 residuos. Probablemente, la adquisición del fragmento C-terminal le confiere el carácter de enzima alostérica o mejora cierta regulación rudimentaria ya presente (50,110). De hecho, se ha demostrado que una enzima no regulada alostéricamente, como lo es la

UDP-Glc PPasa bacteriana, puede adquirir esta propiedad con la simple fusión del extremo C-terminal de una ADP-Glc PPasa de procariotas (144). Esto lleva a pensar que, una vez adquirido ese dominio, la enzima pudo haber experimentado distintos procesos evolutivos que favorecieron una adaptación a los diferentes entornos metabólicos, lo cual produjo la diferenciación en las diversas clases de enzimas (50,110).

El origen de la ADP-Glc PPasa en eucariotas puede estar relacionado con el proceso endosimbiótico entre procariotas, que dio lugar a la formación de plástidos y la posterior transferencia del gen al núcleo (184,185). De acuerdo con esta hipótesis, las enzimas de cianobacterias exhiben una mayor similitud con las subunidades pequeñas de plantas que con las de otras bacterias heterótrofas. En los eucariotas, la subunidad  $\beta$  surgió más tarde en la evolución, probablemente a través de la duplicación de genes, luego de lo cual estos genes dieron lugar de manera divergente a muchas variantes especializadas (110,174). Esto permitió obtener diferentes polipéptidos: una subunidad catalítica y una regulatoria. Aunque ambas parecen provenir del mismo ancestro, dada la similitud de las regiones conservadas, la mayor similitud entre las subunidades  $\alpha$  sugiere que estas han tenido restricciones evolutivas más fuertes que las subunidades  $\beta$ . Además, las subunidades  $\alpha$  muestran una mayor similitud con la enzima cianobacteriana que con las subunidades  $\beta$ , las cuales tienen considerables diferencias de secuencia entre ellas. Esto último probablemente refleja los diferentes requisitos en la modulación de la respuesta de la subunidad  $\alpha$ , es decir, a la activación e inhibición alostérica representada por las diferentes necesidades de tejidos y especies (110,172,174,186). Una etapa posterior en la evolución de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de ADP-Glc PPasas de plantas involucraría la adquisición de mecanismos de regulación post-traducciona (51,110,171,187–189).

Estudios previos (96,146,149,150,190) han demostrado la importancia de caracterizar la regulación de las ADP-Glc PPasas mediante el análisis del efecto concomitante de diferentes efectores. Estos resultados sugieren que la relación entre estos efectores ejerce una fina regulación en la actividad enzimática, lo cual se aproxima mejor a las diferentes condiciones metabólicas en las que se produce la síntesis de glucógeno. Estos trabajos mostraron la existencia de una interacción entre los activadores e inhibidores de la ADP-Glc PPasa de procariotas (96,146,149,150,190). Los resultados obtenidos con la ADP-Glc PPasa de *S. mutans* mostraron que el heterotetrámero no fue afectado por la Fru-1,6-P<sub>2</sub>, pero cuando se midió su actividad en presencia de concentraciones sub-saturantes del inhibidor PEP el mismo fue sensible a la activación por Fru-1,6-P<sub>2</sub> (96). Por otro lado, se sabe que la Fru-1,6-P<sub>2</sub> es el activador principal de la ADP-Glc PPasa de *E. coli* y el Pyr es un activador débil de la misma. Sin embargo, el efecto del Pyr como activador alostérico de la enzima de *E. coli* mejoró cuando se analizó en presencia de Fru-1,6-P<sub>2</sub> (149). Además, se sabe que el AMP es el principal inhibidor de la ADP-Glc PPasa de *E. coli*, actuando principalmente en una interacción cruzada con el activador Fru-1,6-P<sub>2</sub> (180,191,192). Se logró demostrar que cuando el Pyr estaba presente, la enzima es menos sensible

a la inhibición por AMP, disminuyendo 3 veces la afinidad aparente por el AMP (149). Recientemente, se analizó el efecto combinado de los activadores de la enzima de *A. tumefaciens*, el Pyr y la Fru-6P (150). Los resultados obtenidos respaldan un modelo en el que existe una unión sinérgica de estos dos activadores a dos sitios distintos, y que cada activador conduce a diferentes formas activas de la enzima (150). Además, mediante mutagénesis se obtuvieron variantes enzimáticas sensibles a la activación por Pyr, pero en las que la señal alostérica de Fru-6P estaba interrumpida, lo cual indicó que el mecanismo de activación de cada efector no era el mismo (150). Conjuntamente, estos resultados demuestran que es fundamental expandir el análisis sobre la capacidad de evolución de la regulación de las ADP-Glc PPasas, ya que estas interacciones sinérgicas entre efectores alostéricos pueden representar una característica importante en otras enzimas alostéricas.

### 1.3.5. Las glucógeno sintasas

Las glicosiltransferasas (GTs; EC 2.4.x.y) son una gran familia de enzimas involucradas en la biosíntesis de oligosacáridos, polisacáridos y glicoconjugados. Particularmente abundantes son las GTs que transfieren un residuo de azúcar desde el dador nucleotídico activado a moléculasceptoras específicas, mediante la formación de enlaces glucosídicos. Estas enzimas están presentes tanto en procariontes como en eucariontes y, en general, muestran una sutil especificidad para los sustratos dadores y aceptores de glucosilo. La función catalítica GSasa (almidón sintasa, SSasa, en plantas) se agrupa en dos familias de GTs según la base de datos *on-line* CAZy (*Carbohydrate-Active enZYmes database*), GT3 y GT5, que tienen menos del 15% de identidad (73,193,194). En la familia GT3 se encuentran agrupadas principalmente GSasas de hongos y mamíferos, que utilizan preferentemente UDP-Glc como dador de glucosilo (EC 2.4.1.11) y poseen una masa molecular de ~80 kDa. Por su parte, las GTs de tipo GT5 contienen secuencias correspondientes a las GSasas (SSasas) de fuentes bacterianas y vegetales (EC 2.4.1.21), las cuales utilizan exclusivamente ADP-Glc como dador de glucosilo y son más pequeñas (~50 kDa) (99,195,196). Otra diferencia que presentan ambos grupos es que las primeras son activadas alostéricamente por Glc-6P e inhibidas por fosforilación; mientras que las últimas no poseen esta propiedad (38,197).

Sólo se han identificado dos pliegues estructurales, GT-A y GT-B, para enzimas dependientes de NDP-azúcares, los cuales corresponden a variantes de dominios con plegamiento de Rossmann (198–200). Las GSasas y SSasas son miembros de la superfamilia GT-B de las GTs, que consta de dos dominios de tipo Rossmann  $\beta/\alpha/\beta$  separados por una gran hendidura que contiene el sitio activo. Cada dominio de “unión de nucleótidos” o “pliegue de Rossmann” contiene dos conjuntos de unidades  $\beta-\alpha-\beta-\alpha-\beta$ , que juntas forman una hoja paralela única rodeada de  $\alpha$ -hélices (200). Se requiere una orientación relativa adecuada de los dos dominios N- y C-terminal para una precisa geometría del sitio activo y competencia catalítica, como se demostró en varios miembros

bacterianos de GT-B (201–204). En general, se acepta que en las enzimas GT-B los dadores de NDP-azúcares se unen principalmente al dominio C-terminal de la proteína, mientras que el dominio N-terminal está involucrado en el reconocimiento del sustrato aceptor. Debido a que los sustratos aceptores muestran una marcada diversidad de estructuras químicas en comparación con los dadores de NDP-azúcares, la región N-terminal refleja esta variabilidad al mostrar diferentes reordenamientos de los elementos estructurales secundarios (205).

Las GSasas, a diferencia de las nucleotidiltransferasas, no requieren la presencia de metales para su actividad (73). Una observación evolutiva interesante es que la proteína GlgP, responsable de degradar el glucógeno liberando moléculas de Glc-1P, también pertenece a la familia con plegamientos GT-B, lo que sugiere una relación estructural divergente para estas enzimas que catalizan reacciones opuestas (73). Este plegamiento GT-B se conserva entre las GSasas de bacterias, arqueas y eucariotas (203,204,206,207). Sin embargo, las enzimas eucariotas difieren de aquellas de organismos procariotas, no sólo a nivel de secuencia primaria, sino también en su especificidad por los dadores de NDP-azúcar que utilizan y en su regulación (73,74). Como se indicó previamente, las GSasas de animales y hongos son activadas por Glc-6P e inhibidas por la fosforilación reversible de distintos residuos de Ser y Thr. Por el contrario, las GSasas bacterianas no presentan ningún tipo de regulación (99).

Tal como se mencionó anteriormente, el sitio activo de las GSasas se encuentra en una hendidura profunda entre los dominios N- y C-terminal (203,204,206). Gracias a la estructura determinada para la GSasa de *E. coli* se pudo demostrar que el NDP-azúcar se une principalmente a un bolsillo en el lado C-terminal de la hendidura (203,204). Curiosamente, cuatro oligosacáridos se unen al dominio N-terminal, uno en la hendidura y tres en la superficie del dominio. Los oligosacáridos unidos a la superficie muestran menos interacción con la enzima y exhiben una organización estructural similar a una hélice. A pesar del hecho de que los oligosacáridos se unen sólo al dominio N-terminal de la GSasa, esto sugiere fuertemente que el glucógeno *in vivo* se une a un lado de la enzima para asegurar el movimiento entre dominios, que es esencial para la síntesis eficiente y continua de la cadena del  $\alpha$ -glucano (208).

Durante mucho tiempo, se pensó que la polimerización del glucógeno estaba catalizada únicamente por GSasas que utilizan NDP-Glc como dador de residuos glucosilos. Sin embargo, como se mencionó con anterioridad, se ha identificado otra polimerasa bacteriana, GlgE, que no utiliza como dador a la NDP-Glc, sino que utiliza Mal-1P (122). Actualmente, se sabe que las bacterias Gram-positivas que contienen una enzima GlgE presentan un homólogo de GlgA que pertenece a la familia GT4. Esta enzima puede usar ADP-Glc y Glc-1P para sintetizar Mal-1P, por lo que esta actividad enzimática no informada anteriormente se denominó como Mal-1P sintasa (GlgM), y la enzima procedente de *M. smegmatis* ha sido cristalizada (118). A partir de la estructura determinada, se pudo observar que la proteína GlgM consta de 2 dominios, cada uno

con una arquitectura  $\alpha/\beta$  que se asemeja a un pliegue de Rossmann, y que la misma comparte un pliegue GT-B con las GSasas bacterianas (118).

## 1.4. EL METABOLISMO DE LA SACAROSA

La Suc es uno de los principales productos de la fotosíntesis en las plantas y desempeña un papel central en el metabolismo de carbohidratos, ya que constituye la forma más común de carbohidrato transportado desde los órganos que realizan fotosíntesis hacia los sumideros. La Suc se transporta hacia el resto de la planta en desarrollo, donde se cataboliza para proporcionar carbono y energía, tanto para el crecimiento como para la síntesis de compuestos de reserva, como almidón, aceites o fructanos (209–211). Como uno de los solutos más abundantes en las células vegetales, la Suc es un factor importante en la regulación osmótica. Cuando se exponen al estrés por frío, sequía o sal, las plantas a menudo acumulan altos niveles de Suc para mantener el equilibrio osmótico y ayudar a estabilizar sus proteínas y membranas. La Suc también es una molécula de señalización importante que actúa a nivel transcripcional, traduccional y post-traduccional para regular muchos procesos metabólicos y de desarrollo, incluida la inducción de la floración, la ramificación de brotes, la diferenciación vascular, el desarrollo de semillas y la síntesis de productos de almacenamiento (212,213).

Se ha demostrado que las enzimas requeridas para la síntesis de Suc también se encuentran en cianobacterias (214–216). Estos hallazgos establecieron un marco evolutivo en el cual la Suc jugaría un rol crítico en el metabolismo del carbono en especies fijadoras de nitrógeno en células diferenciadas llamadas heterocistos (217). Por otro lado, también se ha sugerido que en cianobacterias unicelulares, la Suc está fisiológicamente relacionada con la tolerancia al estrés salino (218–220), debido a que el disacárido puede actuar como un soluto compatible. Con la dilucidación de distintos genomas, se encontraron las secuencias que codifican las enzimas responsables de la síntesis de Suc en bacterias no fotosintéticas, a pesar de que el papel del disacárido aún no está completamente establecido en estos organismos (221). Sin embargo, la vía biosintética de la Suc en las angiospermas está bien establecida y se conocen los mecanismos reguladores que controlan el flujo a través de esta vía, al menos en algunas especies modelos como espinaca (*Spinacia oleracea*), maíz (*Zea mays*) y *Arabidopsis thaliana* (221).

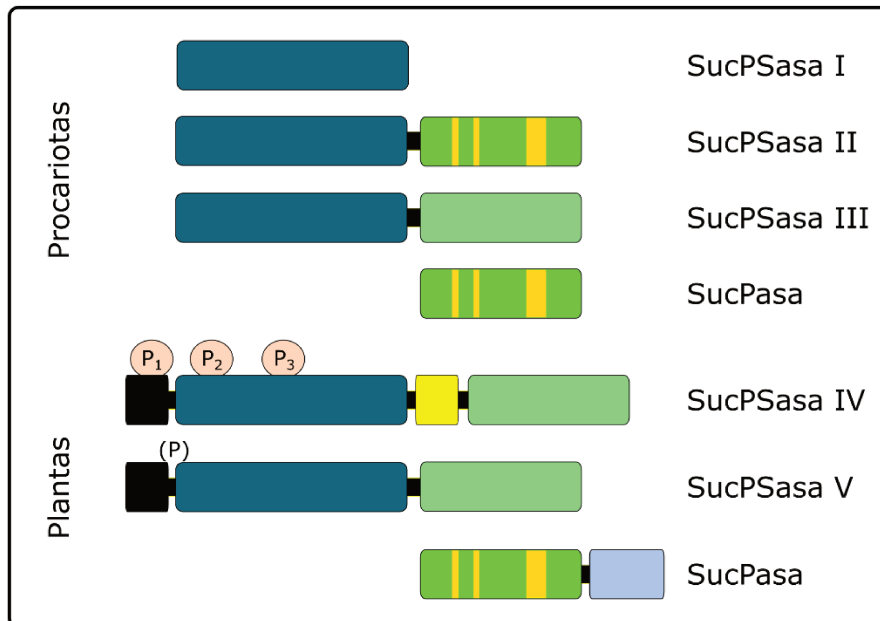
### 1.4.1. Enzimas involucradas en el metabolismo de la Suc

Las dos enzimas de la vía comprometida con la biosíntesis de Suc son: (i) la Suc 6-fosfato sintasa (SucPSasa o SPS; EC 2.4.1.14), que cataliza la síntesis de Suc 6-fosfato (Suc-6P) a partir de un NDP-Glc, generalmente UDP-Glc, y Fru-6P; y (ii) la Suc 6-fosfato fosfatasa (SucPasa o SPP; EC 3.1.3.24), que hidroliza el grupo fosfato de la Suc-6P para liberar Suc y Pi. Ambas enzimas son probablemente de origen bacteriano y fueron heredadas por las plantas del ancestro cianobacteriano de los cloroplastos (221). La reacción irreversible que cataliza la SucPasa ejerce

una influencia crítica en el sentido de la reacción de la SucPSasa. De esta manera, mediante la acción combinada de ambas enzimas, la célula aseguraría la síntesis de Suc cuando las concentraciones de los sustratos NDP-Glc y Fru-6P son bajas, como así también cuando el producto Suc se encuentra en altas concentraciones. Alternativamente, la síntesis del disacárido puede ocurrir en una reacción catalizada por (iii) la Suc sintasa (SucSasa; EC 2.4.1.13) a partir de un NDP-Glc y Fru, aunque en especies vegetales esta reacción suele estar relacionada con la ruta de degradación de la Suc (209,222). Además, como la SucSasa no se encuentra modulada por metabolitos o asociada a otras reacciones, esta reacción dependería exclusivamente de las concentraciones relativas de los sustratos. Varios trabajos realizados con las enzimas de plantas demostraron que la SucPSasa utiliza preferencialmente UDP-Glc (223–226). Distintivamente, los estudios realizados con las enzimas de organismos procariotas sugieren que la SucPSasa y la SucSasa pueden utilizar otros sustratos, en particular la ADP-Glc (216,217,227,228).

- i.  $\text{NDP-Glc} + \text{Fru-6P} \leftrightarrow \text{Suc-6P} + \text{NDP}$  [SucPSasa, EC 2.4.1.14]
- ii.  $\text{Suc-6P} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Suc} + \text{Pi}$  [SucPasa, EC 3.1.3.24]
- iii.  $\text{NDP-Glc} + \text{Fru} \leftrightarrow \text{Suc} + \text{NDP}$  [SucSasa, EC 2.4.1.13]

Se sugirió que existiría una estrecha correlación de secuencias entre los dominios glicosiltransferasa de la SucPSasa y la SucSasa, lo que indicaría un origen evolutivo común entre ambas (229). Además, se postuló que, evolutivamente, el primer aceptor de glucosilo debió haber sido la Fru-6P en lugar de la Fru, debido a su abundancia en el metabolismo intermediario y al hecho de que la hidrólisis del sustrato intermedio, la Suc-6P, conduciría a una vía de síntesis esencialmente irreversible (229,230). Más adelante, con el transcurso de la evolución, se habría adquirido la función SucSasa. Ambas sintasas pertenecen a la subfamilia GT4 de la superfamilia de las GTs. Estas enzimas tienen un mecanismo de reacción que mantiene la conformación anomérica y una estructura del tipo GT-B (194). Al analizar las secuencias de las SucPSasas y SucPasas de distintas fuentes se encontraron distintas arquitecturas. En base a esto, se han descrito diferentes tipos de estructuras para las enzimas involucradas en la síntesis de Suc, dependiendo de la disposición de los dominios que las componen (Figura 2). En bacterias se han identificado, al menos hasta el momento, 3 tipos de SucPSasas. Las cianobacterias formadoras de heterocistos, como *Anabaena* sp. PCC 7120, tienen dos genes que codifican para SucPSasa, denominados *spsA* y *spsB* (215,217,229). Las enzimas codificadas por estos genes pertenecen al grupo de SucPSasas bacterianas de tipo I, ya que poseen únicamente el dominio glicosiltransferasa (Figura 2). Este tipo de proteínas presentan una masa molecular de ~53 kDa y también se encuentran en bacterias como *Halothermothrix orenii*, en algunas cianobacterias unicelulares y en la filamentosa *Nostoc punctiforme* PCC 73102 (211,221). Las especies que presentan una SucPSasa de tipo I, generalmente poseen una secuencia codificante para una SucPasa bacteriana (221).



**Figura 2:** Arquitectura de los dominios que componen las SucPSasas y las SucPasas de bacterias y plantas. Dominio glicosiltransferasa (azul), dominio fosfohidrolasa (verde), dominio similar a fosfohidrolasa no catalítico (verde claro), extensión N-terminal (negro), región de conexión altamente variable entre los dominios glicosiltransferasa y fosfohidrolasa (amarillo), extensión C-terminal que posiblemente participa en la dimerización (celestre). Adaptado de Lunn 2016 (211).

Por otro lado, las SucPSasas de tipo II son enzimas de mayor tamaño (~80 kDa) ya que contienen un dominio fosfohidrolasa C-terminal de 260-270 aminoácidos, adyacente al dominio glicosiltransferasa (Figura 2). Este dominio fosfohidrolasa presenta una elevada identidad de secuencia con las SucPasas bacterianas y contiene varios de los residuos del sitio activo conservados, sugiriendo que estas proteínas de tipo II son enzimas bifuncionales con ambas actividades, SucPSasa y SucPasa (221). Para respaldar aún más esta hipótesis, las especies que presentan una SucPSasa de tipo II, no cuentan con una SucPasa codificada individualmente en su genoma. Entre las especies que poseen una SucPSasa de tipo II se encuentran varias cianobacterias (como *Thermosynechococcus elongatus*, *Synechococcus elongatus* PCC 6301, *Prochlorococcus marinus*), metilótrofos obligados como *Methylobacillus flagellatus* y *Methylovorus glucosatrophus*, algunas proteobacterias litoautotróficas como *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Nitrosomonas europaea* y *Nitrospira multiformis*, y el planctomycete *Rhodopirellula baltica*; cuyos genomas carecen de genes *spp* (SucPasa) (221,231). Las SucPSasas de tipo III poseen similar longitud aminoacídica que las de tipo II, pero carecen de los residuos catalíticamente importantes en el dominio SucPasa C-terminal (Figura 2) (232–234). Esto es consistente con lo demostrado para la enzima SucPSasa de *Synechocystis* sp. PCC 6803, la cual carece de actividad SucPasa (214), y se observó la presencia de una SucPasa separada en esta especie (232). Las SucPasas de *Synechocystis* sp. PCC 6803 y *Anabaena* sp. PCC 7120 tienen una masa molecular de 26-28 kDa y las enzimas nativas son monoméricas (232,233,235). Las

actividades de ambas enzimas dependen estrictamente de la presencia de un catión de metal divalente, prefiriéndose  $Mg^{2+}$ . A su vez, son altamente específicos para Suc-6P, mostrando poca o ninguna actividad hidrolítica con otros azúcares fosforilados.

Se han encontrado muchas isoformas de SucPSasa como de SucPasa en plantas (236,237), y parecen ser más grandes que sus homólogas en organismos procariotas. Las SucPSasas vegetales son más grandes hacia el extremo N-terminal como hacia el C-terminal. Se ha demostrado que el extremo N-terminal contiene residuos involucrados en la regulación por fosforilación (Figura 2) (223), mientras que el extremo C-terminal tiene una identidad significativa con dominios del tipo SucPasa. Este segundo dominio, al igual que ocurre en las SucPSasas de tipo III, no presentaría actividad enzimática por la falta de los residuos involucrados en la catálisis (Figura 2) (210). A partir de análisis filogenéticos de estas SucPSasas vegetales, se agruparon en cuatro familias distintas, que se denominaron A, B, C y D (221,236,238). En las familias A, B y C hay al menos tres sitios involucrados en la regulación por luz-oscuridad, unión a proteínas 14-3-3 y activación por estrés osmótico, respectivamente (223). La familia D contiene dos subfamilias distintas de genes, aunque codifican isoformas similares de SucPSasas que tienen varias características distintivas. Estas isoformas inusuales son más pequeñas (108-109 kDa, tipo V) que las proteínas de las familias A, B o C (114-119 kDa, tipo IV), ya que carecen de una región conectora de ~85 aminoácidos, que se encuentra entre el dominio glicosiltransferasa y el dominio SucPasa (Figura 2) (221). Estudios realizados con la SucPSasa de plantas demostraron que la misma se encuentra altamente regulada, tanto a nivel transcripcional, post-traducciona (activación o inhibición por fosforilación), como alostéricamente (activada por Glc-6P e inhibida por Pi) (211,221,222). Excepto por el sitio Ser<sup>424</sup>, que está ausente en las SucPSasas de la familia B en las eudicotiledóneas, los tres sitios de fosforilación están presentes en casi todas las demás proteínas de las familias A, B y C de las angiospermas. Por el contrario, las SucPSasas de la familia D carecen de dos de los sitios de fosforilación, Ser<sup>229</sup> y Ser<sup>424</sup>, y algunos de los residuos críticos para el reconocimiento de la proteína quinasa también faltan en el motivo del sitio de fosforilación Ser<sup>158</sup> (221). Por otro lado, no se ha encontrado evidencia concreta de que las SucPSasas y las SucPasas procariotas sean reguladas (los residuos blancos de las fosforilaciones no están presentes, ni son activadas por Glc-6P o inhibidas por Pi). Pareciera que la síntesis de Suc en organismos procariotas se encuentra controlada principalmente a nivel de la transcripción de genes y por disponibilidad de sustratos (221).

Con respecto a las SucPasas de plantas, son más grandes hacia el extremo C-terminal, en comparación con sus homólogas procariotas (Figura 2). Estas últimas son monoméricas y tienen una longitud de unos 260 aminoácidos (232,233,235). Por su parte, las SucPasas vegetales presentan un excedente de ~160 aminoácidos, que podría participar en la dimerización o aumentar la eficiencia catalítica (210,211).

### 1.4.2. Síntesis de Suc en bacterias

Además de las plantas verdes y algunos eucariotas fotosintéticos unicelulares, como *Euglena gracilis*, se sabe que ciertos grupos de bacterias sintetizan Suc. Se ha encontrado Suc en especies de cianobacterias marinas y de agua dulce (239,240), incluidas las unicelulares (cepas pertenecientes a *Synechocystis* y *Synechococcus*) y las filamentosas (cepas de los géneros *Nostoc* y *Anabaena*). La Suc también está presente en especies de  $\gamma$ -proteobacterias metanotróficas, halo/álcali tolerantes (*Methylobacter alcaliphilus* 20Z y *Methylocaldum szegediense* O12) (241–243). Además, los genes para la síntesis de Suc se pueden identificar en varias especies pertenecientes a los grupos Firmicutes y Planctomycetes (243). El genoma del planctomiceto marino *R. baltica* tiene un marco de lectura abierto (ORF) que codifica una proteína con una identidad del 42% (60% de similitud) con la SucPSasa de la cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803 (244). Por varias razones, se supone que esta SucPSasa de *R. baltica* es una enzima bifuncional, con actividades SucPSasa y SucPasa. También se ha encontrado un ORF que codifica otra proteína similar a la SucPSasa en la bacteria *H. orenii*. Aunque la secuencia de esta última mostró sólo una similitud moderada con la de *Synechocystis* sp. PCC 6803, se ha informado que la misma tiene actividad SucPSasa (245,246).

A partir de análisis de secuencias genómicas, se identificaron genes *sps* putativos en  $\beta$ -proteobacteria (*N. europaea* y *M. flagellatus*),  $\gamma$ -proteobacteria (*A. ferrooxidans*) (247) y  $\delta/\epsilon$ -proteobacteria (*Desulfuromonas acetoxidans*). La presencia de genes relacionados con la síntesis de Suc en otros grupos bacterianos parece ser mucho menos común, y se sugieren varias razones para esta distribución desigual. Una posible explicación es que la mayoría de los linajes bacterianos han perdido grandes cantidades de enzimas involucradas a la ruta de síntesis de la Suc (221). Alternativamente, la transferencia horizontal y esporádica de genes desde las cianobacterias o las proteobacterias podría explicar casos aislados de la presencia de genes que codifican enzimas responsables de la síntesis de Suc en otros grupos bacterianos. Las cianobacterias comparten el mismo tipo de hábitat que *R. baltica* y *H. orenii*, por lo que seguramente pudo existir la oportunidad para que estas dos especies adquirieran el gen *sps* por transferencia horizontal de genes en algún momento del pasado. Presumiblemente, tal transferencia de genes también ha ocurrido muchas veces en otros tipos de bacterias, pero a menos que la capacidad de sintetizar Suc confiera alguna ventaja competitiva en un hábitat particular, no habría presión de selección para su retención (221).

Varias especies de cianobacterias acuáticas utilizan la Suc como soluto compatible para ayudar a equilibrar su potencial hídrico intracelular con el del ambiente externo (239,248,249), y es probable que especies no cianobacterianas también empleen la Suc como soluto compatible. Algunas cianobacterias utilizan otros compuestos, como Tre o glucosilglicerol, en lugar de la Suc o además de ella (240,250). Las cianobacterias que habitan en entornos secos o cálidos utilizan

estos compuestos para protegerse de los efectos de la desecación y las altas temperaturas (221). Se demostró que la expresión de la SucPSasa de *Synechocystis* sp. PCC 6803 en *E. coli* induce la acumulación de Suc en esta especie, que normalmente no la sintetiza; además, este proceso incrementó la tolerancia a la desecación alrededor de 10.000 veces, demostrando la efectividad de la Suc como agente protector *in vivo* (251).

En un principio se asoció la acumulación de la Suc con la salinidad (252). Estudios posteriores han demostrado otras funciones fisiológicas de este disacárido. En cepas formadoras de heterocistos, la Suc tiene un rol clave como intermediario en el flujo de carbono reducido en los filamentos (217,253), en la acumulación de glucógeno (217,254) y en el crecimiento diazotrófico (255). También, en la cepa *Synechocystis* sp. PCC 6803, se propuso que la Suc participa en la activación de cascadas de señalización como parte de una respuesta general a cambios en la salinidad (256).

## 1.5. ORGANISMOS PROCARIOTAS OCUPANDO POSICIONES EVOLUTIVAS CLAVES

Como se mencionó anteriormente, aunque el mecanismo de elongación de la cadena del  $\alpha$ -1,4-glucano mediante el uso de NDP-Glc es común a todas las células, existen diferencias importantes entre los distintos organismos respecto a que el dador de residuos glucosilos sea la UDP-Glc (en heterótrofos eucariotas) o la ADP-Glc (en bacterias y eucariotas fotosintéticos) (50,51,110). Además, el paso regulatorio de la síntesis de polisacáridos de reserva en heterótrofos eucariotas ocurre a nivel de la GSasa; en cambio, en procariotas, algas verdes y plantas, la vía biosintética es modulada principalmente en la etapa de producción de la ADP-Glc. Se observa, por lo tanto, un importante enclave evolutivo en cuanto al camino específico por el cual la Glc-1P es derivada hacia la biosíntesis de oligo- y polisacáridos estructurales o los  $\alpha$ -1,4-glucanos de reserva.

Las enzimas involucradas específicamente en la producción de NDP-Glc y en la transferencia de residuos glucosilos a polisacáridos, presentan importantes diferencias estructurales y funcionales según los diferentes tipos de células. Por tanto, la ADP-Glc PPasa es una proteína que se encuentra en procariotas (incluidas las cianobacterias), algas verdes y células fotosintéticas y heterótrofas de plantas vasculares, pero que está ausente en organismos eucariotas heterótrofos. Por su parte, si bien la UDP-Glc PPasa es una proteína ubicua, presente en todas las formas celulares, existen importantes diferencias estructurales entre la proteína de origen procariota y la de eucariota, lo cual es claro por el hecho que no son proteínas homólogas (58,64,257). Lo mismo sucede con las  $\alpha$ -1,4-glicosiltransferasas, ya que se pueden distinguir dos formas que se agrupan en las respectivas familias GT3 y GT5 (194). A partir del escenario conocido sobre el metabolismo de carbohidratos comparado entre distintos organismos procariotas, algunos casos

especiales son de gran interés, ya sea por falta de información específica o porque se ubican en posiciones claves del árbol filogenético.

El escenario evolutivo muestra que la caracterización de enzimas implicadas en el metabolismo de hidratos de carbono de diferentes organismos es útil para el análisis comparativo y, de esta manera, poder establecer relaciones entre estructura, función y regulación de las respectivas proteínas. Estos estudios permiten identificar dominios proteicos implicados en las similitudes y diferencias funcionales y estructurales de las enzimas. Es así que para el desarrollo de este trabajo de Tesis se seleccionaron *Melainabacteria*, *B. japonicum* y *N. europaea* como organismos modelos de procariontes, ya que los mismos se encuentran ocupando sitios evolutivos intermedios, para la caracterización bioquímica de las enzimas involucradas en el metabolismo de carbohidratos.

Las proteínas seleccionadas se caracterizaron según sus propiedades cinéticas y reguladoras. En base a esto, se exploró en detalle si existen distintos niveles de especificidad/promiscuidad por el uso de sustratos, así como si hay diferencias respecto a los efectores alostéricos que modulan la actividad enzimática, realizando una comparación con enzimas de otros organismos caracterizadas con anterioridad. De esta manera, los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta Tesis aportan una mayor comprensión de las propiedades cinéticas, regulatorias y estructurales de las enzimas en estudio, de las características evolutivas de la síntesis de carbohidratos en células procariontes, así como nuevos conocimientos sobre posibles características bioquímicas operativas en los organismos estudiados que ayudan a explicar la versatilidad metabólica de cada microorganismo.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVOS GENERALES

El presente trabajo de Tesis se centra en el estudio de NDP-azúcar PPasas y de glucosiltransferasas de ciertas bacterias para su caracterización funcional-estructural. Las enzimas (y su origen biológico) son seleccionadas a partir de que hemos identificado la ocurrencia de más de un gen que codifica para respectivas isoformas proteicas en el mismo organismo, o que el análisis comparativo de secuencias de aminoácidos de las enzimas indica que ocupan posiciones evolutivas intermedias. De esta forma, se pretende mejorar nuestra comprensión sobre los cambios evolutivos operados en las rutas de síntesis de carbohidratos de reserva en organismos procariotas.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

#### 2.2.1. La ocurrencia de la ADP-Glc PPasa en cianobacterias no fotosintéticas

- Estudiar las propiedades cinéticas, regulatorias y estructurales de la ADP-Glc PPasa de cianobacterias, particularmente debido al reciente descubrimiento de cianobacterias no fotosintéticas y su posición en un enclave evolutivo crítico, como es el caso del grupo *Melainabacteria*.

- Hemos identificado en bases de datos que estos organismos poseen genes *glgC* putativos que codificarían para las correspondientes ADP-Glc PPasas. A partir de esto, realizar el clonado molecular por medio de la síntesis *de novo* de estos genes, producir las respectivas enzimas en forma recombinante con alto grado de pureza y caracterizarlas en sus propiedades cinéticas, regulatorias y estructurales.

- Realizar un estudio comparativo con la enzima de organismos fotosintéticos y alcanzar una mejor comprensión de los cambios evolutivos experimentados por la ADP-Glc PPasa como enzima que cataliza el paso regulatorio de la síntesis de polisacáridos de reserva en bacterias.

#### 2.2.2. Estudio de isoformas de GSasa en bacterias: el caso de *B. japonicum*

- Realizar el clonado molecular por medio de la síntesis *de novo* de los dos genes codificantes para las GSasas de *B. japonicum* (genes *bll2778* y *blr6459*), para poder obtener en forma recombinante las enzimas y luego realizar su caracterización cinética.

- Analizar de manera comparativa las propiedades de estas proteínas entre sí y en relación a lo que ocurre en Actinobacteria y otros procariotas.

- Analizar distintos sustratos a modo de indagar sobre la especificidad de uso de NDP-azúcares y/o de glucanos (lineales o ramificados) que puedan producir distintos productos.

### **2.2.3. Metabolismo de la Suc en *N. europaea*: análisis de las enzimas responsables de la síntesis del disacárido**

- Estudiar la ruta de síntesis de la Suc en *N. europaea* mediante la caracterización de la SucPSasa de tipo II, tanto en su versión completa (posiblemente una enzima bifuncional) como en el análisis de los dominios SucPSasa y SucPasa de manera individual.
- Realizar el clonado molecular de la enzima SucPSasa de tipo II mediante la síntesis *de novo*, así como subclonar por separado los dominios SucPSasa y SucPasa. Para luego poder purificar las respectivas enzimas y realizar su caracterización cinética y estructural.
- Abordar el crecimiento de la cepa *N. europaea* y estudiar su relación con la acumulación de Suc y glucógeno.
- Analizar condiciones de estrés y evaluar cambios en los niveles de Suc.
- Estudiar mediante inmunodetección el comportamiento de distintas proteínas relacionadas al metabolismo de carbohidratos en general y de la Suc en particular.
- Explorar la existencia de mecanismos de modificación post-traducciona l en las enzimas que participan en la síntesis de la Suc.

### 3. CAPÍTULO 1: “La ocurrencia de la ADP-Glc PPasa en cianobacterias no fotosintéticas”

#### 3.1. INTRODUCCIÓN

El amplio filo de las cianobacterias incluye bacterias Gram-negativas que viven en una variedad de entornos con amplias variaciones de temperatura y humedad (258). Estos microorganismos transformaron la atmósfera terrestre a partir de realizar la fotosíntesis oxigénica, permitiendo la evolución de organismos vivos más complejos (259). La diversidad de las cianobacterias fotosintéticas se ha determinado morfológica y genéticamente a través de extensos estudios realizados durante varias décadas (260–262). Las cianobacterias son ubicuas y habitan en un amplio espectro de hábitats de agua dulce, marinos y terrestres, incluidos entornos extremos, por ejemplo, aguas termales, costras desérticas y zonas polares. A su vez, desempeñan un papel fundamental en los ciclos biogeoquímicos del carbono y el nitrógeno (263). Con el desarrollo de la metagenómica, se han descubierto muchos tipos de organismos presentes en diversos ecosistemas, incluidas bacterias no fotosintéticas estrechamente relacionadas con las cianobacterias (264–267). Recientemente, se reportó el descubrimiento de *Melainabacteria*, un grupo clasificado como cianobacterias no fotosintéticas, las cuales se encuentran en ambientes afóticos (sedimentos y acuíferos de lagos, así como en intestinos de humanos y animales) (265,266,268,269). Esto ha permitido mejorar nuestra comprensión sobre la amplitud y complejidad de las cianobacterias, un paso clave para entender el origen de la fotosíntesis oxigénica (270) y la clasificación de las cianobacterias (266,271). También ha planteado nuevas preguntas respecto a la relevancia ecológica de las cianobacterias no fotosintéticas en ambientes afóticos. Primeramente, se pensó que constituían un filo hermano de Cianobacteria (265); sin embargo, un análisis genómico posterior confirmó la posición de *Melainabacteria* como un clado hermano de las cianobacterias fotosintéticas y como parte del mismo filo (266). A partir de esta evidencia genómica, se ha propuesto una reclasificación para el filo Cianobacteria, con los siguientes linajes: *Oxyphotobacteria* (todas las cianobacterias capaces de realizar fotosíntesis oxigénica) y *Melainabacteria* (266). Después de divergir de *Melainabacteria*, las *Oxyphotobacteria* desarrollaron la capacidad de realizar la fotosíntesis oxigénica, hace alrededor de 2.400 millones de años, según las estimaciones del reloj molecular y datos geológicos (259,270,272).

Hasta la fecha, sólo se han secuenciado unos pocos genomas de *Melainabacteria* (270). Por lo tanto, las funciones biológicas, las características metabólicas y la posición ecológica de estos microorganismos son poco conocidas. Se han identificado especies de *Melainabacteria* en diferentes entornos, incluidos aguas subterráneas (265), biopelículas de algas y aguas de lagos

(270,273), sedimentos marinos y áreas lacustres (274) y en heces de animales y humanos (266), como así también en intestinos (274). Los datos genómicos respaldan la ausencia de toda la maquinaria fotosintética en *Melainabacteria*, lo que es consistente con la hipótesis de que su divergencia generó la incorporación de los fotosistemas en *Oxyphotobacteria* (266,270).

El descubrimiento de las cianobacterias no fotosintéticas de la clase *Melainabacteria* despertó el interés por estudiar tanto la evolución como la fisiología y la relevancia ecológica de estos organismos. En consecuencia, la caracterización de las enzimas que intervienen en los principales segmentos metabólicos (como lo es la síntesis de glucógeno) es esencial para complementar los criterios bioquímicos que contribuyen a clasificar y comprender el comportamiento metabólico de este nuevo grupo de bacterias. En este contexto, nos planteamos analizar bioquímicamente las propiedades de la ADP-Glc PPasa de dos organismos pertenecientes a *Melainabacteria*, una de origen intestinal y otra de vida libre, como así también la ADP-Glc PPasa de *Anabaena* PCC 7120 (*AnaGlgC*), una cianobacteria fotosintética. El contexto diferencial presentado en cuanto a las propiedades regulatorias y estructurales de dichas enzimas sitúa al trabajo realizado en esta Tesis en una posición clave para un mejor entendimiento de las relaciones entre la estructura y las propiedades alostéricas de ADP-Glc PPasas de cianobacterias no fotosintéticas.

### 3.2. OBJETIVOS

Analizar las propiedades cinéticas, regulatorias y estructurales de las ADP-Glc PPasas de una *Melainabacteria* intestinal y otra de vida libre, cianobacterias no fotosintéticas, particularmente debido al reciente descubrimiento de las mismas y su posición en un enclave evolutivo crítico. Además, realizar una comparación con la enzima de *Anabaena* PCC 7120, una cianobacteria fotosintética. De esta manera, poder obtener información y realizar un análisis comparativo que permita alcanzar una mejor comprensión de los cambios evolutivos experimentados por la enzima ADP-Glc PPasa, la cual cataliza el paso regulatorio de la síntesis de polisacáridos de reserva en bacterias. Para esto se contemplan los siguientes pasos:

- Realizar un análisis filogenético de las ADP-Glc PPasas mencionadas anteriormente, basado en las secuencias de proteínas homólogas para comprender la relación evolutiva entre las enzimas a estudiar en esta Tesis y otras de diferentes organismos.
- Realizar el clonado molecular de los genes *glgC* putativos que codificarían para las correspondientes ADP-Glc PPasas de *Melainabacteria* intestinal y de vida libre.
- Realizar el clonado del gen *glgC* que codifica para la enzima de *Anabaena* PCC 7120, para poder producir la respectiva enzima en forma recombinante con alto grado de pureza en *E. coli*.
- Determinar la estructura cuaternaria de las ADP-Glc PPasas provenientes de *Melainabacteria*.
- Determinar y analizar las propiedades cinéticas de los productos proteicos de los genes anteriormente mencionados. Determinar los parámetros cinéticos de las proteínas en estudio para así establecer las relaciones de estructura a función.
- Analizar la sensibilidad de estas enzimas a diferentes efectores alostéricos y correlacionar los datos cinéticos obtenidos con los datos determinados para otras ADP-Glc PPasas.
- Realizar un estudio comparativo con la enzima de organismos fotosintéticos y alcanzar una mejor comprensión de los cambios evolutivos experimentados por la ADP-Glc PPasa.
- Determinar sus estructuras tridimensionales para poder compararlas con estructuras de ADP-Glc PPasas ya determinadas. A partir de esto, analizar la conservación de dominios o motivos estructurales a lo largo de la evolución.

### 3.3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.3.1. Reactivos químicos y materiales

Todos los reactivos utilizados fueron de la máxima calidad disponible, de grado “pro-análisis” o similar. Los materiales y reactivos químicos empleados en esta Tesis se obtuvieron comercialmente de las siguientes compañías:

- *Componentes de medios bacteriológicos*: Britania, Cicarelli.
- *Reactivos de biología molecular*: Promega, Invitrogen, Fermentas, Novagen, Stratagene, Pierce, New England BioLabs, Productos Bio-Lógicos (PBL).
- *Materiales utilizados en la purificación de proteínas y otros reactivos relacionados a proteínas*: GE Healthcare, Qiagen.
- *Filtros y columnas de desalado*: Sartorius, Millipore.
- *Reactivos químicos*: Sigma-Aldrich, Merck, Perkin Elmer, Amersham Bioscience.
- *Genes y oligonucleótidos sintéticos*: Bio Basic Inc, Macrogen.

#### 3.3.2. Cepas bacterianas

Para el clonado de los diferentes genes y la expresión recombinante de las proteínas caracterizadas en este Capítulo, se emplearon las cepas de *E. coli* que se disponen en nuestro grupo de trabajo, descritas a continuación.

***E. coli* Top10 F<sup>-</sup>**: F<sup>-</sup> *mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74 recA1 araD139  $\Delta$ (*ara-leu*)7697 *galU galK*  $\lambda$ -*rpsL* (Str<sup>R</sup>) *endA1 nupG*. Esta cepa fue empleada durante las etapas de biología molecular para generar las construcciones de expresión.*

***E. coli* BL21 (DE3)**: F<sup>-</sup> *ompT hsdS<sub>B</sub>* (*r<sub>B</sub><sup>-</sup>*, *m<sub>B</sub><sup>-</sup>*) *gal dcm* (DE3). Esta cepa fue empleada para la expresión recombinante de las enzimas caracterizadas en este trabajo.

#### 3.3.3. Medios de cultivo y antibióticos

***Lysogeny broth* (LB)**: extracto de levadura 5 g/l, tripteína 10 g/l y NaCl 5 g/l, pH 7.

***LB-agar***: medio LB suplementado con agar-agar 1,6% (p/v).

***YT2X***: extracto de levadura 10 g/l, tripteína 16 g/l y NaCl 5 g/l.

Los cultivos de *E. coli* se realizaron con el agregado de antibióticos como marcadores de selección [100  $\mu$ g/ml de ampicilina, 50  $\mu$ g/ml de kanamicina, 30  $\mu$ g/ml de cloranfenicol o 100  $\mu$ g/ml de espectinomicina], según el caso de la cepa transformada que se esté utilizando. En los cultivos destinados a la expresión de proteínas recombinantes, se utilizó el inductor correspondiente en concentraciones adecuadas para cada caso. La temperatura empleada para el crecimiento de *E. coli* fue de 37 °C.

### 3.3.4. Plásmidos

Durante el desarrollo de este Capítulo se emplearon distintos plásmidos de expresión para la obtención de las proteínas recombinantes con diferentes estrategias de expresión. Los mismos se detallan a continuación:

**pET28 (b+) y (c+):** vector de expresión para sistemas bacterianos de *E. coli*. La expresión de la proteína de interés es inducida mediante la síntesis de la T<sub>7</sub> RNA polimerasa, cuyo gen está presente en la célula huésped bajo el control del promotor *lac*. El vector es inducible con IPTG (un análogo de la lactosa) y permite incorporar una etiqueta de poli-histidinas (*His-tag*) en el extremo N-terminal de la proteína, para facilitar la posterior purificación de la misma. Este plásmido confiere a la célula resistencia al antibiótico kanamicina.

**pET24 (a+):** vector de expresión para sistemas bacterianos de *E. coli*. Se obtiene la proteína con el agregado de *His-tag* en el extremo C-terminal de la proteína. El vector es inducible con IPTG y le confiere a la célula resistencia al antibiótico kanamicina.

### 3.3.5. Obtención de genes sintéticos

Los genes codificantes para las ADP-Glc PPasas de *Melainabacteria* intestinal y de vida libre, y para la ADP-Glc PPasa de *Anabaena* PCC 7120 caracterizadas en este Capítulo se obtuvieron por síntesis *de novo* (Bio Basic, Canadá). Los codones fueron optimizados para su expresión en *E. coli*, con la adición de los sitios de restricción *NdeI* y *SacI* en los extremos 5' y 3', respectivamente, y se insertaron en el vector pET28c.

### 3.3.6. Digestión con enzimas de restricción

Para realizar el subclonado de los genes, los mismos se liberaron a partir del vector de clonado con las enzimas de restricción que permitieran su incorporación de manera adecuada en el vector de expresión seleccionado, previamente digerido con las mismas enzimas de restricción. Además, el análisis de restricción es útil para confirmar la presencia del gen de interés en el vector en estudio. Las reacciones de digestión contenían 1-2 µg de ADN plasmídico, el *buffer* de reacción correspondiente que provee el fabricante y de 10 a 20 U de la enzima de restricción (Promega o Fermentas); se incubaron durante 3 h a 37 °C. Las digestiones se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa y, en el caso de utilizarse para subclonado, el inserto liberado se purificó a partir del gel.

### 3.3.7. Precipitación de ADN

La precipitación de ADN se utiliza para eliminar todos los componentes no deseados de la mezcla de reacción luego de, por ejemplo, una digestión con enzimas de restricción. En este caso se utilizó como paso intermedio de la digestión sucesiva con distintas enzimas de restricción, o

en la purificación final de los vectores de expresión digeridos con el objeto de subclonar los genes de interés. Para precipitar una solución de ADN se le agregaron 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3 M, pH 4,8 y 2 volúmenes de etanol (pro-análisis). La mezcla se incubó a 4 °C durante toda la noche. Posteriormente, se centrifugó a 18.000  $\times g$  a 4 °C durante 15 min, se eliminó el sobrenadante, el precipitado de ADN se lavó con etanol 70% (v/v) y se dejaron evaporar los restos de etanol 15 min a 25 °C. Por último, se resuspendió el ADN en H<sub>2</sub>O ultrapura esterilizada por calor.

### 3.3.8. Electroforesis en geles de agarosa

Los fragmentos de ADN se separaron electroforéticamente en geles de agarosa al 1% (p/v) en *buffer* TAE 1X (Tris 40 mM, pH 8; ácido acético 40 mM; EDTA 1 mM) con la adición de *Gel Green* 1X (Biotium) en una concentración final de 0,3  $\mu g/ml$ . Las muestras se acondicionaron antes de su corrida con glicerol 3% (v/v) y Azul de Bromofenol 0,05% (p/v). Se utilizó el sistema *Mini-Sub<sup>®</sup> Cell GT* (Bio-Rad) para la corrida propiamente dicha y la visualización de los fragmentos de ADN se realizó a través del transiluminador *UltraSlim Led illuminator* (MaestroGen). La identificación de los productos se llevó a cabo por comparación con marcadores de masa molecular adecuados (100 pb, 400 pb; *Ladder* PB-L Productos Bio-Lógicos).

### 3.3.9. Purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa

Para purificar fragmentos de ADN a partir del gel de agarosa, la banda de interés se escindió del gel y se purificó con las herramientas comerciales *Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) y *EasyPure<sup>®</sup> Quick Gel Extraction Kit* (TransGen Biotech), siguiendo los protocolos especificados por cada fabricante.

### 3.3.10. Ligación de fragmentos de ADN

Las ligaciones se realizaron utilizando la enzima T<sub>4</sub> ADN ligasa (PBL), siguiendo las indicaciones del proveedor. En el caso de las reacciones que implicaron la ligación de los diferentes genes a los vectores de expresión seleccionados, se empleó una mezcla inserto:vector en una relación molar 5:1, la que fue previamente calentada 5 min a 65 °C, luego se agregaron 2 U de ligasa en el *buffer* provisto por el fabricante, en un volumen final de 20  $\mu l$ . Las ligaciones se incubaron toda la noche a 16 °C y luego se utilizaron para transformar células competentes de *E. coli*.

### 3.3.11. Transformación de células de *E. coli* competentes

Para permitir la incorporación de ADN plasmídico exógeno, las células de *E. coli* se hicieron competentes utilizando el método de CaCl<sub>2</sub>. Los pasos seguidos se indican a continuación. Las bacterias se cultivaron hasta saturación en medio LB durante toda la noche a 37 °C. Luego se

realizó una dilución 1/100 en medio LB fresco y se incubó en las mismas condiciones hasta alcanzar una DO a 600 nm de ~0,4, de manera de obtener un cultivo en fase exponencial de crecimiento. Se tomaron alícuotas de 1 ml en tubos plásticos de 1,5 ml y se separaron las células por centrifugación a 5.000 xg durante 5 min a temperatura ambiente. Luego, se resuspendieron en 500 µl de solución ST1 (MOPS-NaOH 50 mM, KCl 10 mM, pH 7). Se centrifugaron nuevamente en las mismas condiciones que el paso anterior y se resuspendieron en 500 µl de solución ST2 (MOPS-NaOH 50 mM, KCl 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 100 mM, pH 6,5). Se incubaron 15 min en hielo y se separaron las células mediante una nueva centrifugación. Finalmente, se resuspendieron en 100 µl de ST2. A estas células competentes se les adicionaron 2 µl de ADN plasmídico (o 5 µl de la reacción de ligación). La mezcla se incubó en hielo durante 1 h y luego se realizó el tratamiento térmico por 45 s a 42 °C. Las células fueron enfriadas en hielo durante 2 min, diluidas en 1 ml de medio LB e incubadas 1 h a 37 °C. Por último, las células se centrifugaron 5 min a 5.000 xg y se resuspendieron en 100 µl de medio LB remanente, para posteriormente sembrarlas en placas de Petri conteniendo medio LB-agar suplementado con el/los antibióticos correspondientes, según la construcción plasmídica con la que se haya transformado. Las placas se incubaron toda la noche a 37 °C y se seleccionaron clones para continuar con el análisis.

### 3.3.12. Minipreparación de ADN plasmídico

Para la extracción de ADN plasmídico a partir de células de *E. coli* transformadas, los clones de interés se repicaron en 4 ml de medio LB líquido suplementado con el antibiótico correspondiente y se cultivaron a 37 °C durante toda la noche. Las células se cosecharon por centrifugación a 3.000 xg durante 10 min y se extrajo el ADN plasmídico utilizando el *kit* comercial *EasyPure® Plasmid MiniPrep Kit* (TransGen Biotech), siguiendo las especificaciones indicadas. La calidad y cantidad del ADN plasmídico se corroboró por electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v). El plásmido recuperado se almacenó a -20 °C hasta su utilización.

### 3.3.13. Secuenciación de ADN

Los plásmidos que contenían los genes de interés se enviaron a secuenciar para corroborar que la secuencia del gen sea la correcta. Para esto, una alícuota de una minipreparación de ADN plasmídico, con una concentración aproximada de 100 ng/µl, se envió a la empresa MacroGen Inc (Seúl, Corea del Sur) para ser secuenciada de forma automatizada utilizando oligonucleótidos específicos que hibridan en una región del plásmido cercana al sitio de inserción del gen.

### 3.3.14. Creación de un banco de células

Con el objetivo de normalizar las condiciones de cultivos y expresión de los distintos clones, se construyó un banco central de células para cada cepa de expresión. Las reservas de células se

prepararon a partir del cultivo de una única colonia de cada clon de expresión y se almacenaron a -80 °C en medio LB suplementado con glicerol 25% (v/v).

### 3.3.15. Optimización de condiciones de expresión

Un vial tomado del banco de células de expresión, conteniendo células transformadas con la construcción plasmídica que porta el gen de interés, se cultivó en 5 ml de medio suplementado con el antibiótico correspondiente, durante toda la noche a 37 °C y en agitación. Este cultivo se diluyó 1/100 con medio fresco suplementado con antibiótico y se incubó a 37 °C, con agitación a 200 rpm, hasta alcanzar una DO entre 0,5 y 0,6. Alcanzada la DO necesaria, se indujo la expresión de la proteína mediante el agregado del inductor (IPTG). La temperatura, el tiempo y la concentración del agente inductor se ajustaron de modo de optimizar la expresión de la proteína recombinante.

### 3.3.16. Expresión y purificación de las proteínas recombinantes

Una vez optimizadas las condiciones de expresión para cada proteína en particular, se llevó a cabo su producción a mayor escala. Para ello, a partir de un vial de células de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con las respectivas construcciones plasmídicas que portan los genes de interés, se realizó el cultivo del clon productor durante toda la noche a 37 °C, en agitación y suplementado con el antibiótico correspondiente. Luego, este cultivo se utilizó para inocular 1 L de medio de cultivo YT2X con el antibiótico adecuado. El medio de cultivo inoculado se incubó a 37 °C con agitación a 200 rpm, hasta que alcanzó una DO a 600 nm de ~0,6. En este momento se indujo la expresión de la proteína de interés mediante el agregado del inductor IPTG 0,1 mM. Las células se cultivaron durante 16 h a 18 °C y 200 rpm. Para cosechar las células, se centrifugó el cultivo a 4 °C durante 10 min a 5.000 xg, se descartó el sobrenadante y se conservaron a -20 °C hasta su uso.

Las células se resuspendieron en una cantidad adecuada de *buffer* H [Tris-HCl 25 mM pH 8, NaCl 300 mM, imidazol 10 mM, glicerol 5% (v/v)] y se enfriaron en un baño de hielo. Luego, se rompieron por ultrasonido con un procesador de alta intensidad *VibraCell™ VCX 130* (Sonics). Para la disrupción de *E. coli*, se aplicaron pulsos de 4 s cada 2 s, durante una sesión de 10 min de tiempo efectivo. El lisado celular resultante se centrifugó a 30.000 xg durante 20 min a 4 °C, hasta obtener un sobrenadante limpio de partículas en suspensión.

### 3.3.17. Cromatografía de afinidad por metal inmovilizado

La cromatografía de afinidad por metal inmovilizado (IMAC) fue utilizada para la purificación de proteínas recombinantes que contienen una etiqueta de poli-His en el extremo N- o C-terminal. La purificación se realizó utilizando un método automatizado empleando el equipo *ÄKTA Explorer 100* (GE Healthcare). La fracción soluble obtenida luego del proceso de

disrupción se sembró en una columna comercial de 1 ml con la resina quelante cargada con Ni<sup>2+</sup> (His-Trap HP, GE Healthcare), previamente equilibrada con *buffer* H. La elución de la proteína retenida se llevó a cabo mediante un gradiente lineal de imidazol en un rango de 10-300 mM, contenido en el *buffer* I [Tris-HCl 25 mM pH 8, NaCl 300 mM, imidazol 300 mM, glicerol 5% (v/v)]. Se recolectaron alícuotas de todas las fracciones, las cuales fueron evaluadas por actividad enzimática y SDS-PAGE. Las fracciones que contenían actividad enzimática y la proteína con mayor grado de pureza, se reunieron y concentraron utilizando un dispositivo de ultrafiltración (Millipore, límite de corte 5-30 kDa) a 4 °C. Para el caso de las ADP-Glc PPasas de *Melainabacteria* y *Anabaena* caracterizadas en este Capítulo, se les realizó un cambio de *buffer* para su conservación [HEPES-NaOH 50 mM pH 8, Suc 10% (p/v), DTT 0,2 mM, EDTA 1 mM]. Por último, se suplementaron con glicerol 10% (v/v) para ser almacenadas a -80 °C hasta su posterior análisis. En estas condiciones, las enzimas permanecieron activas por al menos 12 meses.

### 3.3.18. Electroforesis en geles de poliacrilamida

Para verificar la eficiencia de la expresión y analizar los perfiles electroforéticos de las proteínas recombinantes caracterizadas, se utilizó la electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), siguiendo la técnica descrita por Laemmli (275). Se utilizaron como soportes geles discontinuos con diferentes concentraciones de acrilamida. La concentración del gel de apilamiento fue de 4%, mientras que la concentración del gel de separación fue variada entre 10 y 12%, según la masa molecular de las proteínas a analizar. Las muestras fueron desnaturalizadas antes de su siembra mediante la adición de *buffer* de siembra SDS-PAGE 4X con agente reductor [SDS 8% (p/v), β-ME 20%, en Tris-HCl 250 mM pH 6,7, glicerol 40% (v/v), Azul de Bromofenol 0,2% (p/v)], seguido de un calentamiento a 100 °C durante 5 min. Como marcadores de masa molecular se emplearon: Suc sintasa (97,0 kDa), BSA (66,0 kDa - Sigma), manitol deshidrogenasa (40,0 kDa), RFP (29,0 kDa), β-lactoglobulina (18,4 kDa - Sigma) y lisozima (14,4 kDa - Sigma). La Suc sintasa, la manitol deshidrogenasa y RFP son producidas en forma recombinante en nuestro grupo de trabajo. Una vez sembradas las muestras, la corrida electroforética se realizó aplicando una corriente de intensidad constante de 25 mA por cada gel durante 1 h en *buffer* de corrida [Tris-HCl 0,3% (p/v) pH 8,3, glicina 1,44% (p/v), SDS 0,1% (p/v)], empleando un equipo *Mini Protean III* (Bio-Rad). Finalizada la corrida electroforética, las proteínas en el gel se visualizaron mediante la tinción con *Coomassie*<sup>®</sup> *Brilliant Blue* R-250 en una solución de metanol 50% (v/v) y ácido acético 10% (v/v). Posteriormente, se procedió a la decoloración en una solución de metanol 5% (v/v) y ácido acético 7% (v/v).

### 3.3.19. Cambio de medios y concentración de proteínas

Para cambiar el medio de las soluciones proteicas y/o para concentrar las proteínas, se emplearon dispositivos comerciales de ultrafiltración Amicon (Millipore) con un límite de corte apropiado para cada proteína (de 5 a 30 kDa) y se procedió según las indicaciones del fabricante. La ultrafiltración es un proceso convectivo que utiliza una combinación de centrifugación y filtración mediante membranas semipermeables para separar macromoléculas del solvente según su tamaño molecular. Es particularmente propicia para la concentración de macromoléculas y el cambio de solventes. La centrifugación de los tubos se realizó a 3.000  $\times g$  a 4 °C.

### 3.3.20. Cuantificación de proteínas

Para determinar la concentración total de proteínas en las muestras, se empleó el método de Bradford (276), utilizando una solución de BSA (Sigma) como patrón. Las lecturas de absorbancia se realizaron a 595 nm en un espectrofotómetro de microplacas UV/visible *Multiskan GO* (Thermo Fisher Scientific).

### 3.3.21. Cromatografía de filtración por geles: Determinación de la masa molecular

Para determinar la masa molecular (MM) al estado nativo de las proteínas bajo estudio, se utilizó una columna *Superdex 200 10/300* (GE Healthcare) conectada a un equipo *ÅKTA Explorer 100* (GE Healthcare). Las cromatografías se realizaron a 0,5 ml/min en *buffer G* [HEPES-NaOH 50 mM pH 8, NaCl 100 mM, EDTA 0,1 mM]. La columna se calibró utilizando las siguientes proteínas: ribonucleasa (13,7 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa), ovoalbúmina (44 kDa), conalbúmina (75 kDa), aldolasa (158 kDa), ferritina (440 kDa) y tiroglobulina (669 kDa), contenidas en el *kit* comercial *Gel Filtration Calibration Kit - High Molecular Weight* (GE Healthcare). El volumen muerto o  $V_0$  de la columna se determinó empleando una solución de Azul de Dextrano (Promega). La curva de calibrado se realizó graficando el  $K_{av}$  en función del log de la MM de los marcadores comerciales. El  $K_{av}$  se obtiene a partir de la siguiente ecuación:  $K_{av} = (V_e - V_0) / (V_c - V_0)$ ; donde  $V_e$  es el volumen de elusión de la proteína de interés,  $V_0$  es el volumen muerto y  $V_c$  es el volumen de la columna. A partir de esta curva fueron determinadas las masas moleculares de las enzimas en estudio.

### 3.3.22. Ensayos de actividad enzimática

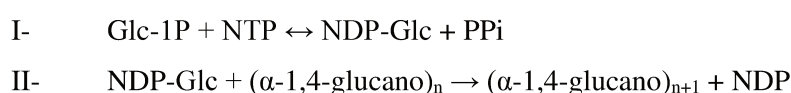
Todas las actividades enzimáticas de las enzimas estudiadas se expresaron en U/mg. Una unidad de actividad enzimática (U) es definida como la cantidad de enzima necesaria para producir/consumir 1  $\mu$ mol de producto/sustrato en 1 min, bajo las condiciones especificadas para cada ensayo.

### 3.3.22.1. Determinación de la actividad de la ADP-Glc PPasa: Método colorimétrico

La actividad de las ADP-Glc PPasas estudiadas en este Capítulo se evaluó en sentido de la síntesis de ADP-Glc mediante el método colorimétrico de alta sensibilidad desarrollado por nuestro grupo de trabajo (277). El mismo se basa en la cuantificación de Pi liberado durante la hidrólisis específica de uno de los productos de la actividad de la enzima, el PPI. Específicamente, durante la síntesis de ADP-Glc a partir de ATP y el azúcar-1P (por ejemplo, Glc-1P) se libera PPI, el cual es hidrolizado a Pi por una pirofosfatasa inorgánica. El Pi es luego cuantificado mediante la formación de un complejo de fosfomolibdato-Verde de Malaquita, el cual presenta un color verde y es detectado a 630 nm. El medio de reacción estándar contenía: MOPS-NaOH 50 mM pH 8, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, ATP 1,5 mM, Glc-1P 1,5 mM, BSA 0,2 mg/ml, 0,5 U/ml de pirofosfatasa inorgánica de levadura (EC 3.6.1.1, producida en forma recombinante en nuestro laboratorio) y una dilución adecuada de la enzima. El ensayo se inició con el agregado del correspondiente monosacárido-1P y se llevó a cabo durante el tiempo necesario para obtener una señal adecuada, generalmente 10 min, sin alcanzar un consumo de sustratos mayor al 5%. Las reacciones se incubaron a 37 °C en un volumen final de 50 µl y se detuvieron con la adición de 375 µl del reactivo de color (el cual se prepara en medio ácido), seguido del agregado de 50 µl de citrato de sodio 34% (p/v). Una alícuota de 250 µl de esta mezcla se dispensó en placas multipocillos y se determinó la absorbancia a 630 nm en un lector de ELISA *Multiskan GO* (Thermo Fisher Scientific). Paralelamente a la determinación, se estableció una curva de calibrado con testigos de PPI y se obtuvo el factor de conversión de absorbancia a nanomoles. El reactivo de color se preparó mezclando 3 volúmenes de Verde de Malaquita (Sigma) al 0,022% (p/v) y 1 volumen de molibdato de amonio 4,2% (p/v) en HCl 5 N. Luego de homogenizar durante 30 min y filtrar, a 5 ml de la solución obtenida se le adicionaron 100 µl de Tween 20 al 2% (v/v).

### 3.3.22.2. Determinación de la actividad de la ADP-Glc PPasa: Método cinético con enzimas acopladas

La actividad de las ADP-Glc PPasas con el efector Pi se determinó en la dirección de la síntesis de ADP-Glc. Para estas medidas, se utilizó un método cinético acoplado a la piruvato quinasa de músculo de conejo (PK, reacción III, Sigma) y la lactato deshidrogenasa de *Lactobacillus* (LDH, reacción IV, Sigma) (278). Este procedimiento sigue la generación de NDP midiendo la desaparición de NADH, según las siguientes reacciones:



**Acople enzimático**

- III-    NDP + PEP → NTP + Pyr            *Piruvato quinasa*  
 IV-    Pyr + NADH ↔ Lactato + NAD<sup>+</sup>    *Lactato deshidrogenasa*

La mezcla de ensayo estándar contenía MOPS-NaOH 50 mM pH 8, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, PEP 0,3 mM, NDP-Glc 1 mM, NADH 0,3 mM, BSA 0,2 mg/ml, PK 0,1 U/μl (EC 2.7.1.40), LDH 0,02 U/μl (EC 1.1.1.27) y enzima en una dilución adecuada. La reacción se inició por el agregado de Glc-1P 2 mM. Para evaluar la actividad de las ADP-Glc PPasas, se agregó a la mezcla de reacción ATP 2 mM, glucógeno de hígado de conejo 1 mg/ml y 0,8 U/μl de glucógeno sintasa de *E. coli*. En todas las experiencias en las que se haya seguido la oxidación/reducción de NADH/NAD<sup>+</sup> a 340 nm, se empleó el coeficiente de extinción molar de 6,22 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> para determinar la variación de la forma reducida de la coenzima en el medio. A menos que se especifique lo contrario, los ensayos fueron realizados durante 10 min a 37 °C, en un volumen final de 50 μl utilizando un lector de microplacas UV/visible *Multiskan GO* (Thermo Fisher Scientific).

**3.3.22.3. Determinación de los parámetros cinéticos**

Los datos de actividad enzimática se graficaron en función de la concentración de sustrato o efector utilizando el programa Origin 8.1 (OriginLab). Los parámetros cinéticos  $V_{\max}$  y  $S_{0,5}$  (siendo este último la concentración de sustrato ([S]) que produce el 50% de la velocidad máxima,  $V_{\max}$ ) fueron determinados mediante ensayos en los que se varió la concentración de uno de los sustratos, manteniendo los otros a concentraciones fijas. Por otro lado, para determinar las constantes cinéticas,  $A_{0,5}$  e  $I_{0,5}$  (la concentración de efector que produce el 50% de la máxima activación o inhibición, respectivamente), se ensayaron distintas concentraciones de efectores en condiciones saturantes para los sustratos.

Para calcular estas constantes cinéticas, los datos experimentales se ajustaron a la ecuación de Hill modificada:  $v = V_{\max} [S]^{n_H} / (S_{0,5}^{n_H} + [S]^{n_H})$ ; donde  $n_H$  es el coeficiente de Hill (279). En el caso de que una enzima presente un comportamiento hiperbólico ( $n_H$  igual a 1), la ecuación de Hill modificada se convierte en la ecuación de velocidad descripta por Briggs-Haldane, conocida como de Michaelis-Menten, en la cual el  $S_{0,5}$  es equivalente a la  $K_m$ . Los valores de  $k_{\text{cat}}$  se calcularon utilizando la  $V_{\max}$  expresada en U/mg y considerando la masa molecular teórica de cada una de las enzimas. Los valores de las constantes cinéticas son el resultado de al menos dos determinaciones, con una variación menor al 10%. Los valores de las mismas se expresan  $\pm$  su error estándar, calculado por el programa informático a partir del ajuste de los datos experimentales a la ecuación utilizada.

### 3.3.23. Tratamiento informático

#### 3.3.23.1. Análisis de secuencias

Los análisis de secuencias requirieron el uso de bases de datos *on line* como:

- NCBI (Blast, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).
- CAZy (<http://www.cazy.org/> (194)).
- Brenda-Enzyme (<http://www.brenda-enzymes.org/>).
- KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>).

El diseño de los oligonucleótidos para amplificar por PCR los genes y los alineamientos de secuencias de proteínas y ADN, para corroborar el resultado de las secuenciaciones y las diferencias entre secuencias, identidad y similitud se realizaron con el programa *Vector NTI 10.0*.

#### 3.3.23.2. Construcción del árbol filogenético

El análisis filogenético se realizó siguiendo los pasos:

1. Se obtuvieron las secuencias de interés (formato FASTA) a partir de la base de datos NCBI.
2. Se alinearon las secuencias de interés utilizando el programa Bio-Edit.
3. El alineamiento fue refinado manualmente.
4. Con estos resultados, se procedió a la construcción del árbol filogenético utilizando la aplicación PhyML del programa SeaView 5 (<https://doua.prabi.fr/software/seaview/> (280)).
5. La figura se armó utilizando el programa FigTree 1.3 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

#### 3.3.23.3. Modelado molecular

Se construyeron los modelos 3D de las ADP-Glc PPasas de *Melainabacteria* y de *Anabaena* PCC 7120 utilizando el algoritmo desarrollado por Google, AlphaFold2 (281). Este algoritmo estima la estructura terciaria de proteínas utilizando información evolutiva. AlphaFold es un sistema de inteligencia artificial desarrollado por DeepMind que realiza predicciones de última generación de estructuras de proteínas a partir de sus secuencias de aminoácidos. Esto ha posibilitado la construcción de buenos modelos estructurales sin la necesidad de plantillas estructurales. La confiabilidad de los respectivos modelos fue evaluada utilizando el programa *Verify3D* (<https://www.doe-mpi.ucla.edu/verify3d/> (282)).

### 3.4. RESULTADOS

#### 3.4.1. Análisis filogenético

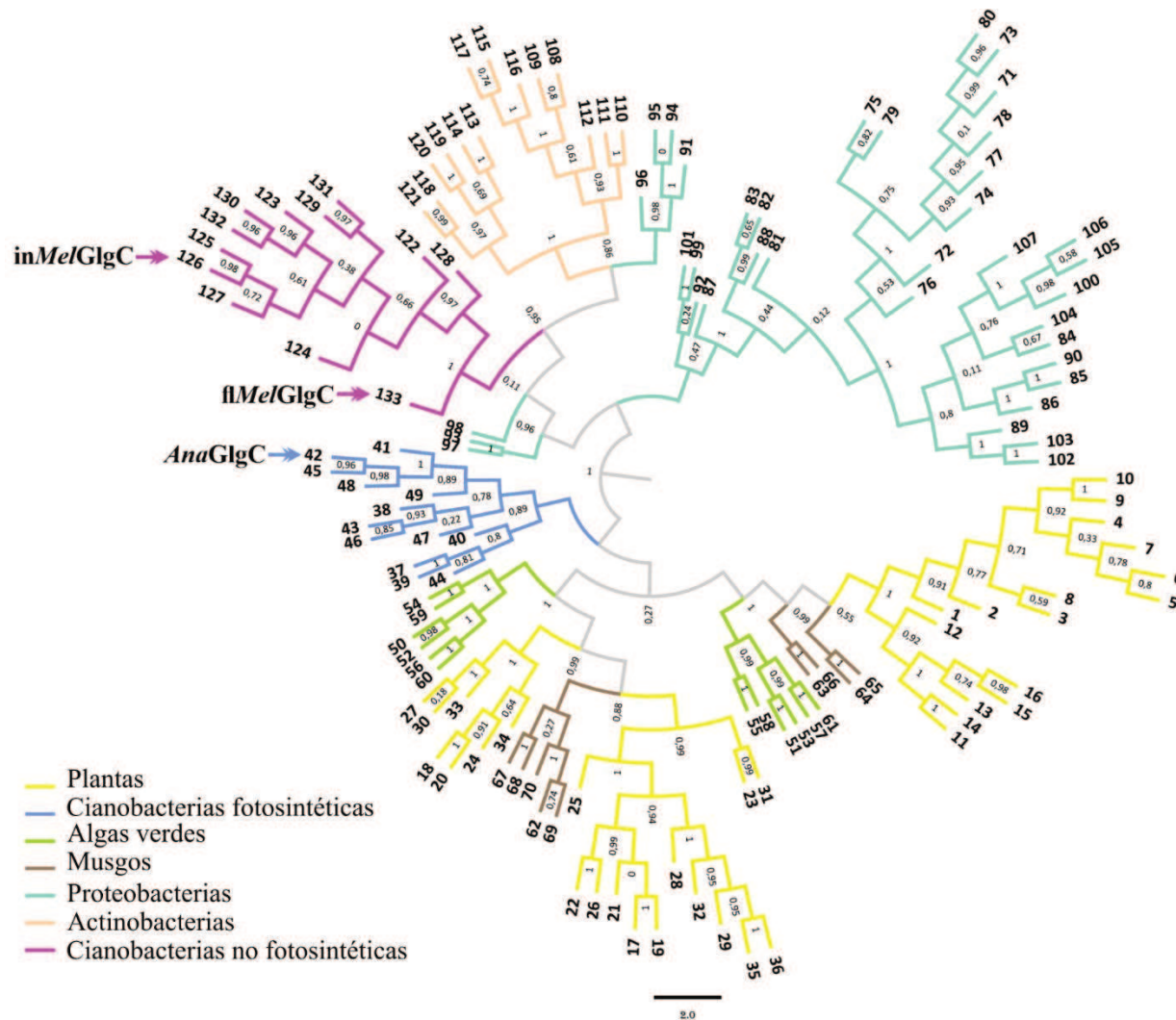
Uno de los objetivos de mayor relevancia en esta Tesis consistió en realizar un análisis exhaustivo de las características cinéticas, regulatorias y estructurales de la ADP-Glc PPasa presente en cianobacterias. Este enfoque cobra especial significado ante el descubrimiento reciente de cianobacterias no fotosintéticas, las cuales ocupan una posición de suma importancia en un contexto evolutivo crucial, como es el caso de *Melainabacteria*. A partir de esto, hemos identificado a través de exhaustivos análisis en bases de datos la presencia de genes *glgC* putativos en estos microorganismos. El análisis se inició con la realización de un árbol filogenético de las respectivas GlgCs.

Las ADP-Glc PPasas de *Melainabacteria* poseen un 66,18% de identidad entre ellas; ~35% con *AnaGlgC*; ~43% con la GlgC de *A. tumefaciens*; y ~44% con la de *S. coelicolor*. Con el objetivo de obtener más información sobre la relación evolutiva entre las ADP-Glc PPasas de *Melainabacteria* y las enzimas de otros grupos taxonómicos, extendimos la comparación de secuencias de aminoácidos de GlgCs, construyendo el árbol filogenético presentado en la Figura 3. Llamativamente, el análisis filogenético muestra que las secuencias de *Melainabacteria* forman un grupo separado, distante de las secuencias de bacterias que realizan fotosíntesis oxigénica (Figura 3). De hecho, las ADP-Glc PPasas de *Melainabacteria* se ubican más cerca de las proteínas de bacterias heterótrofas, particularmente Actinobacteria, que de las de cianobacterias fotosintéticas.

Como se observa en la Figura 3, existe una notable separación entre las GlgCs de organismos fotosintéticos y de aquellos que no realizan fotosíntesis. Particularmente, *AnaGlgC* se encuentra agrupada en forma definida en el grupo de cianobacterias fotosintéticas. Cercano a este clado, se encuentran las ADP-Glc PPasas de algas verdes, musgos y plantas, con las cuales comparten las mismas propiedades regulatorias, en cuanto a efectores alostéricos. La ADP-Glc PPasa de cianobacterias fotosintéticas difiere en su estructura cuaternaria de la enzima de algas verdes y plantas superiores (110). La enzima cianobacteriana es un homotetrámero (como es el caso de la enzima de bacterias no pertenecientes a Firmicutes); mientras que, la enzima de plantas está compuesta por dos subunidades pequeñas (S; 50–54 kDa) y dos grandes (L; 54–60 kDa), conformando un heterotetrámero  $S_2L_2$  (51). Las GlgCs de cianobacterias no fotosintéticas, como *Melainabacteria*, se agrupan en un clado totalmente separado del de las ADP-Glc PPasas de organismos fotosintéticos, como se muestra en el árbol filogenético de la Figura 3. Las enzimas correspondientes a cianobacterias no fotosintéticas están cercanamente relacionadas con las ADP-Glc PPasas del grupo Actinobacteria y de ciertos miembros de Proteobacteria. Por su parte, la mayoría de las GlgCs de Proteobacteria incluidas en el árbol constituyen un clado que diverge

de Actinobacteria y de las cianobacterias no fotosintéticas; además, se observa que están separadas de las enzimas de organismos fotosintéticos (Figura 3).

En resumen, el análisis filogenético ha permitido discernir vínculos evolutivos entre las ADP-Glc PPasas de *Melainabacteria* y las de otros grupos bacterianos. Este análisis no sólo aclara la posición de estas enzimas en el árbol, sino que también abre líneas interesantes de investigación para comprender las bases evolutivas y funcionales de estas enzimas cruciales en la síntesis de glucógeno.



**Figura 3:** Árbol filogenético de ADP-Glc PPasas de diferentes organismos. Se colectaron las secuencias polipeptídicas de GlcCs y con las mismas se realizó la construcción del árbol como se indica en Materiales y Métodos. Los diferentes colores representan las distintas taxonomías como se indica. La Tabla Suplementaria S1 detalla los números y nombres de las secuencias de proteínas.

### 3.4.2. Identificación de genes *glgC*

La realización del análisis filogenético permitió obtener información relevante sobre las relaciones evolutivas entre las enzimas ADP-Glc PPasas de *Melainabacteria* y otros grupos taxonómicos. Los genes *glgC* responsables de codificar las putativas ADP-Glc PPasas en una *Melainabacteria* intestinal (*inMelglgC*) y otra de vida libre (*flMelglgC*) fueron identificados a partir de datos previamente publicados por otros autores (265,267). Con la finalidad de llevar a cabo un análisis comparativo exhaustivo, también se incluyó en nuestros estudios el gen que codifica para la ADP-Glc PPasa de *Anabaena* PCC 7120, una enzima que ya ha sido estudiada (152). Los genes *inMelglgC* (AOR37842.1, 1.236 pb), *flMelglgC* (OGI00355.1, 1.233 pb) y *AnaglgC* (BAB76344.1, 1.290 pb) se obtuvieron mediante síntesis *de novo* (Bio Basic Inc). Los mismos fueron diseñados con los codones de uso frecuente en *E. coli* y flanqueados con los sitios para las enzimas de restricción *NdeI* y *SacI*. Los genes se sintetizaron y se insertaron en el vector de expresión pET28b(+), obteniendo los plásmidos [pET28b/*inMelglgC*], [pET28b/*flMelglgC*] y [pET28b/*AnaglgC*]. La estrategia de clonado les confiere una etiqueta de His en el extremo N-terminal a las proteínas recombinantes obtenidas. Luego se procedió a la transformación de células competentes de *E. coli* BL21 (DE3) con cada una de las construcciones para la producción de las respectivas ADP-Glc PPasas. Asimismo, se realizó la expresión en ausencia de la etiqueta de His, utilizando el vector pET24a, a modo de corroborar que la misma no afecta el comportamiento cinético de esta enzima. Para esto, los 3 genes se sub-clonaron en el vector pET24a, utilizando los mismos sitios de restricción *NdeI* y *SacI*, quedando así [pET24a/*inMelglgC*], [pET24a/*flMelglgC*] y [pET24a/*AnaglgC*]. De esta manera, se produjeron las diferentes enzimas en presencia y ausencia del His-tag.

### 3.4.3. Obtención de las ADP-Glc PPasas de *Melainabacteria* y de *Anabaena* en forma recombinante

Para la obtención de las diferentes ADP-Glc PPasas se partió de 1 L de cultivo de *E. coli* BL21 (DE3) conteniendo la construcción correspondiente. Cada cultivo se creció en el medio YT2X, a 37 °C hasta una DO ~0,6 y se indujo con 0,1 mM de IPTG durante 16 h a 18 °C. Posteriormente, las células se cosecharon por centrifugación durante 10 min a 5.000 xg y 4 °C, luego se resuspendieron en *buffer* H (para las que poseen His-tag) o en *buffer* A (para las que no poseen His-tag) en una proporción de 3-4 ml por gramo de células. La ruptura celular se realizó por ultrasonido, seguido de dos centrifugaciones (30.000 xg) para separar detritos celulares de la fracción sobrenadante, la cual se utilizó para realizar las purificaciones de las proteínas recombinantes, como se detalla en el apartado de Materiales y Métodos de este Capítulo.

La sobreexpresión de las diferentes ADP-Glc PPasas de *Melainabacteria* y *Anabaena* PCC 7120 se realizó produciendo proteínas sin modificar o fusionadas a una etiqueta de His. El hecho de que la enzima posea el tag de His facilita su purificación mediante IMAC; sin embargo,

existen casos en los que esta etiqueta puede afectar los valores cinéticos de la enzima en cuestión. Por esto se decidió ensayar las diferentes enzimas con y sin el agregado de la etiqueta. Para las proteínas en ausencia de *His-tag*, se procedió a su purificación mediante cromatografía de intercambio iónico, utilizando una columna de 10 ml con resina DEAE-*Sepharose fast flow*, previamente equilibrada en *buffer* A. Las fracciones recolectadas fueron analizadas mediante determinación de actividad enzimática y SDS-PAGE. Las fracciones más activas y puras se reunieron, se concentró mediante ultrafiltración, se suplementó con glicerol 10% (v/v) y seguidamente la muestra se almacenó a -80 °C para su posterior análisis.

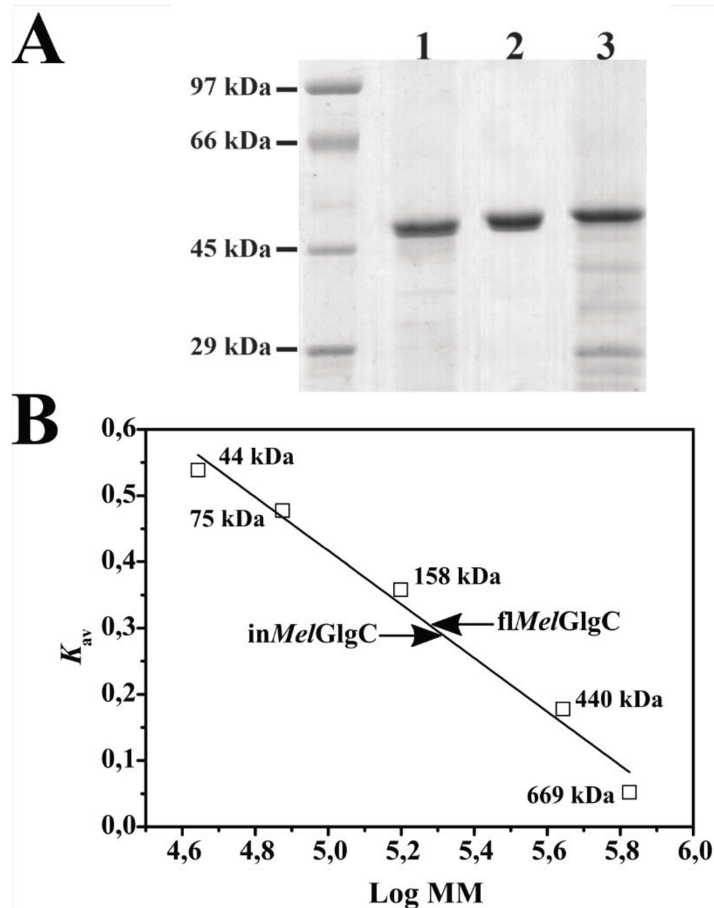
Por su parte, las enzimas expresadas con un *His-tag* N-terminal se purificaron mediante cromatografía IMAC, para lo cual se utilizó una columna HisTrap de 1 ml (GE Healthcare), conteniendo Ni<sup>2+</sup> como metal, previamente equilibrada con *buffer* H. La elusión de la muestra se realizó con un gradiente de imidazol de 0-300 mM. Las fracciones eluidas fueron analizadas por SDS-PAGE y por actividad ADP-Glc PPasa. Aquellas que exhibieron actividad significativa se juntaron, concentraron y almacenaron a -80 °C, previo agregado de glicerol 10% (v/v). Debido a que la enzima *inMelGlgC* obtenida luego de su purificación en estas condiciones y almacenada como se describe resultó ser inestable (pérdida del 50% de actividad en las 48 h posteriores a su purificación), se analizaron alternativas para su almacenamiento. En la Tabla 2 se describen las diferentes condiciones en las que se almacenó la enzima posteriormente a su purificación. Para ello, la proteína purificada se fraccionó inmediatamente en las condiciones detalladas a continuación (Tabla 2).

**Tabla 2:** Ensayo de diferentes condiciones en las que se analizó la estabilidad de la enzima in*MelGlgC*.

Muestra de partida	Actividad (U/mg)	Almacenamiento	Actividad 48 h después (U/mg)	Actividad 72 h después (U/mg)	Actividad 1 semana después (U/mg)
<i>Pool</i> de partida	1,061	Fracción 7			
		Fracción 8			
		Fracción 9			
		Fracción 10			
		Fracción 11			
<i>Buffer A</i>		4 °C	2,789	2,714	2,538
		-80 °C	2,780	2,369	1,978
		4 °C + glicerol 10% (v/v)	2,933	2,567	2,420
		-80 °C + glicerol 10% (v/v)	2,671	2,535	2,381
Tris-HCl 50 mM + DTT 2,5 mM		4 °C	3,113	2,826	2,606
		-80 °C	2,702	2,703	2,484
		4 °C + glicerol 10% (v/v)	2,876	2,645	2,592
		-80 °C + glicerol 10% (v/v)	2,805	2,808	2,269
<i>Buffer S</i>		4 °C	2,421	2,157	2,103
		<b>-80 °C</b>	<b>3,564</b>	<b>3,919</b>	<b>3,200</b>
<i>Buffer I</i>		-80 °C	1,490	1,217	1,193

Los *buffers* que se analizaron fueron: *buffer A* [MOPS-NaOH 50 mM pH 8, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, EDTA 0,1 mM, Suc 5% (p/v)]; Tris-HCl 50 mM + DTT 2,5 mM; *buffer S* [HEPES-NaOH 50 mM pH 8, Suc 10% (p/v), DTT 0,2 mM, EDTA 1 mM]; *buffer I* (mismo *buffer* de elusión). Además, se analizaron distintas temperaturas, con y sin el agregado de glicerol. Luego de 48 h, 72 h y una semana de almacenada en una condición dada, se realizaron medidas de actividad para cada fracción, determinando así la capacidad de cada una de las condiciones ensayadas de conservar la actividad ADP-Glc PPasa. De esta manera, se determinó que in*MelGlgC* permanece estable en el *buffer S*. A partir de este resultado, y para tener las tres GlgCs cianobacterianas en la misma condición, las enzimas in*MelGlgC*, fl*MelGlgC* y AnaGlgC en una nueva purificación se dializaron para mantenerlas en *buffer S*, guardándose a -80 °C. En estas condiciones, las ADP-Glc PPasas purificadas resultaron ser estables al menos por 12 meses.

Así, se logró obtener las ADP-Glc PPasas de *Melainabacteria* y de *Anabaena* PCC 7120 solubles, activas, estables y con un elevado grado de pureza (Figura 4A). Estas son las características mínimas que se buscan al momento de producir enzimas para su caracterización cinética, regulatoria y estructural.



**Figura 4:** Purificación y análisis estructural de las ADP-Glc PPasas de *Melainabacteria* intestinal y de vida libre, y de *Anabaena* PCC 7120 obtenidas en forma recombinante. (A) SDS-PAGE de las enzimas expresadas en *E. coli* BL21 (DE3) y purificadas mediante IMAC; (1) *inMelGlgC*, (2) *flMelGlgC* y (3) *AnaGlgC*. (B) Determinación de la masa molecular de las proteínas de *Melainabacteria* purificadas mediante cromatografía de exclusión molecular *Superdex 200* siguiendo lo detallado en Materiales y Métodos.

#### 3.4.4. Determinación de la estructura cuaternaria de las ADP-Glc PPasas de *Melainabacteria*

Con el fin de caracterizar las estructuras cuaternarias de las ADP-Glc PPasas de *Melainabacteria*, se efectuó una cromatografía de exclusión molecular con cada una de las enzimas purificadas. Ambas GlgCs eluyeron de la columna en un volumen correspondiente a masas moleculares entre 180 y 190 kDa (Figura 4B). Teniendo en cuenta que la masa molecular teórica de estas proteínas es de ~45 kDa y los resultados obtenidos por SDS-PAGE (Figura 4A), se puede afirmar que ambas enzimas poseen una estructura del tipo homotetramérica. Por su parte,

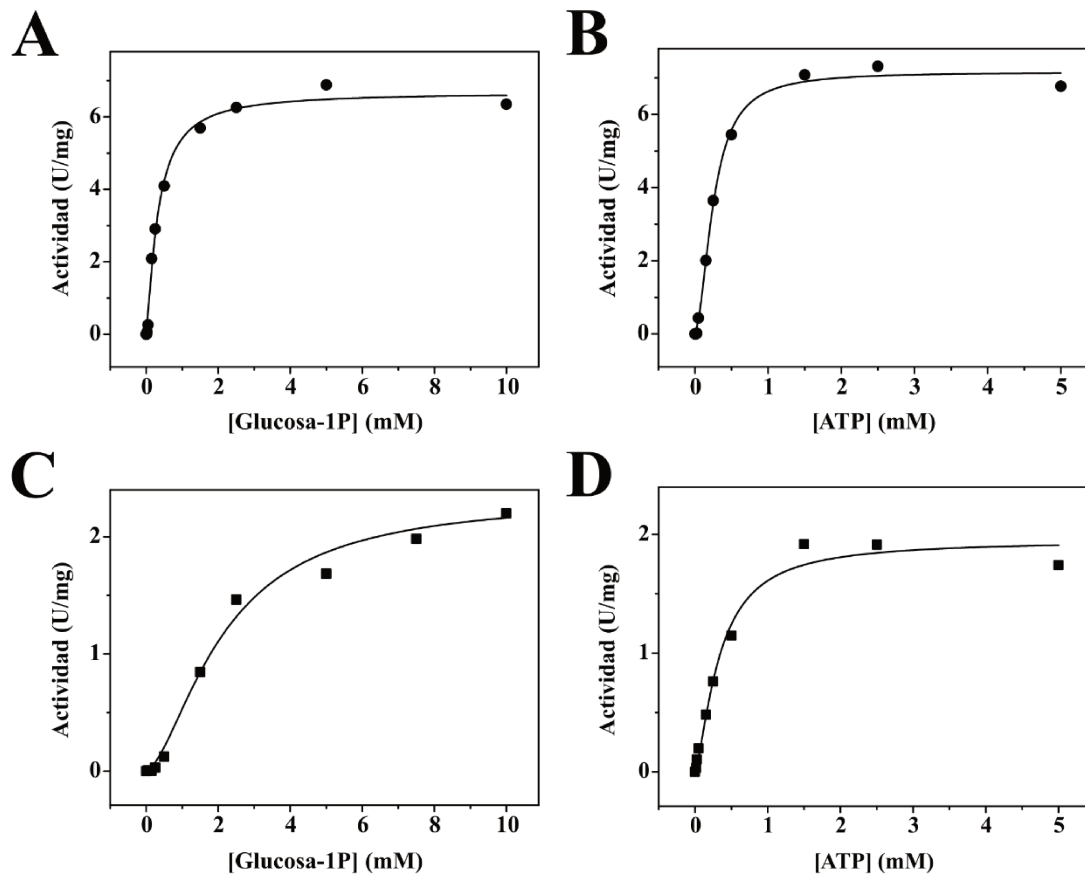
la enzima GlgC de *Anabaena* también presenta una estructura homotetramérica, de acuerdo a resultados previos obtenidos con la enzima purificada de fuente (152). Estos resultados concuerdan con la información publicada para las distintas ADP-Glc PPasas caracterizadas hasta el momento (50,110).

Comparando con los casos de ADP-Glc PPasas de procariotas analizadas hasta el momento, podemos decir que las GlgCs de *Melainabacteria* se comportan de manera similar a lo que ocurre para sus análogas en donde la enzima es codificada por un único gen *glgC*, dando lugar a la conformación homotetramérica  $\alpha_4$ , como en *E. coli* (82,283), *A. tumefaciens* (284), *R. sphaeroides* (285), *S. coelicolor* (120), *M. tuberculosis* (119) y *R. jostii* (160); a diferencia de lo que ocurre con la enzima procedente de Firmicutes, que es heterotetramérica (96,157,158). Además, resultados previos muestran que la ADP-Glc PPasa de cianobacterias fotosintéticas posee una estructura homotetramérica, como se observa para la mayoría de las enzimas bacterianas (50), aunque presenta propiedades reguladoras similares a las enzimas de plantas vasculares (152). De esta manera, los resultados presentan una diferencia sustancial entre las ADP-Glc PPasas de cianobacterias y plantas en cuanto a su estructura cuaternaria. Las características intermedias hacen que la enzima de las cianobacterias sea de interés para determinar su estructura y compararla con la proteína de otras fuentes.

### **3.4.5. Caracterización cinética de las ADP-Glc PPasas de *Melainabacteria* y *Anabaena***

Como se mencionó anteriormente, los genes *inMelglgC*, *fMelglgC* y *AnaglgC* se expresaron independientemente utilizando el sistema pET para obtener las respectivas proteínas recombinantes con y sin His-tag (Figura 4A), dependiendo la estrategia seleccionada (ver Materiales y Métodos). En ensayos preliminares, se determinó que las diferentes ADP-Glc PPasas de *Melainabacteria* y *Anabaena* PCC 7120 se comportaron cinéticamente de manera similar en presencia o ausencia de la etiqueta de His (no mostrado). A partir de esto, decidimos continuar trabajando con las enzimas obtenidas con el His-tag N-terminal, dado que permite obtener las enzimas más rápidamente, evitando la posibilidad de pérdida de actividad y/o desnaturalización. Las enzimas purificadas mostraron valores de actividad específica de 7,1 (*inMelGlgC*), 2,3 (*fMelGlgC*) y 0,31 (*AnaGlgC*) U/mg.

Con el objetivo de realizar una caracterización detallada del comportamiento cinético de las dos ADP-Glc PPasas de *Melainabacteria* y de la de *Anabaena* PCC 7120, para analizarlas comparativamente, se determinaron sus parámetros cinéticos en el sentido de síntesis de ADP-Glc. Se realizaron las curvas de saturación correspondientes para los sustratos Glc-1P y ATP de las enzimas de *Melainabacteria* (Figura 5), a partir de las cuales se calcularon los respectivos parámetros cinéticos, presentados en la Tabla 3.



**Figura 5:** Caracterización cinética de la ADP-Glc PPasa de *Melainabacteria* intestinal (A y B) y de vida libre (C y D). Curvas de saturación de sustrato realizadas en sentido de síntesis de ADP-Glc.

Para ambas enzimas los resultados mostraron una desviación del comportamiento hiperbólico ( $n_H$  mayor a 1), con afinidades similares hacia ATP en ambos casos (Tabla 3). Sin embargo, *inMelGlgC* mostró un  $S_{0,5}$  6 veces menor para la Glc-1P que *fMelGlgC* (Tabla 3). A su vez, el análisis comparativo indica que *AnaGlgC* exhibe una afinidad aparente por Glc-1P un orden de magnitud mayor que *fMelGlgC* (Tabla 3).

**Tabla 3:** Parámetros cinéticos de las ADP-Glc PPasas de *Melainabacteria* y *Anabaena*.

Parámetro	<i>inMelGlgC</i>		<i>fMelGlgC</i>		<i>AnaGlgC</i>	
	Glc-1P	ATP	Glc-1P	ATP	Glc-1P	ATP
$S_{0,5}$ (mM)	$0,32 \pm 0,03$	$0,25 \pm 0,01$	$2,1 \pm 0,2$	$0,34 \pm 0,05$	$0,08 \pm 0,02$	$0,40 \pm 0,04$
$n_H$	1,3	1,8	1,6	1,4	0,7	1,2
$V_{max}$ (U/mg)	$6,7 \pm 0,2$	$7,1 \pm 0,1$	$2,3 \pm 0,1$	$1,9 \pm 0,1$	$0,20 \pm 0,01$	$0,31 \pm 0,01$

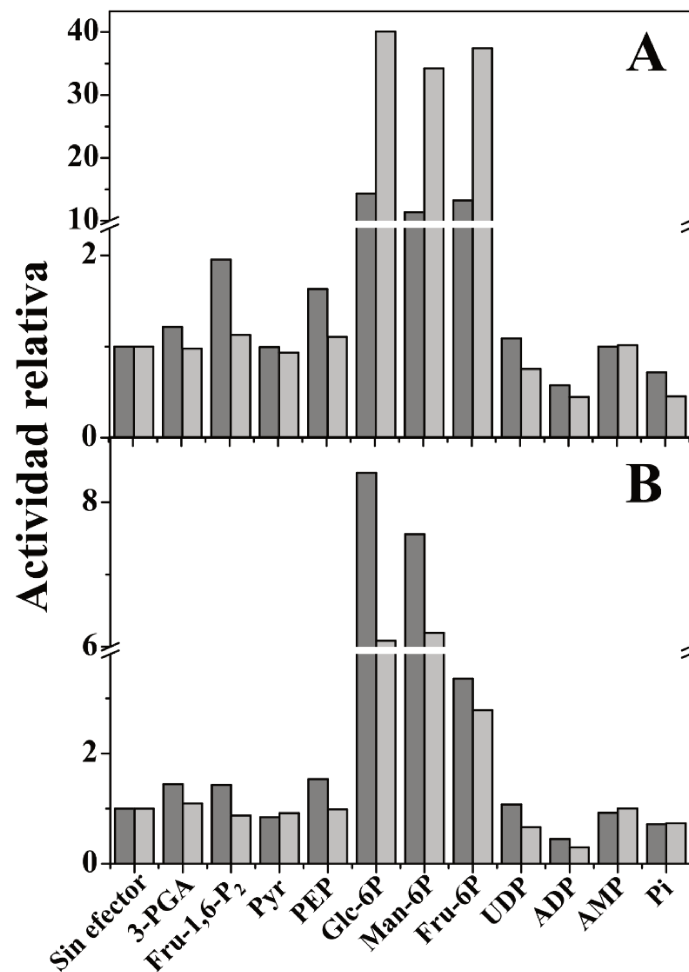
En general, las enzimas de *Melainabacteria* presentaron actividades específicas un orden de magnitud superior a la de *Anabaena* PCC 7120. Sin embargo, esta última mostró una mayor afinidad aparente hacia la Glc-1P (Tabla 3). Cabe destacar que la eficiencia catalítica de las

ADP-Glc PPasas de *Melainabacteria* fue similar a la observada para las enzimas homólogas provenientes de distintas bacterias heterótrofas (50,110,286).

### 3.4.6. Caracterización regulatoria de *inMelGlgC*, *flMelGlgC* y *AnaGlgC*

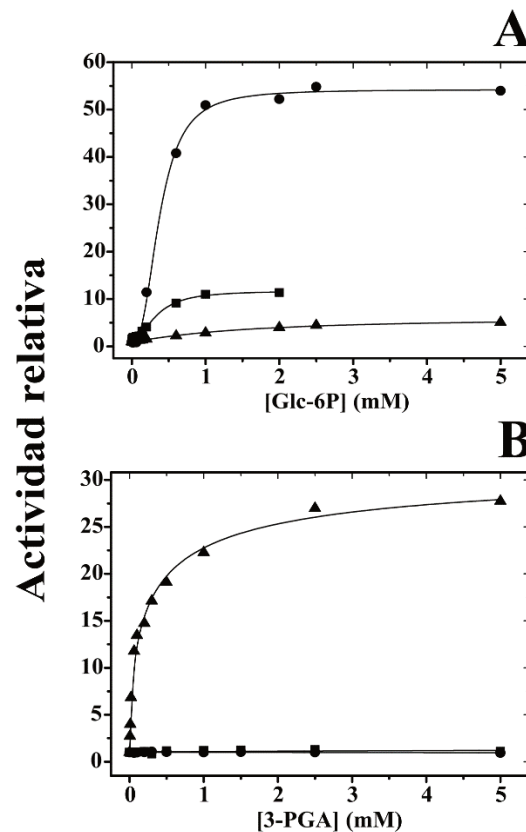
Como se describió en la introducción, la ADP-Glc PPasa es una enzima alostérica que cataliza el paso regulatorio en la vía clásica de síntesis de glucógeno en bacterias. Esto se sustenta por el hecho de que todas las ADP-Glc PPasas caracterizadas hasta el momento (con la única excepción de la procedente de *G. stearothermophilus* (157)) son enzimas alostéricas, reguladas por metabolitos claves de la principal vía de utilización del carbono en el respectivo organismo (50,85,110,283). Los ejemplos típicos y más estudiados son los de la enzima de *E. coli*, que se activa principalmente por el metabolito crítico de la ruta de Embden-Meyerhof, la Fru-1,6-P<sub>2</sub>; y el de la enzima de *A. tumefaciens*, activada por Fru-6P y Pyr, relacionados a la vía de Entner-Doudoroff como principal ruta glucolítica (146,149,150,287,288). De manera similar, las ADP-Glc PPasas de organismos que realizan fotosíntesis oxigénica (cianobacterias, algas verdes y plantas vasculares) tienen al 3-PGA y al Pi como principal activador e inhibidor, respectivamente (110,151–153).

Por lo detallado arriba, en este trabajo de Tesis exploramos el efecto de diferentes moléculas, conocidas por activar o inhibir las ADP-Glc PPasas de distintos organismos (50,110,119,120,150,158,160,289), sobre la actividad de las enzimas de *Melainabacteria*. Así, se ensayaron los siguientes metabolitos a una concentración de 2,5 mM: 3-PGA, Fru-1,6-P<sub>2</sub>, Pyr, PEP, Glc-6P, Man-6P, Fru-6P, UDP, ADP, AMP y Pi. Para cada enzima, las medidas se realizaron utilizando dos condiciones diferentes: sub-saturantes, empleando concentraciones de Glc-1P y ATP cercanas al  $S_{0,5}$  correspondiente (barras color gris oscuro, Figura 6), o saturantes, cuando las concentraciones de los sustratos fueron 3 a 5 veces mayores al respectivo valor de  $S_{0,5}$  (barras color gris claro, Figura 6). Como se detalla en la Figura 6, este abordaje nos permitió identificar metabolitos que afectaron la actividad tanto de *inMelGlgC* como de *flMelGlgC*. De esta manera, encontramos que Glc-6P, Fru-6P y Man-6P son activadores de las ADP-Glc PPasas de *Melainabacteria*, mientras que el ADP y el Pi resultaron inhibidores (Figura 6). Cabe destacar que la actividad de las enzimas de *Melainabacteria* no cambió significativamente en presencia de 3-PGA (Figura 6), el cual es el principal activador de ADP-Glc PPasas de organismos fotosintéticos oxigénicos (50,110,152), incluidas las de fuentes cianobacterianas caracterizadas hasta el momento (155,190,290).



**Figura 6:** Efecto de diferentes metabolitos sobre la actividad de ADP-Glc PPasas de cianobacterias no fotosintéticas: **(A)** *inMelGlgC* y **(B)** *flMelGlgC*. Las actividades relativas se refieren a la relación entre la actividad respectiva en presencia y ausencia de cada efector. El valor de 1 corresponde a la respectiva  $V_{max}$  (ver Tabla 3). La concentración de metabolitos fue de 2,5 mM en todos los casos. Los ensayos se llevaron a cabo con dos conjuntos de concentraciones de Glc-1P y ATP: sub-saturación (barras de color gris oscuro) o saturación (barras de color gris claro).

Luego, realizamos un análisis detallado de la cinética de activación de las diferentes ADP-Glc PPasas estudiadas en esta Tesis. Como se muestra en la Figura 7A, la Glc-6P aumentó la actividad de *inMelGlgC* y *flMelGlgC* unas 54 y 12 veces, respectivamente, con valores de  $A_{0,5}$  similares, alrededor de 0,3 mM (Tabla 4). En cambio, la activación de *AnaGlgC* por Glc-6P alcanzó un máximo de 5 veces, y la afinidad relativa hacia la hexosa-P fue 4 veces menor que la de las enzimas de *Melainabacteria* (Tabla 4). Curiosamente, el 3-PGA no tiene efecto sobre la actividad de las ADP-Glc PPasas de *Melainabacteria* (hasta 5 mM, Figura 7B). Por el contrario, la enzima de *Anabaena* PCC 7120 se activó unas 29 veces en presencia de 3-PGA (con un  $A_{0,5}$  de 0,19 mM), lo que concuerda con trabajos anteriores (152).



**Figura 7:** Activación de las ADP-Glc PPasas cianobacterianas por Glc-6P (A) y 3-PGA (B). inMelGlgC (círculos rellenos), flMelGlgC (cuadrados rellenos), AnaGlgC (triángulos rellenos). El valor de 1 corresponde a actividades de 7,1, 2,3 y 0,25 U/mg para inMelGlgC, flMelGlgC y AnaGlgC, respectivamente.

Se ha demostrado que las propiedades regulatorias de la ADP-Glc PPasa de la cianobacteria *Anabaena* PCC 7120 se ven considerablemente afectadas por las condiciones de *crowding* molecular cuando son analizadas *in vitro* (190,291,292). El *crowding* imita el hacinamiento molecular, lo que ocurre en la célula, y promueve interacciones proteína-proteína específicas (293,294). En medios de reacción con *crowding*, la agregación de proteínas se promueve a través de la exclusión del solvente y el consiguiente aumento local en la concentración de proteínas. A modo de corroborar que el 3-PGA no afecta el comportamiento cinético de las enzimas de *Melainabacteria*, analizamos su posible efecto en presencia de distintas concentraciones de BSA (1; 2,5 y 5 mg/ml) para evaluar si el *crowding* molecular exalta la acción del 3-PGA, que pudiera haber sido subestimada previamente. En estas condiciones, las ADP-Glc PPasas de *Melainabacteria* permanecieron insensibles al efector, y confirmamos que el mismo no es efector, marcando una sustancial diferencia con la enzima de cianobacterias.

También profundizamos el análisis regulatorio de las otras dos hexosas-P (Fru-6P y Man-6P) que identificamos como activadores de las enzimas de *Melainabacteria* estudiadas en esta Tesis, y sus parámetros se muestran en la Tabla 4. Para el caso de inMelGlgC, el incremento en la actividad fue de 40 y 15 veces para Fru-6P y Man-6P, respectivamente; mientras que en

f*Mel*GlgC fue de 4 y 13 veces. Los mismos metabolitos, analizados sobre *Ana*GlgC, aumentaron 14 y 6 veces la actividad, respectivamente. Los valores de afinidad por estos efectores se encuentran en el rango de 0,4-1,7 mM (Tabla 4). En estudios previos (152), ya se había demostrado que el PEP actúa como activador de la ADP-Glc PPasa de *Anabaena* PCC 7120 (Tabla 4), aspecto que profundizamos en esta Tesis, determinando sus parámetros de activación. Curiosamente, a concentraciones de PEP mayores a 2,5 mM se observa una inhibición en la actividad de la enzima. Respecto a las enzimas de *Melainabacteria*, mostraron una baja sensibilidad a la activación por PEP y no avanzamos en mayores estudios cinéticos de este metabolito.

**Tabla 4:** Parámetros cinéticos para efectores alostéricos de ADP-Glc PPasas de cianobacterias.

Efactor	in <i>Mel</i> GlgC		f <i>Mel</i> GlgC		<i>Ana</i> GlgC	
	A <sub>0,5</sub> (mM)	Activación	A <sub>0,5</sub> (mM)	Activación	A <sub>0,5</sub> (mM)	Activación
Glc-6P	0,37 ± 0,01	54	0,35 ± 0,03	12	1,4 ± 0,2	5,4
Fru-6P	0,44 ± 0,05	40	1,7 ± 0,1	3,8	0,9 ± 0,1	14
Man-6P	0,52 ± 0,02	15	0,45 ± 0,04	13	0,40 ± 0,06	6
3-PGA	<i>Sin efecto</i>	1	<i>Sin efecto</i>	1	0,19 ± 0,09	29
PEP	n.d.		n.d.		0,17 ± 0,01	8,3

n.d.: no determinado

Luego, analizamos el comportamiento de ADP y Pi, que resultaron inhibidores de las enzimas ensayadas y cuyos parámetros se indican en la Tabla 5. Notoriamente, la inhibición por Pi fue más pronunciada en *Ana*GlgC que en las enzimas de *Melainabacteria* (in*Mel*GlgC y f*Mel*GlgC), ya que la concentración de inhibidor a la cual se alcanzó el 50% de la máxima inhibición (*I*<sub>0,5</sub>) fue de 0,09, 0,23 y 2,3 mM, respectivamente (Tabla 5). Determinamos una actividad remanente del 20% en in*Mel*GlgC y *Ana*GlgC a una concentración de 2 mM de Pi. En cambio, para la enzima f*Mel*GlgC es necesaria una concentración mayor de Pi (10 mM) para generar la misma inhibición (Figura 8A-C). Por otro lado, la inhibición producida por el ADP presentó un comportamiento sigmoideo sobre las enzimas en estudio. Esta inhibición fue prácticamente total para la enzima in*Mel*GlgC, con un *I*<sub>0,5</sub> de 2,3 mM (Figura 8D). Lo mismo sucede para la f*Mel*GlgC, pero con un *I*<sub>0,5</sub> de 1,44 mM (Figura 8E). En cambio, cuando se analizó este inhibidor para la enzima *Ana*GlgC el *I*<sub>0,5</sub> fue de 1,07 mM, dejando un 60% de actividad remanente (Figura 8F). Por su parte, el PEP y el Pyr presentaron un efecto inhibitorio en ambas enzimas de *Melainabacteria*, aunque significativamente más débil que el de Pi y el ADP (Tabla 5).

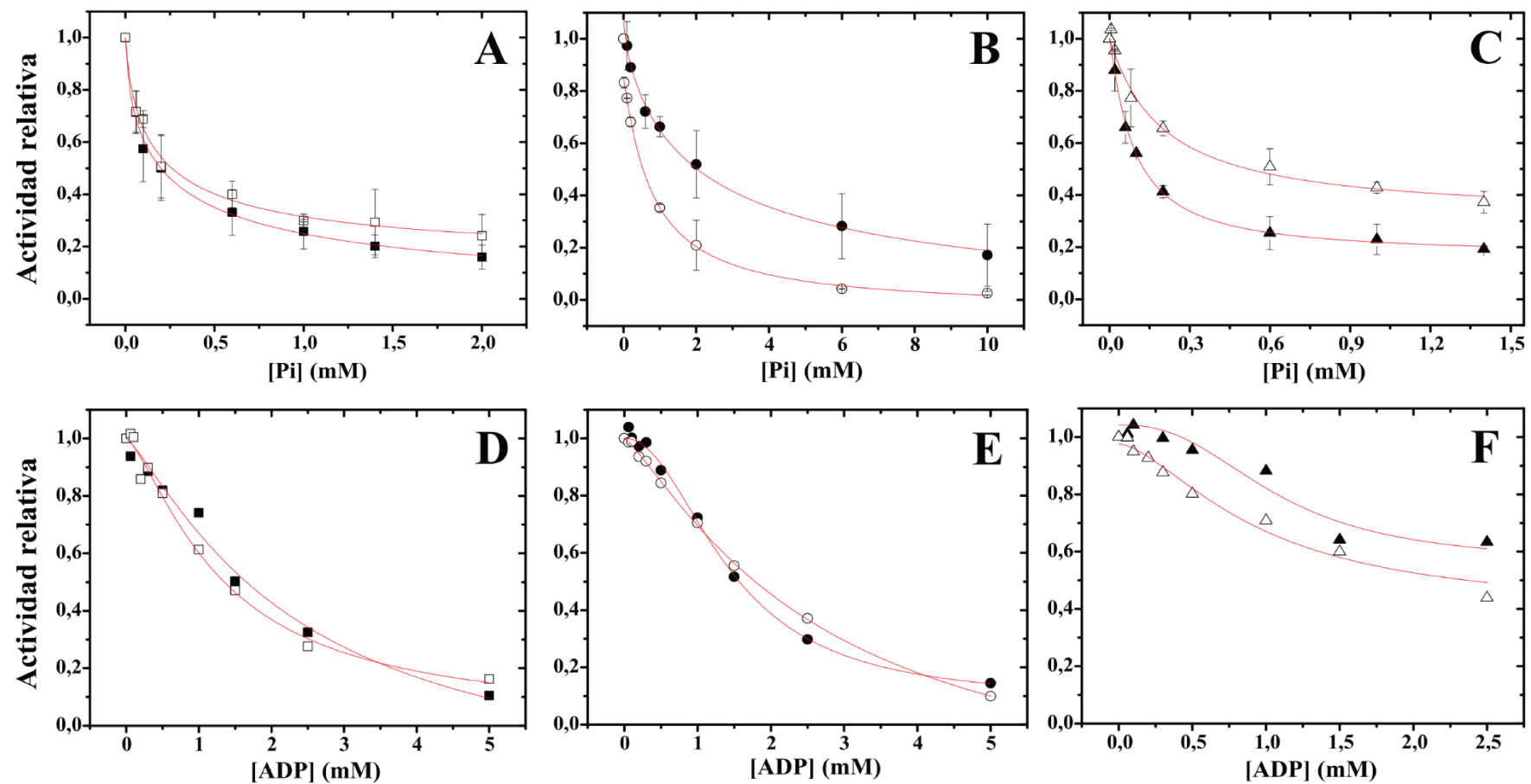
**Tabla 5:** Parámetros cinéticos para inhibidores de ADP-Glc PPasas de cianobacterias.

Efecto	in <i>Mel</i> GlgC		fl <i>Mel</i> GlgC		<i>Ana</i> GlgC	
	$I_{0,5}$ (mM)	$I_{0,5}$ (con 0,4 mM de Glc-6P)	$I_{0,5}$ (mM)	$I_{0,5}$ (con 0,4 mM de Glc-6P)	$I_{0,5}$ (mM)	$I_{0,5}$ (con 0,2 mM de 3-PGA)
Pi	0,23 ± 0,10	0,17 ± 0,06	2,3 ± 0,7	0,8 ± 0,3	0,090 ± 0,004	0,20 ± 0,07
ADP	2,3 ± 0,9	1,3 ± 0,2	1,44 ± 0,08	2,7 ± 0,3	1,07 ± 0,09	0,9 ± 0,1
Pyr	23 ± 6	n.d.	25 ± 4	n.d.		n.d.
PEP	5,4 ± 0,5	n.d.	7,9 ± 0,9	n.d.		n.d.

n.d.: no determinado

Trabajos realizados previamente mostraron la existencia de una interacción entre activadores e inhibidores de la ADP-Glc PPasa de procariontes (96,146,149,158,160,190). En vista de esto, se analizó la actividad de las ADP-Glc PPasas de *Melainabacteria* y *Anabaena* PCC 7120 realizando curvas de los inhibidores Pi y ADP, en presencia de su activador principal, a concentraciones cercanas al  $A_{0,5}$ . Para el caso de las enzimas de *Melainabacteria*, el efecto inhibitorio del Pi y del ADP fue evaluado en presencia de 0,4 mM de Glc-6P. En cambio, para *Ana*GlgC se evaluó en presencia de 0,2 mM de 3-PGA. Estas concentraciones fueron elegidas en base a los respectivos valores de  $A_{0,5}$  (ver Tabla 4). Como se observa en la Figura 8A y 8D, no hay cambios significativos en cuanto a la inhibición del Pi y del ADP para in*Mel*GlgC en presencia del activador Glc-6P. En cuanto a la inhibición por Pi de fl*Mel*GlgC, se obtuvo un  $I_{0,5}$  mayor con respecto a la enzima de origen intestinal, pero cuando se le agregó Glc-6P se observó una disminución de casi 3 veces en el  $I_{0,5}$ , haciendo a la enzima más sensible al inhibidor (Tabla 5, Figura 8B). Lo contrario sucede para el ADP sobre la actividad de la enzima fl*Mel*GlgC, cuando se le agrega Glc-6P el  $I_{0,5}$  aumenta de 1,44 a 2,7 mM (Tabla 5, Figura 8E).

También se sumó al estudio el análisis de la inhibición del Pi en la enzima de *Anabaena* PCC 7120, lo cual ya había sido determinado en trabajos anteriores (152). Lo evaluamos con el método de enzimas acopladas detallado en Materiales y Métodos, obteniendo valores similares a los reportados y un  $I_{0,5}$  de 0,09 mM (Tabla 5). El mismo enfoque fue utilizado para analizar la acción inhibitoria del Pi y el ADP en la enzima de *Anabaena*. Sin embargo, en este caso, en lugar de Glc-6P, se utilizó 3-PGA a una concentración de 0,2 mM (valor cercano a su valor de  $A_{0,5}$ ). Los resultados obtenidos (Tabla 5, Figura 8C) muestran que hay una reducción en la afinidad relativa ( $I_{0,5}$  0,2 mM) y en la inhibición máxima causada por el Pi (40% de actividad remanente). En cuanto al ADP, a concentraciones sub-saturantes de 3-PGA, no se observan cambios significativos, sólo un ligero aumento del efecto inhibitorio del ADP. Esto resultó en actividades remanentes del 60% y 50%, en ausencia y presencia de 3-PGA, respectivamente. Además, las curvas de saturación exhiben un patrón sigmoideo (Tabla 5, Figura 8F).



**Figura 8:** Sensibilidad a inhibidores de las ADP-Glc PPasas cianobacterianas. Respuesta de *inMelGlgC*, de *flMelGlgC* y de *AnaGlgC* a diferentes concentraciones de Pi (A, B y C, respectivamente) y de ADP (D, E y F, respectivamente). Los cuadrados, círculos y triángulos blancos corresponden al agregado del efector Glc-6P, para el caso de *Melainabacteria*, y de 3-PGA para *Anabaena*. Los valores de actividad relativa fueron calculados como el cociente entre la actividad determinada en presencia del inhibidor en relación a la actividad enzimática ensayada en ausencia de efector.

Los resultados hasta aquí mostrados en cuanto a la regulación alostérica indican que se ha caracterizado un nuevo tipo de ADP-Glc PPasa (perteneciente a cianobacterias no fotosintéticas), con propiedades regulatorias distintivas respecto a las de cianobacterias anteriormente estudiadas (50,99,110). Las ADP-Glc PPasas de *Melainabacteria* no fueron activadas por 3-PGA, aspecto que constituye la principal diferencia regulatoria entre las enzimas homólogas de cianobacterias. Dado que *Melainabacteria* ocupa una posición filogenética previa a las cianobacterias fotosintéticas (como *Anabaena* PCC 7120), los resultados obtenidos durante este trabajo de Tesis apoyan dicha idea y sugieren una adaptación evolutiva de la ADP-Glc PPasa de organismos fotosintéticos al escenario metabólico dado con la aparición de la fotosíntesis oxigénica luego de su divergencia de *Melainabacteria* (270,295).

### 3.4.7. Cinéticas de los sustratos en presencia de los efectores

Para analizar con mayor profundidad el efecto sobre las ADP-Glc PPasas de cianobacterias de los metabolitos reguladores descritos arriba, se estudiaron los cambios producidos por los efectores sobre la cinética de saturación de los sustratos. Para esto, determinamos los parámetros cinéticos de las GlgCs en presencia de concentraciones saturantes de cada uno de los efectores, para luego determinar la eficiencia catalítica medida como  $V_{\max}/S_{0,5}$ , que es análogo a calcularlo como  $V_{\max}/K_m$  (o también  $k_{\text{cat}}/K_m$ ) en cinéticas hiperbólicas, con el objetivo de hacer un análisis comparativo (146,296).

Como se muestra en la Tabla 6, los efectores alostéricos modifican los valores de  $V_{\max}$  y/o  $S_{0,5}$  en diferentes magnitudes. Particularmente, la Glc-6P no alteró significativamente las afinidades aparentes de las enzimas hacia el ATP. En cambio, la Glc-6P aumentó 1,6 y 3,8 veces las afinidades aparentes de la Glc-1P para *inMelGlgC* y *flMelGlgC*, respectivamente; por el contrario, la Glc-6P disminuyó ~10 veces la afinidad aparente de la Glc-1P en el caso de *AnaGlgC* (Tabla 6). La Fru-6P aumentó 3,5 y 2,3 veces la afinidad por la Glc-1P de las enzimas *inMelGlgC* y *flMelGlgC*, respectivamente. Mientras que, para la enzima *AnaGlgC*, el efector Fru-6P disminuyó 3,8 veces la afinidad hacia la Glc-1P, sin alterar significativamente la afinidad aparente hacia el ATP (Tabla 6).

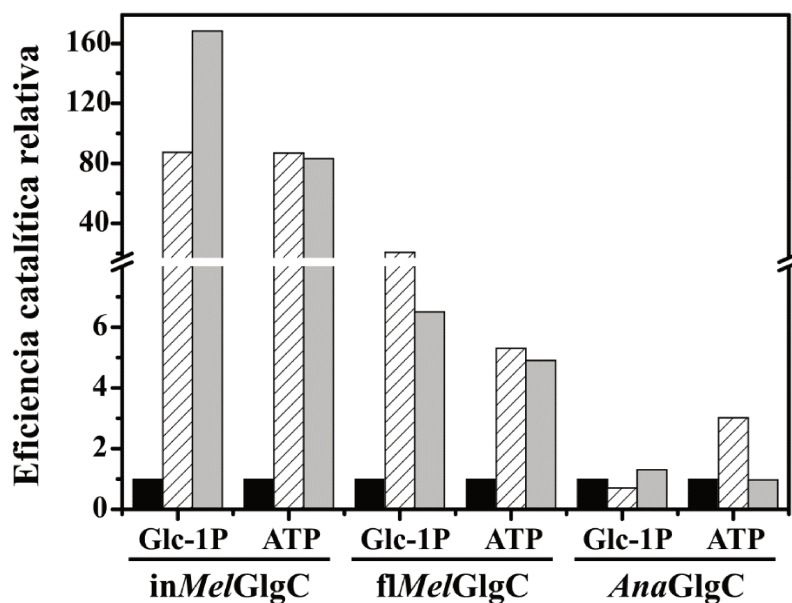
**Tabla 6:** Parámetros cinéticos de las ADP-Glc PPasas de cianobacterias en presencia y en ausencia de los activadores alostéricos.

	<b>inMeIGlgC</b>		<b>flMeIGlgC</b>		<b>AnaGlgC</b>	
	Glc-1P	ATP	Glc-1P	ATP	Glc-1P	ATP
<b><i>Sin efector</i></b>						
$S_{0,5}$ (mM)	0,32 ± 0,03	0,25 ± 0,01	2,1 ± 0,2	0,34 ± 0,05	0,08 ± 0,02	0,40 ± 0,04
$n_H$	1,3	1,8	1,6	1,4	0,7	1,2
$V_{max}$ (U/mg)	6,7 ± 0,2	7,1 ± 0,1	2,3 ± 0,1	1,9 ± 0,1	0,20 ± 0,01	0,31 ± 0,01
<b><i>Glc-6P</i></b>						
$S_{0,5}$ (mM)	0,20 ± 0,02	0,18 ± 0,01	0,55 ± 0,02	0,5 ± 0,1	0,9 ± 0,4	0,55 ± 0,08
$n_H$	1,2	1,6	1,9	1	0,6	2,5
$V_{max}$ (U/mg)	366 ± 10	444 ± 8	12,4 ± 0,2	14,7 ± 0,8	1,6 ± 0,2	1,30 ± 0,09
<b><i>Fru-6P</i></b>						
$S_{0,5}$ (mM)	0,09 ± 0,01	0,151 ± 0,005	0,9 ± 0,2	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,40 ± 0,04
$n_H$	1,1	1,6	0,8	1	0,8	1,2
$V_{max}$ (U/mg)	317 ± 10	357 ± 5	6,4 ± 0,5	8,3 ± 0,8	1 ± 0,01	0,31 ± 0,01

En resumen, la Glc-6P y la Fru-6P aumentan la eficiencia catalítica de *inMelGlgC* y *flMelGlgC* para ambos sustratos. La eficiencia catalítica de *inMelGlgC* se incrementa 80 o 160 veces en presencia de Glc-6P y Fru-6P, respectivamente, para la Glc-1P; y unas 80 veces en presencia de estos efectores para el sustrato ATP (Figura 9). Para el caso de *flMelGlgC*, la eficiencia catalítica aumenta 20 y 5 veces para los sustratos Glc-1P y ATP, respectivamente, en presencia de Glc-6P; mientras que en presencia de Fru-6P este aumento es de 6,5 y 5 veces, respectivamente. Para la enzima *AnaGlgC* no se ve un aumento significativo en la eficiencia catalítica, ya que esta aumenta sólo unas 3 veces para el sustrato ATP cuando está presente el activador Glc-6P (Figura 9).

En conclusión, este estudio profundizó en el análisis de los efectos de los metabolitos reguladores en las ADP-Glc PPasas de cianobacterias. A través de los cambios en la cinética de saturación de los sustratos bajo la influencia de los efectores alostéricos se reveló un panorama complejo de interacciones. Los efectores, como la Glc-6P y la Fru-6P, demostraron tener un impacto significativo en los parámetros cinéticos de las enzimas *inMelGlgC*, *flMelGlgC* y *AnaGlgC* (Tabla 6). Particularmente, se evidenció que la Glc-6P y la Fru-6P ejercen influencias divergentes en diferentes contextos enzimáticos, en el caso de las enzimas pertenecientes a *Melainabacteria*, aumentando las afinidades aparentes hacia los sustratos; mientras que disminuyen estas afinidades para el caso de la enzima de *Anabaena*.

Estos hallazgos subrayan la complejidad de la regulación enzimática en las ADP-Glc PPasas de cianobacterias y resaltan la importancia de considerar la diversidad de respuestas en diferentes enzimas y sustratos. Los resultados presentados en esta Tesis contribuyen al entendimiento más profundo de los mecanismos de regulación en estas enzimas claves en la biosíntesis de glucógeno, allanando el camino para futuras investigaciones.



**Figura 9:** Eficiencia catalítica relativa de las GlgCs cianobacterianas, en ausencia (barras negras) o en presencia de 1,5 mM Glc-6P (barras con diagonal derecha) y 1,5 mM Fru-6P (barras grises). La eficiencia catalítica relativa se estableció como el cociente entre la eficiencia catalítica obtenida para cada condición con respecto a la eficiencia catalítica en ausencia de efector.

### 3.4.8. Análisis de las estructuras proteicas *in silico*

Para construir un modelo 3D de las ADP-Glc PPasas de *Melainabacteria* y de *Anabaena* se utilizó el algoritmo desarrollado por Google, AlphaFold2 (281,297), el primer método computacional que puede predecir estructuras de proteínas con precisión atómica incluso en casos en los que no se conoce una estructura similar.

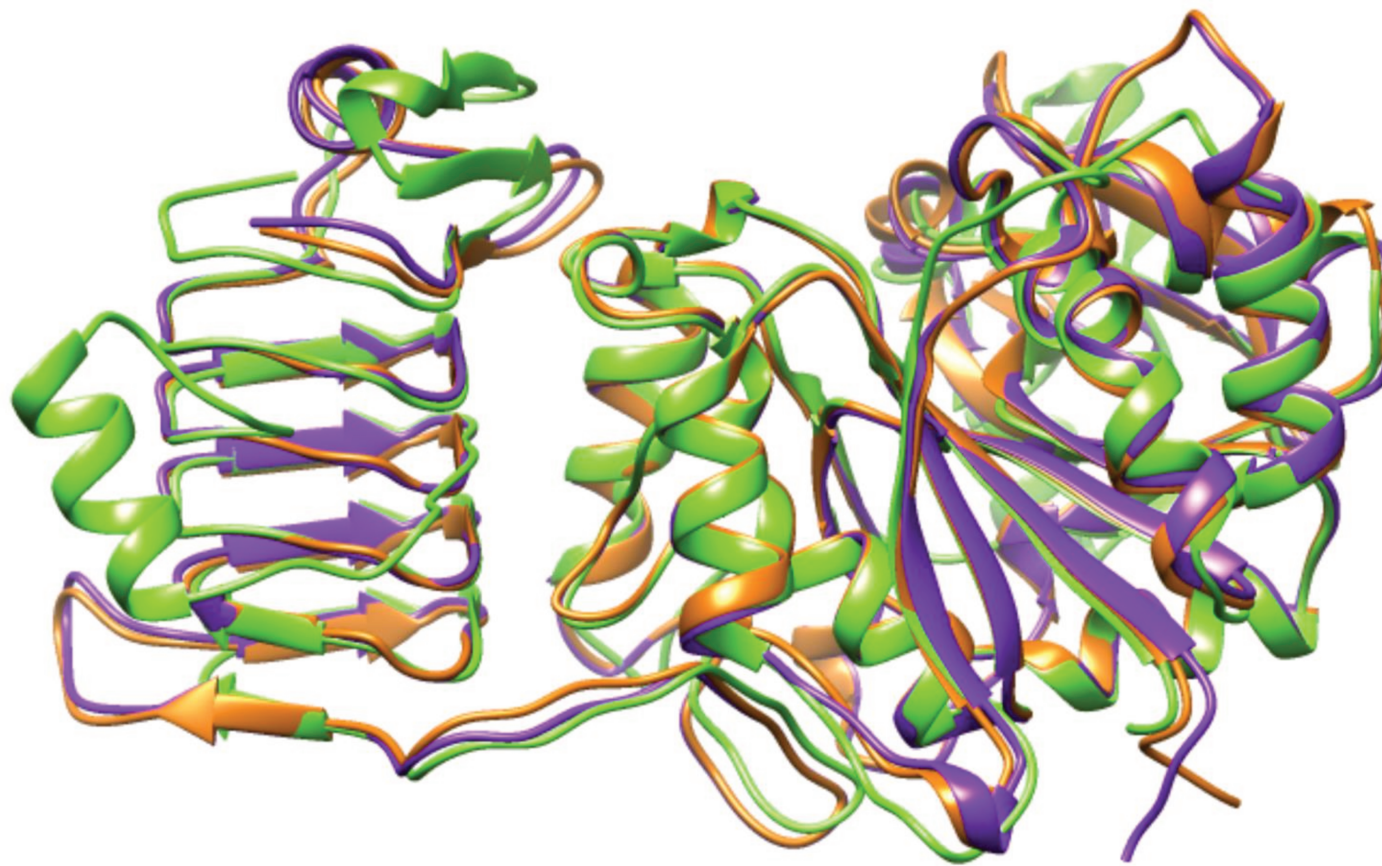
A partir de esto, se llevaron a cabo análisis exhaustivos de las estructuras tridimensionales de las enzimas GlgCs en estudio, con el objetivo de comprender sus similitudes y diferencias a nivel molecular. El monómero de la ADP-Glc PPasa de *Melainabacteria* comprende un dominio catalítico N-terminal y un dominio C-terminal de láminas  $\beta$ . El plegamiento del dominio catalítico es similar a otras pirofosforilasas de fuentes heterótrofas cuyas estructuras han sido dilucidadas (138–140). Los modelos fueron validados mediante el programa *Verify3D*, a partir del cual obtuvimos que un 98,05% para *inMelGlgC* y un 99,51% para *flMelGlgC* de los residuos tienen valores de *score* mayores a 0,2. Los modelos de las tres enzimas en estudio fueron comparados mediante la superposición de sus estructuras (Figura 10). En primer lugar, se procedió a comparar las estructuras de las enzimas *inMelGlgC* y *flMelGlgC*. Esta superposición reveló una elevada similitud entre las estructuras, con un valor de RMSD de 0,596 Å. Posteriormente, se realizó una comparación entre las estructuras de *inMelGlgC* y *AnaGlgC*, así como de *flMelGlgC* y *AnaGlgC*. En este análisis, los valores de RMSD obtenidos fueron de 0,827 Å y 0,839 Å, respectivamente (Figura 10). Aunque ligeramente mayor que la comparación entre las dos enzimas pertenecientes

a *Melainabacteria*, estos valores indican un nivel apreciable de semejanza estructural entre las GlgCs de cianobacterias fotosintéticas y de las recién descubiertas cianobacterias no fotosintéticas. La presencia de áreas conservadas en ambas enzimas podría sugerir una base molecular subyacente para funciones compartidas o interacciones similares en contextos biológicos específicos.

Estudios en la enzima de *E. coli* demostraron que haciendo mutagénesis dirigida al residuo Tyr<sup>114</sup> se produce una disminución en la afinidad por ATP. La mutación de este sitio también disminuyó la afinidad por Glc-1P y el activador Fru-1,6-P<sub>2</sub> (298). Por otro lado, estudios de modificación química mostraron que los activadores alostéricos protegieron la unión a Lys<sup>39</sup> y el sustrato ADP-Glc protegió la unión a Lys<sup>195</sup> (299). La mutagénesis dirigida de la Lys<sup>39</sup> mostró que este residuo es importante para la interacción del activador Fru-1,6-P<sub>2</sub> con la enzima (300). A su vez, la mutagénesis dirigida de la Lys<sup>195</sup> de la enzima de *E. coli* produjo un aumento en la  $K_m$  para la Glc-1P (166). Las constantes cinéticas para ATP, Mg<sup>2+</sup> y Fru-1,6-P<sub>2</sub> fueron similares a las de la enzima de tipo salvaje, lo que sugiere que esta Lys<sup>195</sup> está específicamente involucrada en la unión de Glc-1P (166).

Dado que el piridoxal 5-fosfato (PLP) puede considerarse un análogo estructural de la Fru-1,6-P<sub>2</sub> y del 3-PGA (activadores de las ADP-Glc PPasas de *E. coli*, *Anabaena* y de hoja de espinaca), se utilizó para encontrar residuos de lisina localizados en los posibles sitios activadores (301). En la enzima de hoja de espinaca, el PLP se unió a la Lys<sup>440</sup>, cerca del extremo C-terminal de la subunidad pequeña, y también a otros tres residuos de Lys en la subunidad grande. La unión a estos sitios fue impedida por el efector alostérico 3-PGA, lo que indicó que están directamente involucrados en la unión de este activador (302,303). Se obtuvieron resultados similares con la ADP-Glc PPasa de *Anabaena* PCC 7120. En este caso, los residuos modificados se identificaron como Lys<sup>419</sup>, que es homóloga a Lys<sup>440</sup> y Lys<sup>441</sup> en las subunidades pequeñas de las enzimas de espinaca y tubérculo de papa, respectivamente, y la Lys<sup>382</sup> que es análoga a Lys<sup>404</sup> de la subunidad pequeña de tubérculo de papa. La identificación de estos residuos como sitios de unión a efectores se confirmó mediante mutagénesis dirigida al sitio de la ADP-Glc PPasa de *Anabaena* PCC 7120 (304,305). Por otro lado, estudios sobre la enzima *AnaGlgC* indicaron que la Arg<sup>294</sup> juega un papel en la inhibición por Pi (306).

En base a lo detallado más arriba, realizamos un alineamiento de estructuras para precisar cuáles residuos estarían implicados en la unión a sustratos y efectores, en las enzimas estudiadas en esta Tesis. Basados en el alineamiento de la secuencia aminoacídica (Figura 11), hemos identificado que aquellos aminoácidos postulados como involucrados en la catálisis (Tyr<sup>114</sup>, Asp<sup>142</sup> y Lys<sup>195</sup> en *E. coli*, resaltados en rojo) se encuentran conservados en *inMelGlgC* (Tyr<sup>98</sup>, Asp<sup>126</sup> y Lys<sup>179</sup>), *flMelGlgC* (Tyr<sup>98</sup>, Asp<sup>126</sup> y Lys<sup>179</sup>) y *AnaGlgC* (Phe<sup>97</sup>, Asp<sup>125</sup> y Lys<sup>178</sup>).

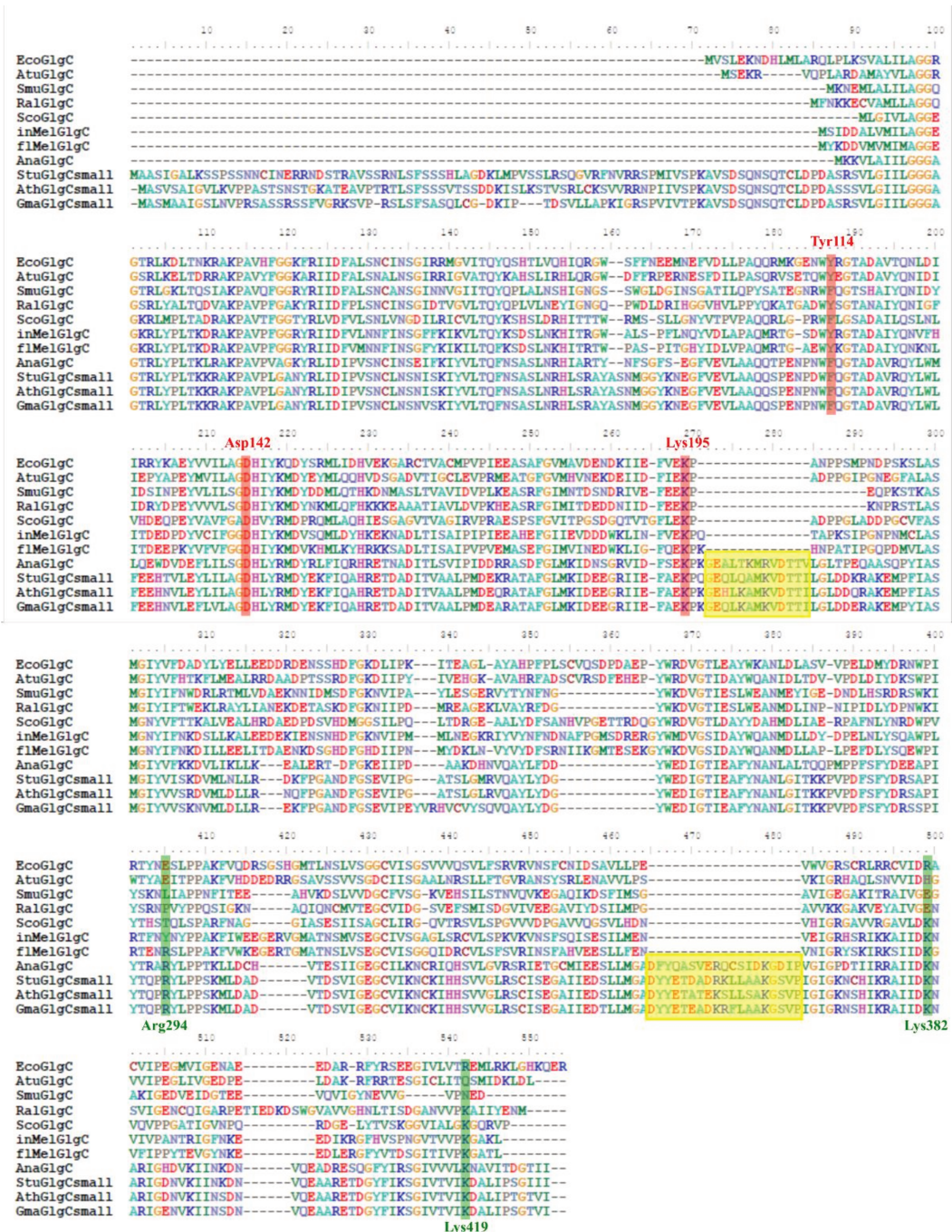


**Figura 10:** Superposición de los modelos tridimensionales obtenidos para el monómero de *inMelGlgC* (naranja), de *flMelGlgC* (violeta) y de *AnaGlgC* (verde), obtenidos por AlphaFold2.

También pudimos identificar otros tres residuos previamente descritos en la ADP-Glc PPasa de *Anabaena* PCC 7120, considerados importantes para la unión a los efectores en este organismo (304–306). Estos residuos son: Arg<sup>294</sup>, responsable de la unión del inhibidor Pi; Lys<sup>382</sup> y Lys<sup>419</sup>, involucrados en la unión del activador 3-PGA (numeración de *Anabaena*, resaltados en verde; Figura 11). Cabe mencionar que, en relación a la unión del 3-PGA, estos residuos están presentes tanto en in*Mel*GlgC como en fl*Mel*GlgC. Los mismos se corresponden con los aminoácidos Lys<sup>373</sup> y Lys<sup>407</sup> en in*Mel*GlgC, y con los aminoácidos Lys<sup>372</sup> y Lys<sup>406</sup> en fl*Mel*GlgC (Figura 11).

Analizando la estructura obtenida mediante AlphaFold2 para la ADP-Glc PPasa de *Anabaena* se puede apreciar que el monómero de *Ana*GlgC está compuesto por un dominio catalítico N-terminal y un dominio C-terminal de hélice  $\beta$  (Figura 10). El dominio catalítico está compuesto por una hoja  $\beta$  de siete hebras en su mayoría paralelas cubierta por hélices  $\alpha$ , presentando un pliegue que concuerda con el pliegue de Rossmann de unión a dinucleótidos (307). El dominio catalítico se une con el dominio de hélice  $\beta$  C-terminal a través de una hélice  $\alpha$  que abarca los residuos 262-273. El dominio C-terminal adopta un pliegue de hélice  $\beta$  levógira con una inserción de una hélice  $\alpha$  (Figura 10). Sin embargo, en el dominio C-terminal de las ADP-Glc PPasas de *Melainabacteria* no se observa esta inserción de la hélice  $\alpha$  (Figura 10). Este tipo de pliegue del dominio de hélice  $\beta$  se ha encontrado en las estructuras de varias proteínas (308–311), pero la orientación y la longitud del dominio de la hélice  $\beta$  es completamente diferente. Funcionalmente, los otros dominios de hélice  $\beta$  pertenecen a acetiltransferasas, succiniltransferasas o a un dispositivo de perforación de membrana. Sin embargo, en las ADP-Glc PPasas, el dominio de hélice  $\beta$  participa en la regulación alostérica, interactúa con el N-terminal dentro de cada monómero y contribuye a la estructura de oligomerización (137).

En el alineamiento realizado con ADP-Glc PPasas de diferentes fuentes (Figura 11), se observa que los residuos Lys<sup>382</sup> y Lys<sup>419</sup> de *Ana*GlgC (responsables de la unión del activador 3-PGA), se encuentran conservados en la enzima de *S. coelicolor* y en ambas enzimas de *Melainabacteria*. Sin embargo, estas enzimas fueron insensibles a este efector, lo que sugiere que las ADP-Glc PPasas de organismos fotosintéticos adquirieron más tarde esta regulación por 3-PGA, permitiéndoles adaptarse al metabolismo que opera en dichos organismos. Hasta ahora, se desconoce si los sitios reguladores están ubicados en los mismos dominios en la estructura de la proteína, pero parece que el extremo C-terminal juega un papel importante en todas las clases de ADP-Glc PPasa (144,146). Algunas de estas enzimas tienen una selectividad relativamente inespecífica para los reguladores alostéricos, lo que indica una cierta flexibilidad para incorporar cambios evolutivos y así poder adaptarse a un metabolismo determinado.



**Figura 11:** Alineamiento de secuencias para las ADP-Glc PPasas de *Melainabacteria* y *Anabaena* con las enzimas de *E. coli*, *A. tumefaciens*, *S. mutans*, *R. albus*, *S. coelicolor*, subunidad S de *Solanum tuberosum*, *A. thaliana* y *Glycine max*. Se resaltaron en rojo los residuos que están relacionados a la catálisis, y en verde los que están relacionados a la regulación alostérica. En amarillo se resaltan las zonas de inserción que se da en las ADP-Glc PPasas de plantas y *Anabaena*.

En la Figura 11 se resaltan en color amarillo las zonas de inserción presentes en las ADP-Glc PPasas de plantas y *Anabaena*. Como se puede observar, en las enzimas provenientes de bacterias heterotróficas y de cianobacterias no fotosintéticas, estas regiones no se encuentran. Estas divergencias, tanto a nivel estructural como cinético, plantean cuestiones biológicas y evolutivas adicionales. La marcada disparidad en la clasificación taxonómica de *Melainabacteria* y la posición filogenética de sus ADP-Glc PPasas también generan interrogantes a responder en futuros trabajos de investigación.

### 3.5. DISCUSIÓN

Inicialmente, el filo de cianobacterias sólo incluía microorganismos que realizaban fotosíntesis oxigénica (266,312). Tal escenario fue cuestionado recientemente después de descubrir el género *Melainabacteria*, un grupo bacteriano estrechamente relacionado con las cianobacterias a nivel filogenético pero incapaz de realizar fotosíntesis (265,266). Esto se debe a que los genomas de *Melainabacteria* carecen por completo de genes relacionados a la fotosíntesis (fotosistemas I y II, membranas tilacoides, succinato deshidrogenasa y complejo del citocromo b<sub>6</sub>f), lo que indica que ninguna de ellas tiene capacidad para realizar fotosíntesis oxigénica o anoxigénica (265). Asimismo, se evidencia la ausencia de genes que codifican proteínas transportadoras de electrones solubles (por ejemplo, plastocianina o ferredoxina fotosintética), así como aquellas asociadas a membranas (por ejemplo, citocromos, quinonas, complejos Fe-S o flavina) (265). El análisis de datos obtenidos por metagenómica, disponibles en bases de datos, nos permitió encontrar genes de *Melainabacteria* relacionados con el metabolismo de los carbohidratos, particularmente la síntesis de glucógeno (Tabla 7). Basándonos en esta premisa, consideramos que el análisis de las propiedades cinéticas y regulatorias de las enzimas metabólicas críticas contribuiría a la discusión bioquímica y evolutiva en relación con la categorización de las cianobacterias fotosintéticas y su grupo cercano, *Melainabacteria*.

La regulación de la síntesis de glucógeno en bacterias se da a nivel de la producción de ADP-Glc, reacción catalizada por la ADP-Glc PPasa (50,51,110), lo cual constituye una diferencia sustancial respecto a lo que ocurre en organismos eucariotas, donde la síntesis de glucógeno se da a partir de UDP-Glc y los mecanismos regulatorios se manifiestan en la elongación del polisacárido (73). Las ADP-Glc PPasas son enzimas alostéricas reguladas por metabolitos involucrados en las principales vías metabólicas de cada organismo (50,110). Un claro ejemplo son las cianobacterias fotosintéticas, que asimilan CO<sub>2</sub> durante la fotosíntesis oxigénica y su ADP-Glc PPasa es activada por el primer producto directo de la fijación del carbono (3-PGA). Por el contrario, los intermediarios glucolíticos controlan la enzima de los microorganismos heterótrofos (por ejemplo, Fru-1,6-P<sub>2</sub> y Pyr en la enzima de *E. coli* (146,148–150,287)). En consecuencia, la comprensión de las propiedades cinéticas y regulatorias de la ADP-Glc PPasa de *Melainabacteria* es una herramienta relevante para inferir las rutas metabólicas primarias, aún por conocer, que tienen lugar en estos organismos.

Los antecedentes arriba detallados muestran una clara diferencia entre las ADP-Glc PPasas de organismos fotosintéticos y no fotosintéticos, cuyas propiedades cinéticas y regulatorias difieren significativamente, lo que nos llevó a hacernos una pregunta: ¿Qué ocurre con la enzima del grupo de cianobacterias no fotosintéticas recientemente descubierto? Para responder a este interrogante, en el presente trabajo de Tesis se ha avanzado en la caracterización funcional y

estructural de la ADP-Glc PPasa de *Melainabacteria*, ya que estos procariotas parecen ubicarse en un nuevo enclave filogenético que merece una mayor caracterización metabólica.

Realizamos un análisis filogenético para obtener más información sobre la relación evolutiva entre las ADP-Glc PPasas de *Melainabacteria* y las enzimas de otros grupos taxonómicos. Nuestro análisis filogenético reveló que las enzimas correspondientes de *Melainabacteria* se agrupan más cerca de aquellas que provienen de bacterias heterótrofas que de las ADP-Glc PPasas de cianobacterias fotosintéticas (Figura 3). Por otro lado, las ADP-Glc PPasas de diferentes fuentes procariotas demostraron ser homotetraméricas, con subunidades de alrededor de 45-50 kDa (50). Hasta ahora, la única excepción es la enzima de Firmicutes, un heterotetrámero compuesto por dos tipos de subunidades, GlgC y GlgD (50,96,158). En los datos metagenómicos de *Melainabacteria* identificamos un único gen *glgC* y, después de la expresión recombinante de las dos enzimas *inMelGlgC* y *flMelGlgC*, demostramos que ambas proteínas son homotetrámeros (Figura 4B). Por lo tanto, las ADP-Glc PPasas de este clado de cianobacterias no fotosintéticas tienen una arquitectura estructural similar a la de las cianobacterias fotosintéticas (y la mayoría de las fuentes bacterianas, excepto Firmicutes (96)).

Globalmente, podemos afirmar que las enzimas de *Melainabacteria* exhibieron actividades específicas un orden de magnitud superior a la de *Anabaena* PCC 7120. No obstante, esta última mostró una afinidad aparentemente mayor hacia la Glc-1P (Tabla 3). Cabe destacar que la eficiencia catalítica de las ADP-Glc PPasas de *Melainabacteria* fue similar a la observada para las enzimas de bacterias heterótrofas (50,110,286). Inesperadamente, evidenciamos que las ADP-Glc PPasas de *Melainabacteria* carecen de activación por 3-PGA, pero demuestran una notable sensibilidad a las hexosas-6P, tales como Glc-6P, Fru-6P y Man-6P (Figura 6 y Tabla 4), de manera similar a las enzimas de bacterias heterótrofas (50), particularmente aquellas de Actinobacteria (119,120,160,161). A su vez, las ADP-Glc PPasas actinobacterianas y las de *Melainabacteria* se ubican, llamativamente, en la misma rama del árbol filogenético (Figura 3). Asimismo, si analizamos particularmente la activación por Glc-6P de *inMelGlgC* (Figura 7), resulta ser la más alta reportada hasta ahora para este metabolito, mientras que el efecto sobre *flMelGlgC* es similar al de la enzima de *R. jostii* (160,161).

Utilizando los datos metagenómicos disponibles, también analizamos la existencia en *Melainabacteria* de otros genes relacionados con el metabolismo del glucógeno en bacterias. Como se muestra en la Tabla 7, encontramos que estos organismos contienen genes *glgA* y *glgB*, que codifican para putativas glucógeno sintasa (GlgA, EC 2.4.1.21) y enzima ramificante de glucógeno (GlgB, EC 2.4.1.18). Curiosamente, la hipotética GlgA de *Melainabacteria* muestra una mayor identidad con las dos enzimas homólogas de *Synechocystis* PCC 6803, GlgA<sub>1</sub> (37%) y GlgA<sub>2</sub> (33%; esta última probablemente relacionada con la elongación del glucano en algunas cianobacterias (313)) que con la de *E. coli* (~29%) o *M. tuberculosis* (~21%; recientemente nombrada como GlgM (118)). Además, las GlgAs de *Melainabacteria* y *Anabaena* PCC 7120

comparten un 36% de identidad entre sí. Por otro lado, la GlgA de *Anabaena* tiene una identidad del 73% y del 30% con las proteínas GlgA<sub>1</sub> y GlgA<sub>2</sub> de *Synechocystis*, respectivamente. En cuanto a la enzima ramificante, encontramos una secuencia de proteína en *Melainabacteria* con un 39% de identidad con la enzima homóloga de *Thermus thermophilus*, que es la única GlgB perteneciente a la familia GH57 en CAZy (194) para la cual se encuentran disponibles datos, tanto cinéticos como estructurales (314). Llamativamente, la putativa GlgB de *Melainabacteria* tiene un 93% de identidad con una hipotética enzima homóloga de *Clostridium*, y un 30 y un 40% de identidad con las GlgB GH57 de *Bacillus halodurans* y *Thermococcus kodakarensis*, respectivamente. Por otro lado, cuando se utilizó como templatado la GlgB de *Anabaena* PCC 7120 (perteneciente a la familia GH13 en CAZy, como la mayoría de las GlgB ya caracterizadas (315)), no se encontraron coincidencias significativas en la base de datos genómicos de *Melainabacteria*. Recientemente, se sugirió que la GlgB de la familia GH57 produce glucanos con ramificaciones cortas, aunque se debe seguir investigando para comprender el papel preciso de este tipo de enzima (316). Entonces, dada la presencia de genes que codifican la ruta clásica y completa para la síntesis de glucógeno, sumado a las propiedades cinéticas y regulatorias de las ADP-Glc PPasas caracterizadas en este trabajo de Tesis, se puede sugerir que el glucano actuaría como una molécula para el almacenamiento de carbono y energía en *Melainabacteria* (99), posiblemente con algunas particularidades estructurales aún por dilucidar (317).

**Tabla 7:** Proteínas detectadas después de realizar BLAST contra el genoma de *Melainabacteria*, en comparación con *Anabaena* PCC 7120.

<b>Gen</b>	<b><i>Melainabacteria</i> Intestinal</b>	<b><i>Melainabacteria</i> de vida libre</b>	<b><i>Anabaena</i> PCC 7120</b>
<i>glgC</i>	ID: AOR37842.1	ID: OGI00355.1	ID: BAB76344.1
<i>glgA</i>	ID: AOR37764.1	ID: OGI01396.1	ID: BAB73578.1 ID: BAB77555.1
<i>glgB</i>	ID: AOR39099.1	ID: OGI01242.1	ID: BAB72670.1
<i>glgX</i>	ID: AOR37731.1	ID: OGI01270.1	ID: BAB77692.1
<i>glgP</i>	ID: AOR37860.1	ID: OGI02531.1	ID: BAB73229.1
<i>glgE<sub>1</sub></i>	ID: AOR39243.1	ID: OGI01701.1 ID: OGI04937.1	<b>No encontrado</b>
<i>glgE<sub>2</sub></i>	ID: AOR39243.1	ID: OGI01701.1 ID: OGI04937.1	<b>No encontrado</b>
<i>sus</i>	<b>No encontrado</b>	<b>No encontrado</b>	ID: BAB76684.1
<i>sps</i>	<b>No encontrado</b>	<b>No encontrado</b>	ID: BAB75069.1 ID: BAB72334.1

La hipótesis del glucógeno como molécula de reserva de carbono y energía en *Melainabacteria* se ve sustentada por la presencia del gen que codifica la maltosiltransferasa (GlgE, EC 2.4.99.16), una enzima que alarga una cadena de  $\alpha$ -1,4-glucano lineal en dos unidades de Glc (112). Esta última se caracterizó únicamente a partir de fuentes actinobacterianas; la enzima de *Streptomyces* fue cristalizada (318) y la de *M. tuberculosis* se propuso como *target* para un fármaco antibacteriano (122). La presencia de genes correspondientes a dos vías del glucógeno se postuló después de un análisis *in silico* (113). Esto fue demostrado en *M. tuberculosis* (88,319), y más recientemente, se caracterizó bioquímicamente en *Chlamydia* (123). Sumado a esto, se estableció que la enzima GlgA micobacteriana cataliza la síntesis de Mal-1P, el sustrato específico para la elongación del glucógeno por GlgE (121). Los sustratos para la síntesis de Mal-1P por parte de la GlgA micobacteriana (ahora GlgM) son Glc-1P (aceptor) y ADP-Glc (dador glucosídico), ambos íntimamente ligados a la actividad de la ADP-Glc PPasa, reforzando así el papel protagónico de esta última en el metabolismo del glucógeno bacteriano. Tomados los resultados de este Capítulo de Tesis en conjunto, la caracterización bioquímica de las ADP-Glc PPasas de *Melainabacteria* y el análisis de los genes que coexisten en su genoma permiten postular que el manejo del carbono en estas bacterias es similar al de otros microorganismos heterótrofos, particularmente Actinobacteria. Por otro lado, no encontramos genes relacionados con la síntesis de Suc en *Melainabacteria* [por ejemplo, Suc-6P sintasa (EC 2.4.1.14) y Suc sintasa (EC 2.4.1.13)], como ocurre en *Anabaena* (Tabla 7). En relación a esto, planteamos la hipótesis de que esta podría ser una diferencia crítica entre *Anabaena* (y otros organismos cianobacterianos) con el clado hermano *Melainabacteria*. A su vez, esta diferencia se ve reflejada en las diferentes propiedades regulatorias determinadas en este trabajo de Tesis para las respectivas ADP-Glc PPasas. También, dada la proximidad entre las ADP-Glc PPasas de Actinobacteria y *Melainabacteria*, prevemos que estas enzimas serán útiles para explicar el mecanismo molecular subyacente a la activación de ADP-Glc PPasa por Glc-6P. Más aún, dado que la Glc-6P es el efector común entre las enzimas de organismos fotosintéticos y algunos heterótrofos (Figura 6 y Tabla 4), aclarar este mecanismo alostérico será fundamental para iluminar el escenario evolutivo relacionado con los cambios en la sensibilidad a un efector dado (155).

Las diferencias en la sensibilidad por los reguladores de las ADP-Glc PPasas juegan un papel metabólico clave en los organismos que utilizan ADP-Glc para la síntesis de polisacáridos como almacenamiento de carbono y energía. Es probable que un ancestro común de la enzima haya evolucionado a otras formas que tienen diferentes propiedades regulatorias y, a su vez, que se adaptan a diversos entornos metabólicos, como ha ocurrido en varias clases de ADP-Glc PPasas (50). En general, nuestros resultados nos permiten enfatizar la importancia de comprender el vínculo entre la síntesis de compuestos de almacenamiento, como el glucógeno, con metabolitos que indican el estado del carbono y la disponibilidad energética de la célula, mediante el estudio

de las características cinéticas, regulatorias y estructurales de enzimas metabólicas críticas. En este sentido, los resultados obtenidos en esta Tesis constituyen el primer informe bioquímico sobre las enzimas involucradas en las rutas metabólicas de *Melainabacteria*, lo que contribuye en gran medida con nuevos conocimientos al tema candente relacionado con la separación filogenética de las cianobacterias fotosintéticas y no fotosintéticas.

## 4. CAPÍTULO 2: “Estudio de isoformas de GSasa en bacterias: el caso de *B. japonicum*”

### 4.1. INTRODUCCIÓN

Las bacterias de vida libre pertenecientes a la clase Rhizobiaceae suelen estar asociadas simbióticamente a las plantas de la familia de las leguminosas (320). Estas bacterias se caracterizan por su capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico en nitrógeno orgánico. El establecimiento de una simbiosis efectiva de fijación de nitrógeno entre la leguminosa y los rizobios es un proceso complejo e implica eventos de reconocimiento y señalización discretos (321). Por lo general, los rizobios se adhieren al pelo de la raíz, penetran a través de la epidermis, se dividen dentro del hilo de infección derivado de la planta y luego invaden las células corticales. Por otro lado, en respuesta a la infección bacteriana, las células corticales de la planta forman un nuevo órgano, el nódulo, en el que residen las bacterias diferenciadas (321).

Generalmente, los microorganismos que cumplen un rol crítico en el ciclo del nitrógeno son las bacterias más abundantes en el suelo. Entre estos organismos se incluyen los géneros *Bradyrhizobium*, *Sphingomonas*, *Flavobacterium*, *Pontibacter* y *Nitrosovibrio* (322). Los procesos de fijación de nitrógeno y oxidación de amoníaco llevados a cabo por estos organismos juegan un papel importante en el mantenimiento de la fertilidad del suelo. Entre estos, *Bradyrhizobium* fue encontrado en niveles superiores al 0,5% en 27 de las 52 microbiotas comparadas, sugiriendo que ningún otro organismo es más ubicuo que *Bradyrhizobium* (322). Numerosos estudios confirman la prevalencia de *Bradyrhizobium* en el suelo (323–327). Basándose en su prevalencia y en las funciones ecológicas claves que realizan, se propuso el uso de organismos del género *Bradyrhizobium* para estudiar la eco-toxicidad de contaminantes para los microorganismos del suelo (322). Además de suelos agrícolas, estos organismos también se detectaron en suelos forestales, incluidas especies no simbióticas (325,327). *B. japonicum* USDA 110 (actualmente renombrado como *B. diazoefficiens*) es una bacteria Gram-negativa del suelo, que infecta y establece una simbiosis fijadora de nitrógeno con la planta de soja, una legumbre tropical y uno de los cultivos leguminosos más importantes en el ámbito agropecuario (328). Esta bacteria se ha utilizado ampliamente en aplicaciones medioambientales y su genoma de 9 Mb se encuentra secuenciado completamente (329).

La exploración de diversos genomas procariotas ha revelado que en un número considerable de bacterias hay más de un gen *glgA*, el cual se encarga de codificar una glicosiltransferasa putativa del tipo GSasa. Un caso particular se observa en el *phylum* Actinobacteria, en organismos tales como *M. tuberculosis*, *S. coelicolor* y *R. jostii*, los cuales poseen dos genes distintos que codifican para GSasas. Cada uno de estos genes se encuentra ubicado en operones separados y se

relacionan estrechamente con el metabolismo de los polisacáridos. A excepción de un único caso reportado en cianobacterias (313), no se encuentran informes de GSasas duplicadas en la bibliografía. Para el caso específico de *M. tuberculosis*, se encontraron GSasas duplicadas, aunque, hasta el momento, el análisis cinético sólo se ha realizado para una de ellas. Este análisis condujo a la identificación de una actividad enzimática hasta entonces desconocida, denominada maltosa-1P sintasa (121).

La duplicación de genes es un evento en el que un gen da lugar a dos genes que son funcionalmente indistinguibles entre sí. Los genes duplicados permanecen en el mismo genoma y, por lo tanto, son parálogos (330). A menudo, los genes duplicados pueden presentar una redundancia funcional y llevar a cabo la misma función bioquímica en las células (331). La duplicación de genes también puede evolucionar y codificar enzimas o isoenzimas que poseen secuencias similares pero con diferentes cinéticas, preferencias de sustrato y/o perfiles de expresión (331). Este tipo de duplicaciones probablemente han ocurrido en un período de tiempo relativamente reciente o están bajo una baja presión selectiva (331). Por lo tanto, la duplicación y especialización de genes son la base de la evolución del metabolismo y la aparición de nuevas propiedades biocatalíticas (332,333). De hecho, la duplicación génica y la promiscuidad de proteínas son cruciales para proporcionar una fuente de diversidad e innovación metabólica en procariotas (2,334).

Llamativamente, *B. japonicum*, un organismo que no pertenece al filo Actinobacteria, también posee dos genes codificantes para putativas GSasas. Como tal, se propuso como uno de los objetivos de este trabajo de Tesis realizar el clonado molecular y la caracterización cinética de estos dos genes que codifican para supuestas GSasas de *B. japonicum*. Posteriormente, se propuso conducir un análisis comparativo de las propiedades de dichas proteínas entre sí y en relación con lo que sucede en Actinobacteria y otros procariotas, debido a que son relativamente escasos los estudios sobre la caracterización de dos isoformas de GSasas bacterianas.

## 4.2. OBJETIVOS

El objetivo principal de este Capítulo es comprender en profundidad la formación de polisacáridos de reserva a través del estudio de dos glicosiltransferasas del tipo GSasa presentes en *B. japonicum*. Para alcanzar este objetivo, se han delineado una serie de pasos específicos, los cuales incluyen:

- Realizar el clonado molecular por medio de la síntesis *de novo* de los dos genes codificantes para las GSasas de *B. japonicum*: genes *bll2778* y *blr6459*.
- Realizar la expresión recombinante de ambas GSasas pertenecientes a *B. japonicum*, utilizando células de *E. coli* como sistema de expresión. Una vez expresadas, proceder a la purificación de estas enzimas, a fin de caracterizarlas cinéticamente.
- Llevar a cabo el análisis cinético detallado de las GSasas obtenidas. Determinar su actividad específica, como así también la afinidad por los sustratos. Así poder realizar una comparación de estas enzimas entre sí y en relación a lo que ocurre en otros procariontes. Obtención de parámetros cinéticos.
- Ensayar la utilización de distintos sustratos por estas isoformas de GSasas, de modo de indagar sobre la especificidad de uso de NDP-azúcares y/o de glucanos (lineales o ramificados) que puedan producir distintos productos.
- Identificar y recopilar secuencias de GSasas homólogas de diversas especies bacterianas, incluidos Actinobacteria y otros procariontes. Construir un árbol filogenético para determinar las relaciones evolutivas entre las GSasas de *B. japonicum* y las de otros organismos.
- Predecir la estructura tridimensional de las GSasas de *B. japonicum* a partir de sus secuencias de aminoácidos. Compararlas con enzimas de estructura conocida para obtener información sobre la posible arquitectura de su sitio activo y regiones funcionales.

### 4.3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 4.3.1. Cepas bacterianas

Para el clonado de los genes y la expresión recombinante de las GSasas de *B. japonicum* se emplearon, además de las cepas de *E. coli* descritas en el Capítulo 1, las que se describen a continuación:

***E. coli* Tuner (DE3):** F<sup>-</sup> *ompT hsdS* (r<sup>-</sup> m<sup>-</sup>) *gal dcm lacY1* (DE3). Esta cepa se utilizó como alternativa a *E. coli* BL21 (DE3). La cepa Tuner, derivada de BL21 con delección *lacZY*, permite niveles ajustables de expresión proteica en todas las células de un cultivo. La mutación en la permeasa lac (*lacY*) facilita la entrada uniforme de IPTG en todas las células de la población, generando un nivel de inducción homogéneo dependiente de la concentración. La expresión a niveles más bajos puede mejorar la solubilidad y la actividad de proteínas de difícil obtención.

***E. coli* BL21 (DE3) B834:** es una cepa deficiente en proteasas y auxótrofa para metionina. Posee una copia cromosomal del gen de la T<sub>7</sub> ARN polimerasa bajo el control del promotor *lac*. Esta cepa es adecuada para la producción de proteínas a partir de genes clonados en vectores pET mediante la inducción con IPTG.

***E. coli* BL21 Codon plus-RP (DE3):** es una cepa derivada de células de BL21 (DE3) que mejora la expresión de proteínas mediante el suministro de copias adicionales de tRNAs específicos que son raros en *E. coli*: el gen *argU*, que reconoce los codones de arginina AGA y AGG, y el gen *proL*, que reconoce el codón de prolina CCC. Estos codones aparecen frecuentemente en genomas ricos en GC. Los genes a expresar se encuentran bajo el control del promotor T<sub>7</sub> inducible con IPTG. La cepa es resistente a cloranfenicol.

***E. coli* Rosetta (DE3):** al igual que la cepa de *E. coli* Codon plus, es derivada de la cepa *E. coli* BL21 (DE3), destinada a aumentar la expresión de proteínas eucariotas que contienen codones raramente usados en *E. coli*. Esta cepa suministra los genes de tRNA para AGG/AGA (Arg), AUA (Ile), CUA (Leu), CCC (Pro) y GGA (Gly) en un plásmido compatible (ColE1) resistente a cloranfenicol.

***E. coli* SoluBL21 (DE3):** F<sup>-</sup> *ompT hsdSB* (rB<sup>-</sup> mB<sup>-</sup>) *gal dcm* (DE3) es una cepa derivada de células de BL21 (DE3) mejorada para la expresión de proteínas tóxicas y proteínas de mamíferos en forma soluble. Los genes a expresar se encuentran bajo el control del promotor T<sub>7</sub> inducible con IPTG.

#### 4.3.2. Medios de cultivo y antibióticos

Para el cultivo de células de *E. coli* se emplearon los medios de cultivo y antibióticos descritos en el Capítulo 1.

### 4.3.3. Plásmidos

Durante el desarrollo de este Capítulo se utilizó el vector de expresión pET28c (detallado en el Capítulo 1) y los siguientes plásmidos de clonado:

**pUC57:** vector de clonado para sistemas bacterianos de *E. coli* derivado del plásmido pUC19. Este plásmido confiere a la célula resistencia al antibiótico ampicilina.

**pGEM-T Easy:** vector de clonado abierto que contiene una timina (T) en el extremo 3', la cual es compatible con los fragmentos de ADN amplificados por PCR con *Taq* ADN polimerasa que poseen extremos con adenina (A) en 3'. Este vector ofrece la posibilidad de verificar la presencia del inserto deseado por digestión con *EcoRI* o *NotI*, ya que posee dos sitios de restricción para estas enzimas a ambos lados del sitio de múltiple clonado. Por otra parte, los promotores T<sub>7</sub> y SP<sub>6</sub> se encuentran flanqueando el sitio de múltiple clonado, los cuales proporcionan la secuencia donde hibridan los oligonucleótidos utilizados como cebadores durante el proceso de secuenciación.

### 4.3.4. Obtención de genes sintéticos

Los genes codificantes para las GSasas (GlgA471 y GlgA482) de *B. japonicum* caracterizadas en este Capítulo se obtuvieron por síntesis *de novo* (Bio Basic, Canadá). Los codones fueron optimizados para su expresión en *E. coli*, con la adición de los sitios de restricción *NdeI* y *SacI* en los extremos 5' y 3', respectivamente, y se insertaron en el vector pUC57.

El resto de las técnicas: electroforesis en gel de agarosa, preparación de ADN plasmídico, digestión con enzimas de restricción, ligación, preparación y transformación de células competentes de *E. coli*, se realizaron siguiendo los protocolos descritos en Materiales y Métodos del Capítulo 1.

### 4.3.5. Expresión y purificación de las proteínas recombinantes

Optimizadas las condiciones de expresión para cada proteína en particular, se llevó a cabo su producción a mayor escala. Para la enzima GSasa482, a partir de un vial de células de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con la respectiva construcción plasmídica que porta el gen de interés, se realizó el cultivo del clon productor durante toda la noche a 37 °C, en agitación y suplementado con el antibiótico correspondiente. Luego, este cultivo se utilizó para inocular 1 L de medio de cultivo YT2X con el antibiótico adecuado. El medio de cultivo inoculado se incubó a 37 °C con agitación a 200 rpm, hasta que alcanzó una DO a 600 nm de ~0,6. En este momento se indujo la expresión de la proteína de interés mediante el agregado del inductor IPTG 0,1 mM. Las células se cultivaron durante 16 h a 18 °C y 200 rpm. Para cosechar las células, se centrifugó el cultivo a 4 °C durante 10 min a 5.000 xg, se descartó el sobrenadante y se conservaron a -20 °C hasta su uso. Por otro lado, la enzima GSasa471 se logró obtener de manera soluble utilizando la cepa de

expresión *E. coli* Solu-BL21 con las mismas condiciones de inducción mencionadas para la GSasa482.

Las células se resuspendieron en una cantidad adecuada de *buffer* H [Tris-HCl 25 mM, pH 8, NaCl 300 mM, imidazol 10 mM, glicerol 5% (v/v)] y se enfriaron en un baño de hielo. Luego se rompieron por ultrasonido con un procesador de alta intensidad *VibraCell™ VCX 130* (Sonics). Para la disrupción de *E. coli* se utilizaron pulsos de 4 s, cada 2 s, durante una sesión de 10 min de tiempo efectivo. El lisado celular resultante se centrifugó a 30.000  $\times g$  durante 20 min a 4 °C hasta obtener un sobrenadante limpio de partículas en suspensión.

#### **4.3.6. Cromatografía de afinidad por metal inmovilizado**

Valiéndose de la etiqueta de His proporcionada por el vector pET28c, se realizó la purificación de las enzimas mediante IMAC, siguiendo lo detallado en el Capítulo 1. En el caso de las GSasas de *B. japonicum*, se dializó contra un *buffer* conteniendo etanolamina 20 mM, pH 8 y glicerol 20% (v/v). De esta manera, las enzimas fueron estables por al menos 6 meses, cuando se almacenaron a -80 °C en las condiciones especificadas.

#### **4.3.7. Métodos bioquímicos generales**

La electroforesis en gel de poliacrilamida, la cuantificación de proteínas, el desalado y concentración de las mismas se realizó siguiendo los protocolos establecidos y descritos en el Capítulo 1. Asimismo, la determinación de la estructura cuaternaria de las GSasas de *B. japonicum* se realizó mediante cromatografía de filtración por gel, comparando con patrones de masa molecular conocidos, acorde a lo detallado en los Materiales y Métodos del Capítulo 1 de la presente Tesis.

#### **4.3.8. Ensayos de actividad enzimática**

Todas las actividades enzimáticas de las enzimas estudiadas en este Capítulo se expresaron en U/mg. Una unidad de actividad enzimática (U) es definida como la cantidad de enzima capaz de convertir 1  $\mu\text{mol}$  de sustrato (o de generar 1  $\mu\text{mol}$  de producto) en 1 min, en las condiciones experimentales especificadas en cada caso.

##### **4.3.8.1. Determinación de la actividad de la GSasa: Método cinético con enzimas acopladas**

La actividad de las GSasas caracterizadas en este Capítulo se determinó en la dirección de la síntesis de glucógeno. Para estas medidas se utilizó el método cinético acoplado a las enzimas PK y LDH descrito en el Capítulo anterior.

La mezcla de reacción contenía MOPS-NaOH 50 mM pH 8, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, PEP 0,3 mM, NDP-Glc 1 mM, NADH 0,3 mM, BSA 0,2 mg/ml, PK 0,02 U/ $\mu\text{l}$  (EC 2.7.1.40), LDH 0,02 U/ $\mu\text{l}$

(EC 1.1.1.27) y enzima en una dilución adecuada. La reacción se inició por el agregado de glucógeno de hígado de conejo 2 mg/ml (Tipo IX, Sigma).

Los parámetros cinéticos se calcularon realizando los ajustes correspondientes, siguiendo lo anteriormente descrito en la metodología del Capítulo 1.

#### **4.3.9. Tratamiento informático**

Para el análisis de las diferentes secuencias se utilizaron las bases de datos *on line* detalladas en el Capítulo 1. Para la construcción del árbol filogenético mostrado en este Capítulo se siguieron los pasos detallados en el Capítulo 1 de esta Tesis. Se construyeron los modelos 3D de las GSasas de *B. japonicum* utilizando el algoritmo AlphaFold2.

## 4.4. RESULTADOS

### 4.4.1. Identificación de genes *glgA*

La individualización de dos genes putativos *glgA* (*bll2778* y *blr6459*) en *B. japonicum* USDA 110 resultó particularmente intrigante. La identificación precisa de estos genes se llevó a cabo mediante un minucioso análisis del genoma de *B. japonicum* (<http://www.microbesonline.org/cgi-bin/genomeInfo.cgi?taxId=224911>; (329)). Este hallazgo de gran relevancia aporta una nueva perspectiva a la comprensión de la distribución y la función de las GSasas en procariotas. La presencia de estos genes en *B. japonicum*, un organismo con características particulares debido a su simbiosis con plantas leguminosas, plantea importantes cuestiones sobre la evolución y la adaptación de las GSasas en diferentes linajes bacterianos. La lógica funcional y evolutiva de esta redundancia genética no ha sido determinada, aunque se especula que la presencia de diferentes  $\alpha$ -1,4-glucanos en determinadas actinobacterias puede estar relacionada con glicosiltransferasas con variantes cinéticas, especificidad de sustratos y mecanismos de acción (335).

### 4.4.2. Clonado y expresión recombinante de las putativas GSasas

Los genes *bll2778* (1.416 pb) y *blr6459* (1.449 pb) se obtuvieron mediante síntesis *de novo* (Bio Basic Inc). Los mismos fueron optimizados para la expresión recombinante en células de *E. coli* y con sitios flanqueantes para las enzimas de restricción *NdeI* y *SacI* en los extremos 5' y 3', respectivamente.

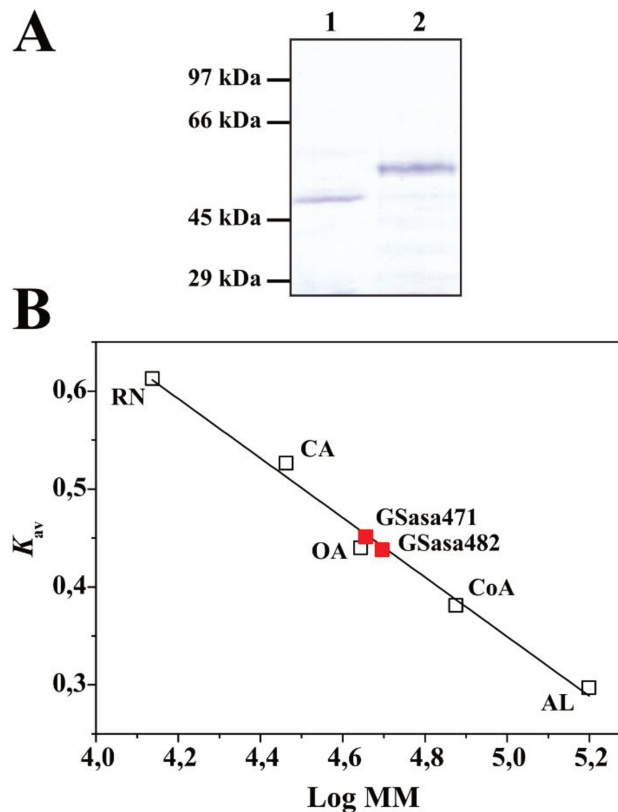
Una vez que se obtuvieron los genes sintetizados *de novo* codificantes para las respectivas GSasas de *B. japonicum*, se utilizaron las enzimas *NdeI* y *SacI* para el subclonado de los mismos en el vector de expresión pET28c. Este vector permite obtener altos niveles de expresión de las enzimas en forma recombinante, fusionadas a una etiqueta de His en el extremo N-terminal, lo cual facilita su posterior purificación mediante cromatografía IMAC.

Las respectivas proteínas se denominaron GSasa471 (*bll2778*) y GSasa482 (*blr6459*), en base a la cantidad de aminoácidos que presentan en su secuencia. Con las construcciones [pET28c/GSasa471] y [pET28c/GSasa482], se procedió a la transformación de células competentes de *E. coli* BL21 (DE3) que permiten la producción recombinante de la enzima. Las células transformantes se crecieron en medios LB e YT2X, y se utilizaron en primer lugar para realizar ensayos de expresión a pequeña escala en búsqueda de condiciones óptimas de expresión. La enzima GSasa482 se obtuvo de manera soluble en el medio de cultivo YT2X. La inducción con 0,1 mM de IPTG a 18 °C durante 16 h resultó exitosa para la obtención de la respectiva proteína. En cuanto a la GSasa471, no se observó expresión soluble cuando se utilizó dicha cepa, incluso cuando se analizaron diferentes condiciones de cultivos (tiempo y temperatura de inducción, así como la concentración de IPTG). Por lo tanto, se evaluó su expresión en otras cepas

de expresión, tales como *E. coli* BL21 Codon plus, Tuner, Rosetta, B834 y Solu-BL21. Con esta última cepa se logró obtener la proteína recombinante de manera soluble, utilizando las mismas condiciones de inducción mencionadas para la GSasa482. A continuación, se procedió al escalado en las mismas condiciones ensayadas, seguido de purificación por cromatografía IMAC-Ni<sup>2+</sup>. Para cada enzima recombinante, se realizó un *pool* de las fracciones activas eluidas de la columna (Figura 12A), el cual se dializó contra un *buffer* conteniendo etanolamina 20 mM pH 8 y 20% (v/v) de glicerol. De esta manera, ambas enzimas fueron estables por al menos 6 meses cuando se almacenaron a -80 °C en las condiciones especificadas.

#### 4.4.3. Caracterización estructural de las GSasas recombinantes

Ambas GSasas de *B. japonicum* obtenidas de forma recombinante y purificadas corrieron con una masa molecular de ~50 kDa en un SDS-PAGE (Figura 12A), coincidente con sus masas moleculares teóricas (51,2 kDa para GSasa471 y 51,8 kDa para GSasa482). Para determinar sus estructuras cuaternarias, se realizó una cromatografía de exclusión molecular (Superdex 200 10/300, GE Healthcare), en la que se observó que la GSasa471 eluyó en un único pico, cuyo volumen de elución se corresponde con una masa molecular de ~45,2 kDa, mientras que para la GSasa482, la masa molecular determinada mediante cromatografía de exclusión molecular fue de ~49,7 kDa (Figura 12B). Teniendo en cuenta las masas moleculares teóricas de los monómeros, se pudo determinar que ambas GSasas de *B. japonicum* presentan una estructura monomérica. Esto resulta coincidente con lo informado para la GSasa de *E. coli*, que se ha cristalizado y es monomérica (204). A su vez, concuerda con los reportes previos para la almidón sintasa I (SSasa I) de endospermo de trigo (*Triticum aestivum*) (336), la SSasa I de arroz (*Oryza sativa*) (337), y la SSasa I de cebada (*Hordeum vulgare*) (338), las cuales presentaron una estructura cuaternaria monomérica; todas ellas pertenecientes a la familia GT5 de glicosiltransferasas categorizadas en la base de datos CAZy (339). La GSasa de *A. tumefaciens* también se ha cristalizado, sin embargo la misma se encuentra formando un dímero (203).



**Figura 12:** Análisis de las GSasas de *B. japonicum* mediante SDS-PAGE y cromatografía de exclusión molecular. (A) SDS-PAGE al 10%; **calle 1**, GSasa471 purificada por IMAC; **calle 2**, GSasa482 purificada por IMAC. (B) Curva de calibrado para la determinación de la masa molecular por cromatografía de exclusión molecular. Gráfico de  $K_{av}$  versus Log (Masa Molecular). (□) Proteínas patrones de masa molecular: RN (ribonucleasa, 13,7 kDa), CA (anhidrasa carbónica, 29 kDa), OA (ovoalbúmina, 44 kDa), CoA (conalbúmina, 75 kDa), AL (aldolasa, 158 kDa); (■) GSasa471 y GSasa482.

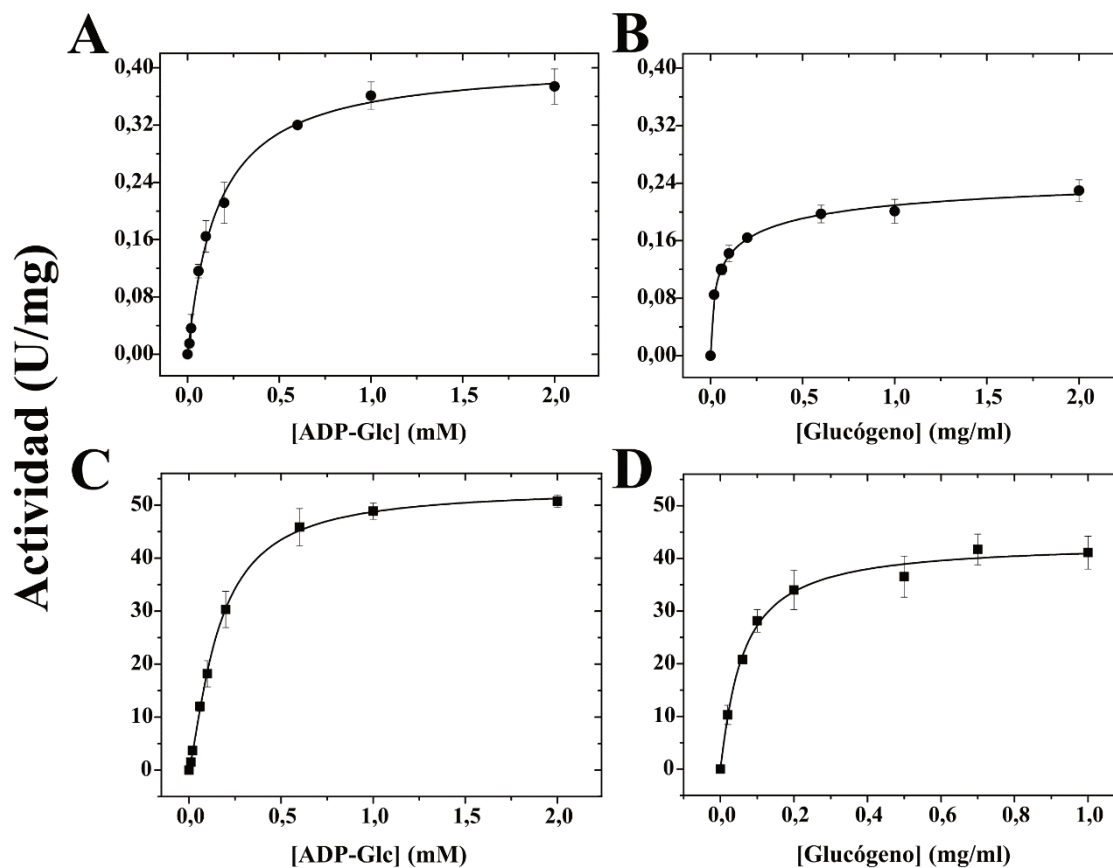
#### 4.4.4. Caracterización cinética de las GSasas recombinantes

Las GSasas catalizan la extensión de cadenas lineales preformadas de  $\alpha$ -1,4-glucanos en una unidad de Glc, utilizando ADP-Glc como sustrato y liberando el ADP correspondiente. Por lo tanto, para caracterizar cinéticamente las dos GSasas de *B. japonicum*, se utilizó un método continuo para seguir la elongación del  $\alpha$ -1,4-glucano, en el que se combinó la liberación del ADP acoplada enzimáticamente con la desaparición de NADH, el cual se puede cuantificar a 340 nm como se describió anteriormente (278). Los parámetros cinéticos ( $K_m$ ,  $V_{max}$  y  $n_H$ ) presentados en la Tabla 8 fueron determinados a partir de las respectivas curvas de saturación para ADP-Glc y glucógeno (mostradas en la Figura 13).

**Tabla 8:** Parámetros cinéticos para ambas GSasas de *B. japonicum*. El valor de  $K_m$  se expresa en mg/ml y mM para glucógeno y ADP-Glc, respectivamente. La eficiencia catalítica posee unidades de  $s^{-1} \cdot (kg/l)^{-1}$  para glucógeno y de  $s^{-1} \cdot M^{-1}$  para ADP-Glc.

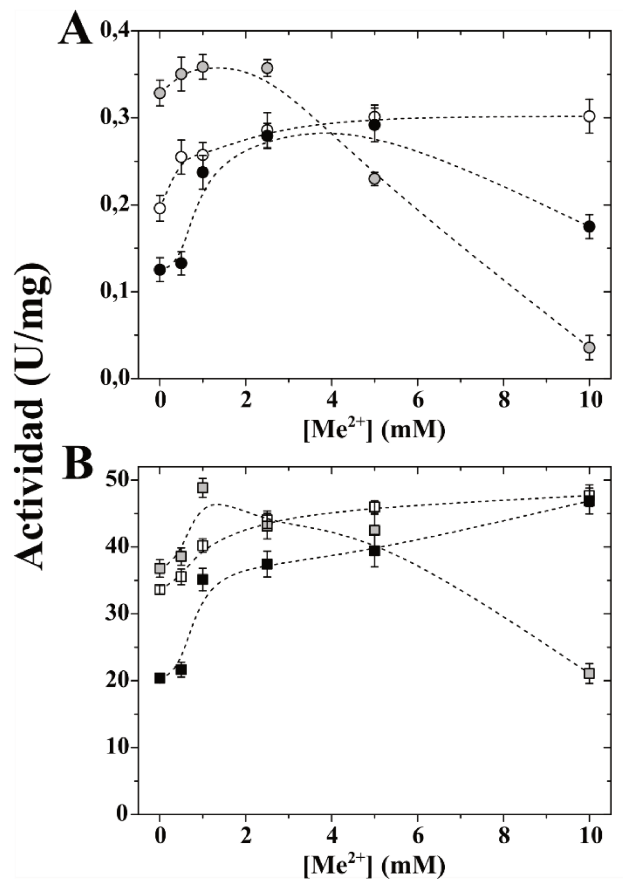
Enzima	Sustrato	$V_{max}$ (U/mg)	$K_m$ (mg/ml) (mM)	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	Ef. Cat. [ $s^{-1} \cdot (kg/l)^{-1}$ ] ( $s^{-1} \cdot M^{-1}$ )
<b>GSasa471</b>	Glucógeno	0,41 ± 0,02	0,09 ± 0,03	0,31	3,4 x 10 <sup>3</sup>
	ADP-Glc		0,16 ± 0,02		1,9 x 10 <sup>3</sup>
<b>GSasa482</b>	Glucógeno	53,1 ± 0,6	0,060 ± 0,007	43,9	731,6 x 10 <sup>3</sup>
	ADP-Glc		0,158 ± 0,005		277,8 x 10 <sup>3</sup>

Como muestran estos resultados, ambas enzimas pueden catalizar la reacción de elongación de un  $\alpha$ -1,4-glucano utilizando como dador glucosídico a la ADP-Glc, lo que sugiere que podrían participar en la vía clásica GlgCA para la síntesis de glucógeno en bacterias. La actividad obtenida para la GSasa482 fue 10 veces menor a la actividad reportada para la enzima homóloga de *E. coli* (340), mientras que la GSasa471 posee una actividad que se encuentra en el mismo orden de magnitud que la reportada para la SSasa de espinaca (341), la SSasa de papa (342) y para las enzimas de actinobacterias (119,120). Los valores de  $K_m$  para el glucógeno y la ADP-Glc se encuentran en el mismo orden de magnitud para ambas enzimas, y las mismas presentan una cinética hiperbólica (Figura 13). Estos valores de  $K_m$  son de un orden de magnitud menor para el glucógeno comparando con las enzimas de *E. coli*, *M. tuberculosis* y *S. coelicolor* (119,120,340); mientras que, las afinidades relativas para la ADP-Glc de ambas enzimas de *B. japonicum* son similares a lo reportado para la enzima de *A. tumefaciens* (343), de arroz (344) y de *S. coelicolor* (120), y a la vez 8 veces mayor a la reportada para la enzima de *E. coli* (340). Aun así, al comparar las eficiencias catalíticas de ambas GSasas de *B. japonicum*, se observa que es de dos órdenes de magnitud mayor para la GSasa482 con ambos sustratos (Tabla 8).



**Figura 13:** Curvas de saturación de sustratos para la GSasa471 (A y B) y para la GSasa482 (C y D) de *B. japonicum*.

Se analizó el efecto de cationes divalentes sobre las actividades de ambas enzimas, dado que en distintas glicosiltransferasas relacionadas se ha demostrado que funcionan como activadores (120,345). Tanto la GSasa471, como la GSasa482, exhibieron actividad en ausencia de los metales estudiados (Figura 14). Se observó que, a bajas concentraciones, los tres cationes evaluados ( $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  y  $Ca^{2+}$ ) actúan como activadores de ambas enzimas de *B. japonicum*. No obstante, es relevante destacar que el  $Mn^{2+}$  fue el único que ejerció un efecto inhibitorio significativo a mayores concentraciones, particularmente en la GSasa471, donde alcanzó una inhibición cercana al 100% a una concentración de 10 mM (Figura 14A). Por otro lado, sobre la enzima GSasa482 la presencia de este catión divalente a 10 mM inhibe en más del 50% a la misma, lo cual coincide con lo observado en otras glicosiltransferasas analizadas (120). Asimismo, se resalta que, en contraste con la GSasa471, la enzima GSasa482 requirió la presencia de 10 mM de  $Ca^{2+}$  para alcanzar su  $V_{max}$  (Figura 14). Además de los resultados mencionados, cabe destacar que, en este análisis, se demostró que la adición de 10 mM de  $Mg^{2+}$  es esencial para que ambas enzimas alcancen su  $V_{max}$  (Figura 14). Estos resultados enfatizan la importancia de considerar el impacto de diferentes cationes divalentes en la actividad de distintas glicosiltransferasas.



**Figura 14:** Actividad de la GSasa471 (A) y de la GSasa482 (B) en función de la concentración de  $Mg^{2+}$  (círculos y cuadrados blancos),  $Mn^{2+}$  (círculos y cuadrados grises) y  $Ca^{2+}$  (círculos y cuadrados negros).

#### 4.4.5. Actividad GSasa en presencia de sustratos alternativos

Se analizó la actividad GSasa con respecto a su especificidad por diferentes NDP-Glc. Se encontró que ambas GSasas de *B. japonicum* utilizan estrictamente ADP-Glc como dador de residuos glucosilos para el alargamiento de una molécula de glucógeno preformada. La UDP-Glc produjo una actividad enzimática no detectable, incluso a concentraciones tan altas como 10 mM.

Para evaluar la especificidad de las GSasas de *B. japonicum* por el sustrato aceptor (aglicón), se determinó la actividad *in vitro* de la GSasa471 y la GSasa482 en presencia de tres 1,4-glucanos diferentes (glucógeno de ostra, maltosa o celobiosa), y los resultados se analizaron comparativamente respecto al glucógeno de hígado de conejo. Tanto la maltosa, disacárido de Glc unidas por un enlace  $\alpha$ -1,4, como la celobiosa, disacárido formado por dos Glc unidas por enlace  $\beta$ -1,4, no fueron empleadas para la reacción de elongación por ninguna de las dos GSasas de *B. japonicum*. Por otra parte, el glucógeno de ostra actuó como sustrato de ambas enzimas. A partir de esto, se realizaron las respectivas caracterizaciones cinéticas con glucógeno de ostra y ADP-Glc para ambas enzimas, como se presenta en la Tabla 9.

**Tabla 9:** Parámetros cinéticos para ambas GSasas de *B. japonicum*. El valor de  $K_m$  se expresa en mg/ml y mM para glucógeno de ostra y ADP-Glc, respectivamente. La eficiencia catalítica posee unidades de  $s^{-1} \cdot (kg/l)^{-1}$  para glucógeno de ostra y de  $s^{-1} \cdot M^{-1}$  para ADP-Glc.

Enzima	Sustrato	$V_{max}$ (U/mg)	$K_m$ (mg/ml) (mM)	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	Ef. Cat. [ $s^{-1} \cdot (kg/l)^{-1}$ ] ( $s^{-1} \cdot M^{-1}$ )
<b>GSasa471</b>	Glucógeno de ostra	$1,2 \pm 0,2$	$0,07 \pm 0,02$	0,904	$12,9 \times 10^3$
	ADP-Glc		$0,4 \pm 0,1$		$2,26 \times 10^3$
<b>GSasa482</b>	Glucógeno de ostra	$18 \pm 1$	$0,031 \pm 0,009$	14,91	$480,9 \times 10^3$
	ADP-Glc		$0,153 \pm 0,008$		$97,4 \times 10^3$

Se ha descrito que el glucógeno de ostra posee una estructura heterogénea debido a la presencia de cadenas  $\alpha$ -1,4-glucano de diferentes longitudes, las cuales presentan un grado de polimerización que varía de 2 a 35 (346). El aspecto distintivo del glucógeno de ostra es su estructura altamente ramificada con cadenas exteriores más cortas, en comparación con el glucógeno de mamíferos. Por otra parte, el glucógeno de bacterias y de eucariotas está compuesto por ramificaciones idénticas conteniendo 12-14 unidades de Glc (347,348). Los resultados presentados en la Tabla 9 muestran que, a diferencia de los datos obtenidos con glucógeno de hígado de conejo (Tabla 8), que fue utilizado inicialmente para realizar la caracterización cinética de ambas enzimas, el valor de  $k_{cat}$  obtenido para el glucógeno de ostra es 3 veces mayor que el obtenido con glucógeno de hígado de conejo para la enzima GSasa471. Sucede lo contrario para la GSasa482, donde la  $k_{cat}$  es 3 veces mayor cuando se utiliza glucógeno de hígado de conejo (Tablas 8 y 9). Si comparamos en términos de eficiencia catalítica ( $k_{cat}/K_m$ ), la GSasa471 es 4 veces más eficiente con el sustrato de ramas más cortas. Contrariamente a la GSasa471, la enzima GSasa482 presentó una eficiencia catalítica 1,5 veces menor con glucógeno de ostra, y 3 veces menor para ADP-Glc cuando se utilizó glucógeno de ostra como sustrato aceptor (Tabla 9).

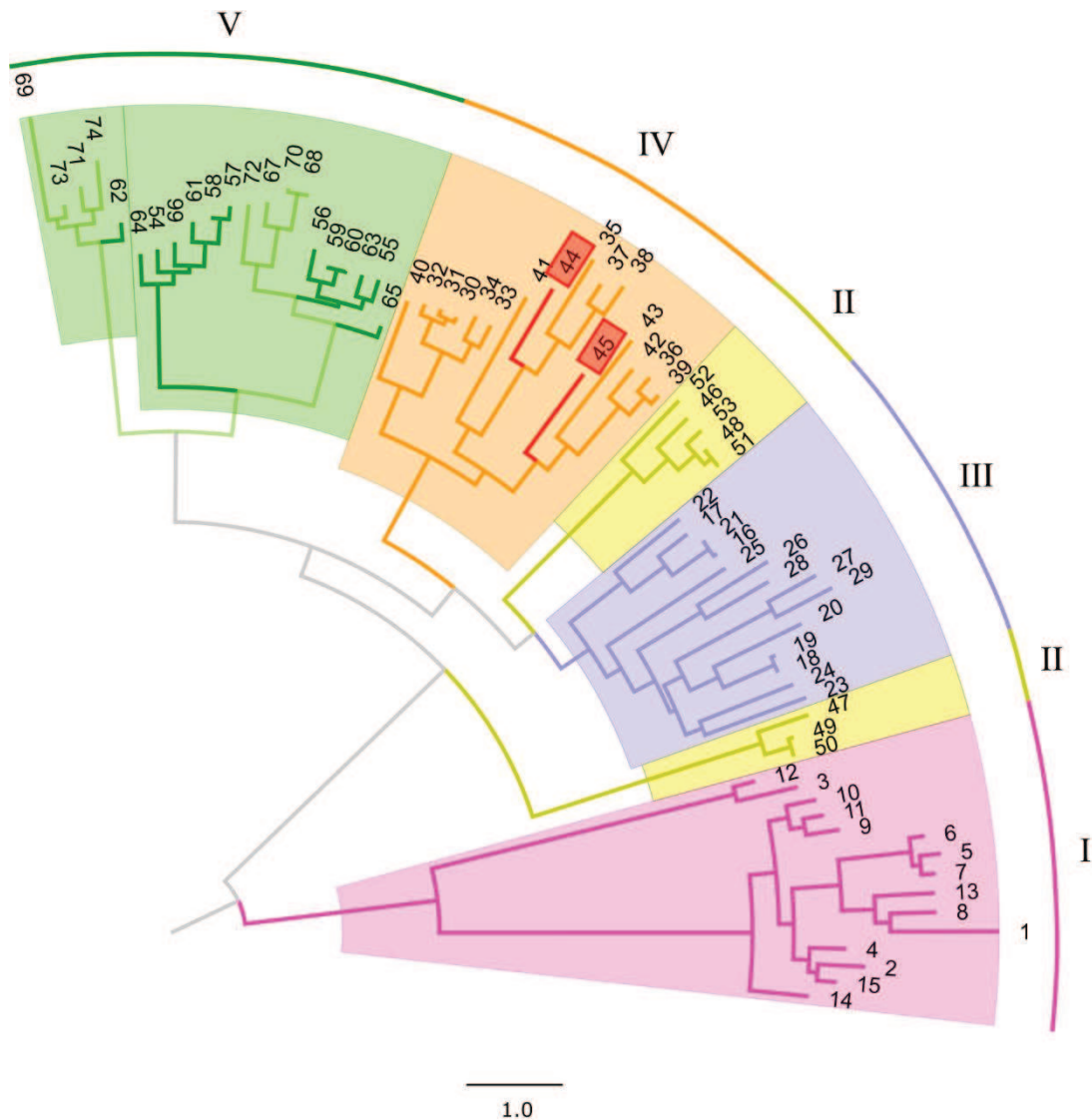
#### 4.4.6. Análisis filogenético de las GSasas de *B. japonicum*

Las enzimas encargadas de elongar glucógeno y/o almidón se agrupan en las familias de glicosiltransferasas GT3 y GT5, según la base de datos *on-line* CAZy ([www.cazy.org](http://www.cazy.org); (194)). La familia GT3 comprende principalmente secuencias de GSasas presentes en hongos y mamíferos (EC 2.4.1.11). En líneas generales, estas enzimas utilizan preferentemente UDP-Glc como sustrato y poseen un peso molecular de aproximadamente 80 kDa. Por otro lado, la familia GT5 agrupa secuencias correspondientes a GSasas y SSasas (EC 2.4.1.21) provenientes de bacterias y plantas, respectivamente. Estas utilizan ADP-Glc como dador glucosídico y son de menor

tamaño, alrededor de 50 kDa. Las GSasas de mamíferos y hongos se distinguen del resto en que están sujetas a regulación mediante fosforilación reversible y efectores alostéricos, siendo la Glc-6P el principal efector (73,206,207). Por el contrario, las GSasas pertenecientes a la familia GT5 no están reguladas, ya que en este caso el paso regulatorio se da en la formación de ADP-Glc. La distinción entre estas dos familias resalta la diversidad funcional y estructural de estas enzimas cruciales en el metabolismo de carbohidratos. El análisis evolutivo revela que la caracterización de las NDP-Glc PPasas como de GSasas de diferentes organismos es esencial para establecer relaciones de estructura proteica a función y regulación. A su vez, es importante destacar que la caracterización cinética de GSasas bacterianas, en general, es un campo relativamente inexplorado y existen limitadas investigaciones. Además, hasta la fecha, son prácticamente nulos los análisis comparativos de isoformas de esta enzima en procariotas. Con el propósito de ampliar la comprensión de las funciones y propiedades de las GSasas de *B. japonicum*, se construyó un árbol filogenético a partir de un alineamiento de secuencias. Este análisis involucra la comparación de las GSasas de *B. japonicum* con las de otros organismos. El árbol resultante se dividió en cinco grupos principales, identificados como grupos I a V (Figura 15). La Figura 15 muestra que las secuencias de Proteobacteria (grupo IV) se agrupan en un clado junto con las GSasas de Firmicutes y cianobacterias, aunque en subgrupos separados. Tanto la GSasa471, como la GSasa482 se agruparon en el grupo IV junto con otras GSasas de Proteobacteria, y se sitúan filogenéticamente cerca de las cianobacterias. Específicamente, se observa que la GSasa471 se agrupa junto con otras GSasas pertenecientes al género *Pseudomonas*, caracterizadas por tener una única GSasa en su genoma (Figura 15). Por otro lado, la GSasa482 muestra una relación estrecha con la GSasa1 y la GSasa2 de *A. tumefaciens*. Adicionalmente, se encuentra en proximidad a la GSasa1 de *Synechocystis* sp., la GSasa1 de *Nostoc* sp. y la GSasa2 de *Trichormus variabilis*, todas ellas pertenecientes al grupo II (cianobacterias, Figura 15). Cabe destacar que las dos isoformas de GSasas están ampliamente distribuidas en este grupo de cianobacterias. De manera notable, se puede observar que la respectiva isoforma de GSasa de las cianobacterias mencionadas previamente diverge antes que los grupos III, IV y V, formando un clado separado (Figura 15). Por su parte, las secuencias correspondientes a las GSasas del *phylum* Actinobacteria forman un clado único y separado (Figura 15), resaltando la singularidad de estas enzimas que no pertenecen a las familias GT3 o GT5, sino a la familia GT4 (118,121). Esta familia es una de las más extensas, comprende enzimas que no solamente emplean nucleótido-azúcares como dadores, sino también azúcares-P simples y azúcares-P lipídicos, lo que sugiere que esta familia tiene un origen ancestral. Las funciones de la familia GT4 abarcan una diversidad tan amplia como sus secuencias, lo que se refleja en variaciones en la especificidad tanto del dador como del aceptor (349).

Estos hallazgos proporcionan una visión más profunda de la relación filogenética entre las GSasas de *B. japonicum* y otras enzimas similares de diversos organismos, y contribuye

significativamente a nuestro conocimiento sobre la evolución y la función de estas enzimas en un contexto biológico más amplio.



**Figura 15:** Análisis filogenético de GSasas. El árbol se construyó utilizando el método de *neighbor-joining* con un *bootstrap* de 1.000 en el programa SeaView 5.0.5. Las secuencias se codificaron con números para mayor claridad (ver Tabla Suplementaria S2). Las enzimas GSasa471 y GSasa481 de *B. japonicum* se encuentran resaltadas en rojo. Grupo I, GSasas de Actinobacteria; grupo II, GSasas de cianobacterias; grupo III, GSasas de Firmicutes; grupo IV, GSasas de Proteobacteria; grupo V, almidón sintasas de dicotiledóneas y monocotiledóneas. Las especies se colorearon de la siguiente manera: Actinobacteria (rosa), cianobacterias (amarillo), Firmicutes (celeste), Proteobacteria (naranja), plantas dicotiledóneas (verde oscuro) y monocotiledóneas (verde claro).

#### 4.4.7. Análisis de la actividad en función de la síntesis de Mal-1P

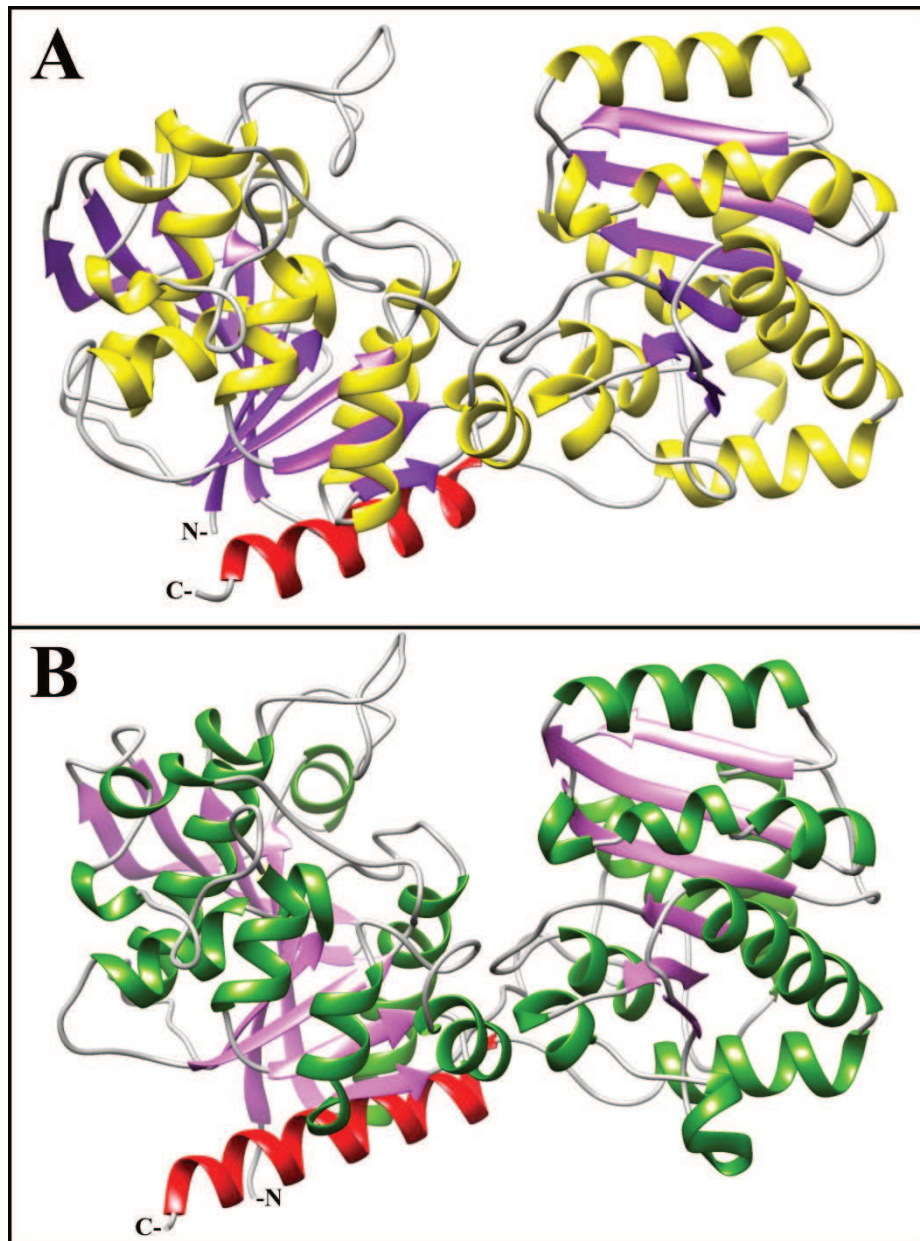
Durante la última década, se ha descrito una vía alternativa para la síntesis de glucógeno en actinobacterias (112,113). En esta vía, la enzima  $\alpha$ -1,4-glucano:maltosa-1-P maltosiltransferasa (GlgE, EC 2.4.99.16) extiende el  $\alpha$ -1,4-glucano en dos unidades de Glc utilizando Mal-1P como dador de maltosilos; mientras que en la vía clásica GlgCA, la GSasa utiliza ADP-Glc como dador de glucosilos para extender el polímero de a una unidad por vez. La enzima GlgE se ha propuesto como blanco de los fármacos antituberculosos, debido a que su inhibición produce una acumulación letal de Mal-1P en la bacteria *M. tuberculosis* (122). Esta Mal-1P es producida a partir de maltosa por la maltoquinasa (MalK, EC 2.7.1.175), una enzima estudiada principalmente en actinobacterias. Asimismo, se ha informado que la GSasa de *M. tuberculosis*, además de catalizar la reacción canónica de elongación de glucógeno (119), produce la transferencia del grupo glucosídico de la ADP-Glc a la Glc-1P, formando Mal-1P (121), que luego se dirige a la síntesis de un glucano por la vía GlgE. Estos hallazgos dan como resultado una convergencia entre la actividad de la MalK y la actividad de esta GSasa sobre la síntesis de Mal-1P en micobacterias. En nuestro grupo de trabajo, se analizó dicha actividad en GSasas de diferentes fuentes que han sido ampliamente caracterizadas, mostrando que la GSasa de *S. coelicolor* y ambas GSasas de *R. jostii* son capaces de catalizar la formación de Mal-1P (335). Por el contrario, las GSasas de *E. coli*, *Giardia lamblia*, *N. europaea* y *Prevotella intermedia* no presentaron esta actividad. Estos resultados preliminares sugieren que esta característica sería exclusiva de las GSasas del tipo GT4, que suelen encontrarse mayoritariamente en actinobacterias (113).

Curiosamente, *B. japonicum*, un organismo Gram-negativo, no perteneciente al phylum Actinobacteria, también posee los genes que codifican proteínas de la vía alternativa para la síntesis de glucógeno/poliglucanos (GlgE), en concordancia con la aparición de dos GSasas (de manera similar a lo que ocurre, por ejemplo, en *R. jostii* (335)). En base a estos antecedentes, se analizó la reacción de síntesis de Mal-1P, utilizando Glc-1P como sustrato, hasta una concentración de 10 mM, en las enzimas GSasa471 y GSasa482 (ambas GT5, como se describió anteriormente). Ninguna de las enzimas fue capaz de utilizar Glc-1P para producir Mal-1P, descartando esta actividad en las GSasas de *B. japonicum*. Estos resultados ratifican la hipótesis que las GSasas del tipo GT4 son las únicas glucosiltransferasas capaces de sintetizar Mal-1P a partir de ADP-Glc y Glc-1P, resaltando así la singularidad funcional de estas proteínas. En contraste, las GSasas derivadas de diversas proteobacterias no exhiben esta capacidad, lo que subraya la distinción en las funciones enzimáticas entre estos dos grupos bacterianos. Este panorama contribuye sustancialmente al entendimiento de las diferencias funcionales y evolutivas de las GSasas en el contexto de la biosíntesis de poliglucanos y ofrece una base para futuras investigaciones en este campo.

#### 4.4.8. Análisis de las estructuras proteicas de las GSasas *in silico*

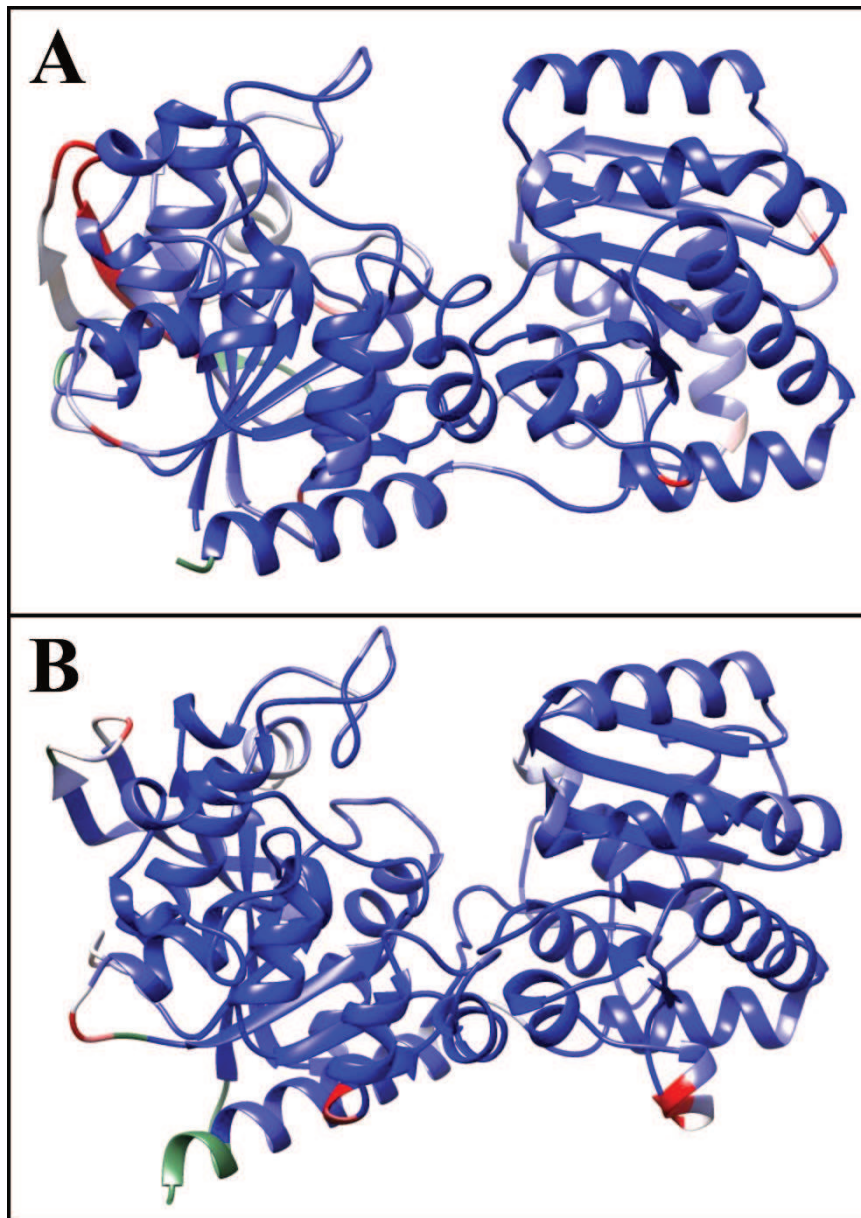
Dado que buscamos profundizar el entendimiento de la relación estructura a función de las enzimas estudiadas en este trabajo de Tesis, analizamos en detalle las estructuras de las GSasas de *B. japonicum* construyendo los modelos tridimensionales para ambas GSasas. En la Figura 16 se muestran las estructuras de la GSasa471 (Figura 16A) y de la GSasa482 (Figura 16B) obtenidas utilizando la herramienta *on-line* AlphaFold2 (281,297). Los modelos tridimensionales obtenidos fueron validados según diversos criterios. Primero, se utilizó *Verify3D*, en el cual se obtuvo una puntuación de 99,58% para la GSasa471 y de 99,38% para la GSasa482 (282). Además, al analizar los gráficos de Ramachandran, se observa que ninguno de los aminoácidos se encuentra en un área no adecuada en ambas enzimas (350). A partir de estos parámetros, podemos asegurar que los modelos resultantes son confiables.

La GSasa de *E. coli* ha sido cristalizada y la misma presentó una estructura monomérica (204). Las estructuras de las GSasas de *B. japonicum* exhiben dos pliegues de Rossmann típicos de las GT-B (198,205); los dominios N- y C-terminal de ambas son de tamaño similar y están compuestos por un “sándwich” de láminas  $\beta$  paralelas entre hélices  $\alpha$  (Figura 16). La cola helicoidal  $\alpha$  final (resaltada en rojo, Figura 16) cruza desde el dominio C-terminal para empacar contra el dominio N-terminal en ambas GSasas. Estos resultados son consistentes con las estructuras de otras GSasas cristalizadas e informadas anteriormente (203,204,206).



**Figura 16:** Representación de cinta de las GSasas de *B. japonicum*. (A) Modelo obtenido para la GSasa471, las cadenas  $\beta$  se encuentran resaltadas en lila y las hélices  $\alpha$  en amarillo. (B) Modelo tridimensional obtenido para la GSasa482, las cadenas  $\beta$  se presentan en color rosado y las hélices  $\alpha$  en verde.

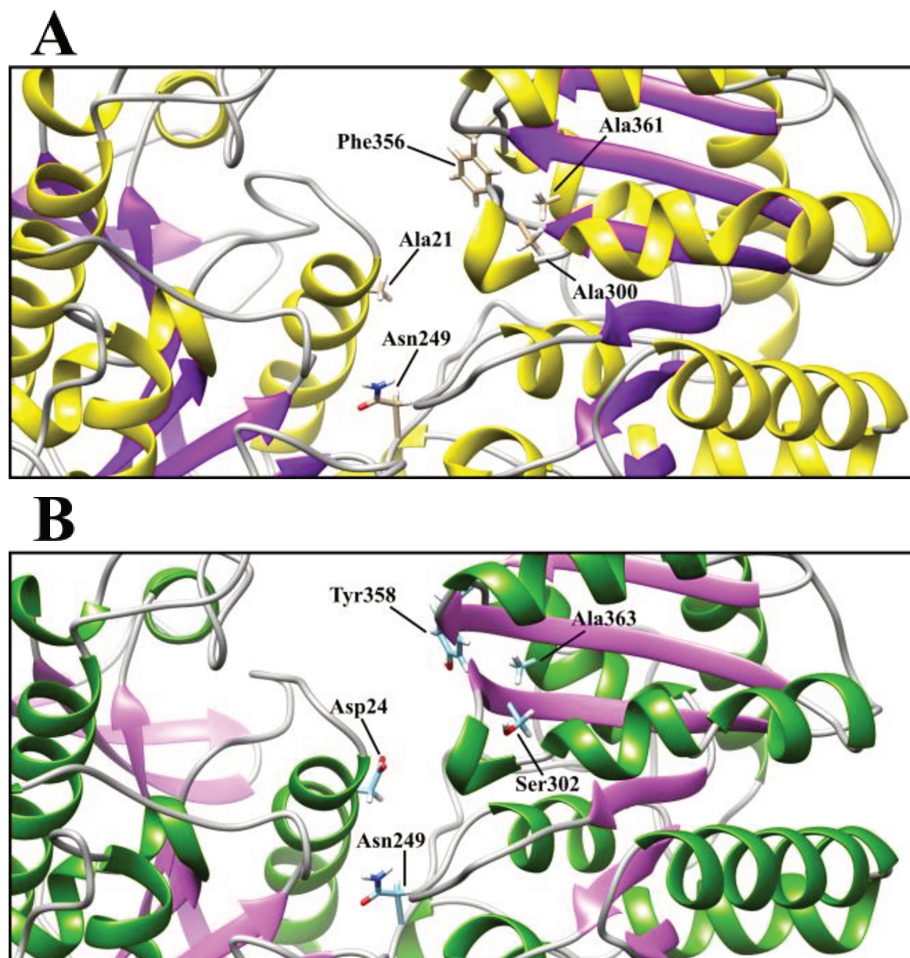
Haciendo un análisis comparativo entre las respectivas GSasas de *B. japonicum* y la GSasa de *E. coli* cristalizada (204), se observa que tanto la estructura tridimensional de la GSasa471 como la de GSasa482 se asemejan a la estructura definida de la GSasa de *E. coli* (Figura 17). Al realizar una superposición de las GSasas de *B. japonicum* con la GSasa de *E. coli* cristalizada, se calculó el valor de RMSD, el cual fue de 1,131 Å para la GSasa471 (Figura17A) y de 1,047 Å para la GSasa482 (Figura17B). Ambas GSasas de *B. japonicum* presentan una identidad del 42,98% en sus secuencias aminoacídicas. A su vez, la GSasa471 tiene una identidad del 41,88% con la GSasa de *E. coli*, mientras que la GSasa482 posee una identidad ligeramente mayor, del 48,43%.



**Figura 17:** Análisis comparativo de las GSasas de *B. japonicum* y la GSasa cristalizada de *E. coli*. Superposición de la GSasa471 y la GSasa482 con la GSasa de *E. coli* y cálculo de RMSD. Modelos tridimensionales de la GSasa471 (A) y de la GSasa482 (B) coloreados por RMSD. La escala para colorear RMSD va del azul (valores RMSD más bajos) al rojo (valores RMSD más altos).

Estudios previos realizados con la GSasa de *E. coli* demostraron que reemplazando los aminoácidos Asp<sup>21</sup>, Asn<sup>246</sup> o Tyr<sup>355</sup> por Ala la afinidad aparente por la ADP-Glc disminuye 18-, 45- y 31-veces, respectivamente (351). Al analizar las secuencias de las GSasas en estudio, se encontró que la GSasa471 carece del Asp<sup>21</sup> y en su lugar presenta una Ala<sup>21</sup> (Figura 18A). Otra diferencia encontrada en la enzima GSasa471 es que, en lugar de la Tyr<sup>355</sup> presente en la GSasa de *E. coli*, posee una Phe<sup>356</sup> (Figura 18A). Por el contrario, la GSasa482 de *B. japonicum* posee los 3 aminoácidos claves para la unión de la ADP-Glc, Asp<sup>24</sup>, Asn<sup>249</sup> y Tyr<sup>358</sup> (Figura 18B). Otros estudios con la enzima de *A. tumefaciens* demostraron que el heterociclo de adenina se estabiliza

mediante una interacción con la Tyr<sup>354</sup> e interacciones adicionales de van der Waals con la Ser<sup>298</sup> y la Ser<sup>359</sup> (203). Nuevamente, la enzima GSasa471 es la que presenta diferencias, dado que posee una Ala<sup>300</sup> y una Ala<sup>361</sup> en lugar de las Ser anteriormente mencionadas, presentes en la GSasa de *A. tumefaciens* (Figura 18A). En cambio, en la GSasa482 se encuentra una Ser<sup>302</sup> y una Ala<sup>363</sup>, en lugar de las Ser<sup>298</sup> y Ser<sup>359</sup> de la enzima de *A. tumefaciens*, respectivamente (Figura 18B). Las diferencias halladas a nivel de las secuencias aminoacídicas podrían explicar los distintos comportamientos cinéticos detallados para ambas enzimas de *B. japonicum* y, a su vez, sustentar la menor actividad de la GSasa471 respecto a la GSasa482 (Tabla 8). Los resultados presentados en esta Tesis constituyen el primer informe sobre el estudio de dos GSasas procariotas concurrentes en un mismo organismo que elongan  $\alpha$ -1,4-glucanos a partir de ADP-Glc. El estudio comparativo de ambas proteínas desde la relación entre la estructura y la función permite profundizar el entendimiento de la historia evolutiva de esta familia de enzimas. Estudios complementarios sobre la ocurrencia espacio-temporal de cada GSasa de *B. japonicum* permitirán un mejor entendimiento del rol fisiológico de la concurrencia de actividades redundantes en el organismo.

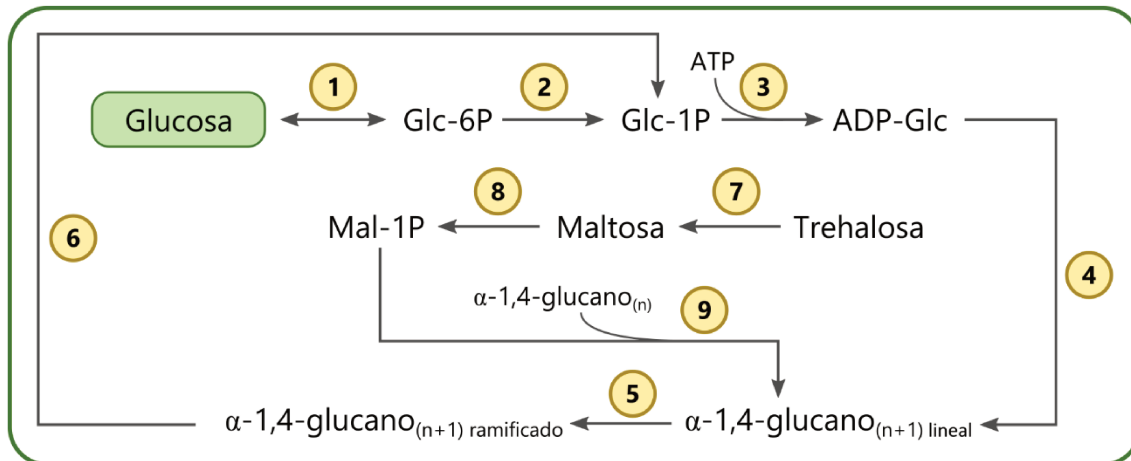


**Figura 18:** Sitio de unión de la ADP-Glc en la GSasa471 (A) y la GSasa482 (B) de *B. japonicum*. Se destacan los residuos que estarían involucrados en la unión de la ADP-Glc.

## 4.5. DISCUSIÓN

### 4.5.1. Análisis de los genes involucrados en la síntesis y degradación del glucógeno

Un análisis sistemático de varios proteomas de especies bacterianas confirmó que la mayoría de ellos contienen el set completo de enzimas involucradas en la vía clásica del metabolismo del glucógeno (Figura 19) (111,199). Esta vía involucra 5 enzimas que operan conjuntamente para promover la síntesis del glucógeno: Glc-1P adenililtransferasa (GlgC, EC 2.7.7.27), GSasa (GlgA, EC 2.4.1.21), enzima ramificante (GlgB, EC 2.4.1.18); y la degradación del mismo: glucógeno fosforilasa (GlgP, EC 2.4.1.1) y enzima desramificante (GlgX, EC 3.2.1.68) (111). Todas estas enzimas, pertenecientes a la vía clásica del glucógeno, están presentes en la bacteria *B. japonicum* (Figura 19, Tabla 10). A su vez, se encontró una segunda vía, poco caracterizada a nivel general en procariontes, para la síntesis de glucógeno en *M. tuberculosis* (112,113). La misma involucra a las enzimas trehalosa sintasa (TreS, EC 5.4.99.16), maltoquinasa (MalK1 o Pep2, EC 2.7.1.175) y maltosiltransferasa (GlgE) (Figura 19) (111). En esta vía metabólica, la enzima clave GlgE se encarga de alargar la cadena de  $\alpha$ -1,4-glucano mediante la adición de dos unidades de Glc. Para esto, GlgE utiliza Mal-1P como dador maltosilo (112). En la vía clásica, la enzima GlgA extiende el polímero añadiendo una sola unidad de Glc a partir de ADP-Glc como dador glucosídico (196). La Mal-1P se forma a partir de maltosa gracias a la acción de la MalK. En el mismo sentido, se ha informado que la GlgA de micobacterias tiene la capacidad de catalizar la síntesis de Mal-1P utilizando Glc-1P y ADP-Glc como sustratos (121). Al analizar el genoma de *B. japonicum*, se encontró la presencia de un gen que codifica para la TreS y otro que codifica una maltosiltransferasa GlgE putativa, pero no cuenta con un gen codificante para una MalK (Figura 19, Tabla 10). Sin embargo, haciendo un análisis sobre genomas pertenecientes a distintos procariontes, se observó que los genes *pep2* (el cual codifica para una MalK) y *glgE* rara vez están presentes en ausencia de los otros dos genes de la vía GlgE (Figura 19) (113). De hecho, *pep2* y *treS* se encontraron fusionados con más frecuencia que separados, lo que a menudo llevó a su subanotación como uno u otro (113). Al analizar el genoma de *B. japonicum*, encontramos que el gen anotado como *treS* codificaría para una proteína de 1.096 aminoácidos, cuya longitud es superior comparada a otras TreS de distintos organismos. Al hacer alineamientos con diferentes proteínas, tanto TreS como Pep2/MalK, concluimos que en *B. japonicum* estas proteínas estarían codificadas/anotadas en un mismo gen, el cual daría lugar a ambas proteínas. Resta averiguar si *Bradyrhizobium* posee una MalK y una GlgE funcionales. En cuanto a los resultados de esta Tesis, se propone que la enzima responsable de la producción de Mal-1P para la acción de GlgE sería la MalK, dado que ambas GSasas no mostraron actividad Mal-1P sintasa.



**Figura 19:** Ilustración esquemática de las vías clásica y no-clásica del metabolismo del glucógeno. Enzimas: **1**, fosfotransferasa; **2**, fosfoglucomutasa; **3**, GlgC; **4**, GlgA; **5**, GlgB; **6**, GlgP; **7**, TreS; **8**, MalK; **9**, GlgE. (Adaptada de Wang *et al* 2019; (111)).

**Tabla 10:** Genes involucrados en la síntesis y degradación del glucógeno en *B. japonicum*

Gen	Proteína	EC	Longitud (pb)	Familia
<i>blr6458</i>	ADP-Glc PPasa (GlgC)	2.7.7.27	1.263	
<i>blr6459</i>	GSasa482 (GlgA)	2.4.1.21	1.449	GT5
<i>blI2778</i>	GSasa471 (GlgA)	2.4.1.21	1.416	GT5
<i>blr6765</i>	4- $\alpha$ -glucanotransferasa (MalQ)	2.4.1.25	1.962	GH77
<i>blr6766</i>	$\alpha$ -1,4-glucano:Mal-1-P maltosiltransferasa (GlgE)	2.4.99.16	1.947	GH13
<i>blr6767</i>	Trehalosa sintasa y Maltoquinasa (fusionadas)	5.4.99.16 2.7.1.175	3.297	GH13
<i>blr6768</i>	Enzima ramificante (GlgB)	2.4.1.18	2.166	GH13
<i>blr6769</i>	Enzima desramificante (GlgX)	3.2.1.68	2.079	GH13
<i>blr6770</i>	Maltooligosil trehalosa trehalohidrolasa	3.2.1.141	1.752	GH13
<i>blr6771</i>	Maltooligosil trehalosa sintasa	5.4.99.15	2.787	GH13
<i>blr8139</i>	Glucógeno fosforilasa (GlgP)	2.4.1.1	2.526	GT35

Los  $\alpha$ -glucanos están extendidos entre bacterias, levaduras, plantas, insectos y mamíferos y, en la mayoría de los casos, se cree que actúan como reserva de carbono y energía (85). Sin dudas, el  $\alpha$ -glucano mejor estudiado en bacterias es el glucógeno, el cual se acumula en la mayoría de

las bacterias en condiciones de crecimiento limitante de nitrógeno (85). Como se mencionó en la introducción, el glucógeno comprende cadenas de (12-14) Glc unidas por enlaces  $\alpha$ -1,4 lineales conectados por puntos de ramificación con enlaces  $\alpha$ -1,6 que dan lugar a una estructura ramificada. En la ruta clásica del glucógeno, los enlaces  $\alpha$ -1,4 son sintetizados por la GSasa, utilizando ADP-Glc como dador de azúcar, y las ramas unidas por enlaces  $\alpha$ -1,6 son generadas por la enzima ramificante (GlgB). Alrededor del 32% de los genomas bacterianos secuenciados contienen los genes que codifican las enzimas de la vía clásica (113). La vía alternativa mediante GlgE que se ha descrito recientemente (112,122) está presente en aproximadamente la mitad de las bacterias, en comparación con la vía clásica (113). El análisis bioinformático sugiere que, incluso cuando los organismos poseen la vía clásica y la ruta GlgE, sólo poseen una enzima GlgB, lo que implica que la enzima ramificante se comparte entre ambas vías (113). Las enzimas GlgB asociadas con estas vías son miembros de las glicosil hidrolasas pertenecientes a la familia 13, subfamilia 9 según la base de datos CAZy (194,352). Curiosamente, en estos casos, el gen que codifica para GlgB generalmente se encuentra en el mismo operón que el gen que codifica para GlgE y no en el operón del gen que codifica para GlgA (116). Esto sucede en *B. japonicum*, donde el único gen codificante para GlgB se encuentra en el operón de la vía GlgE. Contrariamente, en otras bacterias, todas las enzimas involucradas en la biosíntesis y degradación del glucógeno se organizan en un único operón, como *glgBXCAP* en *E. coli* (353). Por otro lado, hasta el momento, la vía GlgE está principalmente asociada al *phylum* Actinobacteria (113), dado que los casos de estudio reportados provienen de dichos organismos, y se desconoce la funcionalidad que la misma pudiera tener en otros organismos, donde coincide con otras enzimas de la vía clásica, como en el caso de *Bradyrhizobium*.

Se ha demostrado que la inactivación de la enzima GlgE provoca la muerte rápida de *M. tuberculosis*, a través de la acumulación de Mal-1P, lo cual provoca un auto envenenamiento (122). De hecho, tanto la proteína GlgE como GlgB, han sido validadas genéticamente como posibles dianas farmacológicas para el tratamiento de la tuberculosis (122). Resta estudiar estas enzimas en bacterias provenientes de otras ramas del árbol filogenético, en particular *B. japonicum*, donde la duplicación de dos GSasas confirmadas como canónicas de bacterias (EC 2.4.1.21) coincide con la existencia de la vía GlgE. Por otra parte, al realizar un análisis del contexto genómico de ambas GSasas de *B. japonicum*, observamos que el gen que codifica la enzima GSasa482 está ubicado adyacente al gen que codifica la ADP-Glc PPasa. Esto sugiere que estos genes están probablemente organizados en un operón destinado a la síntesis de glucógeno, como se ha señalado en investigaciones previas (98,354). Por otro lado, el gen que codifica la GSasa471 se encuentra ubicado en otro lugar del genoma, acompañado de genes *a priori* no relacionados con la síntesis del glucano o el metabolismo general de carbohidratos. Esta disposición se correlaciona con el hecho de que la GSasa482 es la enzima con mayor eficiencia

catalítica para la elongación del glucano, dos órdenes de magnitud superior con respecto a la eficiencia catalítica de la GSasa471.

Por otro lado, se sabe que la Tre, debido a su capacidad para proteger a las células bacterianas de diversos estreses, es importante en la supervivencia de las bacterias tanto dentro como fuera del huésped (355). Esto es evidente en bacterias patógenas de plantas, como por ejemplo *Rhizobium leguminosarum* (356), *Sinorhizobium meliloti* (357) y *B. japonicum* (358), donde se ha vinculado la protección proporcionada por la Tre contra el estrés abiótico con una mayor colonización de los nódulos de las raíces de las plantas, posiblemente al conferir una mayor resistencia al estrés osmótico (358). En trabajos previos, se sugirió que la vía TreS sería la responsable del catabolismo de la Tre en *B. japonicum*, produciendo maltosa. Además, se postuló que la expresión de los genes *otsA* (el cual codifica para la trehalosa-6-P sintasa, EC 2.4.1.15) y *treS* está modulada por la concentración intracelular de Tre (358). Aunque se podría pensar que la Tre sea utilizada como fuente de carbono para el crecimiento bacteriano, investigaciones anteriores han demostrado que *B. japonicum* no puede utilizar este disacárido como única fuente de carbono extracelular (359). En conjunto con los resultados obtenidos en esta Tesis y datos disponibles en bibliografía, la acumulación de Tre influiría en la simbiosis de la bacteria con la planta de soja, actuando como un soluto compatible para superar el estrés osmótico inducido por el huésped que se produce durante la nodulación. Esta Tre acumulada podría ser utilizada por la TreS para generar maltosa, la cual se convierte en Mal-1P y finalmente, por acción de la GlgE, es incorporada a una cadena de  $\alpha$ -glucano en crecimiento, elongando el mismo en dos unidades de Glc (Figura 19).

De acuerdo a datos obtenidos de la bibliografía, se conoce que la Tre ayuda a *Pseudomonas* spp. (y otras bacterias, como *E. coli* (65)) a resistir el estrés osmótico debido a su función como soluto compatible (360). Sin embargo, y contrariamente a informes anteriores, la Tre no protege directamente a las células contra la desecación. En cambio, esta función se atribuye al polisacárido  $\alpha$ -glucano. La presencia de Tre sólo se correlaciona con la protección contra el estrés por desecación, cuando la célula conserva la capacidad de convertir la Tre en  $\alpha$ -glucano a través de la vía GlgE. La pérdida de la capacidad de sintetizar  $\alpha$ -glucano resulta en cepas sensibles a la desecación, independientemente de su capacidad para producir Tre (361). Estos hallazgos pueden tener repercusiones significativas para comprender el papel de la Tre en varias especies bacterianas, y en el caso particular de *B. japonicum*, sugerirían una relación directa con la síntesis de glucógeno. Los genes de la vía GlgE se encuentran en ~14% de los genomas bacterianos secuenciados, incluida *B. japonicum* (113,329). En este sentido, los comportamientos celulares atribuidos previamente a la Tre podrían en realidad estar mediados por el  $\alpha$ -glucano. La estrecha relación (*a priori*, genética) entre la síntesis de Tre y el  $\alpha$ -glucano en *B. japonicum*, apunta a una estrategia prometedora y plantea realizar estudios detallados de las vías GlgA y GlgE en esta bacteria. Este trabajo de Tesis aporta datos relevantes sobre ambas GSasas presentes en este

organismo, capaces de sintetizar  $\alpha$ -glucano. Extender estos estudios hacia la enzima GlgE y analizar los diferentes  $\alpha$ -glucanos sintetizados, podría proporcionar conocimientos cruciales sobre cómo optimizar la capacidad de *B. japonicum* para colonizar y beneficiar a una de las plantas con mayor interés agronómico, como lo es la soja.

#### 4.5.2. Evaluación comparativa de las GlgAs de *B. japonicum*

La evolución de las vías metabólicas es una fuerza importante detrás de la selección natural. En el centro de este proceso se encuentra la evolución estructural de la maquinaria enzimática responsable del metabolismo energético central. Específicamente, el metabolismo del glucógeno permite a los organismos conservar el excedente de carbono y energía ambiental disponible, utilizando polímeros de Glc especializados como compartimentos de almacenamiento que pueden movilizarse para necesidades futuras. El origen de esta ventaja adaptativa se basa en la adquisición de un sistema enzimático para la biosíntesis y degradación del glucógeno, y un mecanismo para equilibrar la velocidad de ensamblaje y descomposición de este polisacárido, con el objetivo de almacenar y recuperar la Glc según la demanda energética de las células (196).

Las glicosiltransferasas son un grupo de enzimas que catalizan la transferencia de un monosacárido desde un donante de glucosilo activado a un aceptor de oligosacáridos (362). En general, esta familia de enzimas es altamente específica para su dador y aceptor y, con pocas excepciones, cada tipo de enlace glucosídico requiere una glicosiltransferasa única (362). Las glicosiltransferasas se clasifican (hasta el momento) en 117 familias diferentes (base de datos *on-line* CAZy; (194)) según las similitudes de la secuencia de aminoácidos. Las GSasas y las SSasas se clasifican en dos grandes familias de proteínas: las GSasas de mamíferos y levaduras pertenecen a la familia GT3, mientras que las GSasas bacterianas y de arqueas, y las SSasas de plantas, se agrupan en la familia GT5 (199,203,204). Las GSasas de mamíferos y levaduras consisten en un ensamblaje de protómeros de ~80 kDa, formando un homotetrámero. Las mismas utilizan UDP-Glc como dador de azúcares y están reguladas por fosforilación y metabolitos, principalmente por el efector Glc-6P (73,207,208). De esta manera, la regulación de la vía está dada directamente a nivel de la enzima que elonga el glucano. Por el contrario, las GSasas bacterianas y las SSasas de plantas poseen una masa molecular de ~50 kDa y adoptan diferentes grados de oligomerización (203,204,206). El glucógeno y el almidón son las principales moléculas de almacenamiento de carbohidratos en la mayoría de los organismos vivos, desde arqueas y bacterias hasta levaduras, animales y plantas (363,364). El paso regulador en ambas rutas biosintéticas se da a nivel de la producción del azúcar-nucleótido, reacción catalizada por la ADP-Glc PPasa (50). Por su parte, las GSasas y las SSasas catalizan la elongación de los  $\alpha$ -1,4-glucanos mediante la adición de unidades de Glc desde el azúcar-nucleótido hasta el extremo no reductor de la cadena en crecimiento (73,364). Como se mencionó anteriormente, las GT bacterianas y vegetales pertenecen a la familia GT5 (194,196). Este grupo de enzimas

prefieren ADP-Glc como dador de azúcar y parecen ser proteínas no reguladas. Sin embargo, algunas de estas enzimas (es decir, las GSasas de arqueas o algunas isoformas de SSasas) podrían usar UDP-Glc con una eficiencia similar o menor (206,365,366).

En general, se considera que la redundancia de genes catabólicos es la base de la plasticidad metabólica, la solidez funcional, la adaptación a entornos extremos y contaminados (331). Se ha descrito que los genes duplicados evolucionan y codifican isoenzimas con secuencias similares, pero con diferentes especificidades de sustrato y patrones de inducción. Por otro lado, se ha informado que algunas duplicaciones son funcionalmente redundantes, ya que catalizan las mismas reacciones metabólicas y exhiben rangos de sustrato superpuestos (367,368). En particular, la duplicación y la especialización de genes son la base de la evolución del metabolismo y la aparición de propiedades catalíticas nuevas (333). De hecho, la duplicación de genes y la promiscuidad de proteínas son fundamentales para proporcionar a los procariontes una fuente de innovación y diversidad metabólica (2,334). Por lo tanto, surgen preguntas sobre la relevancia fisiológica de las GSasas duplicadas en *B. japonicum*. Hasta el momento, este tema ha sido escasamente abordado en relación con el metabolismo del glucógeno bacteriano. Los resultados de esta Tesis aportan una valiosa contribución al campo de la redundancia genética en el metabolismo del glucógeno bacteriano, a la vez que abren nuevas interrogantes. Al analizar detalladamente estas enzimas, arrojamus luz sobre la posible especialización y las diferencias funcionales entre ellas. Esto no sólo amplía nuestra comprensión de la redundancia de genes en *B. japonicum*, sino que también proporciona información relevante sobre cómo estos organismos posiblemente se adaptan y responden a diferentes condiciones ambientales y nutricionales. En última instancia, nuestro trabajo tiene el potencial de impulsar futuras investigaciones basadas en explorar cómo estas enzimas específicas contribuyen a la adaptación y la versatilidad metabólica de *B. japonicum*.

De acuerdo al genoma de *B. japonicum* (329), un organismo Gram-negativo, existen dos secuencias codificantes para putativas GSasas (*bll2778* y *blr6459*). Las proteínas se denominaron arbitrariamente GSasa471 (codificada por *bll2778*) y GSasa482 (*blr6459*), en función de sus residuos de aminoácidos totales. En este trabajo de Tesis se han caracterizado ambas GSasas de *B. japonicum*, las cuales pertenecen a la familia GT5. Los resultados obtenidos demuestran que tanto la GSasa471, como la GSasa482, son capaces de catalizar la reacción de elongación del  $\alpha$ -1,4-glucano, utilizando específicamente ADP-Glc como dador glucosídico (Tabla 8). La enzima GSasa482 exhibió una actividad significativamente superior en comparación con la GSasa471, con valores de  $V_{\max}$  de 53,1 U/mg y 0,41 U/mg, respectivamente. Es importante destacar que la GSasa482 demostró tener una eficiencia catalítica dos órdenes de magnitud mayor que la de la enzima GSasa471, independientemente del sustrato utilizado (Tabla 8). En lo que respecta a los valores de  $K_m$  para el glucógeno y la ADP-Glc, se observa que ambas enzimas presentan valores del mismo orden de magnitud, como se muestra en la Tabla 8. Al comparar

estos resultados con los obtenidos previamente para otras GSasas, se puede destacar que la  $V_{\max}$  obtenida para la GSasa482 es 10 veces menor a la actividad reportada para la enzima homóloga de *E. coli* (340). La  $V_{\max}$  para la GSasa471 se encuentra en el orden de la  $V_{\max}$  reportada para las enzimas de actinobacterias (pertenecientes a la familia GT4) (119,120), aunque carece de la actividad Mal-1P. En un análisis bioinformático, se evidenció que la GSasa perteneciente a bacterias Gram-positivas, que a su vez poseen el gen codificante para GlgE en su genoma, se agrupan exclusivamente en la familia GT4 y no en GT5 (113). La co-existencia de estos dos genes (*glgA* y *glgE*) es consistente con la nueva actividad asociada con la ruta alternativa de generación de Mal-1P, informada para la GSasa (121). Curiosamente, *B. japonicum*, un organismo no perteneciente al *phylum* Actinobacteria, también posee los genes que codifican proteínas de la vía alternativa para la síntesis de glucógeno/poliglucanos (GlgE), concomitantemente con dos GSasas (Tabla 10). Con estos antecedentes, se estudió la síntesis de Mal-1P en las enzimas GSasa471 y GSasa482, utilizando Glc-1P como sustrato hasta una concentración de 10 mM. Sin embargo, ninguna de las enzimas en estudio pudo utilizar la Glc-1P para generar Mal-1P, descartando esta actividad en las GSasas de *B. japonicum*. Los resultados obtenidos en esta Tesis, en conjunto con resultados preliminares de nuestro grupo de trabajo, sugieren que la cualidad de las GSasas de catalizar la formación de Mal-1P sería una particularidad de las GSasas del tipo GT4, mayormente caracterizadas en organismos del grupo Actinobacteria.

Para seguir con el análisis de dichas proteínas se construyó un árbol filogenético a partir de un alineamiento de secuencias, comparando las dos GSasas de *B. japonicum* con las de otras provenientes de diferentes organismos. Como se muestra en la Figura 15, las enzimas GSasa471 y GSasa482, pertenecientes al grupo de las proteobacterias (grupo IV), se agrupan en el mismo clado que las enzimas de cianobacterias y Firmicutes (grupos II y III, respectivamente), todas pertenecientes a la familia GT5. En cambio, las enzimas del filo Actinobacteria se agrupan en un clado separado (Figura 15, grupo I).

Las proteínas GSasa471 y GSasa482 que se describen en esta Tesis tienen masas moleculares teóricas de 51,2 kDa y 51,8 kDa, respectivamente, y comparten una identidad del 42,98%. En comparación con la GSasa micobacteriana, recientemente cristalizada y denominada como GlgM (118,119,121), la GSasa471 presenta una identidad de 22,79%, mientras que la GSasa482 tiene un 24,26% de identidad con GlgM. Además, al comparar las dos GSasas de *B. japonicum* con las dos GSasas de *R. jostii*, otro organismo perteneciente al filo Actinobacteria, que también son conocidas por su capacidad de sintetizar Mal-1P (335), comparten un 22-25% de identidad. Estos resultados resaltan las diferencias entre las enzimas de *B. japonicum* (GT5) y las del *phylum* Actinobacteria (GT4), las cuales pueden también sintetizar Mal-1P a partir de ADP-Glc y Glc-1P. En este contexto, es importante destacar que en esta Tesis se demostró de manera concluyente que tanto la GSasa471 como la GSasa482 de *B. japonicum* carecen de esta actividad adicional. Estas diferencias son notorias también en el árbol filogenético presentado en la Figura 15.

Además, al emplear procedimientos analíticos de filtración en gel, observamos que ambas GSasas de *B. japonicum* eluyen como proteínas monoméricas (Figura 12B), en concordancia con lo que se ha determinado previamente para la enzima de *E. coli* (204). Estos hallazgos resaltan aún más la singularidad de las GSasas de *B. japonicum* estudiadas en esta Tesis y su diferencia notable con las enzimas de actinobacterias.

A modo de profundizar en la caracterización de estas enzimas provenientes de *B. japonicum*, observamos que la enzima GSasa471 presentó mayores  $V_{\max}$  (~3 veces mayor) y eficiencia catalítica (~4 veces mayor) cuando el glucógeno proviene de ostra (Tabla 9). Por el contrario, para la enzima GSasa482 la actividad con este glucano fue menor que con glucógeno de hígado de conejo, con una eficiencia catalítica 1,5 veces menor. Estudios sobre la estructura del glucógeno han demostrado que el glucano proveniente de ostras presenta una estructura muy ramificada con cadenas exteriores más cortas que las que se presentan en el glucógeno de mamíferos (346,348). El aumento en la actividad de la GSasa471 indica que las ramas de glucano más cortas provocan una eficiencia más alta, con lo cual se podría plantear que esta enzima es la encargada de la iniciación de elongación del  $\alpha$ -1,4-glucano. Mientras que la GSasa482, la cual presenta una  $V_{\max}$  con 2 órdenes de magnitud superior, es la encargada de realizar una mayor elongación del glucano (Tabla 8). En levaduras y células de mamíferos, se ha establecido que otra enzima, la glucogenina, participa en el inicio de la síntesis del glucógeno (57,369). Sin embargo, hasta el momento no se ha descrito la enzima glucogenina en bacterias. De esta manera, los resultados presentados en esta Tesis pueden proporcionar una valiosa perspectiva sobre la duplicación de genes en organismos procariotas. Aunque estos genes presentan una redundancia funcional, nuestros resultados demuestran que las enzimas estudiadas exhiben una mayor especificidad en lo que respecta a la maquinaria involucrada en la producción de la principal molécula de almacenamiento, como el glucógeno. Este aspecto es particularmente relevante, ya que sugiere que la duplicación de genes en procariotas no necesariamente conduce a una duplicación funcional exacta. En cambio, puede dar lugar a diferencias sutiles en las funciones de las proteínas duplicadas, como se observa en las distintas eficiencias catalíticas de las enzimas GSasa471 y GSasa482 en relación con diferentes sustratos aceptores.

Basándonos en los resultados presentados en esta Tesis, podemos afirmar que en *B. japonicum*, la síntesis de glucógeno puede llevarse a cabo a través de dos glicosiltransferasas, las cuales tienen la capacidad de elongar el  $\alpha$ -1,4-glucano mediante la adición de una unidad de Glc, utilizando ADP-Glc como dador glucosídico. Pudiendo ser una de estas enzimas la encargada de iniciar la síntesis del polisacárido, mientras que la otra puede elongar un  $\alpha$ -1,4-glucano preformado con una mayor eficiencia. A su vez, *B. japonicum* contiene un gen que codifica para la enzima GlGE, la cual es capaz de extender el  $\alpha$ -1,4-glucano en dos unidades de Glc, utilizando Mal-1P como dador maltosilo. También presenta las secuencias que codifican para TreS y MalK fusionadas en un mismo gen (Tabla 10). Con los resultados obtenidos en esta Tesis, a partir de la

caracterización cinética de ambas GSasas, se puede concluir que la vía GlgE capaz de alargar el glucano en dos unidades, no está conectada directamente con la vía clásica GlgCA de síntesis de glucógeno en *B. japonicum*. Acorde con lo mencionado previamente, mediante un análisis *in silico*, se observó una relación entre las enzimas GSasas pertenecientes a la familia GT4 y la vía GlgE (113,121). Este hallazgo se correlaciona con la capacidad de las GSasas actinobacterianas, agrupadas en GT4, para llevar a cabo la síntesis de Mal-1P. Sin embargo, es importante destacar que, aunque estos resultados arrojan luz sobre la duplicación de las GSasas en *B. japonicum*, se necesitan investigaciones adicionales para comprender en detalle la duplicación de estas enzimas en particular, y no otras enzimas implicadas en la vía biosintética del glucógeno en esta bacteria fijadora de nitrógeno. Estudios posteriores podrían proporcionar información más detallada sobre cómo evolucionaron estas adaptaciones y cómo contribuyen a la versatilidad metabólica de *B. japonicum* en su función como fijadora de nitrógeno.

## 5. CAPÍTULO 3: “Metabolismo de la Suc en *N. europaea*: análisis de las enzimas responsables de la síntesis del disacárido”

### 5.1. INTRODUCCIÓN

Los organismos autótrofos crecen a partir de compuestos inorgánicos, el ejemplo más conocido son las plantas verdes. Las bacterias quimiolitautotróficas, a diferencia de las plantas, no utilizan la energía de la luz y tienen que adquirir toda la energía para los procesos vitales a partir de la oxidación de compuestos inorgánicos (370). Organismos tales como bacterias que utilizan compuestos C<sub>1</sub>, las cuales crecen en metanol o metilamina, a veces se incluyen dentro de las bacterias quimioautótrofas. Por otro lado, las bacterias que solamente pueden crecer a partir de compuestos inorgánicos y formar sus materiales celulares a partir de CO<sub>2</sub>, se denominan bacterias quimiolitautotróficas (370).

*N. europaea* es una bacteria que exhibe un comportamiento autótrofo, oxida amonio para obtener energía, por lo que es un protagonista biogeoquímico importante en el ciclo del nitrógeno (370). En este organismo, el amoníaco (NH<sub>3</sub>) es oxidado en una primera instancia por la amoníaco monooxigenasa para producir hidroxilamina (NH<sub>2</sub>OH) (371), en esta reacción se requiere oxígeno molecular. Luego, la hidroxilamina formada se oxida a ácido nitroso por acción de la hidroxilamina oxidoreductasa. En esta reacción, el átomo de oxígeno del H<sub>2</sub>O se incorpora a la hidroxilamina para producir ácido nitroso (HNO<sub>2</sub>) (370). También, *N. europaea* es miembro de las β-proteobacterias, un grupo de *Eubacteria* del cual se presume un ancestro fotosintético (372). Por su parte, este organismo presenta un interés particular debido a su potencial biotecnológico, relacionado a la biorremediación de sitios contaminados con hidrocarburos alifáticos clorados (373–376).

Algunas bacterias quimiolitautotróficas pueden crecer no sólo autotróficamente, sino también heterotróficamente; a estas se las conoce como quimiolitautotróficas facultativas (370). Aunque *N. europaea* puede ser incluida dentro de dicho grupo, los rendimientos de asimilación de carbono inorgánico siempre mostraron ser superiores respecto a la asimilación heterotrófica en condiciones óptimas de crecimiento (377,378). Sin embargo, se ha demostrado que en condiciones mixotróficas, es decir, en presencia de CO<sub>2</sub> y algunos compuestos orgánicos, los rendimientos de asimilación y crecimiento aumentan (377).

El interés particular en cuanto a la caracterización del metabolismo de los carbohidratos radica en que, al ser *N. europaea* un organismo quimiolitautótrofo, constituye una variante respecto a las bacterias heterótrofas y también a aquellas fotosintéticas, tanto anoxigénicas como oxigénicas, en cuanto a la fijación de carbono, aspecto esencial en el desarrollo de alternativas sustentables para desarrollos circulares. Además, los genomas de al menos cuatro bacterias oxidantes de

amoníaco (incluida *N. europaea*) cuentan con la presencia de genes adyacentes que codifican para una SucPSasa de tipo II y una SucSasa (379). La Suc sirve como transportador de carbono fotoasimilado en las plantas (222); mientras que, en algunos organismos unicelulares, se sintetiza en respuesta a estrés salino u osmótico y, se ha sugerido, que ayuda a mantener el balance osmótico y estabilizar la estructura y función de las membranas y proteínas (371,380,381).

La evidencia genómica indica que *N. europaea* podría tener la capacidad de sintetizar no solamente glucógeno, que es una de las principales formas de almacenar carbono y/o energía en numerosos organismos, sino también Suc, un compuesto que se presumía exclusivo de plantas y cianobacterias. En base a lo anterior, y sumado a la escasa información sobre el metabolismo en este tipo de organismos, resulta de interés indagar y profundizar sobre la partición de la Glc, producida por quimiosíntesis, en este organismo autótrofo. Por lo que, en este trabajo de Tesis se plantea caracterizar la enzima SucPSasa de tipo II de *N. europaea*, tanto en su versión completa como el estudio de los dominios SucPSasa y SucPasa individuales.

## 5.2. OBJETIVOS

El objetivo principal de este Capítulo es profundizar en la comprensión de la síntesis de Suc en *N. europaea*, a través de la caracterización de la SucPSasa de tipo II, tanto en su versión completa como en el estudio de los dominios SucPSasa y SucPasa individuales. Además, explorar el crecimiento de la cepa *N. europaea*. Para lograr esto, se han establecido una serie de pasos específicos, que incluyen:

- Realizar el clonado molecular por medio de la síntesis *de novo* de la enzima SucPSasa de tipo II de *N. europaea* y de los dominios SucPSasa y SucPasa por separado, para su posterior expresión en células de *E. coli*.
- Purificar las proteínas recombinantes correspondientes con el fin de llevar a cabo su caracterización cinética.
- Evaluar la funcionalidad de las enzimas y analizar las propiedades cinéticas de las reacciones que catalizan. Determinar sus parámetros cinéticos.
- Llevar a cabo el crecimiento de la cepa *N. europaea* en diferentes condiciones.
- Analizar diferentes condiciones de estrés con el propósito de inducir cambios en los niveles de Suc.
- Analizar los niveles de transcritos, proteínas, actividades enzimáticas y metabolitos en diferentes condiciones de crecimiento.
- Investigar la posible existencia de mecanismos de modificación post-traduccionales en las enzimas involucradas en la síntesis de Suc en *N. europaea*.
- Determinar la estructura tridimensional de la SucPSasa de tipo II de *N. europaea*, mediante el análisis de su secuencia aminoacídica y, posteriormente, contrastar la estructura obtenida con las de enzimas que fueron cristalizadas, con el objetivo de adquirir información acerca de la disposición de su sitio activo, dominios y del *linker* que une ambos dominios.

## 5.3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.3.1. Cepas bacterianas

Para el clonado del gen *NE1213* y la expresión recombinante de las proteínas *NeuSucPSasa*, *NeuSucPasa* y *NeuSucPSasa-II* utilizadas en este Capítulo de Tesis, se emplearon las cepas de *E. coli* Top10 y BL21 (DE3), cuyas características se detallaron en el Capítulo 1. Asimismo, se utilizaron otras cepas de expresión, además de las que se describen en el Capítulo 2:

***E. coli* SHuffle T7:** son células derivadas de la cepa de *E. coli* K12. Expresan constitutivamente una copia cromosomal que codifica para la proteína disulfuro isomerasa, la cual promueve la formación de puentes disulfuro y la correcta formación de las proteínas expresadas en forma recombinante. La forma citoplasmática de esta proteína también actúa como chaperona, asistiendo al correcto plegamiento de las proteínas, aunque estas no requieran la formación de puentes disulfuro. Es una cepa apta para la expresión de genes que se encuentren bajo el control del promotor T<sub>7</sub>.

Los ensayos de caracterización *in vivo* presentados en este Capítulo se realizaron utilizando la cepa *N. europaea* 19718, la cual hemos adquirido en ATCC®.

### 5.3.2. Medios de cultivo y antibióticos

Para el cultivo de células de *E. coli* se emplearon los medios de cultivo y antibióticos descritos en el Capítulo 1.

La cepa de *N. europaea* fue crecida en el medio de cultivo descrito a continuación, en donde las células crecen en condiciones quimiolitoheterótrofas. Alternativamente, se utilizó el mismo medio de cultivo suplementado con Fru 2% (p/v). La temperatura utilizada para su crecimiento fue de 28 °C. Para las curvas de crecimiento se determinó el valor de DO en tiempos establecidos mediante absorbancia a 600 nm.

Medio de cultivo *N. europaea*:

**S1:**

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> — 3,3 g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> — 0,41 g

MgSO<sub>4</sub> 1 M — 0,75 ml

CaCl<sub>2</sub> 1 M — 0,2 ml

FeSO<sub>4</sub> 30 mM — 0,33 ml (en solución con EDTA 50 mM)

CuSO<sub>4</sub> 50 mM — 0,01 ml

H<sub>2</sub>O — c.s.p. 1 L

**S2:**

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> — 27,22 g

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> — 2,4 g

Ajustar a pH 8 con NaOH 10 N

H<sub>2</sub>O — c.s.p. 500 ml

**S3:**

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> — 5% (p/v)

Se esterilizaron en autoclave las soluciones S1, S2 y S3 por separado. En el momento de iniciar el cultivo, se mezclaron 900 ml de S1, 100 ml de S2 y 8 ml de S3.

### 5.3.3. Plásmidos

Durante el desarrollo de este Capítulo se utilizaron los vectores de expresión pET28c y pET24a (detallados en el Capítulo 1). Además, se realizó la co-expresión de la enzima *NeuSucPSasa-II* con proteínas chaperonas.

**Plásmidos de co-expresión con chaperonas:** una estrategia frecuentemente utilizada para mejorar la expresión soluble de proteínas, consiste en aumentar la disponibilidad de chaperonas en el ambiente intracelular. A tal efecto, empleamos un sistema de plásmidos que portan genes codificando distintas chaperonas de *E. coli* (Takara Bio Inc.). Con estos vectores se co-transforman las células huésped que ya poseen la construcción plasmídica portando el gen de interés, de modo de lograr la co-expresión de las chaperonas en combinación con la proteína buscada. Poseen un origen de replicación derivado de pACYC y el gen de resistencia a cloranfenicol. La expresión de las chaperonas se logra, dependiendo del plásmido, con L-arabinosa o con tetraciclina.

### 5.3.4. Obtención de genes sintéticos

El gen codificante para la *NeuSucPSasa-II* de *N. europaea* caracterizada en este Capítulo se obtuvo por síntesis *de novo* (Bio Basic, Canadá). Los codones fueron optimizados para su expresión en *E. coli*, con la adición de los sitios de restricción *NdeI* y *SacI* en los extremos 5' y 3', respectivamente, y se insertó en el vector pET28c.

### 5.3.5. Extracción de ADN genómico de *N. europaea*

Para la extracción de ADN total de *N. europaea* se procedió de acuerdo a Sambrook y colaboradores (382). Brevemente, las células de *N. europaea* se crecieron en 12,5 ml de medio de cultivo suplementado con Fru 2% (p/v) por 4 días a 28 °C. Luego, se centrifugó ese cultivo y se lavó con *buffer* TE [Tris 100 mM pH 8, EDTA 1 mM]. El paquete celular resultante se resuspendió en 567 µl del mismo *buffer*. Luego se añadieron 10 µl de una solución de lisozima 10 mg/ml y se incubó por 2 h a 37 °C. Seguidamente, se agregaron 30 µl de solución de SDS 10% (p/v) y 3 µl de proteinasa K 20 mg/ml y se incubó por 1 h a 37 °C. Pasado este tiempo, se añadieron 100 µl de una solución de NaCl 5 M y 80 µl de la mezcla SDS 1% (p/v) con NaCl 0,7 M, incubando luego a 65 °C por 10 min. Las proteínas se eliminaron mediante el agregado de

800 µl de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) y con agitación suave por inversión. Las muestras se centrifugaron a 13.000 xg por 10 min a 4 °C, se extrajo la fase acuosa y a partir de ella se precipitó el ADN con isopropanol frío (para favorecer la precipitación se incubó durante toda la noche a -20 °C). Finalmente, se centrifugó a 13.000 xg por 15 min a 4 °C; el precipitado obtenido se lavó con etanol 70% (v/v), se secó y se resuspendió en 150 µl de *buffer* TE. Cabe aclarar que todas las soluciones utilizadas fueron previamente esterilizadas por calor en autoclave.

### 5.3.6. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados en este Capítulo se detallan en la Tabla 11, donde se remarcan las secuencias que determinan los sitios de las enzimas de restricción indicadas (en negrita).

**Tabla 11:** Oligonucleótidos utilizados en este Capítulo. Las secuencias en negrita corresponden a los sitios de restricción de cada oligonucleótido.

Oligonucleótido	Secuencia	Sitio de corte
<i>Neu-S8pept-Fow</i>	5'- <b>GCTAGCATGGCAAATGCAAAAC</b> -3'	<i>NheI</i>
<i>Neu-S8pept-Rev</i>	5'- <b>AAGCTTATTTCTTACCGTGACTG</b> -3'	<i>HindIII</i>

### 5.3.7. Reacción en cadena de la polimerasa

Para la amplificación del gen de interés mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se utilizó el ADN genómico y los oligonucleótidos específicos. La mezcla de reacción se realizó en un volumen final de 50 µl, con una composición estándar indicada en la Tabla 12. En cuanto a la ADN polimerasa, se utilizaron alternativamente *Taq* ADN polimerasa (PBL) o *Pfu* ADN polimerasa (PBL). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador T100™ *Thermal Cycler* (Bio-Rad), con un protocolo estándar: 1 ciclo de 5 min, 95 °C; seguido de 30 ciclos de 1 min a 95 °C, 30 s a T<sub>A</sub> (°C) y t<sub>E</sub> a 72 °C; y finalmente un ciclo de 10 min a 72 °C. T<sub>A</sub> y t<sub>E</sub> indican la temperatura de apareamiento y tiempo de elongación, respectivamente. El producto de PCR se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa.

**Tabla 12:** Composición de la mezcla de reacción para la PCR.

<i>Buffer Taq</i> 10X	5 µl
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	4 µl
dNTPs 10 mM c/u	1 µl
Oligonucleótido Fow 100 pmol/µl	0,5 µl
Oligonucleótido Rev 100 pmol/µl	0,5 µl
<i>Taq</i> (o <i>Pfu</i> ) ADN polimerasa	1 U
ADN genómico	1 µg
Agua desionizada	c.s.p. 50 µl

El resto de las técnicas: electroforesis en gel de agarosa, preparación de ADN plasmídico, digestión con enzimas de restricción, precipitación de ADN, ligación, preparación y transformación de células competentes de *E. coli*, se realizaron siguiendo los protocolos descritos en Materiales y Métodos del Capítulo 1.

### 5.3.8. Expresión y purificación de las proteínas recombinantes

En líneas generales la expresión de las enzimas *NeuSucPSasa*, *NeuSucPasa* y *NeuSucPSasa-II* de *N. europaea* se llevaron a cabo siguiendo los protocolos descritos en el Capítulo 1. Para la expresión en células de *E. coli* BL21 (DE3) con las construcciones [pET24a/*NeuSucPSasa*] y [pET28b/*NeuSucPasa*] se realizó la inducción con 0,2 mM de IPTG, a 18 °C por 16 h. Para la obtención de la enzima *NeuSucPSasa-II* mediante co-expresión con proteínas chaperonas se realizó la inducción por el agregado de ambos inductores: IPTG 0,1 mM y L-arabinosa 0,05% (p/v), también a 18 °C por 16 h. Se analizaron medios de cultivos alternativos, como YT2X, como así también ensayos utilizando las diferentes cepas de *E. coli* en la búsqueda de mejorar la solubilidad de la proteína recombinante *NeuSucPSasa-II*. Las bacterias se cosecharon por centrifugación a 5.000 xg durante 10 min y se descartó el sobrenadante. Las células se lavaron con *buffer* Tris-HCl 20 mM pH 8, para eliminar los restos de medio de cultivo y los paquetes celulares se guardaron a -20 °C hasta su posterior uso. Seguidamente, valiéndose de la etiqueta de His proporcionada por el vector pET28c, se realizó la purificación de las enzimas mediante IMAC, siguiendo lo detallado en el Capítulo 1.

### 5.3.9. Cromatografía de exclusión molecular

Para el caso de las enzimas de *N. europaea*, *NeuSucPSasa* y *NeuSucPasa*, se llevó a cabo un paso adicional de purificación mediante cromatografía de exclusión molecular. El *pool* obtenido luego de la purificación por IMAC se cargó en una columna HiLoad 16/600 Superdex 200 pg (GE Healthcare), previamente equilibrada con *buffer* G [HEPES-NaOH 50 mM, pH 8, NaCl 100 mM, EDTA 0,1 mM]. Nuevamente, las fracciones que contenían actividad enzimática se reunieron y concentraron. Las soluciones que contenían las proteínas purificadas se suplementaron con glicerol 10% (v/v), se dividieron en alícuotas y se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

### 5.3.10. Métodos bioquímicos generales

La electroforesis en gel de poliacrilamida, la cuantificación de proteínas, el desalado y concentración de las mismas se realizó siguiendo los protocolos establecidos y descritos en el Capítulo 1.

### 5.3.11. Electrotransferencia seguida de inmunodetección

En este Capítulo se evidenció la presencia o niveles de expresión de las enzimas estudiadas. Para ello una vez realizada la corrida electroforética de SDS-PAGE, se efectuó la electrotransferencia sobre una membrana de nitrocelulosa o PVDF (Sigma), durante 60 min a 180 mA en un equipo *Mini Protean II* (Bio-Rad). La solución empleada contenía Tris-HCl 25 mM pH 8,3, glicina 192 mM y metanol 20% (v/v). Finalizada la electrotransferencia, la membrana de nitrocelulosa transferida se bloqueó con una solución de leche descremada al 5% (p/v) en *buffer* TBS-*Tween* [Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 150 mM, Tween 20 0,05% (v/v)], incubándose 1 h a 25 °C. Luego, se lavó con solución de TBS-*Tween* 10 min a 25 °C y se incubó con una solución de TBS-leche descremada 1% (p/v) que contenía una dilución adecuada del anticuerpo primario durante 1 h a 25 °C o, eventualmente, toda la noche a 4 °C. Los anticuerpos contra las proteínas de interés fueron preparados en el Centro de Experimentaciones Biológicas y Bioterio, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral, Esperanza, Santa Fe, Argentina; mediante la inmunización de conejos con soluciones de las proteínas purificadas, acorde a lo descripto por Vaitukaitis (383).

Posteriormente, se lavó nuevamente la membrana con solución de TBS-*Tween* 10 min a 25 °C, y se procedió a la incubación de la membrana con una dilución 1/10.000 en TBS-leche 1% (p/v) del anticuerpo secundario (anti-IgG totales de conejo, Sigma) conjugado a peroxidasa de rábano picante (HRP) durante 1 h a 25 °C.

El revelado empleado fue del tipo quimioluminiscente, para lo cual, luego de la incubación con el anticuerpo secundario, se embebió la membrana con una solución basada en luminol, el cual es sustrato de la HRP (Agrisera ECL Bright). Una vez embebida con el sustrato, se expuso la membrana a una placa radiográfica en oscuridad, la cual captó la señal lumínica y nos permitió obtener el revelado del *western-blot*.

Alternativamente, el revelado de la membrana se realizó por un método colorimétrico. Se incubó la membrana a temperatura ambiente con 10 ml de una solución de TBS 1X con la adición de 5 µg de DAB (Sigma) y 3 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 volúmenes, en oscuridad hasta aparición de señal.

### 5.3.12. Ensayos de actividad enzimática

Todas las actividades enzimáticas de las enzimas estudiadas se expresaron en U/mg. Una unidad de actividad enzimática (U) es definida como la cantidad de enzima necesaria para producir/consumir 1 µmol de producto/sustrato en 1 min, bajo las condiciones especificadas para cada ensayo.

Para la determinación de la actividad *NeuSucPasa* estudiada en el presente Capítulo, se utilizó el método colorimétrico del Verde de Malaquita, siguiendo el protocolo detallado en el Capítulo 1. Sin embargo, como la reacción catalítica de la *NeuSucPasa* libera Pi, no fue necesario agregar pirofosfatasa inorgánica. El medio de reacción contenía Bis-Tris-Propano 50 mM pH 6,5,

MgCl<sub>2</sub> 10 mM, Suc-6P 1 mM y una dilución adecuada de la enzima. Se utilizaron patrones de Pi para convertir DO<sub>630nm</sub> a nanomoles.

La actividad de la *NeuSucPSasa* se determinó en sentido de la síntesis de Suc-6P, reacción que genera NDP. La determinación de NDP se siguió de manera similar al método cinético acoplado a las enzimas PK y LDH descrito en el Capítulo 1. El medio de reacción contenía MOPS-NaOH 50 mM pH 8, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, PEP 0,3 mM, NADH 0,3 mM, BSA 0,2 mg/ml, Fru-6P 2 mM, ADP-Glc (UDP-Glc) 10 mM, PK 0,02 U/μl, LDH 0,02 U/μl y enzima en una dilución adecuada.

La determinación de los parámetros cinéticos se realizó mediante los ajustes correspondientes, acorde a lo descrito en la metodología del Capítulo 1.

### 5.3.13. Cuantificación de azúcares solubles

La extracción de azúcares solubles se realizó mediante una extracción con cloroformo/metanol a partir de las muestras de *N. europaea*. Primero se lavó el *pellet* celular con HEPES 50 mM pH 8 y se guardó a -20 °C hasta su procesamiento. Se preparó una solución de cloroformo/metanol 3:7, manteniéndola en hielo. Al *pellet* celular se le agregaron 175 μl de la solución cloroformo/metanol y se mezcló con un micro pilón para romper las células. Se agregaron otros 175 μl de la misma solución, se mezcló nuevamente y se llevó a -20 °C por 2 h. Luego se agregaron 350 μl de agua ultrapura helada, se mezcló con *vortex* y se centrifugó por 10 min a 15.000 rpm a 4 °C. Se recuperó la fase acuosa superior y se volvió a re-extraer la fase inferior con 300 μl de agua ultrapura. Por último, se centrifugó nuevamente y se combinaron las fases acuosas. Las muestras se concentraron mediante el uso de un *speed-vac* para evaporar el solvente hasta secado. Una vez obtenidas las muestras secas se disolvieron en 350 μl de agua ultrapura y luego fueron utilizadas para medir azúcares solubles.

Para las medidas de azúcares solubles se dispuso el sobrenadante obtenido de cada muestra en una microplaca que contenía la mezcla de reacción (HEPES-KOH 100 mM pH 7, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, ATP 1 mM y NADP<sup>+</sup> 1 mM) y la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Glc6PDHase), y se midió la absorbancia a 340 nm. Una vez que la absorbancia se estabilizó, se adicionaron de manera sucesiva las enzimas hexoquinasa, fosfoglucosa isomerasa e invertasa, esperando entre cada una que la absorbancia a 340 nm sea constante. La diferencia entre las absorbancias de cada intervalo constante nos permitió calcular el contenido de Glc, Fru y Suc, respectivamente.

### 5.3.14. Tratamiento informático

Para el análisis de las diferentes secuencias se utilizaron las bases de datos *on line* detalladas en el Capítulo 1. Para la construcción del modelo 3D de la *NeuSucPSasa II* de *N. europaea* se utilizó el algoritmo AlphaFold2, detallado en el Capítulo 1.

## 5.4. RESULTADOS

### 5.4.1. *N. europaea*, cultivos y almacenamiento

Como se mencionó en la introducción, *N. europaea* obtiene toda su energía y poder reductor de la oxidación del amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) para su crecimiento, y puede obtener todo su carbono para biomasa del  $\text{CO}_2$ . El  $\text{NH}_3$  se oxida a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) y el  $\text{CO}_2$  es asimilado por la ribulosa bisfosfato carboxilasa y el ciclo reductor de las pentosas fosfato (ciclo de Calvin). En un principio, debido a que no se había demostrado el crecimiento en otras fuentes de carbono o energía, *N. europaea* fue clasificada como quimiolitautótrofa obligada. La secuenciación del genoma completo de *N. europaea* (384) ha brindado la oportunidad de examinar la base genética sobre la incapacidad de este organismo de crecer heterótrofamente. En general, aunque se encontraron genes para el catabolismo de  $\text{NH}_3$ , la asimilación de nutrientes inorgánicos y la biosíntesis de constituyentes orgánicos, los genes para el catabolismo de compuestos orgánicos son limitados. Sin embargo, los genes necesarios para el catabolismo de los carbohidratos a través de la vía glucolítica hasta el ciclo del ácido tricarbóxico están presentes en el genoma, lo que sugiere que *N. europaea* podría utilizar algunos carbohidratos para crecer. Un estudio de los genes de transportadores en el genoma de *N. europaea* reveló varios genes similares a los genes que codifican transportadores de compuestos inorgánicos e iones, y unos pocos genes que parecen codificar transportadores de aminoácidos. Además, también se identificaron genes que codifican varios componentes de un potencial sistema fosfotransferasa de azúcar (PTS) dependiente de PEP, que tiene niveles altos de similitud de secuencia con los transportadores de Fru o manosa. En un estudio, se demostró que la Fru puede favorecer el crecimiento de este organismo, y se obtuvo la primera evidencia de crecimiento quimiolitorganotrófico de *N. europaea* (377). Las densidades ópticas y el contenido proteico de los cultivos cultivados en Fru aumentaron hasta 2,5 veces durante las 80 h de incubación (377).

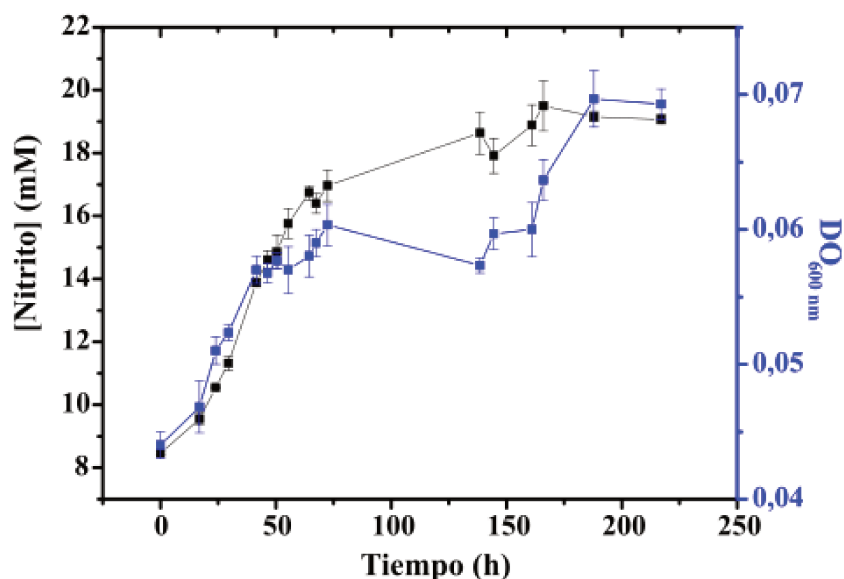
El almacenamiento a largo plazo de estas bacterias que oxidan  $\text{NH}_3$  fue otra de las cuestiones a resolver, ya que el no poder almacenarlas limita su disponibilidad pública y da como resultado una pérdida de biodiversidad. En base a los resultados publicados (385), para poder preservar las células de *N. europaea* a  $-80^\circ\text{C}$  se evaluaron distintas condiciones de almacenamiento. Para esto, cultivos de células de *N. europaea* fueron criopreservados utilizando 5% de DMSO solo; 5% de DMSO más 1% de Tre; o 25% de glicerol como crioprotectores. Luego, estas células fueron reactivadas en su medio de cultivo e incubadas a  $28^\circ\text{C}$ . El almacenamiento a largo plazo pudo lograrse utilizando DMSO al 5% y Tre al 1% como crioprotectores. En estas condiciones, se observó una producción de  $\text{NO}_2^-$  exitosa y una recuperación del crecimiento para los cultivos de *N. europaea*. A partir de estos resultados, se comenzó a conservar las células a  $-80^\circ\text{C}$  en presencia de DMSO 5% y Tre 1%.

### 5.4.2. Curvas de crecimiento

Para el desarrollo de este trabajo de Tesis se utilizó la cepa de *N. europaea* 19718 (*American Type Culture Collection*, ATCC) con la cual se realizó la optimización de los medios de cultivos y condiciones de crecimiento acorde a las instalaciones presentes en nuestro laboratorio. En una primera instancia, los cultivos madre de *N. europaea* se cultivaron en un medio de cultivo que contenía  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  para energía y  $\text{CO}_2$  como fuente de carbono, en agitación a 200 rpm y a 28 °C. La composición del medio de cultivo se detalla en la sección de Materiales y Métodos. El crecimiento se controló determinando la DO a 600 nm y siguiendo la cantidad de  $\text{NO}_2^-$  generado, ya que la manera más simple de monitorear el crecimiento de *N. europaea* es seguir la liberación de este compuesto en el medio de cultivo. El medio contiene amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) que es estequiométricamente convertido a  $\text{NO}_2^-$ , por lo que se siguió la producción de  $\text{NO}_2^-$  utilizando un espectrofotómetro, por monitoreo de la diferencia de DO entre 352 y 400 nm. Luego, la concentración de  $\text{NO}_2^-$  es determinada mediante un coeficiente de extinción molar de  $0,0225 \text{ mM}^{-1}$ , según la siguiente ecuación:

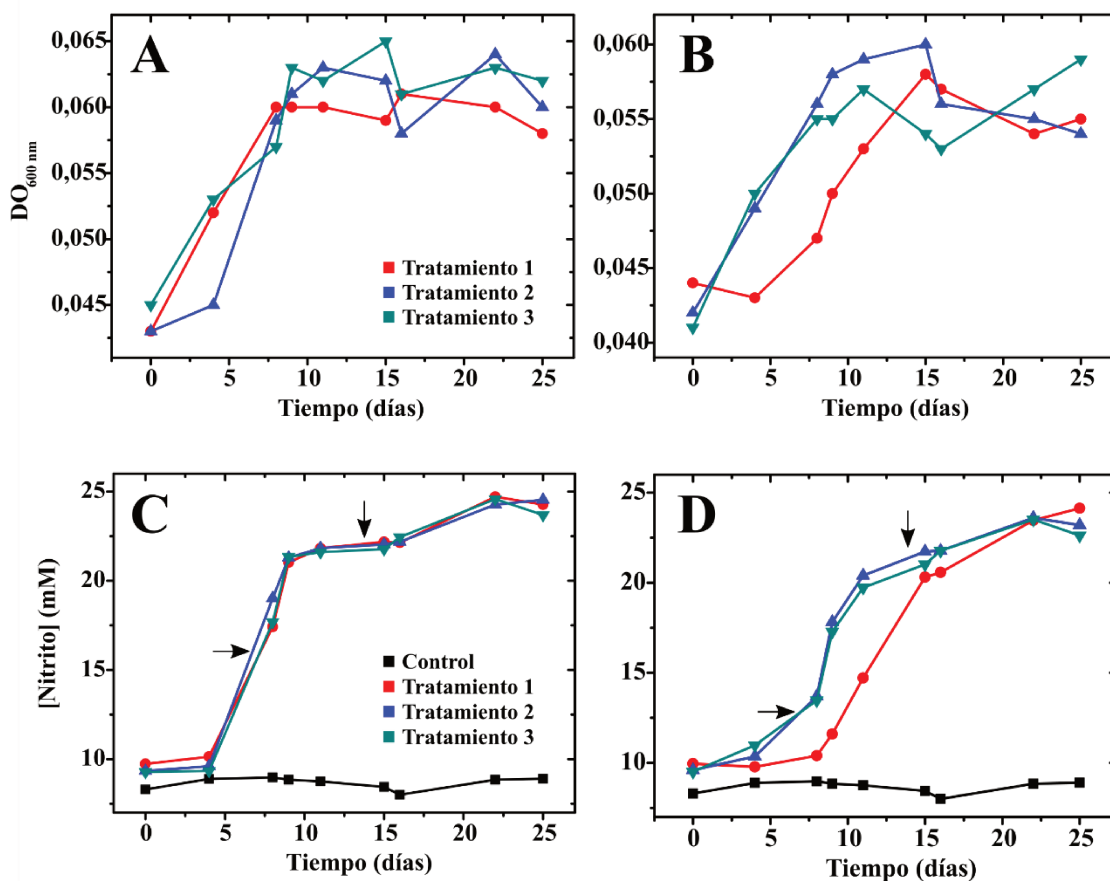
$$[\text{NO}_2^-] (\text{mM}) = \frac{(\text{DO}_{352} - \text{DO}_{400})}{0,0225}$$

En la Figura 20 se puede ver una curva de crecimiento de *N. europaea* siguiendo la DO a 600 nm y la producción de  $\text{NO}_2^-$ . Como se observa, la DO alcanzada es significativamente baja (0,069), a pesar de ello se puede asegurar que las células están creciendo correctamente debido al aumento en la concentración de  $\text{NO}_2^-$ , que alcanza valores de ~20 mM.



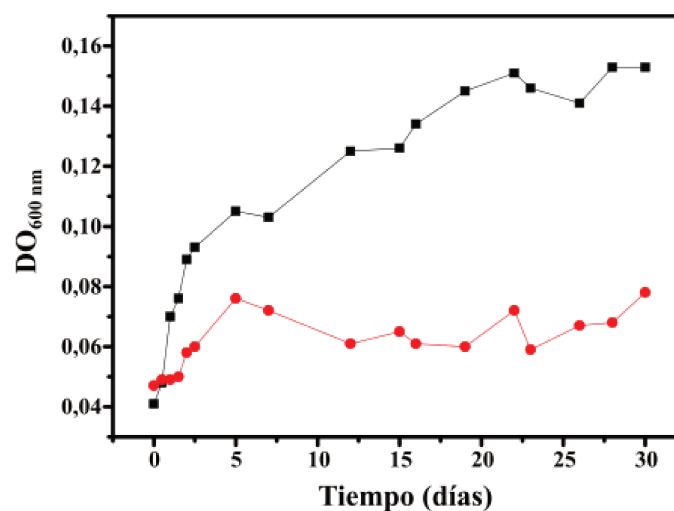
**Figura 20:** Curva de crecimiento de *N. europaea* en condiciones quimiolitotóxicas; se siguió espectrofotométricamente la DO a 600 nm (en azul) y la concentración de  $\text{NO}_2^-$  en el medio (en negro).

Por otro lado, se determinó la influencia de la concentración de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  sobre la generación de biomasa de *N. europaea*. El ensayo se realizó utilizando cantidades de 100 ml de medio en erlenmeyers de 250 ml normales y con *baffles* (deflectores que favorecen la aireación). Todos los erlenmeyers fueron incubados a 28 °C con agitación constante a 200 rpm. Se realizaron tres tratamientos: en el primero, los erlenmeyers recibieron sólo un incremento inicial de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (5 mM); en el segundo tratamiento, los cultivos recibieron un segundo incremento de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  después de 7 días; y en el tercer tratamiento, recibieron 3 incrementos de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , la cantidad inicial y cantidades adicionales a los 7 y 14 días de incubación. En el momento de la inoculación y en distintos intervalos durante las 3 semanas siguientes, los cultivos se analizaron para determinar la DO a 600 nm y la concentración de  $\text{NO}_2^-$ . Como se puede observar en la Figura 21, no hay un aumento significativo en la DO ni en la concentración de  $\text{NO}_2^-$  en los cultivos que fueron crecidos en los erlenmeyers con deflectores en comparación con los recipientes normales (sin deflectores). A su vez, el agregado de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  adicional a la cantidad de partida tampoco influyó en la generación de mayor cantidad de biomasa. Como se muestra en la Figura 21, las células crecieron de manera similar en los 3 tratamientos.



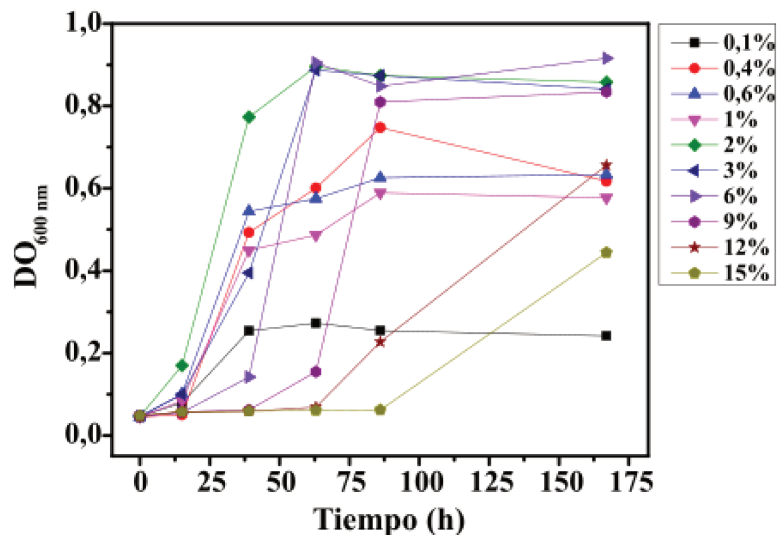
**Figura 21:** Curvas de crecimiento de *N. europaea* siguiendo la DO a 600 nm y la concentración de  $\text{NO}_2^-$  en erlenmeyers normales (A y C) y con deflectores (B y D), respectivamente. Tratamiento 1 en rojo, tratamiento 2 en azul y tratamiento 3 en verde; control en negro. Las flechas negras indican los días en los que se realizaron los suplementos, 7 y 14 días (C y D).

Por otro lado, siendo el  $\text{CO}_2$  y el  $\text{NH}_4^+$  las fuentes de carbono y nitrógeno, respectivamente, y debido a que la velocidad de crecimiento de *N. europaea* es baja en estas condiciones, se logró desarrollar un dispositivo para poder crecer las células en su medio de cultivo con un constante burbujeo de aire. En base a los requerimientos de crecimiento necesarios de estas bacterias, se incubaron en una estufa, en oscuridad, a una temperatura de 28 °C y con aireación continua por medio de mangueras conectadas a una bomba de aire. Paralelamente, se crecieron células de *N. europaea* en su medio de cultivo con agitación a 200 rpm y a 28 °C, pero sin el burbujeo de aire (Figura 22). En tal caso, se observó un aumento de la DO de los cultivos cuando se les suministraba aire, en comparación a cuando crecían sin el suplemento de aire. De este modo, se pudo obtener biomasa de células crecidas en condiciones quimiolitotróficas.



**Figura 22:** Crecimiento de *N. europaea* con suministro de aire (cuadrados negros) y sin suministro de aire (círculos rojos), siguiendo la DO a 600 nm.

Algunas bacterias quimiolitotróficas pueden crecer no sólo autotróficamente sino también heterotróficamente; estas se conocen como quimiolitotróficas facultativas (370). Se ha demostrado que en condiciones mixotróficas, es decir, en presencia de  $\text{CO}_2$  y algunos compuestos orgánicos, los rendimientos de asimilación y crecimiento de *N. europaea* aumentan (377). Por lo tanto, como la velocidad de crecimiento de las células era relativamente baja, se evaluó aumentar la biomasa mediante el agregado de Fru como fuente de carbono, analizando diferentes concentraciones de la hexosa. En la Figura 23 se observa el crecimiento de los cultivos mediante mediciones de DO a 600 nm en función del tiempo utilizando distintas concentraciones de Fru, desde 0,1 a 15% (p/v). A partir de este ensayo, se determinó que la obtención de la mayor cantidad de biomasa se da a los 3-4 días, cuando con 2% (p/v) de Fru en el medio de cultivo, como fue detallado en la sección de Materiales y Métodos.



**Figura 23:** Curvas de crecimiento de *N. europaea* cultivadas en condiciones heterotróficas, en su medio de cultivo suplementado con diferentes concentraciones de Fru, de 0,1 a 15% (p/v).

En las condiciones antes mencionadas, se realizaron las curvas de crecimiento correspondientes que permitieron conocer los tiempos y fases del crecimiento de *N. europaea* en cada caso. Para preparar inóculos para experimentos de crecimiento, 10 ml de células crecidas en Fru 2% (p/v) se recolectaron por centrifugación y se lavaron tres veces con *buffer* (HEPES 50 mM pH 8). Se prepararon erlenmeyers estériles, y luego se les añadió 1 L de medio de *N. europaea*, mezclando las 3 soluciones que lo componen, como se describe en la sección Materiales y Métodos. Se inoculó el litro de medio de cultivo con las células de *N. europaea* lavadas y se cultivaron con aireación constante a 28 °C por 7 días. De esta manera, se logró obtener células crecidas en condiciones quimiolitautótrofas y heterotróficas (en medio suplementado con Fru), tanto para la realización de los ensayos de *western-blot* como para la medida de azúcares solubles.

### 5.4.3. Síntesis de sacarosa

En un primer momento, se había establecido que la síntesis de Suc era una particularidad de plantas y cianobacterias. Sin embargo, gracias a la información genética obtenida a partir de la secuenciación de genomas de diferentes bacterias, se demostró que también sería una característica de algunos procariotas no fotosintéticos. Secuencias putativas para Suc-6P sintasa (SucPSasa) y/o Suc sintasa (SucSasa) se encuentran en algunas bacterias pertenecientes a las divisiones taxonómicas de Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes, Chloroflexi, Planctomycetes, Thermotogae, Chrysiogenetes, Deferribacteres, entre otros (218,221).

El interés particular por caracterizar el metabolismo de la Suc en *N. europaea*, se basa en que es un organismo quimiolitautótrofo, por lo que constituye una variante respecto a las bacterias heterótrofas y a las que realizan fotosíntesis. Además, en su genoma se encontraron genes que codifican enzimas involucradas en la síntesis y degradación de la Suc, en particular, para la

SucSasa y la SucPSasa. La SucSasa cataliza la síntesis de Suc a partir de UDP-Glc y Fru; esta reacción es reversible y, al menos en plantas, se encuentra más relacionada a la degradación de la Suc que a su síntesis (209,222). En principio, la SucSasa no se encontraría modulada por metabolitos o asociada a otras reacciones; hasta el momento, no se ha demostrado que esta enzima sea regulada en bacterias. La SucSasa de *N. europaea* ya fue caracterizada cinéticamente en nuestro grupo de trabajo y, además, se logró obtener la estructura cristalina de la misma (228). Otro de los genes encontrados en *N. europaea* es el que codifica una SucPSasa de tipo II. Este tipo de proteínas son enzimas de ~80 kDa y, como se dijo anteriormente, poseen dos dominios catalíticos: SucPSasa, propiamente dicho, y SucPasa, hacia el C-terminal. El dominio C-terminal tiene una similitud significativa respecto a las SucPasas bacterianas, que incluye varios de los residuos del sitio activo conservados. Por lo tanto, se ha sugerido que estas proteínas de tipo II serían enzimas bifuncionales con ambas actividades. Entre los organismos que presentan una SucPSasa de tipo II se encuentran muchas cianobacterias (*Synechococcus elongatus* PCC 6301, *Prochlorococcus marinus* MIT 9319 y *Thermosynechococcus elongatus* BP-1) y algunas proteobacterias como *N. europaea*, *Acidithiobacillus ferrooxidans* y el planctomycete *Rhodopirellula báltica*.

Al realizar un análisis de la secuencia genómica de *N. europaea* encontramos que la misma posee los genes necesarios para la síntesis y degradación de Suc, por las vías convencionales encontradas en plantas y cianobacterias, en un arreglo génico común que involucra a las enzimas: fructosa quinasa (*NE1212*), SucPSasa tipo II (*NE1213*) y SucSasa (*NE1214*) (384). Por lo tanto, cabe suponer que *N. europaea* sería capaz no sólo de sintetizar glucógeno (289), sino también Suc.

#### **5.4.4. Caracterización *in vivo* e *in vitro* de la SucPSasa de tipo II**

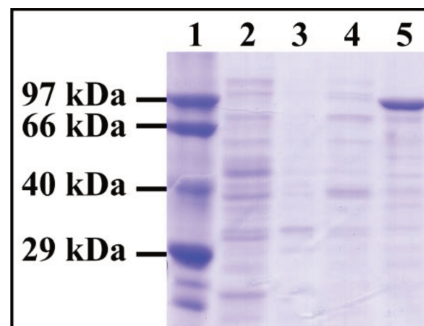
Dado el contexto presentado, en este trabajo de Tesis nos propusimos entender el funcionamiento y regulación de la SucPSasa de tipo II de *N. europaea* (*NeuSucPSasa-II*), supuesta enzima bifuncional debido a los dos dominios que la componen: dominio sintasa (*NeuSucPSasa*) y dominio fosfatasa (*NeuSucPasa*). Para llevar adelante este objetivo, se planteó obtener esta enzima en forma recombinante y caracterizarla en sus propiedades cinéticas, regulatorias y estructurales. A partir de la secuencia disponible en la base de datos del NCBI (del inglés *National Center for Biotechnology Information*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), bajo el código WP\_01111801.1, se procedió al diseño de la síntesis *de novo* del gen *NE1213* (2.142 pb) que codifica la *NeuSucPSasa-II*, una proteína de 713 aminoácidos.

##### **5.4.4.1. Clonado y expresión recombinante de la *NeuSucPSasa-II***

El gen codificante para la *NeuSucPSasa-II* se obtuvo mediante síntesis *de novo* (Bio Basic Inc.), de acuerdo a la información de la secuencia proteica. El gen se diseñó optimizado para la

expresión recombinante en células de *E. coli* y con sitios flanqueantes para las enzimas de restricción *NdeI* y *SacI*. El mismo fue obtenido en el vector de expresión pET28b(+), el cual permite obtener la enzima recombinante fusionada a una etiqueta de His en el extremo N-terminal, lo cual facilita su purificación mediante IMAC.

Con la construcción [pET28b/*NeuSucPSasa-II*] se transformaron células competentes de *E. coli* BL21 (DE3), las que permiten la producción recombinante de la enzima de interés. Las células transformadas se crecieron en medio LB y se utilizaron en primer lugar para realizar ensayos de expresión a pequeña escala en búsqueda de condiciones óptimas de expresión. La inducción se realizó con IPTG 0,5 mM, a una temperatura de 18 °C durante 16 h. Luego, las células se colectaron por centrifugación, se rompieron mediante ultrasonido, se separaron las fracciones solubles e insolubles, las cuales se sembraron en un SDS-PAGE al 12%. Como resultado de esto se observó una sobreexpresión de la enzima en la fracción insoluble, formando cuerpos de inclusión (Figura 24).

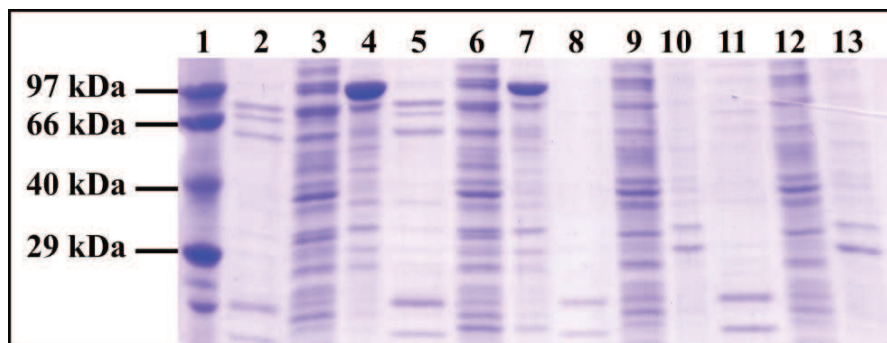


**Figura 24:** Perfil electroforético (SDS-PAGE 12%) del ensayo de expresión de *NeuSucPSasa-II* en la cepa de *E. coli* BL21 (DE3): **carril 1** marcadores de masa molecular; **carril 2** fracción soluble y **carril 3** fracción insoluble de *E. coli* BL21 (DE3); **carril 4** fracción soluble y **carril 5** fracción insoluble de *E. coli* BL21 (DE3) transformada con el plásmido pET28b/*NeuSucPSasa-II*.

En general, para favorecer la expresión de proteínas expresadas en forma heteróloga en *E. coli* bajo el control del promotor T7 (como es el caso del pET28b), se prueba con disminuir la concentración del inductor, temperatura o tiempos de inducción, de forma que la síntesis de la proteína se realice más lentamente y se favorezca el correcto plegamiento. Conociendo esto, se ensayaron diversas variantes en las condiciones de expresión, modificando los parámetros antes mencionados. Sin embargo, en todos los casos la proteína se obtuvo como cuerpos de inclusión.

Por otra parte, existen diferentes cepas de *E. coli* modificadas para ser utilizadas en casos donde las proteínas recombinantes se obtienen de manera insoluble en cuerpos de inclusión (386). Algunas de ellas poseen codones adicionales que favorecen la síntesis adecuada de la proteína de interés; mientras que otras, como las cepas que expresan chaperonas, ayudan al correcto plegamiento de las proteínas en síntesis. Estas últimas colaboran con el plegamiento de los

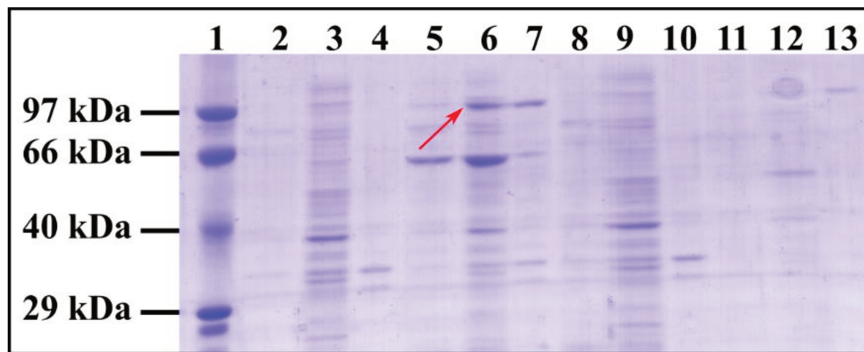
polipéptidos nacientes y sirven como sistema de control de la calidad de los mismos, ya que re-naturalizan productos parciales mal plegados o los agregados proteicos (387,388). En vista de esto, y con el objetivo de optimizar la obtención de la *NeuSUCPSasa-II* en forma soluble y activa, se realizaron ensayos de expresión en distintas cepas de *E. coli* con características diferentes a las de *E. coli* BL21 (DE3). Así, se utilizaron las cepas de *E. coli* Codon Plus, SHuffle, Tuner y Rosetta, descritas en la sección Materiales y Métodos, que poseen codones extras de poca frecuencia en *E. coli* y han sido utilizadas para la expresión de proteínas heterólogas, provenientes de plantas y otros organismos, en forma soluble y con altos rendimientos (389,390). Los resultados obtenidos muestran que, aun utilizando estas cepas diferenciales, no se logró obtener la enzima de forma soluble, obteniendo nuevamente la formación de cuerpos de inclusión, como se muestra en el SDS-PAGE de la Figura 25.



**Figura 25:** Perfil electroforético (SDS-PAGE 12%) de ensayos de expresión de *NeuSUCPSasa-II* en diferentes cepas de *E. coli*: **carril 1** marcadores de masa molecular; **carril 2** captura con resina- $\text{Ni}^{2+}$ , **carril 3** fracción soluble y **carril 4** fracción insoluble de *E. coli* Codon Plus; **carril 5** captura con resina- $\text{Ni}^{2+}$ , **carril 6** fracción soluble y **carril 7** fracción insoluble de *E. coli* Rosetta; **carril 8** captura con resina- $\text{Ni}^{2+}$ , **carril 9** fracción soluble y **carril 10** fracción insoluble de *E. coli* SHuffle; **carril 11** captura con resina- $\text{Ni}^{2+}$ , **carril 12** fracción soluble y **carril 13** fracción insoluble de *E. coli* Tuner.

Otra alternativa para mejorar la expresión de proteínas recombinantes de forma soluble es la co-expresión con chaperonas, las cuales se encargan de facilitar el plegamiento de proteínas que están siendo sintetizadas. Este sistema ha sido utilizado con éxito para la producción de enzimas recombinantes que presentaban problemas de solubilidad (160,388,391). De esta forma, se evaluó la solubilidad de la *NeuSUCPSasa-II* cuando fue co-expresada con distintas chaperonas de *E. coli*. A tal efecto se utilizó un sistema de plásmidos que portan genes codificando diferentes chaperonas (Takara Bio Inc.). Se transformaron células de *E. coli* BL21 (DE3) con la construcción [pET28b/*NeuSUCPSasa-II*] y con los diferentes plásmidos pertenecientes al sistema. Para cada uno de ellos, se cultivaron las células co-transformadas en medio LB y se ensayaron diferentes condiciones de inducción (tiempos, temperatura y concentraciones de inductor), utilizando IPTG para inducir la proteína de interés y L-arabinosa como inductor de las proteínas chaperonas.

Finalmente, utilizando el sistema de co-expresión de chaperonas GroES/GroEL, pudimos obtener la proteína *NeuSUCPSasa-II* de manera soluble, como se muestra en la Figura 26.



**Figura 26:** Perfil electroforético (SDS-PAGE 12%) de ensayos de expresión de *NeuSUCPSasa-II* mediante co-expresión con chaperonas: **carril 1** marcadores de masa molecular; **carril 2** captura con resina- $\text{Ni}^{2+}$ , **carril 3** fracción soluble y **carril 4** fracción insoluble de *E. coli* BL21 (DE3) chaperonas GroES/GroEL, control; **carril 5** captura con resina- $\text{Ni}^{2+}$ , **carril 6** fracción soluble y **carril 7** fracción insoluble de *E. coli* BL21/pET28-*NeuSUCPSasa-II* co-expresadas con chaperonas GroES/GroEL; **carril 8** captura con resina- $\text{Ni}^{2+}$ , **carril 9** fracción soluble y **carril 10** fracción insoluble de *E. coli* BL21 (DE3) chaperonas Tig, control; **carril 11** captura con resina- $\text{Ni}^{2+}$ , **carril 12** fracción soluble y **carril 13** fracción insoluble de *E. coli* BL21/pET28-*NeuSUCPSasa-II* co-expresadas con chaperonas Tig. La flecha roja indica la sobre-expresión y solubilización de la *NeuSUCPSasa-II*.

Habiéndose encontrado una condición que permite la obtención de la *NeuSUCPSasa-II* de forma soluble, se procedió al escalado del cultivo utilizando las condiciones de inducción: IPTG 0,1 mM, L-arabinosa 0,05% (p/v), a 18 °C por 16 h. Luego, la purificación de la misma se realizó mediante IMAC. De esta manera, pudimos obtener la proteína *NeuSUCPSasa-II* purificada.

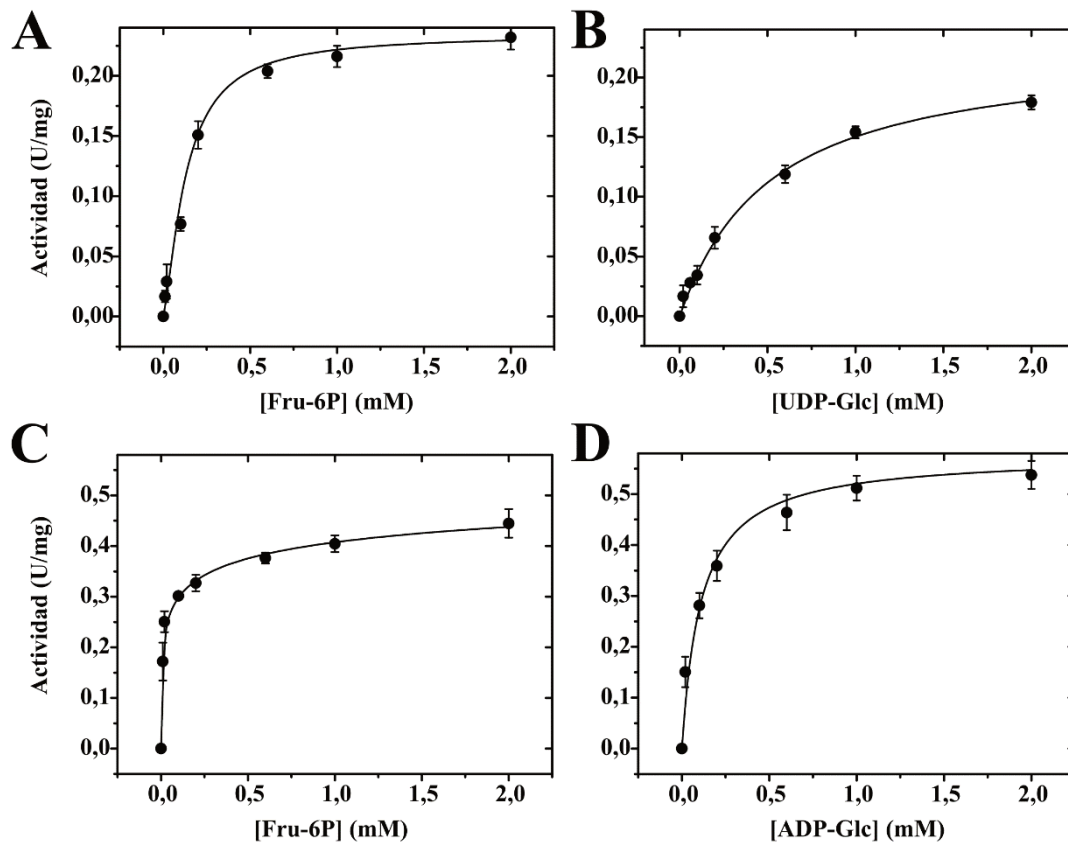
#### 5.4.4.2. Caracterización cinética de la *NeuSUCPSasa-II* recombinante

Para realizar la caracterización cinética de la *NeuSUCPSasa-II*, se utilizaron UDP-Glc y Fru-6P como sustratos. Para determinar la actividad del dominio sintasa se utilizó un método continuo en el que la formación de UDP está acoplada enzimáticamente a la desaparición de NADH (descrito en el apartado de Materiales y Métodos). De este modo, se pudo detectar un valor de actividad para el dominio sintasa de 0,065 U/mg, utilizando 10 mM de UDP-Glc y 2 mM de Fru-6P como sustratos. La actividad del dominio fosfatasa fue medida con el método de determinación de Pi con Verde de Malaquita (como se describe en Materiales y Métodos). En este caso, para el dominio fosfatasa se detectó un valor de actividad de 0,012 U/mg.

Al detectar valores de actividad relativamente bajos y debido a las dificultades encontradas para obtener la proteína entera soluble, se decidió estudiar ambos dominios por separado. En nuestro laboratorio ya contábamos con las construcciones para expresar cada dominio individualmente. Por un lado, el dominio sintasa, *NeuSUCPSasa*, el cual codifica para una proteína

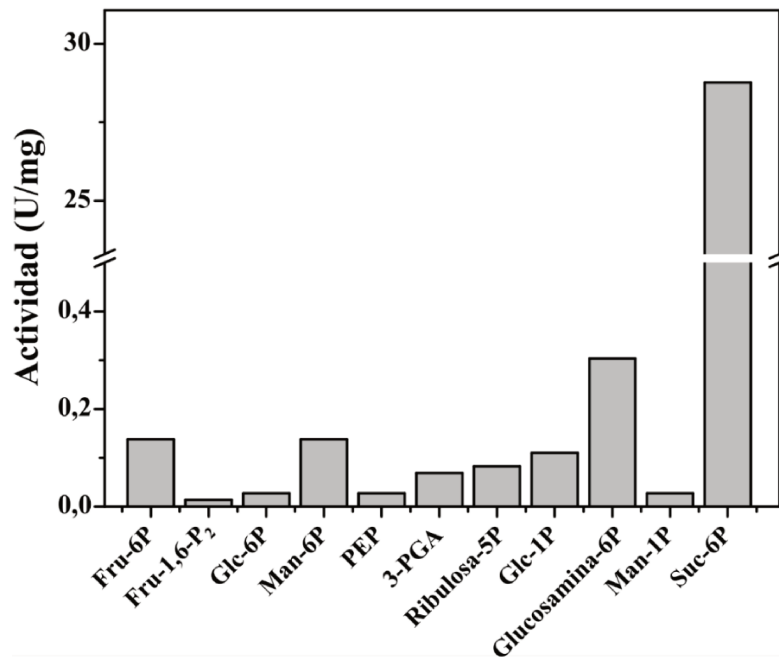
cuya masa molecular teórica es de 53,1 kDa, que se obtuvo con una etiqueta de His en el extremo C-terminal, añadida por el vector de expresión pET24a. Por otro lado, el dominio fosfatasa, *NeuSucPasa*, que codifica una proteína de 27,9 kDa, a la cual se le añadió una etiqueta de His en su extremo N-terminal, expresándolo en el vector pET28b. De esta manera, induciendo la expresión con 0,2 mM de IPTG y a 18 °C por 16 h, ambas proteínas se produjeron solubles y activas.

Así, se pudieron purificar y caracterizar cinéticamente ambos dominios por separado, resultando ser significativamente activos cuando se expresan individualmente. Para el dominio *NeuSucPSasa*, se midió la actividad como se mencionó anteriormente, y en la Figura 27 se observan las respectivas curvas de sustratos. Se obtuvo una  $V_{\max}$  de  $0,77 \pm 0,03$  U/mg para la ADP-Glc con un  $K_m$  de  $0,27 \pm 0,04$  mM, mientras que cuando la actividad se evaluó con UDP-Glc se obtuvo una  $V_{\max}$  de  $0,22 \pm 0,02$  U/mg y un  $K_m$  1,8 veces más alto que para la ADP-Glc. Estos ensayos muestran que la enzima es capaz de utilizar tanto UDP-Glc como ADP-Glc, siendo la afinidad aparente por la ADP-Glc mayor con respecto a la UDP-Glc (Tabla 13). Esta inespecificidad por el sustrato dador de residuos glucosilo (NDP-Glc) ya fue descrita para las SucPSasas de cianobacterias, a diferencia de las de plantas que utilizan preferencialmente UDP-Glc en la síntesis de Suc (211,214–216). Para el sustrato Fru-6P, se observa un patrón similar cuando se utilizan ambos dadores de residuos glucosilo, destacando que con ADP-Glc se alcanza una  $V_{\max}$  2,6 veces mayor que con UDP-Glc (Tabla 13), mientras que el  $K_m$  fue similar cuando se evaluó tanto con ADP-Glc (0,16 mM) como con UDP-Glc (0,13 mM). A partir de estos datos se determinó la eficiencia catalítica medida como  $V_{\max}/S_{0,5}$  que es análogo a calcularlo como  $k_{\text{cat}}/K_m$  (o también  $V_{\max}/K_m$ ) en cinéticas hiperbólicas (Tabla 13). Así, la SucPSasa de *N. europaea* presenta mayor eficiencia catalítica (6,5 veces mayor) para la utilización de ADP-Glc respecto a la de UDP-Glc.



**Figura 27:** Caracterización cinética del dominio SucPSasa de *N. europaea*. Curvas de saturación de sustrato realizadas con UDP-Glc y Fru-6P (A y B) y con ADP-Glc y Fru-6P (C y D).

Por otro lado, debido a que diversas fosfatasas resultan ser inespecíficas, se evaluó la capacidad fosfohidrolasa del dominio *NeuSucPasa* en presencia de Fru-6P, Fru-1,6-P<sub>2</sub>, Glc-6P, Man-6P, PEP, 3-PGA, ribulosa-5P, Glc-1P, glucosamina-6P y Man-1P; los mismos se ensayaron en una concentración de 2 mM. Sin embargo, de todos los sustratos ensayados, la Suc-6P resultó ser el que produjo la mayor velocidad de reacción (Figura 28).



**Figura 28:** Especificidad de sustratos de la SucPasa de *N. europaea*. Se ensayaron diferentes compuestos a una concentración final de 2 mM.

Luego de verificar que se trata de una fosfatasa altamente específica por Suc-6P, se realizó la caracterización cinética para el dominio *NeuSucPasa* con dicho sustrato, midiendo la actividad enzimática con el método del Verde de Malaquita (277). Este dominio también resultó activo, con una  $V_{max}$  de  $28 \pm 1$  U/mg y un  $K_m$  de  $0,50 \pm 0,02$  mM. Además, se determinó que el metal divalente  $Mg^{2+}$  es esencial para la catálisis, con un  $K_m$  de  $3,2 \pm 0,2$  mM (Tabla 13).

**Tabla 13:** Parámetros cinéticos para los dominios SucPSasa y SucPasa de *N. europaea*.

Sustrato fijo	<i>NeuSucPSasa</i>				<i>NeuSucPasa</i>	
	Fru-6P (2 mM)	ADP-Glc (10 mM)	Fru-6P (2 mM)	UDP-Glc (10 mM)	Mg <sup>2+</sup> (10 mM)	Suc-6P (1 mM)
Sustrato variable	ADP-Glc	Fru-6P	UDP-Glc	Fru-6P	Suc-6P	Mg <sup>2+</sup>
$V_{max}$ (U/mg)	$0,77 \pm 0,03$	$0,6 \pm 0,1$	$0,22 \pm 0,02$	$0,23 \pm 0,02$	$28 \pm 1$	
$K_m$ (mM)	$0,27 \pm 0,04$	$0,16 \pm 0,04$	$0,50 \pm 0,02$	$0,13 \pm 0,03$	$0,50 \pm 0,02$	$3,2 \pm 0,2$
$k_{cat}/K_m$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	2.523	3.318	389	1.565	26.040	

Los resultados indican que ambas proteínas, cuando se obtienen como dominios individuales, son activas enzimáticamente (Tabla 13). Sin embargo, cuando están conformando el mismo péptido (proteína completa *NeuSucPSasa-II*) no presentan una actividad considerable. Como se mencionó en la introducción, de los organismos que presentan un gen codificante para una proteína de fusión, se distinguían aquellos que poseerían un dominio SucPasa con todos los residuos importantes del sitio activo (SucPSasa de tipo II) y otros con carencias de algunos de estos (SucPSasa de tipo III). En este caso, el dominio *NeuSucPasa*, mostró ser activo con valores de eficiencia catalítica ( $k_{cat}/K_m$  de  $26.040 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) que sugieren su plausibilidad metabólica (392), confirmando la hipótesis de que la SucPSasa de *N. europaea* es de tipo II.

#### 5.4.4.3. Análisis de actividad de SucPSasa-II en extractos de *N. europaea*

Con el objetivo de comparar el metabolismo de la Suc en células de *N. europaea* crecidas en condiciones quimiolitotróficas y en condiciones heterótrofas, se evaluó la actividad de la SucPSasa de tipo II en extractos de esta bacteria crecida en diferentes condiciones. Para esto, se partió de: (i) cultivos crecidos en condiciones quimiolitotróficas, a  $28 \text{ }^\circ\text{C}$  por 7 días; y (ii) cultivos crecidos con Fru 2% (p/v) (condiciones heterótrofas) a  $28 \text{ }^\circ\text{C}$  por 3 días. Se cosecharon las respectivas células, se lavaron con *buffer* HEPES 50 mM pH 8, y las muestras fueron guardadas a  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  hasta el momento de su procesamiento.

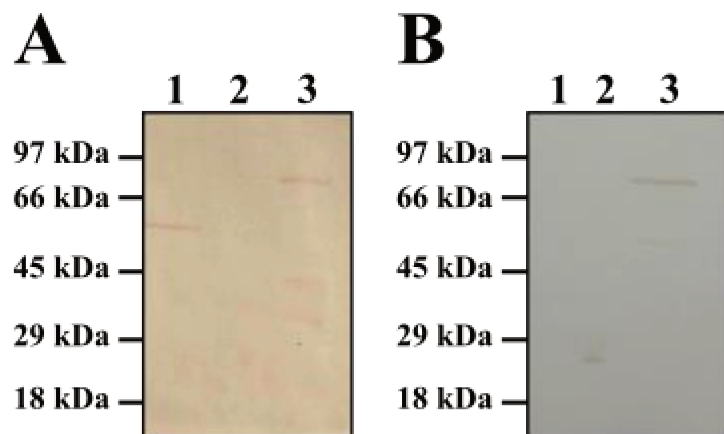
Las células se resuspendieron en *buffer* HEPES 50 mM pH 8 y su disrupción se hizo por sonicación. Finalmente, la suspensión resultante fue centrifugada para separar la fracción soluble de la insoluble. A partir de las fracciones solubles se realizaron medidas de actividad enzimática, acorde a lo detallado en Materiales y Métodos. Para estas medidas, se utilizó UDP-Glc 1 mM y Fru-6P 1 mM, los cuales actúan como sustratos de la reacción catalizada por el dominio *NeuSucPSasa*, y se midió la actividad utilizando el método del Verde de Malaquita (277), detectando el Pi que se libera en la reacción catalizada por el dominio *NeuSucPasa*. Como control se utilizaron ambas enzimas expresadas de manera recombinante y purificadas individualmente, *NeuSucPSasa* y *NeuSucPasa*. Las mismas fueron mezcladas en el medio de reacción y se determinó la liberación de Pi. A partir de los resultados obtenidos, se determinó para el control con las enzimas recombinantes una actividad enzimática de 0,28 U/mg; para los extractos de *N. europaea* crecidas en condiciones quimiolitotróficas se obtuvo un valor de 0,31 U/mg; mientras que para las células que fueron crecidas en condiciones heterótrofas, es decir, en presencia de Fru 2% (p/v), la actividad fue de 0,026 U/mg.

#### 5.4.4.4. Rol fisiológico de la *NeuSucPSasa-II* en condiciones heterótrofas

En una primera instancia, se comenzó a trabajar con células crecidas en medio de cultivo suplementado con Fru 2% (p/v), ya que de esta manera se obtenía buena cantidad de biomasa luego de 3 días de crecimiento. A partir de esto, intentamos dilucidar qué sucede con la enzima

*NeuSocPSasa-II* en células de *N. europaea* crecidas en condiciones heterótrofas, ya que es incompleto el entendimiento de esta enzima y sus funciones en organismos bacterianos.

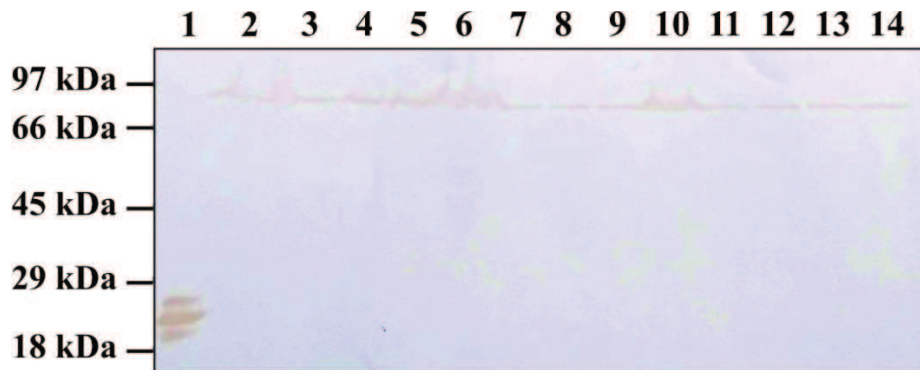
Se realizaron ensayos de inmunodetección en extractos de células de *N. europaea* crecidas en Fru, para lo cual se emplearon anticuerpos primarios policlonales generados en conejo contra las proteínas recombinantes *NeuSocPSasa* y *NeuSocPasa*, purificadas individualmente. El revelado se llevó a cabo empleando DAB (detallado en la sección de Materiales y Métodos de este Capítulo). La Figura 29 muestra que tanto el anticuerpo anti-*NeuSocPSasa* (Figura 29A) como el anticuerpo anti-*NeuSocPasa* (Figura 29B) detectaron la proteína *NeuSocPSasa-II* en su forma completa (de ~80 kDa). Como controles se sembraron los dominios *NeuSocPSasa* y *NeuSocPasa* purificados individualmente (Figura 29A y 29B, respectivamente). Los resultados presentados hasta el momento nos permiten afirmar que la proteína *NeuSocPSasa-II* se expresa en su forma completa y menos activa en células de *N. europaea* crecidas en condiciones heterótrofas.



**Figura 29:** Inmunodetección de los dominios *NeuSocPSasa* y *NeuSocPasa*, utilizando anticuerpos primarios obtenidos contra *NeuSocPSasa* (A) y *NeuSocPasa* (B). Los carriles se definen como: **1-** *NeuSocPSasa* recombinante; **2-** *NeuSocPasa* recombinante; **3-** extractos crudos de *N. europaea* crecidas con Fru 2% (p/v).

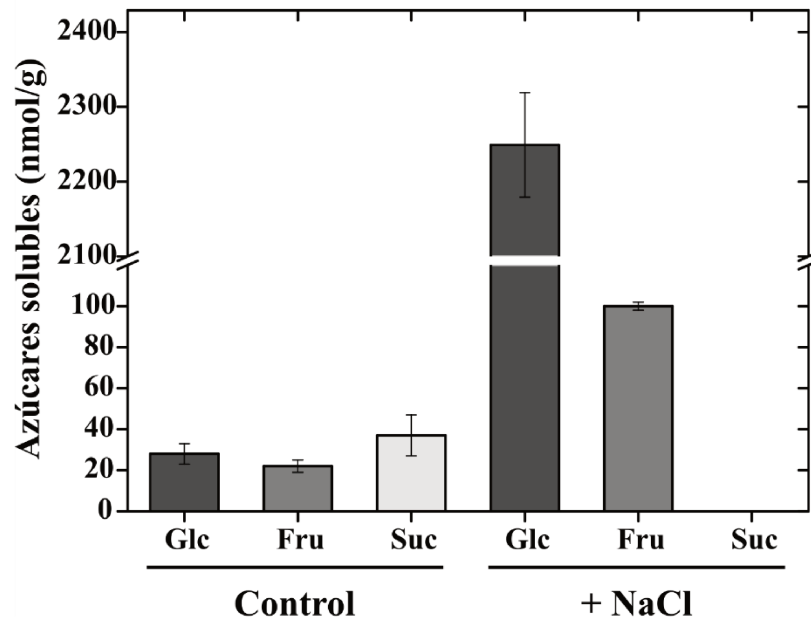
Dado que el rol putativo de la Suc en bacterias estaría relacionado con la tolerancia a estrés salino (218,219,252), se realizaron ensayos de estrés con NaCl en *N. europaea* con el objetivo de evaluar si en condiciones de estrés para la bacteria se producen los dominios individuales de la proteína *NeuSocPSasa-II*, los cuales son activos. Las células fueron crecidas en medio de cultivo suplementado con Fru 2% (p/v) a 28 °C y, luego de 24 h, se les adicionaron diferentes concentraciones de NaCl [2, 5 y 10% (p/v)]. Se cosecharon las células a diferentes tiempos *post* adición del NaCl (después de 1, 3, 6 y 24 h). Las respectivas muestras se procesaron y se realizó un ensayo de inmunodetección utilizando el anticuerpo primario específico anti-*NeuSocPasa* (acorde a lo descrito en Materiales y Métodos). La Figura 30 muestra que la proteína *NeuSocPSasa-II* se produce en su forma completa de ~80 kDa en los extractos obtenidos luego

de incubar las células con diferentes concentraciones de NaCl. A su vez, la cantidad de *NeuSucPSasa-II* se mantiene prácticamente invariable en relación a la concentración de NaCl suministrada. Esto sugiere que la enzima bajo estudio no se encuentra afectada por la concentración de sal en el medio, cuando la bacteria crece en condiciones heterótrofas.



**Figura 30:** Inmunodetección del dominio *NeuSucPasa*. Los carriles se definen como: **1-** *NeuSucPasa* recombinante; **2-** extractos crudos de células cultivadas en medio con Fru 2% (p/v), control; **carriles 3-6:** células cosechadas después de 1, 3, 6 y 24 h de la adición de NaCl 2% (p/v); **carriles 7-10:** células cosechadas después de 1, 3, 6 y 24 h de la adición de NaCl 5% (p/v); **carriles 11-14:** células cosechadas después de 1, 3, 6 y 24 h de la adición de NaCl 10% (p/v).

Las funciones osmoprotectoras y termoprotectoras de la Suc han sido demostradas previamente en diferentes especies de cianobacterias, incluidas aquellas que habitan en nichos de agua dulce (239,393). En base a estos resultados, pensamos en evaluar las cantidades de azúcares solubles en *N. europaea* crecidas en Fru. Primero, se realizó una extracción de los azúcares solubles con metanol/cloroformo como se detalla en la sección de Materiales y Métodos, a partir de células crecidas en medio de cultivo suplementado con Fru 2% (p/v) y tratadas con NaCl 2% (p/v). En el sobrenadante se obtienen los azúcares a cuantificar. La medida se realizó siguiendo el método de Stitt (394), según lo descrito en Materiales y Métodos. Como se observa en la Figura 31, el contenido de Suc en las células crecidas en condiciones heterotróficas alcanzó un valor de 37 nmoles/g de células (en peso fresco), mientras que la misma no fue detectada cuando las células se crecieron en presencia de NaCl. Por otro lado, los niveles de Glc y Fru fueron de 28 y 22 nmoles/g de células (en peso fresco), respectivamente, mientras que cuando a las células se les adicionó NaCl los valores de Glc y Fru fueron de 2.249 y 100 nmoles/g de células (en peso fresco), respectivamente (Figura 31).



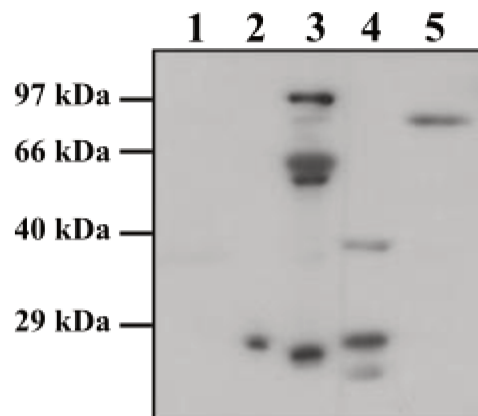
**Figura 31:** Análisis del contenido de azúcares solubles (Glc, Fru y Suc) en células de *N. europaea* crecidas bajo condiciones heterotróficas (control) y con adición de NaCl 2% (p/v).

Los resultados presentados sugieren que, bajo condiciones heterotróficas, las células de *N. europaea* no estarían acumulando Suc como osmolito protector, ya que no se detectó su presencia en las células cultivadas en presencia de NaCl 2% (p/v) (Figura 31). A su vez, esto se condice con el resultado del ensayo de inmunodetección en células crecidas en presencia de distintas concentraciones de NaCl (Figura 30), donde se observa la expresión de la proteína completa *NeuSucPSasa-II* de baja actividad, lo que sugiere que las células no están sintetizando Suc en cantidades detectables. En cambio, se observa un aumento considerable en la cantidad de Glc, con lo cual se podría postular que las células crecidas en un medio suplementado con Fru y NaCl están utilizando sus reservas de carbono transiente (Figura 31). Esto les permitiría sobrevivir en condiciones ambientales no favorables y, posteriormente, metabolizar la Glc para lograr un crecimiento celular y una división rápida cuando las condiciones mejoren. Es importante destacar que, aunque no podemos descartar que la biosíntesis de Suc esté relacionada con el estrés salino, ya que en este caso se analizó sólo en condiciones heterótropas, este no es el único factor que podría desencadenar la síntesis de Suc. Otros factores, como la temperatura, también podrían influir en la síntesis de Suc.

#### 5.4.4.5. Análisis de la *NeuSucPSasa-II* en células crecidas en condiciones quimiolitotróficas

Obtenida la biomasa de células crecidas en condiciones quimiolitotróficas, comenzamos con el análisis de la *NeuSucPSasa-II* en células crecidas en dichas condiciones, de forma comparativa con las condiciones heterotróficas, analizando la producción *in vivo* de

*NeuSucPSasa-II* en los respectivos extractos celulares. Se realizaron ensayos de inmunodetección con las enzimas obtenidas de manera recombinante como control y con extractos crudos de *N. europaea* crecidas en ambas condiciones, utilizando el anticuerpo generado contra el dominio *NeuSucPasa*. En la Figura 32, se observa la detección del dominio *NeuSucPasa* en extractos crudos de células cultivadas en condiciones quimiolitotróficas. Mientras que, en extractos crudos de células cultivadas en condiciones heterótrofas se detectó la proteína *NeuSucPSasa-II* en su forma completa de ~80 kDa (Figura 32).



**Figura 32:** Inmunodetección del dominio *NeuSucPasa*, utilizando el anticuerpo primario obtenido contra *NeuSucPasa*. Los carriles se definen como: **1-** *NeuSucPSasa* recombinante; **2-** *NeuSucPasa* recombinante; **3-** *NeuSucPSasa-II* recombinante; **4-** extractos crudos de células cultivadas en condiciones quimiolitotróficas; **5-** extractos crudos de células cultivadas con Fru 2% (p/v).

Los resultados nos permiten plantear la hipótesis que cuando las células de *N. europaea* crecen en presencia de Fru, es decir, en condiciones heterótrofas, la proteína *NeuSucPSasa-II* se produce en su forma completa de ~80 kDa y de baja actividad, como ya se presentó en los ensayos anteriores (Figura 29). Por otra parte, en células crecidas en condiciones quimiolitotróficas (en presencia de CO<sub>2</sub> y NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), se detectó el dominio fosfatasa (*NeuSucPasa*), el cual es activo cuando se obtiene de manera individual, y no se detectó la proteína completa de ~80 kDa (Figura 32). En conjunto, los resultados sugieren que la enzima *NeuSucPSasa-II*, responsable putativa de la síntesis de Suc en *N. europaea*, podría ser regulada mediante proteólisis, dando lugar a sus dos dominios individuales y activos enzimáticamente, frente a determinadas condiciones de crecimiento.

#### 5.4.5. Regulación de la *NeuSucPSasa-II*

La SucPSasa es altamente regulada en plantas, tanto a nivel transcripcional, post-traducciona (activación o inhibición por fosforilación, dependiendo del residuo fosforilado) y alostéricamente (activada por Glc-6P e inhibida por Pi), siendo influenciada por factores ambientales como luz y estrés osmótico (210). En cambio, hasta el momento no se han encontrado evidencias concretas de que las SucPSasas procariotas sean reguladas, ya que no poseen los residuos blanco de las fosforilaciones, ni fueron activadas por Glc-6P o inhibidas por Pi. Sin embargo, pareciera que la síntesis de Suc está muy bien controlada a nivel transcripcional en cianobacterias (395–398).

Así como fue propuesto para la trehalosa-6P (399), la Suc-6P podría funcionar en la señalización de procesos metabólicos. Cuando a células de *A. thaliana* en cultivo se les eliminan los azúcares, la SucPSasa es escindida proteolíticamente al dejar de interactuar con proteínas 14-3-3 (400). Sin embargo, esta proteólisis no afectaría a la actividad SucPSasa, pero sí eliminaría el dominio C-terminal (SucPasa\* inactivo) y, por lo tanto, la capacidad de formar un complejo “SucPSasa/SucPasa” activo. Esto permitiría un aumento de la concentración de Suc-6P, la cual actuaría como señalizador de la condición “privación de azúcar” (232).

Al ensayar la actividad de la enzima *NeuSucPSasa-II*, se pudo comprobar que la misma es prácticamente inactiva. Por el contrario, cuando los dominios fueron obtenidos individualmente, se demostró fehacientemente que ambos son activos y se producen en condiciones de quimiolitautotrofia (Tabla 13 y Figura 32). Ante estos resultados, decidimos analizar la posible regulación por proteólisis de la *NeuSucPSasa-II*. Para esto, se utilizó un servidor informático especializado que proporciona información sobre cortes de enzimas proteolíticas ([https://procleave.erc.monash.edu/Procleave\\_crf](https://procleave.erc.monash.edu/Procleave_crf)). Inicialmente, se envió al servidor la secuencia de la enzima *NeuSucPSasa-II* para su análisis. Este servidor procesó la secuencia proporcionada y generó un resultado detallado que incluía la identificación de una peptidasa de tipo KPC2. La misma se cataloga como una enzima perteneciente a la familia de peptidasas S8, también conocidas como subtilisinas o familia de subtilasas, que es la segunda familia más grande de serin proteasas (401). Todas las proteasas de esta familia se caracterizan por poseer una tríada catalítica Asp/His/Ser y un centro catalítico de pliegues  $\alpha/\beta$ , que contiene una hoja  $\beta$  paralela de siete hebras (402). La serina peptidasa identificada posee el siguiente patrón de corte: f/g/K/R↓S/a, el cual coincide con la secuencia h/a/G/R↓S/p de la proteína bajo estudio y escindiría a la *NeuSucPSasa-II* en la posición 468, es decir, en el *linker* que une ambos dominios catalíticos, dando lugar a las enzimas *NeuSucPSasa* y *NeuSucPasa*, las cuales son activas individualmente (Figura 33).



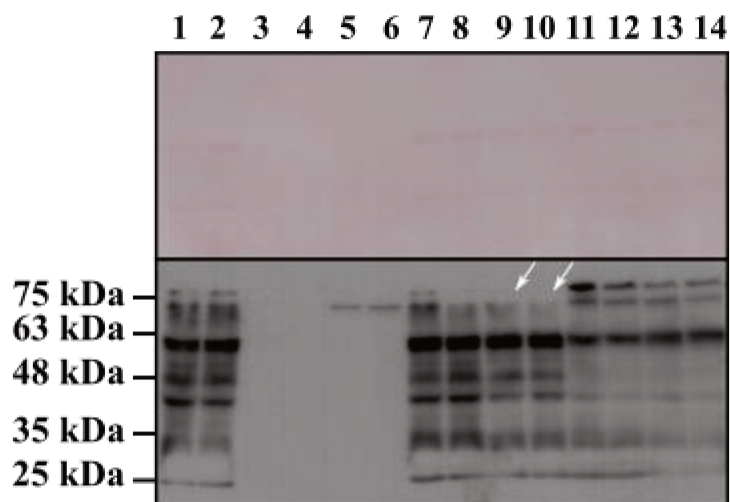
**Figura 33:** Secuencia aminoacídica de la *NeuSucPSasa-II* completa. Las flechas rojas señalan el supuesto sitio de corte de la serina peptidasa, dando lugar a los dominios individuales, *NeuSucPSasa* y *NeuSucPasa* (resaltado en amarillo).

En base a esto, se realizó una búsqueda en el genoma de *N. europaea*, y se encontró un gen que codifica para una serina peptidasa de la familia S8, la cual tiene conservados los residuos del sitio activo Asp/His/Ser. Conociendo la secuencia del gen *NE1574* (ID WP\_011112138), codificante para la serina peptidasa de *N. europaea* (*NeuS8pept*), se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar este gen mediante PCR, según lo descrito en la sección Materiales y Métodos de este Capítulo.

Partiendo de un cultivo de *N. europaea* crecido con Fru 2% (p/v), se realizó la extracción del ADN genómico, el cual se utilizó para realizar una PCR utilizando los oligonucleótidos *Neu-S8pept-Fow* y *Neu-S8pept-Rev* (Tabla 11 de Materiales y Métodos). Sin embargo, hasta el momento de la escritura de esta Tesis no ha sido posible obtener el fragmento completo de la secuencia nucleotídica de la *NeuS8pept* (~2.200 pb), a pesar de haberse ensayado diversas condiciones de amplificación, como así también distintas concentraciones de ADN genómico. Por este motivo, para este trabajo de Tesis no pudo realizarse el clonado de la misma y su correspondiente purificación y caracterización cinética.

#### 5.4.5.1. Ensayos de proteólisis sobre *NeuSUCPSasa-II*

Al contar con extractos proteicos de la bacteria *N. europaea*, crecida en condiciones quimiolitotrofas y heterótrofas, y debido a que no se pudo amplificar y obtener de manera recombinante la proteasa *NeuS8pept*, se llevaron a cabo ensayos de proteólisis enzimática utilizando los correspondientes extractos crudos como fuente de la peptidasa. Para esto, se utilizó la enzima *NeuSUCPSasa-II* obtenida de manera recombinante, como sustrato de la peptidasa. Inicialmente, se crecieron cultivos de *N. europaea* en ambas condiciones de crecimiento a 28 °C. Luego, se realizó la lisis por sonicación de los respectivos cultivos, seguido de una centrifugación a 12.000 rpm y a 4 °C por 10 min. La reacción de proteólisis se llevó a cabo incubando los extractos crudos más la proteína recombinante *NeuSUCPSasa-II*, en *buffer* HEPES pH 8, a 25 °C durante 1 h. Las muestras resultantes se analizaron mediante un ensayo de *western-blot* (Figura 34).



**Figura 34:** Inmunodetección del dominio *NeuSUCPSasa-II*. Los carriles se definen como: **1 y 2-** *NeuSUCPSasa-II* recombinante ( $t_0$  y  $t_1$ ); **3 y 4-** extractos crudos de *N. europaea* crecidas en condiciones quimiolitotrofas ( $t_0$  y  $t_1$ ); **5 y 6-** extractos crudos de *N. europaea* crecidas con Fru 2% (p/v) ( $t_0$  y  $t_1$ ); **7 a 10-** extractos de células crecidas con aireación más *NeuSUCPSasa-II* recombinante a  $t_0$  (**7 y 8**) y a  $t_1$  (**9 y 10**); **11 a 14-** extractos de células crecidas con Fru 2% (p/v) más *NeuSUCPSasa-II* recombinante a  $t_0$  (**11 y 12**) y a  $t_1$  (**13 y 14**).

En la Figura 34, se observa que en los extractos de células crecidas en condiciones quimiolitotrofas, la banda correspondiente a la proteína completa *NeuSUCPSasa-II* desaparece (indicado en la Figura 34 con flechas blancas); mientras que en los extractos de células crecidas con Fru 2% (p/v), la banda de interés se continúa observando. Estos resultados indican que la proteólisis de la enzima completa sucedería cuando las células crecen en condiciones de quimiolitotrofia. Esto, a su vez, se correlaciona con la baja actividad detectada en extractos de células crecidas en condiciones heterótroficas y con los ensayos de *western-blot* sobre los mismos, detectando siempre la enzima completa. Acorde con los resultados presentados

previamente, cuando *N. europaea* crece en condiciones de quimiolitotrofia, se observó la proteólisis de la enzima responsable de generar Suc, dando lugar a los dominios individuales enzimáticamente activos (Figura 32).

#### 5.4.6. Análisis de la estructura proteica de la *NeuSucPSasa-II in silico*

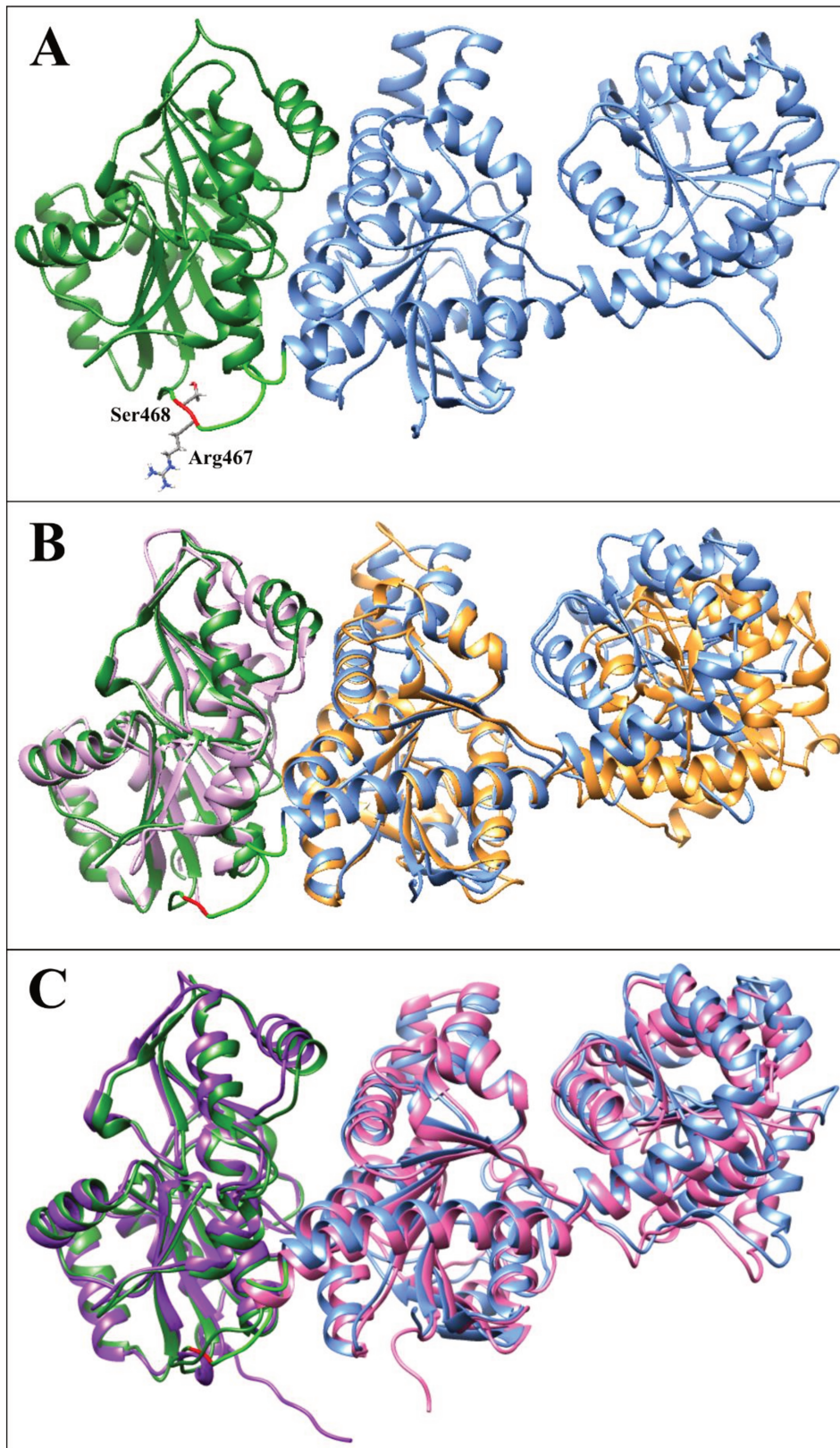
En búsqueda de respuestas para los interrogantes desencadenados a partir de los resultados expuestos anteriormente, se procedió a la construcción de un modelo de la *NeuSucPSasa-II*. Para construir dicho modelo 3D, se utilizó el algoritmo desarrollado por Google, AlphaFold2 (281,297). El mismo puede predecir estructuras de proteínas con precisión atómica, incluso en casos en los que no se conoce una estructura similar. En la Figura 35A se muestra el modelo obtenido para *NeuSucPSasa-II*. Dicho modelo fue analizado con el servidor *Verify3D*, a partir del cual se obtuvo una puntuación de 95,09%, denotando que ese porcentaje de los residuos tienen valores de *score* mayores a 0,2 (282). Por otra parte, el gráfico de Ramachandran del modelo mostró que sólo el 0,3% de los aminoácidos se encuentran en un área no permitida (350). A partir de los resultados obtenidos con los validadores, mostrando en conjunto una buena puntuación en cuanto a los valores estructurales, se puede afirmar que el modelo resultante es confiable.

En la Figura 35A se observa la estructura tridimensional de la *NeuSucPSasa-II*. En color celeste se representa el dominio glicosiltransferasa, el cual consta de dos subdominios que forman una hendidura de unión al sustrato profunda en la interfaz. La topología de cada subdominio es similar a un pliegue de Rossmann (Figura 35A). El subdominio A, compuesto principalmente por los residuos N-terminales y que se encuentra cercano al dominio SucPasa, tiene un núcleo central que consta de ocho hebras  $\beta$  en su mayoría paralelas, flanqueadas por hélices  $\alpha$ . El subdominio B tiene una hoja  $\beta$  paralela central de cuatro hebras, flanqueada por nueve hélices  $\alpha$ . Estos subdominios, A y B, están conectados a través de los bucles Pro<sup>222</sup>-Thr<sup>224</sup> y Tyr<sup>431</sup>-Thr<sup>432</sup>. A su vez, este último bucle se considera parte del nudo que cruza los dos subdominios y conecta dos hélices  $\alpha$ , una característica común de las enzimas que pertenecen a la superfamilia GT-B (206,403,404). El *linker* que une el dominio glicosiltransferasa con el dominio fosfatasa, está representado en color verde claro (Figura 35A). El mismo tiene una longitud de 14 aminoácidos. En cuanto al dominio fosfatasa, que se representa en color verde oscuro, también consta de dos subdominios conectados por dos bucles que forman una bisagra (Figura 35A). El subdominio central (residuos Leu<sup>472</sup>-Arg<sup>561</sup> y Lys<sup>635</sup>-Gln<sup>713</sup>) y el subdominio de la tapa (residuos Trp<sup>562</sup>-Ser<sup>634</sup>), ambos contienen un ( $\alpha\beta$ )-sándwich de tres capas.

Por otra parte, se realizó una comparación entre el modelo obtenido para la *NeuSucPSasa-II* y las estructuras cristalinas resueltas de la SucPSasa de *H. orenii* (246), la cual presenta un 33,96% de identidad con el dominio *NeuSucPSasa*; y la SucPasa de *Synechocystis* sp. PCC 6803 (234), que posee una identidad del 33,33% con el dominio *NeuSucPasa* (Figura 35B). La estructura cristalina de la SucPSasa de la bacteria no fotosintética *H. orenii* presenta dos dominios distintos

de pliegues de Rossmann, con una gran hendidura de unión al sustrato entre los dominios. Además, esta enzima pertenece a la familia GT-B de glicosiltransferasas de retención de la configuración del enlace glicosídico, y su estructura reveló detalles sobre los sitios de unión al sustrato y el mecanismo de reacción, que es independiente de iones metálicos (246). En cuanto a la SucPasa de *Synechocystis* sp PCC 6803, se determinó que la misma cuenta con dos dominios desiguales unidos por una región de bisagra flexible, lo que permite que la proteína adopte conformaciones abiertas y cerradas. El sitio activo, que contiene un sitio de unión para el cofactor  $Mg^{2+}$ , está ubicado en el dominio más grande, frente a la hendidura entre los dominios. El más pequeño de los dos dominios contiene un bolsillo de unión a la Glc, que determina en gran medida la especificidad del sustrato Suc-6P. Gracias a la estructura cristalina de la SucPasa de *Synechocystis* sp PCC 6803, se revelaron detalles del mecanismo catalítico. La reacción procede mediante la transferencia del grupo fosfato de la Suc-6P al residuo de Asp en el sitio activo, con la liberación de Suc y la formación de un intermediario fosfoacilo covalente, que está coordinado por el ion  $Mg^{2+}$ . En el segundo paso de la reacción, el fosfoacilo se hidroliza para liberar Pi y regenerar el sitio aceptor del Asp (234).

También, recientemente se caracterizó una SucPSasa de tipo II de un metilotrofo obligado aeróbico, *M. flagellatus* KT. Esta enzima bifuncional es dependiente de  $Mg^{2+}$  y resultó ser un homotetrámero de ~340 kDa, activado por Fru-1,6- $P_2$  y ATP, e inhibida por Glc-6P, Fru-1P, AMP y Pi. A su vez, se demostró que en *M. flagellatus* la síntesis de Suc se asocia con la respuesta a estrés salino y a altas temperaturas (231). En base a estos resultados, se realizó una comparación entre el modelo obtenido para la NeuSucPSasa-II y el modelo de la SucPSasa de *M. flagellatus*, obtenido también por AlphaFold2 (Figura 35C). Dicha enzima posee un 66,67% de identidad con NeuSucPSasa-II. En cuanto al *linker* que une ambos dominios en este organismo tiene una longitud similar al de la enzima de *N. europaea*, de 13 aminoácidos.



**Figura 35:** Representación de cinta de la *NeuSucPSasa-II*. (A) El dominio *NeuSucPSasa* se muestra en color celeste y el dominio *NeuSucPasa* en color verde. Se resaltan los residuos Arg<sup>467</sup> y Ser<sup>468</sup> donde ocurriría la escisión mediada por la peptidasa S8. (B) Análisis comparativo de las estructuras: *SucPSasa* de *H. orenii* (en naranja) y *SucPasa* de *Synechocystis* sp. PCC 6803 (en lila) con la *NeuSucPSasa-II*. (C) Análisis comparativo de la estructura de la *SucPSasa* de tipo II de *M. flagellatus* (en rosa el dominio *SucPSasa* y en lila el dominio *SucPasa*) con la *NeuSucPSasa-II*.

## 5.5. DISCUSIÓN

La Suc es uno de los productos más abundantes de la fotosíntesis. Hasta hace relativamente poco, se pensaba que la misma se producía exclusivamente en organismos fototróficos, incluyendo plantas, algas unicelulares y cianobacterias (250,405). Las vías bioquímicas para el metabolismo de la Suc se han investigado principalmente en plantas superiores y cianobacterias, donde la biosíntesis del disacárido involucra la SucPSasa y la SucPasa (232,240,406). Sin embargo, se conoce menos sobre las enzimas que catalizan la biosíntesis y el posterior metabolismo de la Suc en procariotas no-fototróficos.

En la cianobacteria *Synechococcus* sp. PCC 7002, se describió una vía para la escisión de la Suc (396). Este organismo contiene el gen *amsA*, que codifica para una amilosacarasa (Ams, EC 2.4.1.4), una enzima perteneciente a la familia 13 de glucósido hidrolasas capaz de catabolizar la Suc. También se ha identificado el gen *frkA*, el cual codifica una fructoquinasa (FruK, EC 2.7.1.4), enzima que produce Fru-6P, uno de los sustratos utilizados en la síntesis de Suc. Estas enzimas, presentes en un microorganismo fotosintético oxigénico, han sido caracterizadas y se ha demostrado que su expresión aumenta en respuesta a un tratamiento con sal (396). En concordancia con esto, se ha evidenciado recientemente que diversas bacterias metilotróficas, aquellas que emplean metano, metanol o aminas metiladas, tienen la capacidad de acumular Suc, ya sea como un metabolito primario o secundario (241,407,408). Por ejemplo, *Methylobacterium alcaliphilum* 20Z, un metanotrofo gammaproteobacteriano halotolerante, es capaz de sintetizar Suc en respuesta a un aumento en la salinidad de los medios de crecimiento (241). En el genoma de esta bacteria, se han identificado un conjunto de cuatro genes que codifican putativas SucPSasa, SucPasa, FruK y Ams (243). Se ha demostrado que la mutación de la SucPSasa abolió la capacidad de esta bacteria de acumular Suc, lo que respalda el papel crucial de esta enzima en el proceso de biosíntesis del disacárido (408).

*N. europaea* es una bacteria que puede obtener toda su energía y capacidad reductora para el crecimiento a partir de la oxidación del  $\text{NH}_3$  a hidroxilamina en presencia de  $\text{O}_2$  (370,384,409). En un ambiente en presencia de oxígeno, este microorganismo se comporta como un quimiolitotrofo obligado, que acopla oxidaciones inorgánicas primarias a las reacciones biosintéticas celulares para la reducción de  $\text{CO}_2$  (410). Los estudios sobre la incorporación de  $^{14}\text{C}\text{CO}_2$  por células y extractos libres de células de *N. europaea* han concluido que el patrón de fijación de  $\text{CO}_2$  en esta bacteria es similar al de las plantas verdes, como también ocurre en otros organismos quimioautotróficos (411). En el ciclo de Calvin-Benson-Bassham (CBB), típico de los organismos fotosintéticos, el  $\text{CO}_2$  es fijado por la Rubisco y luego el ATP y el NAD(P)H, producidos a partir de la captura de luz, se utilizan para reducir el 3-PGA a gliceraldehído-3P (Ga3P). Este último desempeña un papel fundamental en todo el metabolismo del carbono (412).

*N. europaea*, junto con otros microorganismos, participa en la conversión y circulación de material inorgánico en la Tierra (409). La bacteria fija el CO<sub>2</sub> mediante un ciclo de CBB similar al que se encuentra en las plantas, pero utilizando la energía obtenida a través de la oxidación del nitrógeno inorgánico en lugar de la luz solar para el proceso de síntesis (411). En algas verdes y plantas, donde el ciclo de CBB se conoce detalladamente, la fijación de CO<sub>2</sub> por la Rubisco produce 3-PGA que luego se convierte en Ga3P dentro del cloroplasto. Esta última conversión implica dos pasos: en el primero, el 3-PGA es fosforilado por una fosfoglicerato quinasa (EC 2.7.2.3) a 1,3-bisfosfoglicerato (1,3-bis-PGA), que luego se reduce en una segunda reacción, catalizada por la Ga3P deshidrogenasa dependiente de NADH (EC 1.2.1.12) para producir Ga3P. A continuación, la triosa-P se reparte entre las vías metabólicas que tienen lugar en diferentes compartimentos celulares (412). El análisis del genoma de *N. europaea* secuenciado en 2003 (384) aporta información sobre su posible escenario metabólico. En cuanto al ciclo de CBB, se encontraron genes que codifican para casi todas las enzimas, excepto para la sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa (EC 3.1.3.37) y para la Ga3P deshidrogenasa dependiente de NADPH (EC 1.2.1.13) (384). Chain y sus colegas (384) sugirieron que estas enzimas son reemplazadas por la Fru-1,6-bisfosfatasa (EC 3.1.3.11) y la Ga3P deshidrogenasa dependiente de NADH, que se emplean en la gluconeogénesis y la glucólisis, respectivamente (384). Esto se debe a que, en organismos como *N. europaea*, donde la fijación de CO<sub>2</sub> y la gluconeogénesis ocurren de manera continua, tener dos genes separados no ofrece una ventaja evidente, y una sola enzima cumple eficazmente ambas funciones. La regulación enzimática sigue siendo importante para garantizar el flujo adecuado de estos procesos metabólicos. Una razón que respalda la versatilidad de estas enzimas en las funciones celulares en las que participan radica en el hecho de que, a diferencia de los organismos eucariotas fotosintéticos, todas las rutas metabólicas tienen lugar en el citoplasma, sin compartimentos separados.

Como se mencionó anteriormente, *N. europaea* es un organismo autótrofo, por lo que el carbono requerido para su crecimiento proviene de la asimilación de carbono inorgánico. Aunque se ha demostrado que es más bien un autótrofo facultativo (377,378), cuando el organismo se cultivó con una fuente de carbono inorgánico (CO<sub>2</sub>), su tasa de crecimiento es mayor que la de una fuente de carbono orgánico (378,413). Sin embargo, el desarrollo del organismo en condiciones mixotróficas tiene beneficios a través de la asimilación del carbono y reduce el costo energético de fijar el carbono inorgánico. No obstante, vale la pena explorar el impacto ecológico de estos compuestos orgánicos en el entorno que se desarrolla *N. europaea*. Por otro lado, el NH<sub>4</sub><sup>+</sup> es siempre esencial como fuente de nitrógeno y de energía en condiciones aeróbicas. Sin embargo, se ha observado que en condiciones anaeróbicas, donde se detiene la producción de energía a través de la oxidación del NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, las células pueden obtener energía a partir de la oxidación de Pyr y la reducción de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> en un proceso contrario a la nitrificación, pero el NH<sub>4</sub><sup>+</sup> aún es esencial, posiblemente como fuente de nitrógeno (414).

Una característica interesante del genoma de *N. europaea* es la preponderancia de secuencias de inserción. Lo más probable es que el tamaño del genoma esté disminuyendo y que las secuencias de inserción puedan estar ayudando, en una marcha evolutiva hacia un genoma más compacto. Se ha postulado que *N. europaea* continúa su reducción hacia un genoma más compacto, como otras bacterias catabólicamente limitadas (384). En este contexto, la preservación de los genes relacionados con el metabolismo del glucógeno y de la Suc puede ofrecer algún beneficio a su estilo de vida. Es lógico especular que el glucógeno puede actuar como un compuesto de almacenamiento de carbono, más que de energía. Hay poca evidencia sobre el rol de la Suc en procariontes no fotosintéticos. En los pocos casos que se han estudiado la misma se sintetiza en respuesta a estrés salino o térmico, manteniendo el equilibrio osmótico y estabilizando la estructura y/o la función de membranas y proteínas (231,243,248,249,252,415). Sin embargo, la Suc también se podría utilizar como reserva de carbono temporal, lo que permitiría que las células sobrevivan a condiciones ambientales adversas y luego se metabolice cuando las condiciones mejoren, para permitir que las células crezcan y se dividan rápidamente (233). Los ORFs de las enzimas SucPSasa y SucSasa en *N. europaea* están adyacentes entre sí en la misma hebra y separados por sólo 70 pb. La importancia de este supuesto operón SucPSasa-SucSasa en este organismo no está clara, ya que resulta contradictorio que las enzimas para la síntesis y degradación de Suc se transcriban juntas. En este trabajo de Tesis hemos obtenido resultados que explicarían la razón por la cual se transcribirían juntas, entendiendo la posibilidad de un mecanismo de regulación post-transcripcional mediante un proceso de clivaje proteolítico.

Es probable que en *N. europaea* el carbono utilizado para sintetizar tanto glucógeno como Suc provenga de la asimilación de CO<sub>2</sub> por el ciclo de CBB, y no de una fuente orgánica externa. Este carbono puede entrar en muchas vías metabólicas por cualquiera de los intermediarios de este ciclo, principalmente a partir de 3-PGA. Luego, este compuesto puede entrar en la glucólisis (ruta de Embden-Meyerhof-Parnas), convertirse en Pyr y entrar al ciclo de Krebs. En *N. europaea* este ciclo se considera inactivo y en su lugar sería una “herradura” de Krebs, proveyendo los esqueletos de carbono necesarios para la síntesis de aminoácidos, lípidos y otros compuestos orgánicos (379,416,417).

Por otro lado, el 3-PGA puede, a través de la gluconeogénesis, generar Glc-1P, la cual puede ser activada a UDP-Glc o ADP-Glc por acción de las enzimas UDP-Glc PPasa o ADP-Glc PPasa, respectivamente. Esta partición de la Glc-1P suele permitir el establecimiento de rutas metabólicas específicas, y no superpuestas, como ocurre, por ejemplo, en cianobacterias, donde la UDP-Glc sirve para la síntesis de Suc, mientras que la ADP-Glc es utilizada principalmente para la síntesis de glucógeno (418).

Como ya se mencionó, el ciclo de CBB es una vía operativa importante para la absorción autótrofa de CO<sub>2</sub> inorgánico. Tanto el primer producto de la fijación del carbono, el 3-PGA, como

así también la Fru-6P, son intermediarios clave que vinculan el ciclo con otras vías metabólicas. Por lo tanto, el flujo de carbono asimilado puede dirigirse hacia (i) la glucólisis y la producción de energía (ATP), (ii) las vías de cetoácidos y aminoácidos relacionados con el metabolismo del nitrógeno, y (iii) el almacenamiento de polisacáridos, principalmente glucógeno. En este contexto, las propiedades reguladoras identificadas para la ADP-Glc PPasa de *N. europaea* respaldan que la regulación de la síntesis de glucógeno está coordinada con la disponibilidad de carbono y energía en las bacterias (289). Por un lado, la síntesis de ADP-Glc en *N. europaea* estaría íntimamente asociada con un alto contenido energético, ya que la enzima utiliza ATP como sustrato y, además, porque es sensible al AMP, que es el principal inhibidor alostérico. A su vez, la activación de la ADP-Glc PPasa por Pyr, PEP y OAA respalda la síntesis de glucógeno cuando el carbono está en exceso relativo, ya que los niveles elevados de estos metabolitos superan las demandas de muchas vías metabólicas. De hecho, la regulación de Pyr, PEP y OAA es importante porque son parte del enclave metabólico central para la distribución de carbono y energía (289).

En este trabajo de Tesis pudimos demostrar que la enzima *NeuSucPSasa-II* no posee actividad como tal, pero cuando sus dominios se producen por separado son activos. El dominio *NeuSucPSasa* puede utilizar los sustratos ADP-Glc y UDP-Glc como dadores glucosilos con similar eficiencia catalítica (Tabla 13). El dominio *NeuSucPasa* mostró ser activo y específico por el disacárido fosforilado Suc-6P. En base a estos resultados *in vitro*, parece posible que la Suc se sintetice a partir de ADP-Glc y UDP-Glc a través de la *NeuSucPSasa-II*. Si bien se especula que la síntesis de Suc ocurre principalmente a partir de UDP-Glc, se observó *in vitro* que la *SucSasa* resulta más eficiente para transferir Glc desde ADP-Glc que desde UDP-Glc, contrariamente a lo que sucede en eucariotas, los cuales utilizan preferencialmente UDP-Glc. Similar especificidad se observó en el sentido inverso, como operaría fisiológicamente en otros organismos, mostrando preferencia en el uso de ADP en la degradación de la Suc. Esto permite predecir que los organismos procariotas tienen un escenario metabólico diferente al de las plantas. La preferencia de nucleótidos en estas enzimas determina dónde se dirige el resto de la Glc después de que se degrada la Suc (228). Es importante señalar que, en las plantas, la ADP-Glc se encuentra exclusivamente en los plástidos, mientras que la UDP-Glc se localiza en el citoplasma. Esta distribución tiene un papel fundamental en la especificidad de ciertas enzimas, como la ADP-Glc PPasa que opera en el cloroplasto y la *SucPSasa* que se encuentra en el citosol (419). A partir de estos resultados, podría postularse que en *N. europaea* la Suc se puede acumular a partir de UDP-Glc como de ADP-Glc, gracias a la vía irreversible de la *NeuSucPSasa-II*, y su degradación podría llevarse a cabo a través de la reacción reversible catalizada por la *SucSasa*, dando ADP-Glc. A su vez, esto sugiere que el metabolismo de la Suc podría estar ligado a la síntesis de glucógeno, ya que la ADP-Glc es el dador glucosilo para la síntesis del polisacárido.

Es razonable entonces que exista un mecanismo finamente regulado que permita dirigir los dadores glucosilos hacia una u otra vía. Existen diferentes mecanismos de regulación metabólica;

entre ellas, la de tipo alostérico, que produce respuestas inmediatas frente a los cambios metabólicos (420). En plantas y bacterias, la síntesis de glucanos de reserva está regulada alostéricamente por activación/inhibición de la ADP-Glc PPasa; a diferencia de la regulación que ocurre en mamíferos y hongos, donde se da a nivel de la glucógeno sintasa. En todos los casos, independientemente del papel que cumpla el glucógeno, se sintetizará siempre que haya energía y carbono disponibles para ese fin. Los metabolitos que regulan alostéricamente las ADP-Glc PPasas varían según la fuente y dependen del metabolismo energético de asimilación de carbono (50,51,110).

Otro mecanismo de regulación de la actividad enzimática lo constituyen las modificaciones post-traduccionales (420). Entre ellas, se encuentra la proteólisis controlada mediada por proteasas específicas. Estas son enzimas que tienen un significado único en los procesos celulares y fisiológicos, y son sintetizadas por todos los organismos. Las mismas catalizan la hidrólisis de enlaces peptídicos en los polipéptidos. Una variedad de funciones y procesos biológicos dependen de su actividad. Independientemente de la complejidad del organismo, las peptidasas son esenciales en cada etapa de la vida de cada célula individual, ya que todas las moléculas de proteínas producidas deben procesarse proteolíticamente y eventualmente reciclarse. La proteólisis específica a menudo da como resultado la activación o inactivación de proteínas; en cambio, la proteólisis inespecífica resulta en la degradación de proteínas y, por lo tanto, estas enzimas son potencialmente peligrosas para las células y pueden alterar su entorno (421). Las endoproteasas de Ser (EC 3.4.21) tienen un centro de Ser activo que participa en el proceso catalítico. Varias proteasas aisladas de organismos halófilos pertenecen a las proteasas de Ser. Las mismas constan de tres aminoácidos en su sitio activo: Asp, His y Ser, organizados según una tríada catalítica (422). En el desarrollo de esta Tesis, se demostró que la enzima *NeuSUCPSasa-II* es relativamente inactiva en su forma completa, mientras que los dos dominios que la componen presentaron una actividad considerable cuando se obtuvieron de manera individual (Tabla 13). A su vez, se observó que la *NeuSUCPSasa-II* se encuentra en su forma completa y de baja actividad en células que fueron crecidas en condiciones mixotróficas (Figura 29). Por el contrario, en condiciones quimiolitotróficas, la proteína se identificó con cada uno de sus dominios individuales (Figura 32), sugiriendo que la síntesis de Suc se da en condiciones normales de quimiolitotrofia. A partir de estos resultados, se analizó la posibilidad de una escisión proteolítica, identificando un sitio de corte potencial por una proteasa de Ser de la familia S8 (Figura 33). La búsqueda *in silico* de posibles genes que codifiquen esta enzima en *N. europaea* reveló un gen que codificaría para la *NeuS8pept*. Aunque se realizaron varios intentos para amplificarlo a partir del ADN genómico de *N. europaea*, no se logró obtener el fragmento completo del gen, lo que resultó en la incapacidad de llevar a cabo la expresión recombinante de la proteína. Sin embargo, se realizaron ensayos *in vivo* evaluando la proteólisis de *NeuSUCPSasa-II*, utilizando extractos crudos de células crecidas en ambas condiciones y la

proteína completa recombinante. En extractos de células crecidas en condiciones quimiolitautotróficas, se observó la desaparición de la banda correspondiente a la NeuSucPSasa-II (~80 kDa); mientras que en extractos de células crecidas con Fru 2% (p/v), la enzima permanece en su forma completa (Figura 34). A su vez, estos resultados se conciben con las medidas de actividad realizadas sobre los extractos crudos de *N. europaea*, mostrando una actividad para la SucPSasa de 0,31 U/mg en condiciones quimiolitautotróficas, similar al valor obtenido *in vitro*; por el contrario, en condiciones heterótrofas (Fru 2% p/v) el valor de actividad fue de 0,026 U/mg.

A partir del modelo estructural que se obtuvo para la NeuSucPSasa-II mediante AlphaFold2 (Figura 35), se puede concluir que la estructura de esta proteína se asemeja a las estructuras ya cristalizadas de las proteínas SucPSasa de *H. orenii* y a la SucPasa de *Synechocystis* sp. PCC 6803. Dichas proteínas no pertenecen al grupo de las SucPSasas de tipo II, las cuales son proteínas compuestas por ambos dominios, glicosiltransferasa y fosfohidrolasa, como NeuSucPSasa-II. Sin embargo, según los resultados obtenidos, la proteína de *N. europaea* en su forma completa no presentaría actividad enzimática y, cuando la misma es escindida, sí se pudo caracterizar cinéticamente. En la determinación de los parámetros cinéticos, se encontraron valores de  $S_{0,5}$  con un orden de magnitud menor para ADP-Glc y UDP-Glc, comparados a los determinados para la SucPSasa-II de *M. flagellatus* ( $K_m$  1,3 y 1,2 mM para UDP-Glc y Fru-6P, respectivamente). La enzima de *M. flagellatus* resultó ser bifuncional, como Suc fosfato sintasa/fosfatasa, y ambas actividades enzimáticas dependen fuertemente de  $Mg^{2+}$ , con una concentración iónica óptima de 17,5 mM (231). En cuanto a la actividad del dominio fosfatasa, los valores de  $V_{max}$  y  $K_m$  para la Suc-6P se encuentran en el mismo orden que los determinados para la enzima de *M. flagellatus* (Tabla 13) (231).

La aparición de las enzimas que sintetizan Suc y enzimas que la degradan en el mismo operón, plantea cuestiones metabólicas sobre la función de estas enzimas en organismos no fotosintéticos. Se demostró que la producción de Suc y la escisión de la misma en *N. europaea* están determinadas por un único operón. Esta red metabólica incluye dos etapas. De manera similar a las plantas superiores y a las cianobacterias, *N. europaea* convierte la Fru-6P y la ADP-Glc (o UDP-Glc) en Suc, con la participación de los dominios que componen a la NeuSucPSasa-II. En la siguiente etapa, se degradaría la Suc, dando ADP-Glc y Fru libre, mediante la acción de la SucSasa. En nuestro laboratorio, se realizó previamente con detalle la caracterización cinética de esta enzima (228). En este estudio, la enzima mostró tener una actividad enzimática, en el sentido de degradación de la Suc, significativa con el sustrato ADP, y mucho menor cuando se analizaron los sustratos UDP, CDP, dTDP y GDP. Luego, la Fru libre se puede convertir nuevamente en Fru-6P a través de la FruK (NE1212) dependiente de ATP. Por lo tanto, esta red metabólica probablemente representa un “ciclo de Suc”. Junto con los resultados obtenidos en esta Tesis, se puede concluir que la síntesis o degradación de la Suc, vía NeuSucPSasa-II y NeuSucSasa, sería

preferencial para especies químicas derivadas de adenina que de uridina, a diferencia de lo que ocurre principalmente en plantas. Esta especificidad tendría implicaciones para la partición del carbono entre la Suc y el glucógeno, ya que implicaría una asignación importante de la ADP-Glc en el metabolismo de carbohidratos en *N. europaea*.

Se ha demostrado que un suministro de ADP-Glc para la biosíntesis de glucógeno también podría atribuirse a la escisión de la Suc por medio de la SucSasa (217,254). La clara preferencia por ADP, observada por las enzimas de especies no fotosintéticas, podría indicar una función similar en la regulación del flujo de carbono entre la Suc y el glucógeno. También se observaron diferencias en la preferencia de nucleótidos para las SucPSasas. De hecho, las SucPSasas de plantas son altamente específicas para UDP-Glc, mientras que las bacterianas pueden usar otros NDP-Glc como sustratos (215,423). Con la resolución de la estructura de la SucPSasa de *H. orenii* se sugirieron tres residuos de unión de nucleótidos conservados en plantas, pero muy variables entre bacterias (246), los cuales podrían ser responsables de los diferentes modos de unión en las SucPSasas de plantas y de bacterias.

El ciclo del metabolismo de la Suc, resultante de las enzimas mencionadas anteriormente, podría ser un mecanismo ingenioso para ajustar el suministro de Suc y nucleótidos-azúcar, dependiendo de la demanda de la célula bajo ciertas condiciones ambientales. De hecho, se ha propuesto previamente que los ciclos de Suc en las plantas, caracterizados por procesos permanentes de formación y degradación, podrían permitir que los organismos puedan responder con un alto grado de sensibilidad a los factores que influyen en la acumulación de azúcares, el potencial osmótico, la respiración y la señalización del azúcar (217,424).

La síntesis de glucógeno a través de Suc como intermediario requiere dos moléculas de NTP para unir el residuo de glucosilo al cebador de glucógeno. Esta ruta es menos eficiente energéticamente en comparación con la ruta de la ADP-Glc PPasa/GSasa (vía clásica GlgCA), que requiere sólo una molécula de NTP para la elongación del glucógeno. El genoma de *N. europaea* posee y expresa los genes necesarios para esta última vía (384,425). La acumulación intracelular de Suc en *N. europaea* podría ser una respuesta a estrés salino. Se describió que este microorganismo es tolerante a salinidad, hasta 400 mM de NaCl (425). Sería razonable entonces pensar que la función principal de la ruta bajo estudio es la biosíntesis *de novo* de Suc. Esta sugerencia está respaldada, ya que se observaron varias diferencias en células crecidas con bajo nivel de NaCl *versus* células crecidas a altos niveles de salinidad, en enzimas cruciales asociadas con la producción de osmolitos en *N. europaea* (425). La modificación principal que se observó estaba relacionada con dos enzimas, asociadas con la producción de Suc, uno de los osmolitos más comúnmente descritos (426). Codificadas por el mismo operón, se piensa que estas enzimas proporcionan una producción oportuna de Suc en respuesta a las condiciones ambientales. En última instancia, el análisis de los datos proteómicos en relación con los osmolitos, confirmó que *N. europaea* modifica varias enzimas involucradas en la producción de osmolitos y

probablemente utiliza estas moléculas en respuesta a altas concentraciones de sal (425). Tal respuesta, aunque beneficiosa para la fisiología celular en general, es un proceso que demanda nutrientes y energía. En trabajos previos, se ha reportado que la producción de osmolitos puede sumar potencialmente hasta el 30-40% del carbono total y el 60% de las demandas totales de nitrógeno, lo que resulta en un aumento de 2-3 veces en el costo energético para las bacterias (427). Las respuestas metabólicas específicas observadas en *N. europaea*, sugieren un papel del metabolismo del carbono en la generación de poder reductor, posiblemente para satisfacer las demandas de energía de los mecanismos de respuesta al estrés inducidos por la alta salinidad (425).

Como se mencionó anteriormente, en la naturaleza se presentan dos vías posibles para la síntesis de Suc. Se encuentra la vía convencional que funciona en plantas y cianobacterias *in vivo*, y posiblemente en la naturaleza en general, mediante la acción combinada de la SucPSasa y la SucPasa, para generar Suc a partir de Fru-6P y NDP-Glc. Por otra parte, existen evidencias *in vitro* de la síntesis de Suc a partir de NDP-Glc y Fru catalizada por la SucSasa. Sin embargo, a pesar de su nomenclatura, *in vivo* esta enzima parece funcionar en la dirección opuesta, es decir, escindiendo Suc. Tanto la SucPSasa como la SucSasa tienen un dominio glicosiltransferasa funcional, presumiblemente con un origen evolutivo común (229). Se postuló que la biosíntesis de Suc pudo haber sido coordinada por una enzima del tipo SucPSasa, ya que así lo sugieren los análisis filogenéticos de las secuencias, y además porque el primer aceptor glucosilo habría sido la Fru-6P en lugar de la Fru, debido a su abundancia en el metabolismo intermedio (229). A su vez, la hidrólisis del intermediario de esta vía, la Suc-6P, conduciría irreversiblemente a la síntesis de Suc. A lo largo de la evolución, la aparición de la función SucSasa ahorraría energía al escindir la Suc, en comparación con las enzimas del tipo invertasas. La reacción de la SucSasa, cuando se acopla a la pirofosforólisis de NDP-Glc a través de una NDP-Glc PPasa, consume sólo una molécula de PPI en la conversión de la Suc en hexosas-fosfato; mientras que la ruta catabólica de Suc generalmente requiere 2 moléculas de ATP. Esta vía de ahorro energético es relativamente pequeña cuando la Suc se respira a través de la glucólisis y el ciclo de Krebs, pero puede ser significativa en condiciones de oxígeno limitado, donde el ciclo de Krebs no está completamente operativo (221). También es interesante mencionar que la oxidación del amonio como mecanismo de obtención de energía es dependiente de oxígeno y, en condiciones anaeróbicas, se inician otros procesos metabólicos, como la reducción de  $\text{NO}_2^-$  utilizando Pyr como dador de electrones, como estrategia para obtener energía. Además de esto, en muchas cianobacterias, la inducción de la SucSasa se da en condiciones de hipoxia, lo que aumenta la importancia económica de esta vía de degradación de Suc (230).

En este trabajo de Tesis, se puso en evidencia ciertas particularidades del metabolismo de la Suc en *N. europaea*, un organismo quimiolitautótrofo que obtiene energía por la oxidación del  $\text{NH}_4^+$  en condiciones aeróbicas. Basándonos en todos los resultados presentados, los mismos nos

ayudan a reforzar la hipótesis de que el metabolismo de la Suc en *N. europaea* podría estar regulado por proteólisis, una respuesta rápida frente a los cambios ambientales, según las necesidades metabólicas de esta bacteria. Aún queda trabajo por realizar para llegar a un conocimiento integrador del metabolismo de Suc en *N. europaea*, aunque esta Tesis ha generado un avance significativo hacia tal entendimiento. El papel exacto de los genes de biosíntesis/utilización de la Suc en clados microbianos cuya caracterización es deficiente tiene que continuar siendo estudiado. Teniendo en cuenta que estos filos bacterianos se aislaron de una variedad de ecosistemas marinos, de agua dulce y terrestres, en el futuro podría desarrollarse una imagen más compleja de la Suc como intermediario de las redes metabólicas microbianas.

## 6. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta Tesis han permitido arribar a las siguientes conclusiones a nivel general:

✓ Se profundizó en el estudio de las propiedades cinéticas, regulatorias y estructurales de las enzimas involucradas en la partición del carbono. El presente trabajo de Tesis contribuye a incrementar el conocimiento sobre las propiedades funcionales y estructurales de la ADP-Glc PPasa de *Melainabacteria*, dos GSasas de *B. japonicum* y la SucPSasa-II de *N. europaea*.

✓ Se desarrollaron y optimizaron sistemas de expresión para la obtención recombinante de distintas enzimas bacterianas involucradas en el metabolismo de hidratos de carbono, específicamente oligo- y poli-sacáridos de reserva y la partición de la Glc-1P.

Para el caso de *Melainabacteria*:

- El estudio se centró en la caracterización funcional y estructural de la enzima ADP-Glc PPasa, con el objetivo de entender las rutas metabólicas primarias de este grupo de bacterias relacionado con las cianobacterias, pero incapaz de realizar fotosíntesis.

- Los resultados de esta Tesis contribuyen al conocimiento de las propiedades funcionales y estructurales de las ADP-Glc PPasas de cianobacterias no fotosintéticas, las cuales no habían sido estudiadas hasta el momento y no se disponía de ningún dato bioquímico/metabólico hasta la realización de este trabajo.

- Las ADP-Glc PPasas caracterizadas tienen propiedades específicas en términos de su cinética y especificidad por los reguladores alostéricos y/o estructura cuaternaria. Las ADP-Glc PPasas de *Melainabacteria* poseen una estructura homotetramérica, similar a la de las cianobacterias fotosintéticas y la mayoría de las fuentes bacterianas, a la vez que sus propiedades regulatorias son semejantes a las enzimas de Actinobacteria. Esto condice con el análisis filogenético realizado, donde las proteínas de *Melainabacteria* se ubican más cerca a las de bacterias heterótrofas (particularmente Actinobacteria) que de las de cianobacterias fotosintéticas.

- En el análisis comparativo entre las ADP-Glc PPasas de *Melainabacteria* y *Anabaena* (cianobacteria fotosintética) mostró aspectos comunes respecto a la sensibilidad a efectores (activación por Glc-6P), lo cual sustenta la hipótesis de *Melainabacteria* como predecesor de las cianobacterias que realizan fotosíntesis, en donde la regulación por 3-PGA apareció posteriormente.

- A partir de esta caracterización cinética, regulatoria y estructural, junto al análisis de datos genómicos de *Melainabacteria*, proponemos la hipótesis de un metabolismo activo de síntesis y degradación del glucógeno.

- Los hallazgos de este trabajo de Tesis constituyen el primer informe bioquímico sobre enzimas involucradas en las rutas metabólicas de *Melainabacteria*, lo que contribuye significativamente al tema actual acerca de la separación entre las cianobacterias fotosintéticas y no fotosintéticas.

Para el caso de *B. japonicum*:

- Los resultados obtenidos nos permiten tener un acercamiento sobre la regulación, el uso de diferentes sustratos y las características cinéticas distintivas de dos isoformas de GSasa presentes en *B. japonicum*.

- Las dos GSasas catalizaron la elongación de un  $\alpha$ -1,4-glucano lineal empleando específicamente ADP-Glc. Una de ellas (GSasa482) presentó una actividad específica dos órdenes de magnitud mayor que la otra (GSasa471). Se confirmó que ambas GSasas no tienen capacidad para sintetizar Mal-1P, una cualidad típica de las GSasas GT4.

- A partir de estos hallazgos y de análisis genómicos, planteamos también la hipótesis que en *B. japonicum* se sintetiza activamente glucógeno a través de dos glicosiltransferasas con actividades aparentemente redundantes, aunque con distintas eficiencias catalíticas.

- En función de las diferencias en la preferencia del tipo de glucano, podría suponerse que estas enzimas participan en la elongación de distintos tipos de glicanos. No se dispone de información sobre la(s) estructura(s) específica(s) del glucógeno presente(s) en el organismo.

Para el caso de *N. europaea*:

- El entendimiento del metabolismo de la Suc en este organismo se realizó con abordajes tanto *in vitro* como *in vivo*, estudiando comparativamente en distintas condiciones la presencia de enzimas, isoformas y cuantificando metabolitos.

- Demostramos que la proteína completa *NeuSucPSasa-II* no presenta valores de actividad detectable en ninguna de las dos actividades cuyos dominios la constituyen (SucPSasa y SucPasa). Mientras que, los dominios obtenidos de manera individual resultan en enzimas activas y específicas para la síntesis de Suc. Los resultados de esta Tesis complementan la caracterización de otras enzimas del metabolismo de la Suc en *N. europaea* que el grupo de trabajo viene realizando. En conjunto, la caracterización de estas enzimas lleva a proponer una estrecha relación entre los metabolismos de glucógeno y Suc, basada en la utilización de metabolitos/precursores comunes.

- Se desarrollaron estrategias eficientes para el cultivo de células de *N. europaea* en dos condiciones de crecimiento, quimiolitotrófica y heterótrofa, lo que ha permitido generar biomasa para realizar caracterizaciones bioquímicas comparativas.

- En cuanto a los ensayos *in vivo*, indicaron la presencia de la enzima completa no funcional en condiciones heterotróficas (en presencia de Fru), mientras que en condiciones quimiolitotróficas se encuentra la presencia de cada dominio funcional, activo, de manera independiente.

- Para la proteína *NeuSucPSasa-II* se identificó un posible sitio de corte por parte de una serin peptidasa, la cual se detectó en el genoma de *N. europaea* como *NeuS8pept*.

- Se postula que la enzima *NeuSucPSasa-II* es la responsable de la producción de Suc en esta bacteria, y que la regulación de la síntesis del disacárido está ligada a la escisión de esta enzima, lo cual constituye un mecanismo importante de regulación frente a cambios ambientales, según las necesidades metabólicas de este organismo quimiolitotrófico.

En conjunto, los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis, proporcionan un importante aporte al entendimiento del metabolismo del carbono en bacterias recientemente descubiertas o poco caracterizadas a nivel bioquímico. El trabajo es un aporte original al entendimiento del metabolismo de la Suc en el organismo quimiolitotrófico *N. europaea*, donde describimos incipientemente un mecanismo de regulación post-traducciona sensible a las condiciones de crecimiento del organismo.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Nelson DL, Cox MM. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 7th ed. New York, NY: W. H. Freeman; 2017. 3270 p.
2. Glasner ME, Truong DP, Morse BC. How enzyme promiscuity and horizontal gene transfer contribute to metabolic innovation. *FEBS J* [Internet]. 2020 Apr 1 [cited 2022 Jun 26];287(7):1323–42. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/febs.15185>
3. Nobeli I, Favia AD, Thornton JM. Protein promiscuity and its implications for biotechnology. *Nat Biotechnol*. 2009;27(2):157–67.
4. D'Ari RD, Casadesús J. Underground metabolism. *BioEssays*. 1998;20:181–6.
5. Thakur D, Pandit SB. Substrate promiscuity: a continuum feature of enzymes. *Biophys J* [Internet]. 2022 Feb 11 [cited 2023 Jan 3];121(3):344a. Available from: <http://www.cell.com/article/S0006349521019901/fulltext>
6. Alves R, Chaleil RAG, Sternberg MJE. Evolution of enzymes in metabolism: a network perspective. *J Mol Biol*. 2002 Jul 19;320:751–70.
7. Nahum Alves L, Riley M. Divergence of Function in Sequence-Related Groups of *Escherichia coli* Proteins. *Genome Res* [Internet]. 2001;11:1375–81. Available from: <http://www.genome.org/cgi/doi/10.1101/gr.180901>.www.genome.org
8. Todd AE, Orengo CA, Thornton JM. Evolution of function in protein superfamilies, from a structural perspective. *J Mol Biol*. 2001;307(4):1113–43.
9. Jensen RA. Enzyme recruitment in evolution of new function. *Annu Rev Microbiol* [Internet]. 1976 Nov 28 [cited 2022 Jul 1];30:409–25. Available from: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.mi.30.100176.002205>
10. Khersonsky O, Tawfik DS. Enzyme promiscuity: A mechanistic and evolutionary perspective. *Annu Rev Biochem*. 2010;79:471–505.
11. Huang R, Hippauf F, Rohrbeck D, Hausteim M, Wenke K, Feike J, et al. Enzyme functional evolution through improved catalysis of ancestrally nonpreferred substrates. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2012;109(8):2966–71. Available from: [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1019605109](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1019605109)
12. Nam H, Lewis NE, Lerman JA, Lee D-H, Chang RL, Kim D, et al. Network context and selection in the evolution to enzyme specificity. *Science (80- )* [Internet]. 2012;337:1101–4. Available from: [www.sciencemag.org/cgi/content/full/337/6098/1097/DC1](http://www.sciencemag.org/cgi/content/full/337/6098/1097/DC1)
13. Voordeckers K, Brown CA, Vanneste K, Van Der Zande E, Voet A, Maere S, et al. Reconstruction of Ancestral Metabolic Enzymes Reveals Molecular Mechanisms Underlying Evolutionary Innovation through Gene Duplication. *PLoS Biol* [Internet]. 2012;10(12):1–17. Available from: [www.plosbiology.org](http://www.plosbiology.org)
14. Koonin E V. Systemic determinants of gene evolution and function. *Mol Syst Biol*. 2005;1:1–2.
15. Pál C, Papp B, Lercher MJ. An integrated view of protein evolution. *Nat Rev Genet*. 2006;7(5):337–48.
16. Dickerson RE. The structure of cytochrome c and the rates of molecular evolution. *J Mol Evol* [Internet]. 1971 [cited 2022 Jul 5];1:26–45. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF01659392>
17. Nei M, Kumar S. *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford University Press, USA; 2000.
18. Webster AJ, Payne RJH, Pagel M. *Molecular Phylogenies Link Rates of Evolution and*

- Speciation. *Science* (80- ) [Internet]. 2003;301:478. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1083202>
19. Bromham L, Leys R. Sociality and the Rate of Molecular Evolution. *Mol Biol Evol* [Internet]. 2005;22(6):1393–402. Available from: <https://academic.oup.com/mbe/article/22/6/1393/1111798>
  20. Brakmann S, Schwienhorst A. *Evolutionary Methods in Biotechnology. Clever Tricks for Directed Evolution* [Internet]. Wiley-VCH, Weinheim; 2004. Available from: [www.angewandte.org](http://www.angewandte.org)
  21. Smith NGC, Eyre-Walker A. Human disease genes: Patterns and predictions. *Gene*. 2003 Oct 30;318:169–75.
  22. Searls DB. Pharmacophylogenomics: genes, evolution and drug targets. *Nat Rev Drug Discov*. 2003;2(8):613–23.
  23. Ramani AK, Marcotte EM. Exploiting the co-evolution of interacting proteins to discover interaction specificity. *J Mol Biol*. 2003 Mar 14;327(1):273–84.
  24. Yčas M. On earlier states of the biochemical system. *J Theor Biol*. 1974;44:145–60.
  25. Ohno S. *Evolution by Gene Duplication*. Springer Berlin, Heidelberg; 1970.
  26. Babbie A, Tokuriki N, Hollfelder F. What makes an enzyme promiscuous? *Curr Opin Chem Biol* [Internet]. 2010;14(2):200–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.11.028>
  27. Khersonsky O, Malitsky S, Rogachev I, Tawfik DS. Role of chemistry versus substrate binding in recruiting promiscuous enzyme functions. *Biochemistry*. 2011;50(13):2683–90.
  28. Gatti-Lafranconi P, Hollfelder F. Flexibility and Reactivity in Promiscuous Enzymes. *ChemBioChem*. 2013;14(3):285–92.
  29. Pandya C, Farelli JD, Dunaway-Mariano D, Allen KN. Enzyme promiscuity: Engine of evolutionary innovation. *J Biol Chem*. 2014;289(44):30229–36.
  30. Copley SD. An Evolutionary Biochemist’s Perspective on Promiscuity. *Trends Biochem Sci*. 2015;40(2):72–8.
  31. Copley SD. Shining a light on enzyme promiscuity. *Curr Opin Struct Biol* [Internet]. 2017;47:167–75. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sbi.2017.11.001>
  32. Lazcano A, Díaz-Villagómez E, Mills T, Oró J. On the levels of enzymatic substrate specificity: implications for the early evolution of metabolic pathways. *Adv Sp Res*. 1995;15(3):345–356.
  33. Copley SD. Evolution of a metabolic pathway for degradation of a toxic xenobiotic: the patchwork approach. *Trends Biochem Sci*. 2000;25(6):261–5.
  34. Noda-Garcia L, Liebermeister W, Tawfik DS. Metabolite-enzyme coevolution: from single enzymes to metabolic pathways and networks. *Annu Rev Biochem*. 2018;87:187–216.
  35. Fani R, Fondi M. Origin and evolution of metabolic pathways. *Phys Life Rev*. 2009 Mar 1;6(1):23–52.
  36. Cornish-Bowden A. The perfect molecule. In: *The pursuit of perfection: aspects of biochemical evolution*. 1st ed. Oxford, United Kingdom: Oxford University Press; 2004. p. 176.
  37. Stick R V, Williams SJ. *Carbohydrates: The Essential Molecules of Life* [Internet]. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier; 2008 [cited 2022 Jul 7]. 496 p. Available from:

- [https://books.google.ps/books?id=PRqX5tETChQC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](https://books.google.ps/books?id=PRqX5tETChQC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false)
38. Voet D, Voet JG, Pratt CW. Fundamentals of Biochemistry: Life at the molecular level. 5th ed. Wiley; 2016. 1184 p.
  39. Spector MP. Metabolism, Central (Intermediary). In: Echaechter M, editor. Encyclopedia of Microbiology. 3rd ed. American Press; 2009. p. 728–50.
  40. Brust H, Orzechowski S, Fettke J. Starch and glycogen analyses: Methods and techniques. Biomolecules. 2020 Jul 1;10(7):1–26.
  41. Imberty A, Buleon A, Tran V, Pérez S. Recent Advances in Knowledge of Starch Structure. Starch-Stärke. 1991;43:375–84.
  42. Buléon A, Colonna P, Planchot V, Ball S. Starch granules: Structure and biosynthesis. Int J Biol Macromol. 1998 Aug;23(2):85–112.
  43. Ball SG, Van De Wal MHBJ, Visser RGF. Progress in understanding the biosynthesis of amylose. Trends Plant Sci. 1998 Dec 1;3(12):462–7.
  44. Zeeman SC, Smith SM, Smith AM. The Priming of Amylose Synthesis in Arabidopsis Leaves. Plant Physiol [Internet]. 2002 Mar 1 [cited 2022 Apr 6];128(3):1069–76. Available from: <https://academic.oup.com/plphys/article/128/3/1069/6110094>
  45. Bar-Even A, Flamholz A, Noor E, Milo R. Rethinking glycolysis: on the biochemical logic of metabolic pathways. Nat Chem Biol [Internet]. 2012;8:509–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nchembio.971>
  46. Romano AH, Conway T. Evolution of carbohydrate metabolic pathways. Res Microbiol. 1996;147(6–7):448–55.
  47. Bar-Peled M, O’Neill MA. Plant nucleotide sugar formation, interconversion, and salvage by sugar recycling. Annu Rev Plant Biol. 2011;62:127–55.
  48. Yang T, Bar-Peled Y, Smith JA, Glushka J, Bar-Peled M. In-microbe formation of nucleotide sugars in engineered *Escherichia coli*. Anal Biochem [Internet]. 2012;421:691–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2011.12.028>
  49. Decker D, Kleczkowski LA. UDP-sugar producing pyrophosphorylases: distinct and essential enzymes with overlapping substrate specificities, providing *de novo* precursors for glycosylation reactions. Front Plant Sci. 2019;9(1822).
  50. Ballicora MA, Iglesias AA, Preiss J. ADP-glucose pyrophosphorylase, a regulatory enzyme for bacterial glycogen synthesis. Microbiol Mol Biol Rev [Internet]. 2003 [cited 2019 Jan 28];67:213–25. Available from: <https://mmbr.asm.org/content/67/2/213.short>
  51. Figueroa CM, Asencion Diez MD, Ballicora MA, Iglesias AA. Structure, function, and evolution of plant ADP-glucose pyrophosphorylase [Internet]. Plant Molecular Biology. Springer Netherlands; 2022. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11103-021-01235-8>
  52. Cereijo AE, Kuhn ML, Hernández MA, Ballicora MA, Iglesias AA, Alvarez HM, et al. Study of duplicated *galU* genes in *Rhodococcus jostii* and a putative new metabolic node for glucosamine-1P in rhodococci. Biochim Biophys Acta - Gen Subj. 2021 Jan 1;1865(1):129727.
  53. Leloir LF. Two decades of research on the biosynthesis of saccharides. Science (80- ). 1971;172(3990):1299–303.
  54. Figueroa CM, Lunn JE, Iglesias AA. Nucleotide-sugar metabolism in plants: the legacy of Luis F. Leloir. J Exp Bot. 2021;72(11):4053–67.
  55. Roeben A, Plitzko JM, Körner R, Böttcher UMK, Siegers K, Hayer-Hartl M, et al.

- Structural basis for subunit assembly in UDP-glucose pyrophosphorylase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol.* 2006;364:551–60.
56. Steiner T, Lamerz AC, Hess P, Breithaupt C, Krapp S, Bourenkov G, et al. Open and closed structures of the UDP-glucose pyrophosphorylase from *Leishmania major*. *J Biol Chem* [Internet]. 2007;282(17):13003–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M609984200>
  57. Alonso MD, Lomako J, Lomako WM, Whelan WJ. A new look at the biogenesis of glycogen. *FASEB J* [Internet]. 1995 Sep 1 [cited 2022 Jun 26];9(12):1126–37. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1096/fasebj.9.12.7672505>
  58. Kleczkowski LA, Geisler M, Ciereszko I, Johansson H. UDP-glucose pyrophosphorylase. An old protein with new tricks. *Plant Physiol.* 2004;134(3):912–8.
  59. Bonofiglio L, García E, Mollerach M. Biochemical characterization of the pneumococcal glucose 1-phosphate uridylyltransferase (GalU) essential for capsule biosynthesis. *Curr Microbiol.* 2005;51(4):217–21.
  60. Leloir LF. The enzymatic transformation of uridine diphosphate glucose into a galactose derivative. *Arch Biochem Biophys.* 1951;33(2):186–90.
  61. Frey PA. The Leloir pathway: a mechanistic imperative for three enzymes to change the stereochemical configuration of a single carbon in galactose. *FASEB J* [Internet]. 1996 [cited 2023 Jan 18];10(4):461–70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8647345/>
  62. Mollerach M, López R, García E. Characterization of the *galU* gene of *Streptococcus pneumoniae* encoding a uridine diphosphoglucose pyrophosphorylase: a gene essential for capsular polysaccharide biosynthesis. *J Exp Med.* 1998;188(11):2047–56.
  63. Komeda Y, Icho T, Iino T. Effects of *galU* mutation on flagellar formation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1977;129(2):908–15.
  64. Thoden JB, Holden HM. The molecular architecture of glucose-1-phosphate uridylyltransferase. *Protein Sci.* 2007;16(3):432–40.
  65. Padilla L, Morbach S, Krämer R, Agosin E. Impact of heterologous expression of *Escherichia coli* UDP-glucose pyrophosphorylase on trehalose and glycogen synthesis in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Environ Microbiol.* 2004;70(7):3845–54.
  66. Ross P, Mayer R, Benziman M. Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiol Rev.* 1991;55(1):35–58.
  67. Turnock DC, Ferguson MAJ. Sugar nucleotide pools of *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, and *Leishmania major*. *Eukaryot Cell.* 2007;6(8):1450–63.
  68. Leloir LF. Far away and long ago. *Annu Rev Biochem.* 1983;52:1–15.
  69. Recondo E, Leloir LF. Adenosine diphosphate glucose and starch synthesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 1961 Nov 1;6(2):85–8.
  70. Espada J. Enzymic Synthesis of Adenosine Diphosphate Glucose from Glucose 1-Phosphate and Adenosine Triphosphate. *J Biol Chem.* 1962 Dec;237(12):3577–81.
  71. Recondo E, Dankert M, Leloir LF. Isolation of adenosine diphosphate D-glucose from corn grains. *Biochem Biophys Res Commun.* 1963;12(3):173–4.
  72. Preiss J, Sivak MN. Biochemistry, molecular biology and regulation of starch synthesis. *Genet Eng (N Y)* [Internet]. 1998 [cited 2020 Jul 3];20:177–223. Available from: [http://link.springer.com/10.1007/978-1-4899-1739-3\\_10](http://link.springer.com/10.1007/978-1-4899-1739-3_10)
  73. Roach PJ, Depaoli-Roach AA, Hurley TD, Tagliabracci VS. Glycogen and its metabolism: some new developments and old themes. *Biochem J.* 2012;441(3):763–87.

74. Wilson WA, Roach PJ, Montero M, Baroja-Fernández E, Muñoz FJ, Eydallin G, et al. Regulation of glycogen metabolism in yeast and bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 2010;34(6):952–85.
75. Melendez R, Melendez-Hevia E, Cascante M. How did glycogen structure evolve to satisfy the requirement for rapid mobilization of glucose? A problem of physical constraints in structure building. *J Mol Evol.* 1997;45:446–55.
76. Melendez-Hevia E, Waddell TG, Shelton ED. Optimization of molecular design in the evolution of metabolism: the glycogen molecule. Vol. 295, *Biochem. J.* 1993.
77. Madsen NB, Cori CF. The Binding of Glycogen and Phosphorylase. *J Biol Chem.* 1958 Dec 1;233(6):1251–6.
78. Prats C, Graham TE, Shearer J. The dynamic life of the glycogen granule. *J Biol Chem* [Internet]. 2018;293(19):7089–98. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.R117.802843>
79. Kiel JAKW, Boels JM, Beldman G, Venema G. Molecular cloning and nucleotide sequence of the glycogen branching enzyme gene (*glgB*) from *Bacillus stearothermophilus* and expression in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Mol Gen Genet.* 1991;230:136–44.
80. Wang L, Wise MJ. Glycogen with short average chain length enhances bacterial durability. *Naturwissenschaften.* 2011;98(9):719–29.
81. Bilgen T. Metabolic Evolution and the Origin of Life. In: Storey KB, editor. *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation.* John Wiley & Sons, Inc.; 2004. p. 557–82.
82. Preiss J. Bacterial glycogen synthesis and its regulation. *Annu Rev Microbiol* [Internet]. 1984 Oct [cited 2019 Jan 28];38:419–58. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.mi.38.100184.002223>
83. Manners DJ. Recent developments in our understanding of glycogen structure. *Carbohydr Polym.* 1991;16(1):37–82.
84. Ball S, Colleoni C, Cenci U, Raj JN, Tirtiaux C. The evolution of glycogen and starch metabolism in eukaryotes gives molecular clues to understand the establishment of plastid endosymbiosis. *J Exp Bot* [Internet]. 2011 [cited 2020 Apr 2];62(6):1775–801. Available from: <https://academic.oup.com/jxb/article-abstract/62/6/1775/597318>
85. Preiss J. Glycogen Biosynthesis. In: *Encyclopedia of Microbiology.* 3rd ed. Academic Press; 2009. p. 145–58.
86. Jones SA, Jorgensen M, Chowdhury FZ, Rodgers R, Hartline J, Leatham MP, et al. Glycogen and maltose utilization by *Escherichia coli* O157:H7 in the mouse intestine. *Infect Immun* [Internet]. 2008 Jun [cited 2022 Jul 21];76(6):2531–40. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/IAI.00096-08>
87. Bonafonte MA, Solano C, Sesma B, Alvarez M, Montuenga L, García-Ros D, et al. The relationship between glycogen synthesis, biofilm formation and virulence in *Salmonella enteritidis*. *FEMS Microbiol Lett* [Internet]. 2000 Oct 1 [cited 2022 Jul 21];191(1):31–6. Available from: <https://academic.oup.com/femsle/article/191/1/31/631342>
88. Sambou T, Dinadayala P, Stadthagen G, Barilone N, Bordat Y, Constant P, et al. Capsular glucan and intracellular glycogen of *Mycobacterium tuberculosis*: biosynthesis and impact on the persistence in mice. *Mol Microbiol.* 2008;70(3):762–74.
89. Bourassa L, Camilli A. Glycogen Contributes to the Environmental Persistence and Transmission of *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol* [Internet]. 2009 Apr [cited 2022 Jul 21];72(1):138. Available from: [/pmc/articles/PMC2704980/](https://pmc/articles/PMC2704980/)
90. Park K-H. Roles of Enzymes in Glycogen Metabolism and Degradation in *Escherichia*

- coli. *J Appl Glycosci*. 2015;62(2):37–45.
91. Gehre L, Gorgette O, Perrinet S, Prevost MC, Ducatez M, Giebel AM, et al. Sequestration of host metabolism by an intracellular pathogen. *Elife*. 2016 Mar 16;5(e12552).
  92. Strange RE. Bacterial “Glycogen” and Survival. *Nature* [Internet]. 1968 [cited 2022 Jul 21];220(5167):606–7. Available from: <https://www.nature.com/articles/220606a0>
  93. Seibold GM, Eikmanns BJ. The *glgX* gene product of *Corynebacterium glutamicum* is required for glycogen degradation and for fast adaptation to hyperosmotic stress. *Microbiology* [Internet]. 2007 Jul 1 [cited 2022 Jul 21];153(7):2212–20. Available from: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.2006/005181-0>
  94. Dalmaso M, Aubert J, Even S, Falentin H, Maillard MB, Parayre S, et al. Accumulation of intracellular glycogen and trehalose by *Propionibacterium freudenreichii* under conditions mimicking cheese ripening in the cold. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2012 Sep [cited 2022 Jul 21];78(17):6357–64. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.00561-12>
  95. Wang L, Regina A, Butardo VM, Kosar-Hashemi B, Larroque O, Kahler CM, et al. Influence of in situ progressive N-terminal is still controversial truncation of glycogen branching enzyme in *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  on glycogen structure, accumulation, and bacterial viability. *BMC Microbiol* [Internet]. 2015 Dec 1 [cited 2022 Jul 21];15(96):1–14. Available from: <https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12866-015-0421-9>
  96. Asención Díez MD, Demonte AM, Guerrero SA, Ballicora MA, Iglesias AA. The ADP-glucose pyrophosphorylase from *Streptococcus mutans* provides evidence for the regulation of polysaccharide biosynthesis in Firmicutes. *Mol Microbiol* [Internet]. 2013 Dec [cited 2019 Apr 10];90(5):1011–27. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24112771>
  97. Demonte AM, Asención Díez MD, Naleway C, Iglesias AA, Ballicora MA. Monofluorophosphate blocks internal polysaccharide synthesis in *Streptococcus mutans*. *PLoS One* [Internet]. 2017 [cited 2019 Apr 10];12(1):e0170483. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28125652>
  98. Preiss J, Romeo T. Molecular biology and regulatory aspects of glycogen biosynthesis in bacteria. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 1994;47:299–329.
  99. Preiss J. Glycogen: Biosynthesis and Regulation. *EcoSal Plus*. 2014;6(1):1–28.
  100. Antoine AD, Tepper BS. Environmental control of glycogen and lipid content of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol*. 1969;100(1):538–9.
  101. Lapp D, Elbein AD. Purification and properties of the adenosine diphosphate-glucose and uridine diphosphate-glucose pyrophosphorylases of *Mycobacterium smegmatis*: inhibition and activation of the adenosine diphosphate-glucose pyrophosphorylase. *J Bacteriol*. 1972;112(1):327–36.
  102. Elbein AD, Mitchell M. Levels of glycogen and trehalose in *Mycobacterium smegmatis* and the purification and properties of the glycogen synthetase. *J Bacteriol*. 1973;113(2):863–73.
  103. Govons S, Gentner N, Greenberg E, Preiss J. Biosynthesis of Bacterial Glycogen: XI. KINETIC CHARACTERIZATION OF AN ALTERED ADENOSINE DIPHOSPHATE-GLUCOSE SYNTHASE FROM A “GLYCOGEN-EXCESS” MUTANT OF *ESCHERICHIA COLI* B. *J Biol Chem*. 1973 Mar 10;248(5):1731–40.
  104. Eydallin G, Viale AM, Morán-Zorzano MT, Muñoz FJ, Montero M, Baroja-Fernández E, et al. Genome-wide screening of genes affecting glycogen metabolism in *Escherichia coli*

- K-12. FEBS Lett [Internet]. 2007;581:2947–53. Available from: <http://www.ecocyc.org/>
105. Van Houte J, Jansen HM. Role of Glycogen in Survival of *Streptococcus mitis*. J Bacteriol [Internet]. 1970 Mar [cited 2022 Jul 21];101(3):1083–5. Available from: <https://journals.asm.org/journal/jb>
106. Wilkinson JF. Carbon and energy storage in bacteria. J Gen Microbiol. 1963 Aug 1;32(2):171–6.
107. Kiel JAKW, Boels JM, Beldman G, Venema G. Glycogen in *Bacillus subtilis*: molecular characterization of an operon encoding enzymes involved in glycogen biosynthesis and degradation. Vol. 11, Molecular Microbiology. 1994.
108. Martin MC, Schneider D, Bruton CJ, Chater KF, Hardisson C. A *glgC* gene essential only for the first of two spatially distinct phases of glycogen synthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2). J Bacteriol [Internet]. 1997 [cited 2022 Jul 21];179(24):7784–9. Available from: <https://journals.asm.org/journal/jb>
109. Plaskitt KA, Chater KF. Influences of developmental genes on localized glycogen deposition in colonies of a mycelial prokaryote, *Streptomyces coelicolor* A3(2): a possible interface between metabolism and morphogenesis. Philos Trans Biol Sci [Internet]. 1995 [cited 2022 Jul 21];347(1320):105–21. Available from: <https://ui.adsabs.harvard.edu/abs/1995RSPTB.347..105P/abstract>
110. Ballicora MA, Iglesias AA, Preiss J. ADP-glucose pyrophosphorylase: a regulatory enzyme for plant starch synthesis. Photosynth Res [Internet]. 2004 [cited 2019 Apr 10];79(1):1–24. Available from: <http://link.springer.com/10.1023/B:PRES.0000011916.67519.58>
111. Wang L, Wise MJ. An updated view on bacterial glycogen structure. Microbiol Aust [Internet]. 2019 Nov 8 [cited 2022 Jul 20];40(4):195–9. Available from: <https://www.publish.csiro.au/ma/MA19056>
112. Elbein AD, Pastuszak I, Tackett AJ, Wilson T, Pan YT. Last step in the conversion of trehalose to glycogen. A mycobacterial enzyme that transfers maltose from maltose 1-phosphate to glycogen. J Biol Chem. 2010;285(13):9803–12.
113. Chandra G, Chater KF, Bornemann S. Unexpected and widespread connections between bacterial glycogen and trehalose metabolism [Internet]. Vol. 157, Microbiology. Microbiology (Reading); 2011 [cited 2021 Apr 14]. p. 1565–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21474533/>
114. Roy R, Usha V, Kermani A, Scott DJ, Hyde EI, Besra GS, et al. Synthesis of  $\alpha$ -glucan in mycobacteria involves a hetero-octameric complex of trehalose synthase TreS and maltokinase Pep2. ACS Chem Biol. 2013;8(10):2245–55.
115. Fraga J, Maranhã A, Mendes V, Pereira PJB, Empadinhas N, Macedo-Ribeiro S. Structure of mycobacterial maltokinase, the missing link in the essential GlgE-pathway. Sci Reports 2015 51. 2015 Jan;5(1):1–12.
116. Rashid AM, Batey SFD, Syson K, Koliwer-Brandl H, Miah F, Barclay JE, et al. Assembly of  $\alpha$ -Glucan by GlgE and GlgB in Mycobacteria and Streptomyces. Biochemistry [Internet]. 2016;55:3270–84. Available from: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
117. Bornemann S.  $\alpha$ -Glucan biosynthesis and the GlgE pathway in *Mycobacterium tuberculosis*. Biochem Soc Trans. 2016;44:68–73.
118. Syson K, Stevenson CEM, Lawson DM, Bornemann S. Structure of the *Mycobacterium smegmatis*  $\alpha$ -maltose-1-phosphate synthase GlgM. Acta Crystallogr [Internet]. 2020 Apr 1 [cited 2021 Apr 14];76(4):175–81. Available from: <https://doi.org/10.1107/S2053230X20004343>
119. Asención Díez MD, Demonte AM, Syson K, Arias DG, Gorelik A, Guerrero SA, et al.

- Allosteric regulation of the partitioning of glucose-1-phosphate between glycogen and trehalose biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* [Internet]. 2015;1850(1):13–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.09.023>
120. Asención Díez MD, Peirú S, Demonte AM, Gramajo H, Iglesias AA. Characterization of recombinant UDP- and ADP-glucose pyrophosphorylases and glycogen synthase to elucidate glucose-1-phosphate partitioning into oligo- and polysaccharides in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol* [Internet]. 2012 Mar [cited 2019 Apr 30];194(6):1485–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22210767>
  121. Koliwer-Brandl H, Syson K, Van De Weerd R, Chandra G, Appelmeik B, Alber M, et al. Metabolic network for the biosynthesis of intra- and extracellular  $\alpha$ -glucans required for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLOS Pathog*. 2016;12(8):1–26.
  122. Kalscheuer R, Syson K, Veeraraghavan U, Weinrick B, Biermann KE, Liu Z, et al. Self-poisoning of *Mycobacterium tuberculosis* by targeting GlgE in an  $\alpha$ -glucan pathway. *Nat Chem Biol* [Internet]. 2010 [cited 2021 Apr 16];6(5):376–84. Available from: </pmc/articles/PMC3256575/>
  123. Colpaert M, Kadouche D, Ducatez M, Pillonel T, Kebbi-Beghdadi C, Cenci U, et al. Conservation of the glycogen metabolism pathway underlines a pivotal function of storage polysaccharides in *Chlamydiae*. *Commun Biol* [Internet]. 2021 Mar 5 [cited 2021 Apr 14];4(296). Available from: <https://doi.org/10.1038/s42003-021-01794-y>
  124. Madloo P, Lema M, Rodríguez VM, Soengas P. Transcriptomic reprogramming of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* after treatment with hydrolytic products derived from glucosinolates. *Plants*. 2021;10(8):1656.
  125. Singh S, Phillips GN, Thorson JS. The structural biology of enzymes involved in natural product glycosylation. *Nat Prod Rep*. 2012;29(10):1201–137.
  126. Blankenfeldt W, Asuncion M, Lam JS, Naismith JH. The structural basis of the catalytic mechanism and regulation of glucose-1-phosphate thymidyltransferase (RmlA). *EMBO J* [Internet]. 2000 Dec 12 [cited 2023 Jan 31];19(24):6663. Available from: </pmc/articles/PMC305900/>
  127. Barton WA, Lesniak J, Biggins JB, Jeffrey PD, Jiang J, Rajashankar KR, et al. Structure, mechanism and engineering of a nucleotidyltransferase as a first step toward glycorandomization. *Nat Struct Biol* [Internet]. 2001 [cited 2023 Jan 31];8(6):545–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11373625/>
  128. Zuccotti S, Zanardi D, Rosano C, Sturla L, Tonetti M, Bolognesi M. Kinetic and crystallographic analyses support a sequential-ordered bi bi catalytic mechanism for *Escherichia coli* glucose-1-phosphate thymidyltransferase. *J Mol Biol*. 2001 Nov 2;313(4):831–43.
  129. Thoden JB, Ruzicka FJ, Frey PA, Rayment I, Holden HM. Structural analysis of the H166G site-directed mutant of galactose-1-phosphate uridylyltransferase complexed with either UDP-glucose or UDP-galactose: detailed description of the nucleotide sugar binding site. *Biochemistry*. 1997;36(6):1212–22.
  130. Thoden JB, Holden HM. Active site geometry of glucose-1-phosphate uridylyltransferase. *Protein Sci*. 2007 Jul;16(7):1379–88.
  131. Brown K, Pompeo F, Dixon S, Mengin-Lecreulx D, Cambillau C, Bourne Y. Crystal structure of the bifunctional *N*-acetylglucosamine 1-phosphate uridylyltransferase from *Escherichia coli*: a paradigm for the related pyrophosphorylase superfamily. *EMBO J* [Internet]. 1999 Aug 8 [cited 2023 Jan 31];18(15):4107. Available from: </pmc/articles/PMC1171487/?report=abstract>
  132. Kostrewa D, D'Arcy A, Takacs B, Kamber M. Crystal structures of *Streptococcus*

- pneumoniae* N-acetylglucosamine-1-phosphate uridyltransferase, GlmU, in apo form at 2.33 Å resolution and in complex with UDP-N-acetylglucosamine and Mg<sup>2+</sup> at 1.96 Å resolution. *J Mol Biol*. 2001 Jan 12;305(2):279–89.
133. Verma SK, Jaiswal M, Kumar N, Parikh A, Nandicoori VK, Prakash B. Structure of N-acetylglucosamine-1-phosphate uridyltransferase (GlmU) from *Mycobacterium tuberculosis* in a cubic space group. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* [Internet]. 2009 May 5 [cited 2023 Jan 31];65(Pt 5):439. Available from: [/pmc/articles/PMC2675579/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15292268/)
  134. Koropatkin NM, Holden HM. Molecular structure of alpha-D-glucose-1-phosphate cytidyltransferase from *Salmonella typhi*. *J Biol Chem* [Internet]. 2004 Oct 15 [cited 2023 Jan 31];279(42):44023–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15292268/>
  135. Koropatkin NM, Cleland WW, Holden HM. Kinetic and structural analysis of α-D-glucose-1-phosphate cytidyltransferase from *Salmonella typhi*. *J Biol Chem*. 2005 Mar 18;280(11):10774–80.
  136. Pelissier MC, Lesley SA, Kuhn P, Bourne Y. Structural insights into the catalytic mechanism of bacterial guanosine-diphospho-D-mannose pyrophosphorylase and its regulation by divalent ions. *J Biol Chem* [Internet]. 2010 Jun 23 [cited 2023 Jan 31];285(35):27468–76. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmid/20573954/?tool=EBI>
  137. Jin X, Ballicora MA, Preiss J, Geiger JH. Crystal structure of potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase. *EMBO J*. 2005;24(4):694–704.
  138. Cupp-Vickery JR, Igarashi RY, Perez M, Poland M, Meyer CR. Structural analysis of ADP-glucose pyrophosphorylase from the bacterium *Agrobacterium tumefaciens*. *Biochemistry* [Internet]. 2008 [cited 2022 Mar 28];47:4439–51. Available from: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
  139. Cifuentes JO, Comino N, Madariaga-Marcos J, López-Fernández S, García-Alija M, Agirre J, et al. Structural basis of glycogen biosynthesis regulation in bacteria. *Structure*. 2016;24(9):1613–22.
  140. Hill BL, Mascarenhas R, Patel HP, Asencion Diez MD, Wu R, Iglesias AA, et al. Structural analysis reveals a pyruvate-binding activator site in the *Agrobacterium tumefaciens* ADP-glucose pyrophosphorylase. *J Biol Chem*. 2019;294(4):1338–48.
  141. Shinabarger D, Berry A, May TB, Rothmel R, Fialho A, Chakrabarty AM. Purification and characterization of phosphomannose isomerase-guanosine diphospho-D-mannose pyrophosphorylase: a bifunctional enzyme in the alginate biosynthetic pathway of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem*. 1991;266(4):2080–8.
  142. Mengin Lecreulx D, Van Heijenoort J. Identification of the *glmU* gene encoding N-acetylglucosamine-1-phosphate uridyltransferase in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* [Internet]. 1993 [cited 2023 Feb 1];175(19):6150–7. Available from: <https://journals.asm.org/journal/jb>
  143. Perugini MA, Griffin MDW, Smith BJ, Webb LE, Davis AJ, Handman E, et al. Insight into the self-association of key enzymes from pathogenic species. *Eur Biophys J*. 2005;34(5):469–76.
  144. Asención Diez MD, Ebrecht AC, Martínez LI, Aleanzi MC, Guerrero SA, Ballicora MA, et al. A chimeric UDP-Glucose pyrophosphorylase produced by protein engineering exhibits sensitivity to allosteric regulators. *Int J Mol Sci*. 2013;14(5):9703–21.
  145. Sivaram J, Sauve V, Matte A, Cygler M. Crystal Structure of *Escherichia coli* glucose-1-phosphate thymidyltransferase (RffH) complexed with dTTP and Mg<sup>2+</sup>. *J Biol Chem*. 2002 Nov 15;277(46):44214–9.

146. Ballicora MA, Sesma JI, Iglesias AA, Preiss J. Characterization of chimeric ADP-glucose pyrophosphorylases of *Escherichia coli* and *Agrobacterium tumefaciens*. Importance of the C-terminus on the selectivity for allosteric regulators. *Biochemistry*. 2002 Jul 30;41(30):9431–7.
147. Gómez-Casati DF, Igarashi RY, Berger CN, Brandt ME, Iglesias AA, Meyer CR. Identification of functionally important amino-terminal arginines of *Agrobacterium tumefaciens* ADP-glucose pyrophosphorylase by alanine scanning mutagenesis. *Biochemistry* [Internet]. 2001;40(34):10169–78. Available from: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
148. Ballicora MA, Erben ED, Yazaki T, Bertolo AL, Demonte AM, Schmidt JR, et al. Identification of regions critically affecting kinetics and allosteric regulation of the *Escherichia coli* ADP-glucose pyrophosphorylase by modeling and pentapeptide-scanning mutagenesis. *J Bacteriol*. 2007;189(14):5325–33.
149. Asención Diez MD, Aleanzi MC, Iglesias AA, Ballicora MA. A novel dual allosteric activation mechanism of *Escherichia coli* ADP-glucose pyrophosphorylase: the role of pyruvate. *PLoS One* [Internet]. 2014 Aug 7 [cited 2020 Mar 10];9(8):e103888. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25102309>
150. Asención Diez MD, Figueroa CM, Esper MC, Mascarenhas R, Aleanzi MC, Liu D, et al. On the simultaneous activation of *Agrobacterium tumefaciens* ADP-glucose pyrophosphorylase by pyruvate and fructose 6-phosphate. *Biochimie*. 2020;171–172:23–30.
151. Gómez Casati DF, Aon MA, Iglesias AA. Ultrasensitive glycogen synthesis in Cyanobacteria. *FEBS Lett*. 1999;
152. Iglesias AA, Kakefuda G, Preiss J. Regulatory and structural properties of the cyanobacterial ADP-glucose pyrophosphorylases. *Plant Physiol* [Internet]. 1991 [cited 2019 Jan 28];97:1187–95. Available from: <http://www.plantphysiol.org/content/97/3/1187.short>
153. Gómez-Casati DF, Cortassa S, Aon MA, Iglesias AA. Ultrasensitive behavior in the synthesis of storage polysaccharides in cyanobacteria. *Planta*. 2003;216:969–75.
154. Gómez-Casati DF, Iglesias AA. ADP-glucose pyrophosphorylase from wheat endosperm. Purification and characterization of an enzyme with novel regulatory properties. *Planta*. 2002;214:428–34.
155. Kuhn ML, Figueroa CM, Iglesias AA, Ballicora MA. The ancestral activation promiscuity of ADP-glucose pyrophosphorylases from oxygenic photosynthetic organisms. *BMC Evol Biol*. 2013;13(51):1–8.
156. Ferretti M V, Hussien RA, Ballicora MA, Iglesias AA, Figueroa CM, Asención Diez MD. The ADP-glucose pyrophosphorylase from *Melainabacteria*: a comparative study between photosynthetic and non-photosynthetic bacterial sources. *Biochimie* [Internet]. 2022;192:30–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2021.09.011>
157. Takata H, Takaha T, Okada S, Takagi M, Imanaka T. Characterization of a gene cluster for glycogen biosynthesis and a heterotetrameric ADP-glucose pyrophosphorylase from *Bacillus stearothermophilus*. *J Bacteriol* [Internet]. 1997 [cited 2019 Jan 28];179(15):4689–98. Available from: <http://jb.asm.org/content/179/15/4689.short>
158. Cereijo AE, Asención Diez MD, Ballicora MA, Iglesias AA. Regulatory properties of the ADP-glucose pyrophosphorylase from the Clostridial Firmicutes member *Ruminococcus albus*. *J Bacteriol* [Internet]. 2018;200(17):e00172-18. Available from: <http://jb.asm.org/>
159. Yeo M, Chater K. The interplay of glycogen metabolism and differentiation provides an insight into the developmental biology of *Streptomyces coelicolor*. *Microbiology* [Internet]. 2005 Mar [cited 2023 Feb 3];151:855–61. Available from:

- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15758231/>
160. Cereijo AE, Asención Diez MD, Dávila Costa JS, Alvarez HM, Iglesias AA. On the kinetic and allosteric regulatory properties of the ADP-glucose pyrophosphorylase from *Rhodococcus jostii*: An approach to evaluate glycogen metabolism in oleaginous bacteria. *Front Microbiol.* 2016;7:830.
  161. Cereijo AE, Alvarez HM, Iglesias AA, Asencion Diez MD. Glucosamine-P and rhodococcal ADP-glucose pyrophosphorylases: A hint to (re)discover (actino)bacterial amino sugar metabolism. *Biochimie* [Internet]. 2020 Sep 1 [cited 2021 Apr 12];176:158–61. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.07.006>
  162. Borodina I, Krabben P, Nielsen J. Genome-scale analysis of *Streptomyces coelicolor* A3(2) metabolism. *Genome Res* [Internet]. 2005 Jun [cited 2023 Feb 3];15(6):820–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15930493/>
  163. Hodgson DA. Primary metabolism and its control in streptomycetes: a most unusual group of bacteria. *Adv Microb Physiol.* 2000 Jan 1;42:47–238.
  164. Ryu YG, Butler MJ, Chater KF, Lee KJ. Engineering of primary carbohydrate metabolism for increased production of actinorhodin in *Streptomyces coelicolor*. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2006 Nov [cited 2023 Feb 3];72(11):7132–9. Available from: <https://journals.asm.org/journal/aem>
  165. Haugen TH, Ishaque A, Preiss J. Biosynthesis of bacterial glycogen. Characterization of the subunit structure of *Escherichia coli* B glucose 1 phosphate adenylyltransferase (EC 2.7.7.27). *J Biol Chem.* 1976;251(24):7880–5.
  166. Hill MA, Kaufmann K, Otero J, Preiss J. Biosynthesis of bacterial glycogen. Mutagenesis of a catalytic site residue of ADP glucose pyrophosphorylase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 1991;266(19):12455–60.
  167. Frueauf JB, Ballicora MA, Preiss J. Aspartate residue 142 is important for catalysis by ADP-glucose pyrophosphorylase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* [Internet]. 2001 Dec 7 [cited 2022 Mar 11];276(49):46319–25. Available from: <http://www.jbc.org>
  168. Lehmann M, Preiss J. Biosynthesis of bacterial glycogen: purification and properties of *Salmonella typhimurium* LT-2 adenosine diphosphate glucose pyrophosphorylase. *J Bacteriol* [Internet]. 1980 [cited 2022 Jul 26];143(1):120–7. Available from: <https://journals.asm.org/journal/jb>
  169. Steiner KE, Preiss J. Biosynthesis of bacterial glycogen: Genetic and allosteric regulation of glycogen biosynthesis in *Salmonella typhimurium* LT 2. *J Bacteriol* [Internet]. 1977 [cited 2022 Jul 26];129(1):246–53. Available from: <https://journals.asm.org/journal/jb>
  170. Zeng L, Burne RA. Sucrose- and fructose-specific effects on the transcriptome of *Streptococcus mutans*, as determined by RNA sequencing. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2016 [cited 2023 Feb 2];82(1):146–56. Available from: <http://dx.doi.org/10.1128>
  171. Ferrero DM, Piattoni C V, Asencion Diez MD, Rojas BE, Hartman MD, Ballicora MA, et al. Phosphorylation of ADP-glucose pyrophosphorylase during wheat seeds development. *Front Plant Sci* [Internet]. 2020;11(1058):1–11. Available from: [www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org)
  172. Crevillén P, Ballicora MA, Mérida Á, Preiss J, Romero JM. The different large subunit isoforms of *Arabidopsis thaliana* ADP-glucose pyrophosphorylase confer distinct kinetic and regulatory properties to the heterotetrameric enzyme. *J Biol Chem.* 2003 Aug 1;278(31):28508–15.
  173. Ballicora MA, Dubay JR, Devillers CH, Preiss J. Resurrecting the ancestral enzymatic role of a modulatory subunit. *J Biol Chem.* 2005 Mar 18;280(11):10189–95.

174. Kuhn ML, Falaschetti CA, Ballicora MA. *Ostreococcus tauri* ADP-glucose pyrophosphorylase reveals alternative paths for the evolution of subunit roles. *J Biol Chem* [Internet]. 2009;284(49):34092–102. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M109.037614>
175. Ferrero DML, Asencion Diez MD, Kuhn ML, Falaschetti CA, Piattoni C V, Iglesias AA, et al. On the roles of wheat endosperm ADP-glucose pyrophosphorylase subunits. *Front Plant Sci*. 2018;9(1498):1–7.
176. Smith-White BJ, Preiss J. Comparison of proteins of ADP-glucose pyrophosphorylase from diverse sources. *J Mol Evol* [Internet]. 1992 [cited 2022 Jul 28];34(5):449–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1318389/>
177. Georgelis N, Braun EL, Hannah LC. Duplications and functional divergence of ADP-glucose pyrophosphorylase genes in plants. *BMC Evol Biol*. 2008;8(232):1–17.
178. Baris I, Tuncel A, Ozber N, Keskin O, Kavakli IH. Investigation of the interaction between the large and small subunits of potato ADP-glucose pyrophosphorylase. *PLOS Comput Biol* [Internet]. 2009 [cited 2023 Feb 7];5(10):e1000546. Available from: <https://journals.plos.org/ploscompbiol/article?id=10.1371/journal.pcbi.1000546>
179. Boehlein SK, Shaw JR, Stewart JD, Hannah LC. Characterization of an autonomously activated plant ADP-glucose pyrophosphorylase. *Plant Physiol* [Internet]. 2009 [cited 2023 Feb 7];149(1):318–26. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18715954/>
180. Bejar CM, Ballicora MA, Gómez-Casati DF, Iglesias AA, Preiss J. The ADP-glucose pyrophosphorylase from *Escherichia coli* comprises two tightly bound distinct domains. *FEBS Lett* [Internet]. 2004 Aug 27 [cited 2023 Feb 7];573(1–3):99–104. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15327982/>
181. Bejar CM, Ballicora MA, Iglesias AA, Preiss J. ADP-glucose pyrophosphorylase's N-terminus: structural role in allosteric regulation. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2006 Apr 28 [cited 2023 Feb 7];343(1):216–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16530732/>
182. Boehlein SK, Sewell AK, Cross J, Stewart JD, Hannah LC. Purification and characterization of adenosine diphosphate glucose pyrophosphorylase from maize/potato mosaics. *Plant Physiol* [Internet]. 2005 [cited 2023 Feb 7];138(3):1552–62. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15951484/>
183. Figueroa CM, Esper MC, Bertolo A, Demonte AM, Aleanzi M, Iglesias AA, et al. Understanding the allosteric trigger for the fructose-1,6-bisphosphate regulation of the ADP-glucose pyrophosphorylase from *Escherichia coli*. *Biochimie* [Internet]. 2011 Oct [cited 2019 Apr 10];93(10):1816–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21741429>
184. Martin W, Herrmann RG. Gene transfer from organelles to the nucleus: how much, what happens, and why? *Plant Physiol* [Internet]. 1998 [cited 2023 Feb 15];118(1):9–17. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9733521/>
185. Martin W, Stoebe B, Goremykin V, Hansmann S, Hasegawa M, Kowallik K V. Gene transfer to the nucleus and the evolution of chloroplasts. *Nature* [Internet]. 1998 May 14 [cited 2023 Feb 15];393(6681):162–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11560168/>
186. Smith-White BJ, Preiss J. Comparison of proteins of ADP-glucose pyrophosphorylase from diverse sources. *J Mol Evol* [Internet]. 1992 [cited 2023 Feb 14];34(5):449–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1318389/>
187. Zhu GR, Yan X, Zhu D, Deng X, Wu JS, Xia J, et al. Lysine acetylproteome profiling under water deficit reveals key acetylated proteins involved in wheat grain development and starch biosynthesis. *J Proteomics*. 2018 Aug 15;185:8–24.

188. Nakagami H, Sugiyama N, Mochida K, Daudi A, Yoshida Y, Toyoda T, et al. Large-scale comparative phosphoproteomics identifies conserved phosphorylation sites in plants. *Plant Physiol* [Internet]. 2010 Jul 1 [cited 2023 Feb 16];153(3):1161–74. Available from: <https://academic.oup.com/plphys/article/153/3/1161/6109457>
189. Rose CM, Venkateswaran M, Volkening JD, Grimsrud PA, Maeda J, Bailey DJ, et al. Rapid phosphoproteomic and transcriptomic changes in the rhizobia-legume symbiosis. *Mol Cell Proteomics* [Internet]. 2012 Sep [cited 2023 Feb 16];11(9):744. Available from: </pmc/articles/PMC3434772/>
190. Gómez Casati DF, Aon MA, Iglesias AA. Kinetic and structural analysis of the ultrasensitive behaviour of cyanobacterial adp-glucose pyrophosphorylase. *Biochem J*. 2000;350:139–47.
191. Wu MX, Preiss J. The N-terminal region is important for the allosteric activation and inhibition of the *Escherichia coli* ADP-glucose pyrophosphorylase. *Arch Biochem Biophys* [Internet]. 1998 Oct 1 [cited 2023 Feb 14];358(1):182–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9750179/>
192. Wu M-X, Preiss J. Truncated forms of the recombinant *Escherichia coli* ADP-glucose pyrophosphorylase: the importance of the N-terminal region for allosteric activation and inhibition. *Arch Biochem Biophys* [Internet]. 2001 May 15 [cited 2023 Feb 14];389(2):159–65. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003986101923276>
193. Roach PJ. Glycogen and its Metabolism. *Curr Mol Med*. 2002;2(2):101–20.
194. Drula E, Garron M-L, Dogan S, Lombard V, Henrissat B, Terrapon N. The carbohydrate-active enzyme database: functions and literature. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2021;50:571–7. Available from: <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1045>
195. Busi M V, Palopoli N, Valdez HA, Fornasari MS, Wayllace NZ, Gomez-Casati DF, et al. Functional and structural characterization of the catalytic domain of the starch synthase III from *Arabidopsis thaliana*. *Proteins* [Internet]. 2008;70:31–40. Available from: <http://bioserv.cbs>.
196. Cifuentes JO, Comino N, Trastoy B, D'Angelo C, Guerin ME. Structural basis of glycogen metabolism in bacteria. *Biochem J*. 2019 Jul 31;476(14):2059–92.
197. Villar-Palasi C, Guinovart JJ. The role of glucose 6-phosphate in the control of glycogen synthase. *FASEB J*. 1997 Jun 1;11(7):544–58.
198. Lairson LL, Henrissat B, Davies GJ, Withers SG. Glycosyltransferases: Structures, Functions, and Mechanisms. *Annu Rev Biochem* [Internet]. 2008;77:521–55. Available from: [www.annualreviews.org](http://www.annualreviews.org)
199. Albasa-Jové D, Giganti D, Jackson M, Alzari PM, Guerin ME. Structure-function relationships of membrane-associated GT-B glycosyltransferases. *Glycobiology* [Internet]. 2014;24(2):108–24. Available from: [www.cazy.org](http://www.cazy.org)
200. Rossmann MG, Moras D, Olsen KW. Chemical and biological evolution of a nucleotide-binding protein. *Nature*. 1974;250:194–9.
201. Giganti D, Albasa-jové D, Urresti S, Rodrigo-Unzueta A, Martínez MA, Comino N, et al. Secondary structure reshuffling modulates glycosyltransferase function at the membrane. *Nat Chem Biol*. 2015;11:16–8.
202. Guerin ME, Kordulakova J, Schaeffer F, Svetlikova Z, Buschiazzi A, Giganti D, et al. Molecular recognition and interfacial catalysis by the essential phosphatidylinositol mannosyltransferase PimA from mycobacteria. *J Biol Chem*. 2007 Jul 13;282(28):20705–14.
203. Buschiazzi A, Ugalde JE, Guerin ME, Shepard W, Ugalde RA, Alzari PM. Crystal

- structure of glycogen synthase: homologous enzymes catalyze glycogen synthesis and degradation. *EMBO J* [Internet]. 2004 [cited 2022 Jun 6];23:3196–205. Available from: [www.embojournal.org](http://www.embojournal.org)
204. Sheng F, Jia X, Yep A, Preiss J, Geiger JH. The crystal structures of the open and catalytically competent closed conformation of *Escherichia coli* glycogen synthase. *J Biol Chem* [Internet]. 2009;284(26):17796–807. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M809804200>
  205. Breton C, Fournel-Gigleux S, Palcic MM. Recent structures, evolution and mechanisms of glycosyltransferases. *Curr Opin Struct Biol*. 2012 Oct;22(5):540–9.
  206. Horcajada C, Guinovart JJ, Fita I, Ferrer JC. Crystal structure of an archaeal glycogen synthase: Insights into oligomerization and substrate binding of eukaryotic glycogen synthases. *J Biol Chem* [Internet]. 2006;281(5):2923–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M507394200>
  207. Baskaran S, Roach PJ, Depaoli-Roach AA, Hurley TD. Structural basis for glucose-6-phosphate activation of glycogen synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2010;107(41):17563–8. Available from: [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1006340107](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1006340107)
  208. Baskaran S, Chikwana VM, Contreras CJ, Davis KD, Wilson WA, Depaoli-Roach AA, et al. Multiple glycogen-binding sites in eukaryotic glycogen synthase are required for high catalytic efficiency toward glycogen. *J Biol Chem* [Internet]. 2011;286(39):33999–4006. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M111.264531>
  209. Koch K. Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Curr Opin Plant Biol* [Internet]. 2004 Jun [cited 2020 Mar 27];7(3):235–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15134743>
  210. Lunn JE, MacRae E. New complexities in the synthesis of sucrose. Vol. 6, *Current Opinion in Plant Biology*. Elsevier Ltd; 2003. p. 208–14.
  211. Lunn JE. Sucrose metabolism. In: *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley. 2016. p. 1–9.
  212. Lastdrager J, Hanson J, Smeekens S. Sugar signals and the control of plant growth and development. *J Exp Bot* [Internet]. 2014;65(3):799–807. Available from: <https://academic.oup.com/jxb/article/65/3/799/525682>
  213. Mason MG, Ross JJ, Babst BA, Wienclaw BN, Beveridge CA. Sugar demand, not auxin, is the initial regulator of apical dominance. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2014;111(16):6092–7. Available from: [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1322045111](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1322045111)
  214. Curatti L, Folco E, Desplats P, Abratti G, Limones V, Herrera-Estrella L, et al. Sucrose-phosphate synthase from *Synechocystis* sp. strain PCC 6803: Identification of the spsA gene and characterization of the enzyme expressed in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* [Internet]. 1998 [cited 2022 May 4];180(24):6776–9. Available from: <https://journals.asm.org/journal/jb>
  215. Porchia AC, Salerno GL. Sucrose biosynthesis in a prokaryotic organism: Presence of two sucrose-phosphate synthases in *Anabaena* with remarkable differences compared with the plant enzymes. *Biochemistry*. 1996;93:13600–4.
  216. Porchia AC, Curatti L, Salerno GL. Sucrose metabolism in cyanobacteria: sucrose synthase from *Anabaena* sp. strain PCC 7119 is remarkably different from the plant enzymes with respect to substrate affinity and amino-terminal sequence. *Planta*. 1999;210:34–40.
  217. Cumino AC, Marcozzi C, Barreiro R, Salerno GL. Carbon Cycling in *Anabaena* sp. PCC 7120. Sucrose Synthesis in the Heterocysts and Possible Role in Nitrogen Fixation. *Plant*

- Physiol [Internet]. 2007;143:1385–97. Available from: [www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.106.091736](http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.106.091736)
218. Kolman MA, Nishi CN, Perez-Cenci M, Salerno GL. Sucrose in cyanobacteria: from a salt-response molecule to play a key role in nitrogen fixation. *Life* [Internet]. 2015;5:102–26. Available from: [www.mdpi.com/journal/life](http://www.mdpi.com/journal/life)
  219. Kolman MA, Torres LL, Martin ML, Salerno GL. Sucrose synthase in unicellular cyanobacteria and its relationship with salt and hypoxic stress. *Planta* [Internet]. 2012;235:955–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
  220. Kolman MA, Salerno GL. Sucrose in bloom-forming cyanobacteria: loss and gain of genes involved in its biosynthesis. *Environ Microbiol*. 2016;18:439–49.
  221. MacRae E, Lunn JE. Photosynthetic sucrose biosynthesis: an evolutionary perspective. In: Eaton-Rye J., Tripathy B. ST (eds) P, editor. *Advances in Photosynthesis and Respiration* [Internet]. Vol. 34. Springer, Dordrecht; 2012. p. 675–702. Available from: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-007-1579-0\\_27](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-007-1579-0_27)
  222. Winter H, Huber SC. Regulation of sucrose metabolism in higher plants: localization and regulation of activity of key enzymes. *CRC Crit Rev Plant Sci*. 2000;19(1):31–67.
  223. Huber SC, Huber JL. Role and regulation of sucrose-phosphate synthase in higher plants [Internet]. Vol. 47, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol*. 1996. Available from: [www.annualreviews.org](http://www.annualreviews.org)
  224. Salerno GL, Pagnussat GC, Pontis HG. Studies on sucrose-phosphate synthase from rice leaves. *Cell Mol Biol* [Internet]. 1998 May 1 [cited 2022 Aug 3];44(3):407–16. Available from: <https://europepmc.org/article/med/9620436>
  225. Pagnussat GC, Curatti L, Salerno GL. Rice sucrose-phosphate synthase: Identification of an isoform specific for heterotrophic tissues with distinct metabolite regulation from the mature leaf enzyme. *Physiol Plant*. 2000;108:337–44.
  226. Lunn JE, Ap Rees T. Purification and properties of sucrose-phosphate synthase from seeds of *Pisum sativum*. *Phytochemistry*. 1990;29(4):1057–63.
  227. Figueroa CM, Asención Diez MD, Kuhn ML, McEwen S, Salerno GL, Iglesias AA, et al. The unique nucleotide specificity of the sucrose synthase from *Thermosynechococcus elongatus*. *FEBS Lett* [Internet]. 2013 Jan 16 [cited 2020 Apr 7];587(2):165–9. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1016/j.febslet.2012.11.011>
  228. Wu R, Asención Diez MD, Figueroa CM, Machtay M, Iglesias AA, Ballicora MA, et al. The crystal structure of *Nitrosomonas europaea* sucrose synthase reveals critical conformational changes and insights into sucrose metabolism in prokaryotes. *J Bacteriol*. 2015;197(17):2734–46.
  229. Cumino A, Curatti L, Giarrocco L, Salerno GL. Sucrose metabolism: Anabaena sucrose-phosphate synthase and sucrose-phosphate phosphatase define minimal functional domains shuffled during evolution. *FEBS Lett*. 2002 Apr 24;517(1–3):19–23.
  230. Kolman MA, Torres LL, Martin ML, Salerno GL. Sucrose synthase in unicellular cyanobacteria and its relationship with salt and hypoxic stress. *Planta* [Internet]. 2011 [cited 2021 Apr 22];235:955–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
  231. But SY, Khmelenina VN, Reshetnikov AS, Trotsenko YA. Bifunctional sucrose phosphate synthase/phosphatase is involved in the sucrose biosynthesis by *Methylobacillus flagellatus* KT. *FEMS Microbiol Lett*. 2013;347(1):43–51.
  232. Lunn JE, Ashton AR, Hatch MD, Heldt HW. Purification, molecular cloning, and sequence analysis of sucrose-6(F)-phosphate phosphohydrolase from plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2000 Nov 7 [cited 2020 Mar 27];97(23):12914–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11050182>

233. Lunn JE. Evolution of sucrose synthesis. *Plant Physiol* [Internet]. 2002 Apr [cited 2020 Mar 27];128(4):1490–500. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11950997>
234. Fieulaine S, Lunn JE, Borel F, Ferrer J-L. The Structure of a Cyanobacterial Sucrose-Phosphatase Reveals the Sugar Tongs That Release Free Sucrose in the Cell. *Plant Cell* [Internet]. 2005;17:2049–58. Available from: [www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.105.031229](http://www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.105.031229).
235. Cumino A, Ekeroth C, Salerno GL. Sucrose-phosphate phosphatase from *Anabaena* sp. strain PCC 7120: isolation of the protein and gene revealed significant structural differences from the higher-plant enzyme. *Planta* [Internet]. 2001;214:250–6. Available from: [www.kazusa.or.jp/cyano/](http://www.kazusa.or.jp/cyano/)
236. Langenkämper G, Fung RWM, Newcomb RD, Atkinson RG, Gardner RC, MacRae EA. Sucrose phosphate synthase genes in plants belong to three different families. *J Mol Evol*. 2002;54:322–32.
237. Lunn JE. Sucrose-phosphatase gene families in plants. *Gene*. 2003 Jan 16;303:187–96.
238. Castleden CK, Aoki N, Gillespie VJ, MacRae EA, Quick WP, Buchner P, et al. Evolution and function of the sucrose-phosphate synthase gene families in wheat and other grasses. *Plant Physiol* [Internet]. 2004 [cited 2020 Mar 18];135:1753–64. Available from: [www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.104.042457](http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.104.042457).
239. Reed RH, Richardson DL, Warr SRC, Stewart WDP. Carbohydrate accumulation and osmotic stress in cyanobacteria. *J Gen Microbiol*. 1984;130(1):1–4.
240. Page-Sharp M, Behm CA, Smith GD. Involvement of the compatible solutes trehalose and sucrose in the response to salt stress of a cyanobacterial *Scytonema* species isolated from desert soils. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj*. 1999 Nov 16;1472(3):519–28.
241. Khmelenina VN, Kalyuzhnaya MG, Sakharovsky VG, Suzina NE, Trotsenko YA, Gottschalk G. Osmoadaptation in halophilic and alkaliphilic methanotrophs. *Arch Microbiol* [Internet]. 1999 [cited 2021 Apr 22];172(5):321–9. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s002030050786>
242. Khmelenina VN, Sakharovskii VG, Reshetnikov AS, Trotsenko IA. Synthesis of osmoprotectors by halophilic and alkaliphilic methanotrophs. *Mikrobiologiya*. 2000;69(4):465–70.
243. But SY, Khmelenina VN, Reshetnikov AS, Mustakhimov II, Kalyuzhnaya MG, Trotsenko YA. Sucrose metabolism in halotolerant methanotroph *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z. *Arch Microbiol*. 2015;197:471–80.
244. D'Avó AF, Cunha S, Mingote A, Lamosa P, da Costa MS, Costa J. A unique pool of compatible solutes on *Rhodospirellula baltica*, member of the deep-branching phylum Planctomycetes. *PLoS One*. 2013;8(e68289):1–8.
245. Huynh F, Tan T-C, Swaminathan K, Patel BKC. Expression, purification and preliminary crystallographic analysis of sucrose phosphate synthase (SPS) from *Halothermothrix orenii*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Commun*. 2005;61:116–7.
246. Khiang Chua T, Bujnicki JM, Tan T-C, Huynh F, Patel BK, Sivaraman J. The Structure of Sucrose Phosphate Synthase from *Halothermothrix orenii* Reveals Its Mechanism of Action and Binding Mode. *Plant Cell* [Internet]. 2008;20:1059–72. Available from: [www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.107.051193](http://www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.107.051193)
247. Mijts BN, Patel BKC. Random sequence analysis of genomic DNA of an anaerobic, thermophilic, halophilic bacterium, *Halothermothrix orenii*. *Extremophiles* [Internet]. 2001;5:61–9. Available from: [www.mbio.ncsu.edu/RNaseP/info/programs/BIOEDIT/](http://www.mbio.ncsu.edu/RNaseP/info/programs/BIOEDIT/)
248. Reed RH, Stewart WDP. Osmotic adjustment and organic solute accumulation in

- unicellular cyanobacteria from freshwater and marine habitats. *Mar Biol* [Internet]. 1985 Aug [cited 2021 Apr 22];88(1):1–9. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00393037>
249. Reed RH, Borowitzka LJ, Mackay MA, Chudek JA, Foster R, Warr SRC, et al. Organic solute accumulation in osmotically stressed cyanobacteria. *FEMS Microbiol Rev* [Internet]. 1986 [cited 2021 Apr 22];2(1–2):51–6. Available from: <https://academic.oup.com/femsre/article/2/1-2/51/535966>
  250. Klähn S, Hagemann M. Compatible solute biosynthesis in cyanobacteria. *Environ Microbiol*. 2011;13(3):551–62.
  251. Billi D, Wright DJ, Helm RF, Prickett T, Potts M, Crowe JH. Engineering desiccation tolerance in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2000 Apr [cited 2022 Aug 3];66(4):1680–4. Available from: <https://journals.asm.org/journal/aem>
  252. Hagemann M, Marin K. Salt-induced sucrose accumulation is mediated by sucrose-phosphate-synthase in Cyanobacteria. *J Plant Physiol* [Internet]. 1999 [cited 2021 Apr 22];155(3):424–30. Available from: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0176161799801266?token=28882D6775D83282FEE3CF10C20A016D5B96182C8ADC78937DBB8676E6F98F4BC43D5E82DA0C33D2FA2EC049AD4117BA&originRegion=us-east-1&originCreation=20210422135445>
  253. Marcozzi C, Cumino AC, Salerno GL. Role of NtcA, a cyanobacterial global nitrogen regulator, in the regulation of sucrose metabolism gene expression in *Anabaena* sp. PCC 7120. *Arch Microbiol*. 2009;191:255–63.
  254. Curatti L, Giarrocco LE, Cumino AC, Salerno GL. Sucrose synthase is involved in the conversion of sucrose to polysaccharides in filamentous nitrogen-fixing cyanobacteria. *Planta*. 2008;228(4):617–25.
  255. Vargas WA, Nishi CN, Giarrocco LE, Salerno GL. Differential roles of alkaline/neutral invertases in *Nostoc* sp. PCC 7120: Inv-B isoform is essential for diazotrophic growth. *Planta*. 2011;233:153–62.
  256. Desplats P, Folco E, Salerno GL. Sucrose may play an additional role to that of an osmolyte in *Synechocystis* sp. PCC 6803 salt-shocked cells. *Plant Physiol Biochem*. 2005 Feb 1;43(2):133–8.
  257. Kleczkowski LA, Geisler M, Fitzek E, Wilczynska M. A common structural blueprint for plant UDP-sugar-producing pyrophosphorylases. *Biochem J* [Internet]. 2011 Nov 1 [cited 2023 Feb 28];439(3):375–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21992098/>
  258. Whitton BA, Potts M. *The Ecology of Cyanobacteria: their diversity in time and space*. New York: Springer Dordrecht; 2002. 669 p.
  259. Fischer WW, Hemp J, Johnson JE. Evolution of Oxygenic Photosynthesis. *Annu Rev Earth Planet Sci* [Internet]. 2016 Jun 29 [cited 2019 Nov 28];44(1):647–83. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-earth-060313-054810>
  260. Rippka R, Deruelles J, Waterbury JB, Herdman M, Stanier RY. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J Gen Microbiol*. 1979;111:1–61.
  261. Komárek J, Kaštovský J, Mareš J, Johansen JR. Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. *Preslia*. 2014;86(4):295–335.
  262. Shih PM, Wu D, Latifi A, Axen SD, Fewer DP, Talla E, et al. Improving the coverage of the cyanobacterial phylum using diversity-driven genome sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Jan 15;110(3):1053–8.
  263. Díez B, Ininbergs K. Ecological importance of cyanobacteria. In: Sharma NK, Rai AK,

- Stal LJ, editors. Cyanobacteria: An Economic Perspective [Internet]. First. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Ltd; 2014 [cited 2022 Aug 4]. p. 43–63. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/9781118402238.ch3>
264. Sogin ML, Morrison HG, Huber JA, Welch DM, Huse SM, Neal PR, et al. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere.” *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Aug 8;103(32):12115–20.
265. Di Rienzi SC, Sharon I, Wrighton KC, Koren O, Hug LA, Thomas BC, et al. The human gut and groundwater harbor non-photosynthetic bacteria belonging to a new candidate phylum sibling to Cyanobacteria. *Elife*. 2013;2:e01102.
266. Soo RM, Skennerton CT, Sekiguchi Y, Imelfort M, Paech SJ, Dennis PG, et al. An expanded genomic representation of the phylum Cyanobacteria. *Genome Biol Evol* [Internet]. 2014 May [cited 2019 Apr 10];6(5):1031–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24709563>
267. Anantharaman K, Brown CT, Hug LA, Sharon I, Castelle CJ, Probst AJ, et al. Thousands of microbial genomes shed light on interconnected biogeochemical processes in an aquifer system. *Nat Commun* [Internet]. 2016 Dec 24 [cited 2019 Jan 28];7(1):13219. Available from: <http://www.nature.com/articles/ncomms13219>
268. Utami YD, Kuwahara H, Murakami T, Morikawa T, Sugaya K, Kihara K, et al. Phylogenetic Diversity and Single-Cell Genome Analysis of “*Melainabacteria*”, a Non-Photosynthetic Cyanobacterial Group, in the Termite Gut. *Microbes Environ*. 2018;33(1):50–7.
269. Monchamp M-E, Spaak P, Pomati F. Long term diversity and distribution of non-photosynthetic Cyanobacteria in peri-alpine lakes. *Front Microbiol* [Internet]. 2019 [cited 2019 Jan 29];9(3344):1–11. Available from: [www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org)
270. Soo RM, Hemp J, Parks DH, Fischer WW, Hugenholtz P. On the origins of oxygenic photosynthesis and aerobic respiration in Cyanobacteria [Internet]. Vol. 355, *Science*. American Association for the Advancement of Science; 2017 Mar [cited 2021 Apr 14]. Available from: <http://science.sciencemag.org/>
271. Garcia-Pichel F, Zehr JP, Bhattacharya D, Pakrasi HB. What’s in a name? The case of cyanobacteria. *J Phycol* [Internet]. 2020;56:1–5. Available from: <https://github.com/>
272. Shih PM, Hemp J, Ward LM, Matzke NJ, Fischer WW. Crown group Oxyphotobacteria postdate the rise of oxygen. *Geobiology*. 2016;1–11.
273. Salmaso N, Albanese D, Capelli C, Boscaini A, Pindo M, Donati C. Diversity and cyclical seasonal transitions in the bacterial community in a large and deep perialpine lake. *Microb Ecol*. 2018 Jul 1;76(1):125–43.
274. Ley RE, Bäckhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Aug 2;102(31):11070–5.
275. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* [Internet]. 1970 [cited 2019 Jan 28];227:680–5. Available from: <https://www.nature.com/articles/227680a0>
276. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* [Internet]. 1976 [cited 2019 Jan 28];72:248–54. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003269776905273>
277. Fusari C, Demonte A, Figueroa C, Aleanzi M, Iglesias A. A colorimetric method for the assay of ADP-glucose pyrophosphorylase. *Anal Biochem* [Internet]. 2006 [cited 2019 Jan 28];352:145–7. Available from: [http://www.academia.edu/download/42336287/A\\_colorimetric\\_method\\_for\\_the\\_assay\\_o](http://www.academia.edu/download/42336287/A_colorimetric_method_for_the_assay_o)

- f\_A20160207-21893-1owj5od.pdf
278. Wayllace NZ, Valdez HA, Merás A, Ugalde RA, Busi M V., Gomez-Casati DF. An enzyme-coupled continuous spectrophotometric assay for glycogen synthases. *Mol Biol Rep.* 2012;39(1):8585–91.
  279. Hill AV. The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves. *J Physiol [Internet]*. 1910 [cited 2022 Feb 11];40:4–6. Available from: <https://ci.nii.ac.jp/naid/10008305829>
  280. Gouy M, Tannier E, Comte N, Parsons DP. Seaview Version 5: A Multiplatform Software for Multiple Sequence Alignment, Molecular Phylogenetic Analyses, and Tree Reconciliation. *Methods Mol Biol [Internet]*. 2021 [cited 2021 Dec 6];2231:241–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33289897/>
  281. Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nat* 2021 5967873 [Internet]. 2021 Jul 15 [cited 2022 Mar 21];596(7873):583–9. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41586-021-03819-2>
  282. Eisenberg D, Lüthy R, Bowie JU. VERIFY3D: assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Methods Enzymol [Internet]*. 1997 [cited 2022 Mar 21];277:396–404. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9379925/>
  283. Iglesias AA, Preiss J. Bacterial glycogen and plant starch biosynthesis. *Biochem Educ.* 1992;20(4):196–203.
  284. Uttaro AD, Ugalde RA, Preiss J, Iglesias AA. Cloning and expression of the *glgC* gene from *Agrobacterium tumefaciens*: purification and characterization of the ADP-glucose synthetase. *Arch Biochem Biophys.* 1998;357(1):13–21.
  285. Igarashi RY, Meyer CR. Cloning and Sequencing of Glycogen Metabolism Genes from *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. Expression and Characterization of Recombinant ADP-Glucose Pyrophosphorylase. *Arch Biochem Biophys.* 2000;376(1):47–58.
  286. Preiss J. Bacterial glycogen inclusions: enzymology and regulation of synthesis. In: *Inclusions in Prokaryotes*. Springer; 2006. p. 71–108.
  287. Gómez-Casati DF, Igarashi RY, Berger CN, Brandt ME, Iglesias AA, Meyer CR. Identification of functionally important amino-terminal Arginines of *Agrobacterium tumefaciens* ADP-glucose pyrophosphorylase by alanine scanning mutagenesis. *Biochemistry.* 2001 Aug 28;40(34):10169–78.
  288. Ballicora M, Erben E, Yazaki T, ... AB. Identification of regions critically affecting kinetics and allosteric regulation of the *Escherichia coli* ADP-glucose pyrophosphorylase by modeling and pentapeptide-scanning mutagenesis. *J Bacteriol [Internet]*. 2007 [cited 2019 Jan 28];189:5325–33. Available from: <http://jlb.asm.org/content/189/14/5325.short>
  289. Machtey M, Kuhn ML, Flasch DA, Aleanzi M, Ballicora MA, Iglesias AA. Insights into glycogen metabolism in chemolithoautotrophic bacteria from distinctive kinetic and regulatory properties of ADP-glucose pyrophosphorylase from *Nitrosomonas europaea*. *J Bacteriol [Internet]*. 2012 Nov 15 [cited 2020 Mar 23];194(22):6056–65. Available from: <http://jlb.asm.org/cgi/doi/10.1128/JB.00810-12>
  290. Kakefuda G, Charnng YY, Iglesias AA, McIntosh L, Preiss J. Molecular cloning and sequencing of ADP-glucose pyrophosphorylase from *Synechocystis* PCC 6803. *Plant Physiol.* 1992;99(1):359–61.
  291. Gomez Casati DF, Aon MA, Iglesias AA. Molecular Crowding and Cytoskeletal Proteins Affect the Allosteric Regulatory Properties of ADP Glucose Pyrophosphorylase. *Photosynth Mech Eff [Internet]*. 1998 [cited 2022 Feb 24];3695–8. Available from: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-011-3953-3\\_861](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-011-3953-3_861)

292. Gómez Casati DF, Aon MA, Iglesias AA. Ultrasensitive glycogen synthesis in Cyanobacteria. *FEBS Lett* [Internet]. 1999 Mar 5 [cited 2019 Aug 22];446(1):117–21. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1016/S0014-5793%2899%2900201-X>
293. Minton AP. The effect of volume occupancy upon the thermodynamic activity of proteins: some biochemical consequences. *Mol Cell Biochem* [Internet]. 1983 Sep [cited 2022 Feb 24];55(2):119–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6633513/>
294. Minton AP. Molecular crowding: Analysis of effects of high concentrations of inert cosolutes on biochemical equilibria and rates in terms of volume exclusion. *Methods Enzymol*. 1998 Jan 1;295:127–49.
295. Blankenship RE. How Cyanobacteria went green. *Science*. 2017.
296. Ebrecht AC, Solamen L, Hill BL, Iglesias AA, Olsen KW, Ballicora MA. Allosteric Control of Substrate Specificity of the *Escherichia coli* ADP-Glucose Pyrophosphorylase. *Front Chem*. 2017;5:1–11.
297. Senior AW, Evans R, Jumper J, Kirkpatrick J, Sifre L, Green T, et al. Improved protein structure prediction using potentials from deep learning. *Nature* [Internet]. 2020 Jan 15 [cited 2022 Mar 21];577(7792):706–10. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41586-019-1923-7>
298. Lee YMOO, Mukherjee S, Preiss J. Covalent modification of *Escherichia coli* ADPglucose synthetase with 8-azido substrate analogs. *Arch Biochem Biophys*. 1986;244(2):585–95.
299. Parsons TF, Preiss J. Biosynthesis of bacterial glycogen. Isolation and characterization of the pyridoxal-P allosteric activator site and the ADP-glucose-protected pyridoxal-P binding site of *Escherichia coli* B ADP-glucose synthase. *J Biol Chem*. 1978 Nov 10;253(21):7638–45.
300. Gardiol A, Preiss J. *Escherichia coli* E-39 ADP-glucose synthetase has different activation kinetics from the wild-type allosteric enzyme. *Arch Biochem Biophys* [Internet]. 1990 [cited 2022 Mar 28];280(1):175–80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2162151/>
301. Preiss J. ADP-glucose pyrophosphorylase: basic science and applications in biotechnology. *Biotechnol Annu Rev*. 1996;2:259–79.
302. Morell M, Bloom M, Preiss J. Affinity labeling of the allosteric activator site(s) of spinach leaf ADP-glucose pyrophosphorylase. *J Biol Chem*. 1988 Jan 15;263(2):633–7.
303. Ball K, Preiss J. Allosteric Sites of the Large Subunit of the Spinach Leaf ADPglucose Pyrophosphorylase. *J Biol Chem*. 1994;269(40):24706–11.
304. Charng YY, Iglesias AA, Preiss J. Structure-function relationships of cyanobacterial ADP-glucose pyrophosphorylase. Site-directed mutagenesis and chemical modification of the activator-binding sites of ADP-glucose pyrophosphorylase from *Anabaena* PCC 7120. *J Biol Chem* [Internet]. 1994 Sep 30 [cited 2019 Apr 10];269(39):24107–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7929064>
305. Sheng J, Charng Y, Preiss J. Site-directed mutagenesis of lysine382, the activator-binding site, of ADP-glucose pyrophosphorylase from *Anabaena* PCC 7120. *Biochemistry* [Internet]. 1996 Mar 5 [cited 2022 Mar 28];35(9):3115–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8608152/>
306. Sheng J, Preiss J. Arginine294 is essential for the inhibition of *Anabaena* PCC 7120 ADP-glucose pyrophosphorylase by phosphate. *Biochemistry* [Internet]. 1997 Oct 21 [cited 2022 Mar 28];36(42):13077–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9335570/>
307. Rossman MG, Liljas A, Brändén CI, Banaszak LJ. Evolutionary and structural

- relationships among dehydrogenases. In: *The Enzymes*. Academic Press; 1975. p. 61–102.
308. Raetz CRH, Roderick SL. A left-handed parallel  $\beta$  helix in the structure of UDP-*N*-acetylglucosamine acyltransferase. *Science* (80- ). 1995;270(5238):997–1000.
  309. Kisker C, Schindelin H, Alber BE, Ferry JG, Rees DC. A left-handed  $\beta$ -helix revealed by the crystal structure of a carbonic anhydrase from the archaeon *Methanosarcina thermophila*. *EMBO J*. 1996;15(10):2323–30.
  310. Beaman TW, Binder DA, Blanchard JS, Roderick SL. Three-dimensional structure of tetrahydrodipicolinate *N*- succinyltransferase. *Biochemistry*. 1997;36(3):489–94.
  311. Kanamaru S, Leiman PG, Kostyuchenko VA, Chipman PR, Mesyanzhinov V V., Arisaka F, et al. Structure of the cell-puncturing device of bacteriophage T4. *Nature*. 2002;415:553–7.
  312. Demoulin CF, Lara YJ, Cornet L, François C, Baurain D, Wilmotte A, et al. Cyanobacteria evolution: Insight from the fossil record. Vol. 140, *Free Radical Biology and Medicine*. Elsevier Inc.; 2019. p. 206–23.
  313. Kadouche D, Ducatez M, Cenci U, Tirtiaux C, Suzuki E, Nakamura Y, et al. Characterization of function of the GlgA2 glycogen/starch synthase in *Cyanobacterium* sp. Clg1 highlights convergent evolution of glycogen metabolism into starch granule aggregation. *Plant Physiol* [Internet]. 2016;171:1879–92. Available from: [www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.16.00049](http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.16.00049)
  314. Palomo M, Pijning T, Booiman T, Dobruchowska JM, Van Der Vlist J, Kralj S, et al. *Thermus thermophilus* glycoside hydrolase family 57 branching enzyme: Crystal structure, mechanism of action, and products formed. *J Biol Chem*. 2011 Feb 4;286(5):3520–30.
  315. Suzuki E, Suzuki R. Distribution of glucan-branching enzymes among prokaryotes. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2016;73:2643–60. Available from: <http://www.cazy.org/>
  316. Zhang X, Leemhuis H, Van Der Maarel MJEC. Characterization of the GH13 and GH57 glycogen branching enzymes from *Petrotoga mobilis* SJ95 and potential role in glycogen biosynthesis. *PLoS One* [Internet]. 2019;14(7):e0219844. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219844>
  317. Colpaert M, Chabi M, Cenci U, Colleoni C. Storage Polysaccharides in Prokaryotes: Glycogen, Granulose, and Starch-Like Granules. In 2020. p. 177–210.
  318. Syson K, Stevenson CEM, Rejzek M, Fairhurst SA, Nair A, Bruton CJ, et al. Structure of *Streptomyces* maltosyltransferase GlgE, a homologue of a genetically validated anti-tuberculosis target. *J Biol Chem* [Internet]. 2011 [cited 2021 Apr 14];286(44):38298–310. Available from: <http://www.rcsb.org/>
  319. Kalscheuer R, Jacobs WR. The significance of GlgE as a new target for tuberculosis [Internet]. Vol. 23, *Drug News and Perspectives*. *Drug News Perspect*; 2010 [cited 2021 Apr 14]. p. 619–24. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21180647/>
  320. Spaink HP, Kondorosi A, Hooykaas PJJ. The Rhizobiaceae. *Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria* [Internet]. 1st ed. Springer Dordrecht; 1998 [cited 2022 Aug 16]. 566 p. Available from: [https://books.google.com/books/about/The\\_Rhizobiaceae.html?hl=es&id=JcTwAAAAAAAJ](https://books.google.com/books/about/The_Rhizobiaceae.html?hl=es&id=JcTwAAAAAAAJ)
  321. Fisher RF, Long SR. Rhizobium--plant signal exchange. *Nature* [Internet]. 1992 [cited 2022 Aug 16];357(6380):655–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1614514/>
  322. Shah V, Subramaniam S. *Bradyrhizobium japonicum* USDA110: A representative model organism for studying the impact of pollutants on soil microbiota. *Sci Total Environ*. 2018

- May 15;624:963–7.
323. Tan Z, Hurek T, Vinuesa P, Müller P, Ladha JK, Reinhold-Hurek B. Specific detection of *Bradyrhizobium* and *Rhizobium* strains colonizing rice (*Oryza sativa*) roots by 16S-23S ribosomal DNA intergenic spacer-targeted PCR. *Appl Environ Microbiol*. 2001 Aug;67(8):3655–64.
  324. Vinuesa P, Rademaker JLW, de Bruijn FJ, Werner D. Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulating endemic woody legumes of the Canary Islands by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of genes encoding 16S rRNA (16S rDNA) and 16S-23S rDNA intergenic spacers, repeti. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 1998 Jun [cited 2022 Aug 29];64(6):2096–104. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.64.6.2096-2104.1998>
  325. Ormeño-Orrillo E, Rogel-Hernández MA, Lloret L, López-López A, Martínez J, Barois I, et al. Change in land use alters the diversity and composition of *Bradyrhizobium* communities and led to the introduction of *Rhizobium etli* into the tropical rain forest of Los Tuxtlas (Mexico). *Microb Ecol* [Internet]. 2012 May 23 [cited 2022 Aug 29];63(4):822–34. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00248-011-9974-9>
  326. Florentino LA, de Sousa PM, Silva JS, Silva KB, Moreira FM de S. Diversity and efficiency of *Bradyrhizobium* strains isolated from soil samples collected from around *Sesbania virgata* roots using cowpea as trap species. *Rev Bras Cienc do Solo*. 2010;34(4):1113–23.
  327. VanInsberghe D, Maas KR, Cardenas E, Strachan CR, Hallam SJ, Mohn WW. Non-symbiotic *Bradyrhizobium* ecotypes dominate North American forest soils. *ISME J* [Internet]. 2015 Apr 24 [cited 2022 Aug 29];9(11):2435–41. Available from: <https://www.nature.com/articles/ismej201554>
  328. Mathis JN, McMillin DE, Champion RA, Hunt PG. Genetic variation in two cultures of *Bradyrhizobium japonicum* 110 differing in their ability to impart drought tolerance to soybean. *Curr Microbiol*. 1997;35:363–6.
  329. Kaneko T, Nakamura Y, Sato S, Minamisawa K, Uchiumi T, Sasamoto S, et al. Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *DNA Res* [Internet]. 2002;9:189–97. Available from: <https://academic.oup.com/dnaresearch/article/9/6/189/424837>
  330. Gevers D, Vandepoele K, Simillion C, Van De Peer Y. Gene duplication and biased functional retention of paralogs in bacterial genomes. *Trends Microbiol*. 2004;12(4):148–54.
  331. Cappelletti M, Zampolli J, Di Gennaro P, Zannoni D. Genomics of *Rhodococcus*. In: Alvarez H, editor. *Biology of Rhodococcus*. 2nd ed. Springer; 2019. p. 23–60.
  332. Peracchi A. The limits of enzyme specificity and the evolution of metabolism. *Trends Biochem Sci*. 2018;43(12):984–96.
  333. Rosenberg J, Commichau FM. Harnessing underground metabolism for pathway development. *Trends Biotechnol*. 2019 Jan 1;37(1):29–37.
  334. Álvarez-Lugo A, Becerra A. The role of gene duplication in the divergence of enzyme function: a comparative approach. *Front Genet* [Internet]. 2021;12(641817):1–16. Available from: [www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org)
  335. Cereijo AE, Ferretti M V, Iglesias AA, Álvarez HM, Asencion Diez MD. Comparative analysis between two GT4 glycosyltransferases related to polysaccharide biosynthesis in *Rhodococcus jostii* RHA1. *bioRxiv* [Internet]. 2023;1–43. Available from: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2023.02.13.525685v1%0Ahttps://www.biorxiv.org/content/10.1101/2023.02.13.525685v1.abstract>

336. Tetlow IJ, Beisel KG, Cameron S, Makhmoudova A, Liu F, Bresolin NS, et al. Analysis of protein complexes in wheat amyloplasts reveals functional interactions among starch biosynthetic enzymes. *Plant Physiol*. 2008;146(4):1878–91.
337. Momma M, Fujimoto Z. Interdomain disulfide bridge in the rice granule bound starch synthase I catalytic domain as elucidated by X-ray structure analysis. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2012;76(8):1591–5.
338. Cuesta-Seijo JA, Nielsen MM, Marri L, Tanaka H, Beeren SR, Palcic MM. Structure of starch synthase I from barley: insight into regulatory mechanisms of starch synthase activity. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr*. 2013;69(6):1013–25.
339. Lombard V, Golaconda Ramulu H, Drula E, Coutinho PM, Henrissat B. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res [Internet]*. 2014;42:490–5. Available from: <http://www.cazy.org>
340. Yep A, Ballicora MA, Preiss J. The active site of the *Escherichia coli* glycogen synthase is similar to the active site of retaining GT-B glycosyltransferases. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;316(3):960–6.
341. Ozbun JL, Hawker JS, Preiss J. Soluble adenosine diphosphate glucose- $\alpha$ -1,4-glucan  $\alpha$ -4-glucosyltransferases from spinach leaves. *Biochem J*. 1972;126:953–63.
342. Edwards A, Borthakur A, Bornemann S, Venail J, Denyer K, Waite D, et al. Specificity of starch synthase isoforms from potato. *Eur J Biochem*. 1999;266(3):724–36.
343. Martín M, Wayllace NZ, Valdez HA, Gomez-Casati DF, Busi M V. Improving the glycosyltransferase activity of *Agrobacterium tumefaciens* glycogen synthase by fusion of N-terminal starch binding domains (SBDs). *Biochimie [Internet]*. 2013;95(10):1865–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2013.06.009>
344. Nakamura Y, Aihara S, Crofts N, Sawada T, Fujita N. *In vitro* studies of enzymatic properties of starch synthases and interactions between starch synthase I and starch branching enzymes from rice. *Plant Sci [Internet]*. 2014;224:1–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.03.021>
345. Minen RI, Martinez MP, Iglesias AA, Figueroa CM. Biochemical characterization of recombinant UDP-sugar pyrophosphorylase and galactinol synthase from *Brachypodium distachyon*. *Plant Physiol Biochem [Internet]*. 2020;155:780–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.08.030>
346. Matsui M, Kakut M, Misaki A. Fine structural features of oyster glycogen: Mode of multiple branching. *Carbohydr Polym*. 1996 Dec;31(4):227–35.
347. Wang M, Liu Q, Kang X, Zhu Z, Yang H, Xi X, et al. Glycogen Metabolism Impairment via Single Gene Mutation in the *glgBXCAP* Operon Alters the Survival Rate of *Escherichia coli* Under Various Environmental Stresses. *Front Microbiol [Internet]*. 2020;11(588099):1–13. Available from: [www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org)
348. Liu QH, Tang JW, Wen PB, Wang MM, Zhang X, Wang L. From Prokaryotes to Eukaryotes: Insights Into the Molecular Structure of Glycogen Particles. *Front Mol Biosci*. 2021 Apr 29;8(673315):1–15.
349. Martinez-Fleites C, Proctor M, Roberts S, Bolam DN, Gilbert HJ, Davies GJ. Insights into the synthesis of lipopolysaccharide and antibiotics through the structures of two retaining glycosyltransferases from family GT4. *Chem Biol*. 2006;13(11):1143–52.
350. Ramachandran GN, Ramakrishnan C, Sasisekharan V. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *J Mol Biol*. 1963;7:95–9.
351. Yep A, Ballicora MA, Preiss J. The ADP-glucose binding site of the *Escherichia coli* glycogen synthase. *Arch Biochem Biophys*. 2006;453(2):188–96.

352. Stam MR, Danchin EGJ, Rancurel C, Coutinho PM, Henrissat B. Dividing the large glycoside hydrolase family 13 into subfamilies: towards improved functional annotations of  $\alpha$ -amylase-related proteins. *Protein Eng Des Sel* [Internet]. 2006;19(12):555–62. Available from: <http://www.pubmed.org>
353. Montero M, Almagro G, Eydallin G, Viale AM, Muñoz FJ, Bahaji A, et al. *Escherichia coli* glycogen genes are organized in a single *glgBXCAP* transcriptional unit possessing an alternative suboperonic promoter within *glgC* that directs *glgAP* expression. *Biochem J* [Internet]. 2011 Jan 1 [cited 2022 Jul 22];433(1):107–17. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21029047/>
354. Ugalde JE, Lepek V, Uttaro A, Estrella J, Iglesias A, Ugalde RA. Gene organization and transcription analysis of the *Agrobacterium tumefaciens* glycogen (*glg*) operon: two transcripts for the single phosphoglucomutase gene. *J Bacteriol* [Internet]. 1998 Dec [cited 2019 Apr 10];180(24):6557–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9851999>
355. Vanaporn M, Titball RW. Trehalose and bacterial virulence. *Virulence* [Internet]. 2020;11(1):1192–202. Available from: <https://doi.org/10.1080/21505594.2020.1809326>
356. McIntyre HJ, Davies H, Hore TA, Miller SH, Dufour JP, Ronson CW. Trehalose biosynthesis in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and its role in desiccation tolerance. *Appl Environ Microbiol*. 2007;73(12):3984–92.
357. Jensen JB, Ampomah OY, Darrah R, Peters NK, Bhuvaneshwari T V. Role of trehalose transport and utilization in *Sinorhizobium meliloti*-alfalfa interactions. *Mol Plant-Microbe Interact*. 2005;18(7):694–702.
358. Sugawara M, Cytryn EJ, Sadowsky MJ. Functional role of *Bradyrhizobium japonicum* trehalose biosynthesis and metabolism genes during physiological stress and nodulation. *Appl Environ Microbiol*. 2010;76(4):1071–81.
359. Streeter JG. Accumulation of  $\alpha,\alpha$ -trehalose by *Rhizobium* bacteria and bacteroids. *J Bacteriol*. 1985;164(1):78–84.
360. Elbein AD, Pan YT, Pastuszak I, Carroll D. New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology*. 2003;13(4):17–27.
361. Woodcock SD, Syson K, Little RH, Ward D, Sifouna D, Brown JKM, et al. Trehalose and  $\alpha$ -glucan mediate distinct abiotic stress responses in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Genet* [Internet]. 2021;17(4):1–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1009524>
362. Coutinho PM, Deleury E, Davies GJ, Henrissat B. An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases. *J Mol Biol*. 2003 Apr 25;328(2):307–17.
363. Smith AM. The Biosynthesis of Starch Granules. *Biomacromolecules* [Internet]. 2001;2(2):335–41. Available from: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
364. Ball SG, Morell MK. From bacterial glycogen to starch: understanding the biogenesis of the plant starch granule. *Annu Rev Plant Biol* [Internet]. 2003;54:207–33. Available from: [www.annualreviews.org](http://www.annualreviews.org)
365. Gruyer S, Legin E, Bliard C, Ball S, Duchiron F. The endopolysaccharide metabolism of the hyperthermophilic archeon *Thermococcus hydrothermalis*: Polymer structure and biosynthesis. *Curr Microbiol*. 2002 Mar 1;44(3):206–11.
366. Valdez HA, Busi M V, Wayllace NZ, Parisi G, Ugalde RA, Gomez-Casati DF. Role of the N-terminal starch-binding domains in the kinetic properties of starch synthase III from *Arabidopsis thaliana*. *Biochemistry*. 2008;47:3026–32.
367. Pérez-Pérez JM, Candela H, Micol JL. Understanding synergy in genetic interactions. *Trends Genet* [Internet]. 2009 Aug 1 [cited 2022 Jun 26];25(8):368–76. Available from:

- <http://www.cell.com/article/S0168952509001322/fulltext>
368. Zhang J. Genetic redundancies and their evolutionary maintenance. *Evol Syst Biol* [Internet]. 2012 [cited 2022 Jun 26];751:279–300. Available from: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4614-3567-9\\_13](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4614-3567-9_13)
  369. Smythe C, Cohen P. The discovery of glycogenin and the priming mechanism for glycogen biogenesis. *Eur J Biochem*. 1991;200:625–31.
  370. Yamanaka T. *Chemolithoautotrophic Bacteria: Biochemistry and Environmental Biology*. Springer; 2008. 157 p.
  371. Hofman T, Lees H. The Biochemistry of the Nitrifying Organisms. *Biochem J* [Internet]. 1953 [cited 2020 Jul 19];54:579–83. Available from: <https://portlandpress.com/biochemj/article-pdf/54/4/579/801656/bj0540579.pdf>
  372. Teske A, Alm E, Regan JM, Toze S, Rittmann BE, Stahl DA. Evolutionary relationships among ammonia- and nitrite-oxidizing bacteria. *J Bacteriol* [Internet]. 1994 Nov [cited 2019 Apr 10];176(21):6623–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7961414>
  373. Vannelli T, Logan M, Arciero DM, Hooper AB. Degradation of halogenated aliphatic compounds by the ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas europaea*. *Appl Environ Microbiol*. 1990 Apr 1;56(4):1169–71.
  374. Rasche ME, Hyman MR, Arp DJ. Factors limiting aliphatic chlorocarbon degradation by *Nitrosomonas europaea*: cometabolic inactivation of ammonia monooxygenase and substrate specificity. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 1991 Oct 1 [cited 2020 Apr 7];57(10):2986–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16348568>
  375. Juliette LY, Hyman MR, Arp DJ. Mechanism-Based Inactivation of Ammonia Monooxygenase in *Nitrosomonas europaea* by Allylsulfide. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 1993 Nov 1 [cited 2020 Apr 7];59(11):3728–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16349087>
  376. Keener WK, Arp DJ. Transformations of aromatic compounds by *Nitrosomonas europaea*. *Appl Environ Microbiol*. 1994;60(6):1914–20.
  377. Hommes NG, Sayavedra-Soto LA, Arp DJ. Chemolithoorganotrophic Growth of *Nitrosomonas europaea* on Fructose. *J Bacteriol*. 2003;185(23):6809–14.
  378. Schmidt I. Chemoorganoheterotrophic growth of *Nitrosomonas europaea* and *Nitrosomonas eutropha*. *Curr Microbiol*. 2009 Aug 19;59(2):130–8.
  379. Arp DJ, Chain PSG, Klotz MG. The Impact of Genome Analyses on Our Understanding of Ammonia-Oxidizing Bacteria. *Annu Rev Microbiol* [Internet]. 2007 Oct [cited 2020 Jul 3];61(1):503–28. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.micro.61.080706.093449>
  380. Schmidt S, Sunyaev S, Bork P, Dandekar T. Metabolites: a helping hand for pathway evolution? *Trends Biochem Sci*. 2003;28(6):336–41.
  381. Schmidt I, Steenbakkens PJM, Op Den Camp HJM, Schmidt K, Jetten MSM. Physiologic and proteomic evidence for a role of nitric oxide in biofilm formation by *Nitrosomonas europaea* and other ammonia oxidizers. *J Bacteriol* [Internet]. 2004 May 1 [cited 2020 Jul 19];186(9):2781–8. Available from: <http://pedant.gsf.de/>
  382. Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001. 2344 p.
  383. Vaitukaitis JL. Production of antisera with small doses of immunogen: multiple intradermal injections. *Methods Enzymol*. 1981 Jan 1;73:46–52.
  384. Chain P, Lamerdin J, Larimer F, Regala W, Lao V, Land M, et al. Complete genome

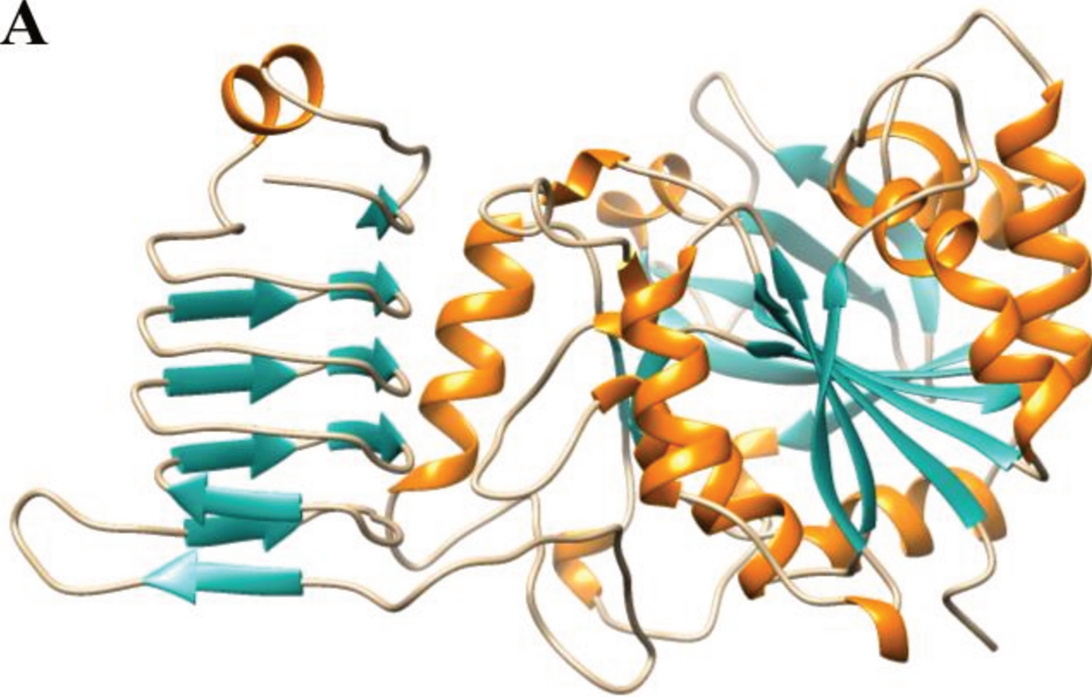
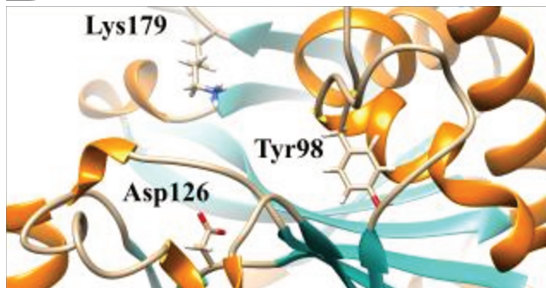
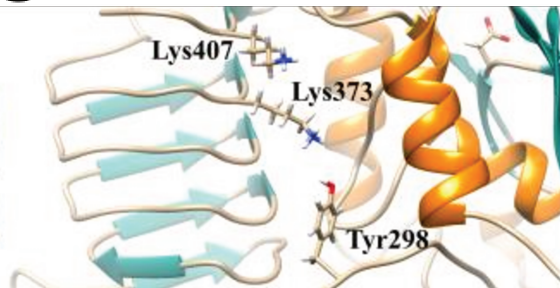
- sequence of the ammonia-oxidizing bacterium and obligate chemolithoautotroph *Nitrosomonas europaea*. *J Bacteriol.* 2003 May 1;185(9):2759–73.
385. Hoefman S, Pommerening-Röser A, Samyn E, De Vos P, Heylen K. Efficient cryopreservation protocol enables accessibility of a broad range of ammonia-oxidizing bacteria for the scientific community. *Res Microbiol.* 2013;164(4):288–92.
386. Gopal GJ, Kumar A. Strategies for the production of recombinant protein in *Escherichia coli*. *Protein J.* 2013 Aug;32(6):419–25.
387. Nishihara K, Kanemori M, Kitagawa M, Yanagi H, Yura T. Chaperone coexpression plasmids: differential and synergistic roles of DnaK-DnaJ-GrpE and GroEL-GroES in assisting folding of an allergen of Japanese cedar pollen, Cryj2, in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 1998;64(5):1694–9.
388. de Marco A, Deuerling E, Mogk A, Tomoyasu T, Bukau B. Chaperone-based procedure to increase yields of soluble recombinant proteins produced in *E. coli*. *BMC Biotechnol* [Internet]. 2007 Jun 12 [cited 2022 Apr 25];7(32):1–9. Available from: <https://bmcbiotechnol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1472-6750-7-32>
389. Piattoni C V, Rius SP, Gomez-Casati DF, Guerrero SA, Iglesias AA. Heterologous expression of non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Triticum aestivum* and *Arabidopsis thaliana*. *Biochimie.* 2010 Jul;92(7):909–13.
390. Rosano GL, Morales ES, Ceccarelli EA. New tools for recombinant protein production in *Escherichia coli*: A 5-year update. *Protein Sci.* 2019;28:1412–22.
391. Schrödel A, De Marco A. Characterization of the aggregates formed during recombinant protein expression in bacteria. *BMC Biochem* [Internet]. 2005 May 31 [cited 2022 Apr 25];6(10):1–11. Available from: <https://bmcbiochem.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2091-6-10>
392. Bar-Even A, Noor E, Savir Y, Liebermeister W, Davidi D, Tawfik DS, et al. The moderately efficient enzyme: evolutionary and physicochemical trends shaping enzyme parameters. *Biochemistry.* 2011;50(21):4402–10.
393. Hagemann M. Molecular biology of cyanobacterial salt acclimation. *FEMS Microbiol Rev.* 2011;35:87–123.
394. Stitt M, Lilley RM, Gerhardt R, Heldt HW. Metabolite levels in specific cells and subcellular compartments of plant leaves. In: *Methods in Enzymology*. Academic Press; 1989. p. 518–52.
395. Cumino AC, Perez-Cenci M, Giarrocco LE, Salerno GL. The proteins involved in sucrose synthesis in the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002 are encoded by two genes transcribed from a gene cluster. *FEBS Lett* [Internet]. 2010;584:4655–60. Available from: [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)
396. Perez-Cenci M, Salerno GL. Functional characterization of *Synechococcus* amylosucrase and fructokinase encoding genes discovers two novel actors on the stage of cyanobacterial sucrose metabolism. *Plant Sci.* 2014 Jul 1;224:95–102.
397. Kirsch F, Klähn S, Hagemann M. Salt-regulated accumulation of the compatible solutes sucrose and glucosylglycerol in Cyanobacteria and its biotechnological potential. *Front Microbiol.* 2019;10(2139):1–17.
398. Lin P-C, Zhang F, Pakrasi HB. Enhanced production of sucrose in the fast-growing cyanobacterium *Synechococcus elongatus* UTEX 2973. *Sci Rep.* 2020;10(390):1–8.
399. Fichtner F, Lunn JE. The role of trehalose 6-phosphate (Tre6P) in plant metabolism and development. *Annu Rev Plant Biol.* 2021;72:737–60.
400. Cotellet V, Meek SEM, Provan F, Milne FC, Morrice N, MacKintosh C. 14-3-3s regulate

- global cleavage of their diverse binding partners in sugar-starved *Arabidopsis* cells. *EMBO J.* 2000 Jun 15;19(12):2869–76.
401. Rawlings ND, Barrett AJ, Bateman A. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2010;38:D227–33. Available from: <http://merops.sanger.ac.uk>.
  402. Rawlings ND, Morton FR, Barrett AJ. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2006;34:D270–2. Available from: [https://academic.oup.com/nar/article/34/suppl\\_1/D270/1133252](https://academic.oup.com/nar/article/34/suppl_1/D270/1133252)
  403. Gibson RP, Turkenburg JP, Charnock SJ, Lloyd R, Davies GJ. Insights into trehalose synthesis provided by the structure of the retaining glucosyltransferase OtsA. *Chem Biol.* 2002;9(12):1337–46.
  404. Breton C, Šnajdrová L, Jeanneau C, Koča J, Imberty A. Structures and mechanisms of glycosyltransferases. *Glycobiology.* 2006 Feb;16(2):29R–37R.
  405. Salerno GL, Curatti L. Origin of sucrose metabolism in higher plants: when, how and why? Vol. 8, *Trends in Plant Science.* Elsevier Ltd; 2003. p. 63–9.
  406. Bruneau JM, Worrell AC, Cambou B, Lando D, Voelker TA. Sucrose Phosphate Synthase, a Key Enzyme for Sucrose Biosynthesis in Plants Protein Purification from Corn Leaves and Immunological Detection. *Plant Physiol* [Internet]. 1991 Jun 1 [cited 2022 May 17];96(2):473–8. Available from: <https://academic.oup.com/plphys/article/96/2/473/6086634>
  407. Doronina N V, Darmaeva TD, Trotsenko YA. *Methylophaga alcalica* sp. nov., a novel alkaliphilic and moderately halophilic, obligately methylotrophic bacterium from an East Mongolian saline soda lake. *Int J Syst Evol Microbiol* [Internet]. 2003 Jan 1 [cited 2022 May 17];53(1):223–9. Available from: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijms.0.02267-0>
  408. But SY, Khmelenina VN, Mustakhimov II, Trotsenko YA. Construction and characterization of *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z knockout mutants defective in sucrose and ectoine biosynthesis genes. *Microbiol* 2013 822 [Internet]. 2013 Apr 18 [cited 2022 May 17];82(2):253–5. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1134/S0026261713020021>
  409. Yamanaka T. Nitrogen Circulation on Earth and Bacteria. In: *Chemolithoautotrophic Bacteria* [Internet]. Springer, Tokyo; 2008 [cited 2022 May 11]. p. 17–51. Available from: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-4-431-78541-5\\_3](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-4-431-78541-5_3)
  410. Aleem MIH. Oxidation of Inorganic Nitrogen Compounds. *Annu Rev Plant Physiol* [Internet]. 1970 Nov 28 [cited 2022 May 11];21(1):67–90. Available from: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.pp.21.060170.000435>
  411. Rao PS, Nicholas DJD. Studies on the incorporation of CO<sub>2</sub> by cells and cell-free extracts of *Nitrosomonas europaea*. *Biochim Biophys Acta.* 1966 Aug 24;124(2):221–32.
  412. Plaxton WC. The organization and regulation of plant glycolysis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* [Internet]. 1996 [cited 2022 May 11];47:185–214. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15012287/>
  413. Clark C, Schmidt EL. Effect of mixed culture on *Nitrosomonas europaea* simulated by uptake and utilization of pyruvate. *J Bacteriol* [Internet]. 1966 Jan [cited 2022 May 17];91(1):367–73. Available from: <https://journals.asm.org/journal/jb>
  414. Abeliovich A, Vonshak A. Anaerobic metabolism of *Nitrosomonas europaea*. *Arch Microbiol* [Internet]. 1992 Sep [cited 2022 May 17];158(4):267–70. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00245243>
  415. But SY, Solntseva NP, Egorova S V, Mustakhimov II, Khmelenina VN, Reshetnikov · Alexander, et al. The genes and enzymes of sucrose metabolism in moderately

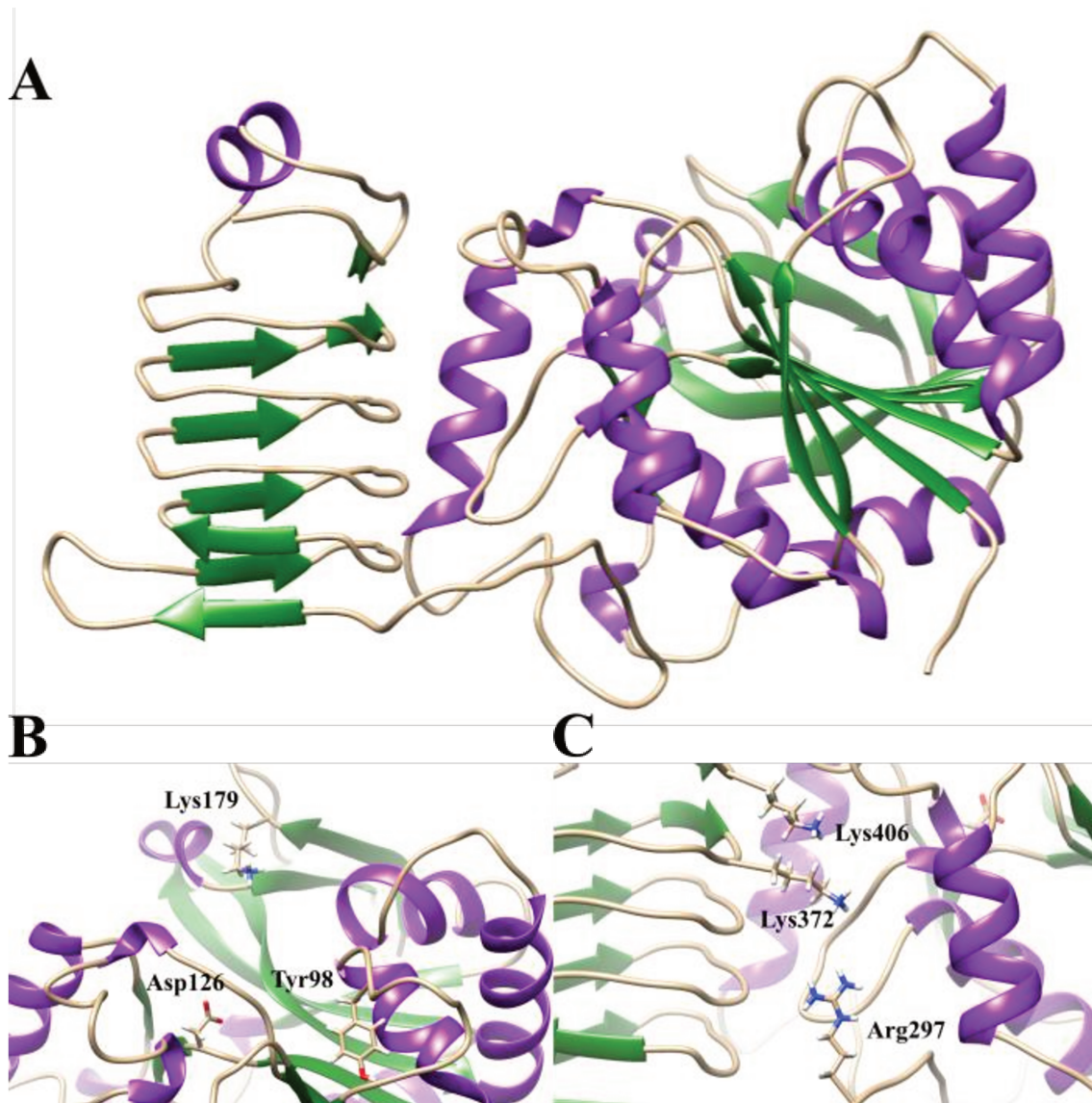
- thermophilic methanotroph *Methylocaldum szegediense* O12. 2018;22:433–45. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00792-018-1006-y>
416. Wood AP, Aurikko JP, Kelly DP. A challenge for 21st century molecular biology and biochemistry: what are the causes of obligate autotrophy and methanotrophy? *FEMS Microbiol Rev* [Internet]. 2004;28:335–52. Available from: <https://academic.oup.com/femsre/article/28/3/335/602063>
417. Corregido MC, Asención Díez MD, Iglesias AÁ, Piattoni CV. New pieces to the carbon metabolism puzzle of *Nitrosomonas europaea*: Kinetic characterization of glyceraldehyde-3 phosphate and succinate semialdehyde dehydrogenases. *Biochimie*. 2019 Mar 1;158:238–45.
418. Miao X, Wu Q, Wu G, Zhao N. Sucrose accumulation in salt-stressed cells of *agp* gene deletion-mutant in cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEMS Microbiol Lett*. 2003;218(1):71–7.
419. Szcwoka M, Heise R, Tohge T, Nunes-Nesi A, Vosloh D, Huege J, et al. Metabolic fluxes in an illuminated *Arabidopsis* rosette. *Plant Cell*. 2013;25(2):694–714.
420. Hartman MD, Rojas BE, Iglesias AA, Figueroa CM. The involvement of allosteric effectors and post-translational modifications in the control of plant central carbon metabolism. *Plant J*. 2023;114(5):1037–58.
421. Wladyka B, Pustelny K. Regulation of bacterial protease activity. *Cell Mol Biol Lett* [Internet]. 2008;13:212–29. Available from: <http://www.cmbi.org.pl>
422. Mokashe N, Chaudhari B, Patil U. Operative utility of salt-stable proteases of halophilic and halotolerant bacteria in the biotechnology sector. *Int J Biol Macromol*. 2018 Oct 1;117:493–522.
423. Lunn JE, Price GD, Furbank RT. Cloning and expression of a prokaryotic sucrose-phosphate synthase gene from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Mol Biol*. 1999;40:297–305.
424. Roby C, Cortès S, Gromova M, Le Bail J-L, Roberts JKM. Sucrose cycling in heterotrophic plant cell metabolism: first step towards an experimental model. *Mol Biol Rep* [Internet]. 2002 [cited 2022 May 20];29:145–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12241046/>
425. Ilgrande C, Leroy B, Wattiez R, Vlaeminck SE, Boon N, Clauwaert P. Metabolic and Proteomic Responses to Salinity in Synthetic Nitrifying Communities of *Nitrosomonas* spp. and *Nitrobacter* spp. *Front Microbiol* [Internet]. 2018;9(2914):1–12. Available from: [www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org)
426. Empadinhas N, Costa MS. Osmoadaptation mechanisms in prokaryotes: distribution of compatible solutes. *Int Microbiol*. 2008;11:151–61.
427. Schimel J, Balsler TC, Wallenstein M. Microbial stress-response physiology and its implications for ecosystem function. *Ecology* [Internet]. 2007 Jun 1 [cited 2022 May 23];88(6):1386–94. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1890/06-0219>

## 8. MATERIAL SUPLEMENTARIO

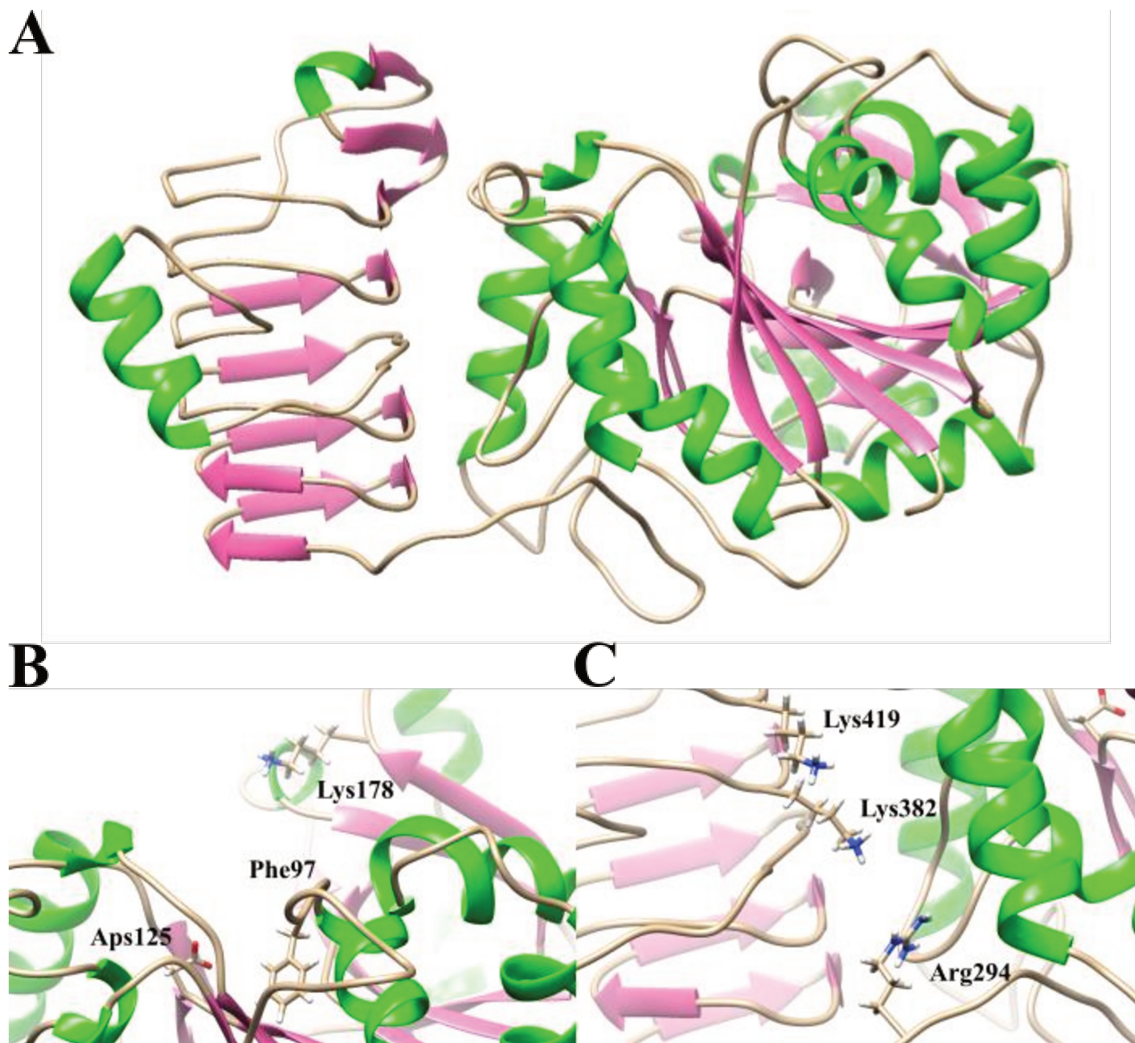
### 8.1. Figuras Suplementarias

**A****B****C**

**Figura S1:** Modelo tridimensional del monómero de *inMelGlgC* obtenido por AlphaFold2. (A) La imagen muestra el plegamiento de Rossmann dentro del dominio N-terminal, con las cadenas  $\beta$  resaltadas en celeste y las hélices  $\alpha$  en naranja. (B) Se muestran los residuos del supuesto sitio catalítico (Tyr<sup>98</sup>, Asp<sup>126</sup> y Lys<sup>179</sup>). (C) Se muestran los residuos encargados de la unión a efectores (Tyr<sup>298</sup>, Lys<sup>373</sup> y Lys<sup>407</sup>).



**Figura S2:** Modelo tridimensional del monómero de f1MeIGlC obtenido por AlphaFold2. (A) La imagen muestra el plegamiento de Rossmann dentro del dominio N-terminal, con las cadenas  $\beta$  resaltadas en verde oscuro y las hélices  $\alpha$  en lila. (B) Se muestran los residuos del supuesto sitio catalítico (Tyr<sup>98</sup>, Asp<sup>126</sup> y Lys<sup>179</sup>). (C) Se muestran los residuos encargados de la unión a efectores (Arg<sup>297</sup>, Lys<sup>372</sup> y Lys<sup>406</sup>).



**Figura S3:** Modelo tridimensional del monómero de *AnaGlgC* obtenido por AlphaFold2. (A) La imagen muestra el plegamiento de Rossmann dentro del dominio N-terminal, con las cadenas  $\beta$  resaltadas en rosa y las hélices  $\alpha$  en verde claro. (B) Se muestran los residuos del sitio catalítico (Phe<sup>97</sup>, Asp<sup>125</sup> y Lys<sup>178</sup>). (C) Se muestran los residuos encargados de la unión a efectores (Arg<sup>294</sup>, Lys<sup>382</sup> y Lys<sup>419</sup>).

## 8.2. Tablas Suplementarias

**Tabla Suplementaria S1:** Información correspondiente a las secuencias utilizadas para la construcción del árbol filogenético presentado en la Figura 3.

N°	Enzima	Organismo	Código
1	ADP-Glc PPasa ( <i>small</i> )	<i>Solanum tuberosum</i>	1YP2
2	ADP-Glc PPasa ( <i>small</i> )	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_199641.1
3	ADP-Glc PPasa ( <i>small</i> )	<i>Medicago truncatula</i>	XP_003617925.1
4	ADP-Glc PPasa ( <i>small</i> )	<i>Glycine max</i>	XP_003544493.1
5	ADP-Glc PPasa ( <i>small</i> )	<i>Populus trichocarpa</i>	XP_002321214.1
6	ADP-Glc PPasa ( <i>small</i> )	<i>Ricinus communis</i>	XP_002524583.1
7	ADP-Glc PPasa ( <i>small</i> )	<i>Vitis vinifera</i>	XP_002263255.1
8	ADP-Glc PPasa ( <i>small</i> )	<i>Beta vulgaris</i> subsp. <i>vulgaris</i>	CAA55515.1
9	ADP-Glc PPasa ( <i>small</i> )	<i>Pisum sativum</i>	CAA65539.1
10	ADP-Glc PPasa ( <i>small</i> )	<i>Vicia faba</i> var. <i>minor</i>	CAA54260.1
11	ADP-Glc PPasa ( <i>small</i> )	<i>Zea mays</i>	NP_001105178.1
12	ADP-Glc PPasa ( <i>small</i> )	<i>Oryza sativa japonica</i>	NP_001061603.1
13	ADP-Glc PPasa ( <i>small</i> )	<i>Brachypodium distachyon</i>	XP_003577955.1
14	ADP-Glc PPasa ( <i>small</i> )	<i>Sorghum bicolor</i>	XP_002462140.1
15	ADP-Glc PPasa ( <i>small</i> )	<i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i>	AAO16183.1
16	ADP-Glc PPasa ( <i>small</i> )	<i>Triticum aestivum</i>	AAU50665.1
17	ADP-Glc PPasa ( <i>large</i> )	<i>Solanum tuberosum</i>	Q00081.1
18	ADP-Glc PPasa ( <i>large</i> )	<i>Arabidopsis thaliana</i>	P55229.3
19	ADP-Glc PPasa ( <i>large</i> )	<i>Solanum lycopersicum</i>	AAC49941.1
20	ADP-Glc PPasa ( <i>large</i> )	<i>Arabidopsis lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>	XP_002873938.1
21	ADP-Glc PPasa ( <i>large</i> )	<i>Arabidopsis lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>	XP_002878559.1
22	ADP-Glc PPasa ( <i>large</i> )	<i>Medicago truncatula</i>	XP_003603943.1
23	ADP-Glc PPasa ( <i>large</i> )	<i>Glycine max</i>	XP_003553688.1
24	ADP-Glc PPasa ( <i>large</i> )	<i>Glycine max</i>	XP_003549968.1
25	ADP-Glc PPasa ( <i>large</i> )	<i>Glycine max</i>	XP_003549440.1
26	ADP-Glc PPasa ( <i>large</i> )	<i>Glycine max</i>	XP_003527197.1
27	ADP-Glc PPasa ( <i>large</i> )	<i>Zea mays</i>	NP_001106017.1
28	ADP-Glc PPasa ( <i>large</i> )	<i>Zea mays</i>	NP_001121104.1
29	ADP-Glc PPasa ( <i>large</i> )	<i>Brachypodium distachyon</i>	XP_003567817.1
30	ADP-Glc PPasa ( <i>large</i> )	<i>Oryza sativa japonica</i>	NP_001051184.1
31	ADP-Glc PPasa ( <i>large</i> )	<i>Oryza sativa japonica</i>	NP_001059276.1
32	ADP-Glc PPasa ( <i>large</i> )	<i>Sorghum bicolor</i>	XP_002440313.1
33	ADP-Glc PPasa ( <i>large</i> )	<i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i>	AAC49729.1
34	ADP-Glc PPasa ( <i>large</i> )	<i>Oncidium goldiana</i>	AAM95945.1
35	ADP-Glc PPasa ( <i>large</i> )	<i>Triticum aestivum</i>	CAD98749.1
36	ADP-Glc PPasa ( <i>large</i> )	<i>Triticum aestivum</i>	P12299.2
37	ADP-Glc PPasa	<i>Synechococcus</i> sp. RS9917	ZP_01080177.1
38	ADP-Glc PPasa	<i>Cyanothece</i> sp. CCY0110	ZP_01731458.1
39	ADP-Glc PPasa	<i>Synechococcus</i> sp. CB0101	ZP_07973311.1
40	ADP-Glc PPasa	<i>Thermosynechococcus elongatus</i> BP-1	NP_682077.1
41	ADP-Glc PPasa	<i>Nostoc punctiforme</i> PCC 73102	YP_001869319.1

42	ADP-Glc PPasa	<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120	NP_488685.1
43	ADP-Glc PPasa	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	NP_443010.1
44	ADP-Glc PPasa	<i>Synechococcus elongatus</i> PCC 6301	YP_171631.1
45	ADP-Glc PPasa	<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413	YP_322537.1
46	ADP-Glc PPasa	<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002	YP_001733367.1
47	ADP-Glc PPasa	<i>Cyanothece</i> sp. PCC 7822	YP_003887306.1
48	ADP-Glc PPasa	<i>Nostoc azollae</i>	YP_003722981.1
49	ADP-Glc PPasa	<i>Arthrospira maxima</i> CS-328	ZP_03275613.1
50	ADP-Glc PPasa	<i>Micromonas pusilla</i> CCMP1545	XP_003056043.1
51	ADP-Glc PPasa	<i>Micromonas pusilla</i> CCMP1545	XP_003054985.1
52	ADP-Glc PPasa	<i>Micromonas</i> sp. RCC299	XP_002507549.1
53	ADP-Glc PPasa	<i>Micromonas</i> sp. RCC299	XP_002503615.1
54	ADP-Glc PPasa ( <i>large</i> )	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	XP_001693447.1
55	ADP-Glc PPasa ( <i>small</i> )	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	XP_001691854.1
56	ADP-Glc PPasa	<i>Ostreococcus tauri</i>	XP_003084430.1
57	ADP-Glc PPasa	<i>Ostreococcus tauri</i>	XP_003080399.1
58	ADP-Glc PPasa	<i>Volvox carteri</i> f. <i>nagariensis</i>	XP_002956068.1
59	ADP-Glc PPasa	<i>Volvox carteri</i> f. <i>nagariensis</i>	XP_002951950.1
60	ADP-Glc PPasa	<i>Ostreococcus lucimarinus</i> CCE9901	XP_001422382.1
61	ADP-Glc PPasa	<i>Ostreococcus lucimarinus</i> CCE9901	XP_001418959.1
62	ADP-Glc PPasa	<i>Selaginella moellendorffii</i>	XP_002994500.1
63	ADP-Glc PPasa	<i>Selaginella moellendorffii</i>	XP_002989290.1
64	ADP-Glc PPasa	<i>Selaginella moellendorffii</i>	XP_002982912.1
65	ADP-Glc PPasa	<i>Selaginella moellendorffii</i>	XP_002981933.1
66	ADP-Glc PPasa	<i>Selaginella moellendorffii</i>	XP_002980858.1
67	ADP-Glc PPasa	<i>Selaginella moellendorffii</i>	XP_002975788.1
68	ADP-Glc PPasa	<i>Selaginella moellendorffii</i>	XP_002973739.1
69	ADP-Glc PPasa	<i>Selaginella moellendorffii</i>	XP_002970384.1
70	ADP-Glc PPasa	<i>Selaginella moellendorffii</i>	XP_002968152.1
71	ADP-Glc PPasa	<i>Shinella zoogloeoides</i>	WP_119256651.1
72	ADP-Glc PPasa	<i>Paracoccus thiocyanatus</i>	WP_115756538.1
73	ADP-Glc PPasa	<i>Rhizobiales bacterium</i>	WP_115156201.1
74	ADP-Glc PPasa	<i>Mesorhizobium oceanicum</i>	WP_114579936.1
75	ADP-Glc PPasa	<i>Rhodoplanes elegans</i>	WP_111356150.1
76	ADP-Glc PPasa	<i>Azospirillum</i> sp. TSO5	WP_109150954.1
77	ADP-Glc PPasa	<i>Marteella mediterranea</i>	WP_106310289.1
78	ADP-Glc PPasa	<i>Rhizobium mesoamericanum</i>	WP_028746729.1
79	ADP-Glc PPasa	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	WP_014493115.1
80	ADP-Glc PPasa	<i>Rhizobiales bacterium</i>	WP_113529535.1
81	ADP-Glc PPasa	<i>Sulfuritortus calidifontis</i>	WP_126462236.1
82	ADP-Glc PPasa	<i>Nitrosomonas marina</i>	WP_090633633.1
83	ADP-Glc PPasa	<i>Nitrosomonas oligotropha</i>	WP_090317903.1
84	ADP-Glc PPasa	<i>Xylophilus ampelinus</i>	WP_110464968.1
85	ADP-Glc PPasa	<i>Paraburkholderia rhynchosiae</i>	WP_102635427.1
86	ADP-Glc PPasa	<i>Caballeronia sordidicola</i>	WP_089164405.1
87	ADP-Glc PPasa	<i>Rhodoferax antarcticus</i>	WP_075585858.1

88	ADP-Glc PPasa	<i>Nitrosospira multiformis</i>	WP_113067136.1
89	ADP-Glc PPasa	<i>Neisseria dumasiana</i>	WP_096777558.1
90	ADP-Glc PPasa	<i>Paraburkholderia bryophila</i>	WP_111935803.1
91	ADP-Glc PPasa	<i>Corallococcus</i> sp. CA051B	WP_120645735.1
92	ADP-Glc PPasa	<i>Desulfatiglans anilini</i>	WP_028321096.1
93	ADP-Glc PPasa	<i>Myxococcus stipitatus</i>	WP_015352759.1
94	ADP-Glc PPasa	<i>Myxococcus macrosporus</i>	WP_013935338.1
95	ADP-Glc PPasa	<i>Stigmatella aurantiaca</i>	WP_002610372.1
96	ADP-Glc PPasa	<i>Vulgatibacter incomptus</i>	WP_050724205.1
97	ADP-Glc PPasa	<i>Stigmatella aurantiaca</i>	WP_013376533.1
98	ADP-Glc PPasa	<i>Geobacter bemidjiensis</i>	WP_012529339.1
99	ADP-Glc PPasa	<i>Vibrio mediterranei</i>	WP_124941924.1
100	ADP-Glc PPasa	<i>Salmonella enterica</i>	WP_122029635.1
101	ADP-Glc PPasa	<i>Vibrio cholerae</i>	WP_119560420.1
102	ADP-Glc PPasa	<i>Haemophilus influenzae</i>	WP_118873727.1
103	ADP-Glc PPasa	<i>Haemophilus haemolyticus</i>	WP_118861127.1
104	ADP-Glc PPasa	<i>Aeromonas hydrophila</i>	WP_118836321.1
105	ADP-Glc PPasa	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	WP_117373127.1
106	ADP-Glc PPasa	<i>Escherichia coli</i>	WP_115431588.1
107	ADP-Glc PPasa	<i>Yersinia pestis</i>	WP_016678934.1
108	ADP-Glc PPasa	<i>Rhodococcus fascians</i>	WP_032403021.1
109	ADP-Glc PPasa	<i>Rhodococcus jostii</i>	WP_073370619.1
110	ADP-Glc PPasa	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	NP_625258.2
111	ADP-Glc PPasa	<i>Streptomyces scabiei</i>	WP_037698817.1
112	ADP-Glc PPasa	<i>Corynebacterium minutissimum</i>	WP_039674867.1
113	ADP-Glc PPasa	<i>Microbacterium testaceum</i>	WP_058598057.1
114	ADP-Glc PPasa	<i>Microbacterium oxydans</i>	WP_045280110.1
115	ADP-Glc PPasa	<i>Mycobacterium vulneris</i>	WP_085292363.1
116	ADP-Glc PPasa	<i>Mycobacterium shigaense</i>	WP_096441957.1
117	ADP-Glc PPasa	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	WP_057375489.1
118	ADP-Glc PPasa	<i>Micrococcus luteus</i>	WP_036383376.1
119	ADP-Glc PPasa	<i>Actinomyces ruminicola</i>	WP_092537108.1
120	ADP-Glc PPasa	<i>Actinomyces oris</i>	WP_060958022.1
121	ADP-Glc PPasa	<i>Kocuria palustris</i>	WP_058872255.1
122	ADP-Glc PPasa	<i>Melainabacteria bacterium</i>	RAI15060.1
123	ADP-Glc PPasa	<i>Melainabacteria bacterium</i>	RAI13416.1
124	ADP-Glc PPasa	<i>Melainabacteria bacterium</i>	RAI12533.1
125	ADP-Glc PPasa	<i>Gastranaerophilales bacterium</i> HUM_20	WP_129697482.1
126	ADP-Glc PPasa	<i>Melainabacteria bacterium</i> MEL.A1	WP_129696015.1
127	ADP-Glc PPasa	<i>Gastranaerophilales bacterium</i>	PWL74908.1
128	ADP-Glc PPasa	<i>Gastranaerophilales bacterium</i> HUM_21	DAB23140.1
129	ADP-Glc PPasa	<i>Gastranaerophilales bacterium</i> HUM_9	DAA96560.1
130	ADP-Glc PPasa	<i>Gastranaerophilales bacterium</i> HUM_6	DAA93442.1
131	ADP-Glc PPasa	<i>Gastranaerophilales bacterium</i> HUM_5	DAA90045.1
132	ADP-Glc PPasa	<i>Gastranaerophilales bacterium</i> HUM_1	DAA82094.1
133	ADP-Glc PPasa	<i>Melainabacteria bacterium</i> GWF2_37_15	OGI00355.1

**Tabla Suplementaria S2:** Información correspondiente a las secuencias utilizadas para la construcción del árbol filogenético presentado en la Figura 15.

N°	Enzima	Organismo	Código
1	GlgA	<i>Bifidobacterium longum</i>	WP_117839538.1
2	GlgM	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	WP_057372227.1
3	GlgA	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	P9WMY9
4	GlgA	<i>Mycobacteroides abscessus</i>	WP_052554574.1
5	GlgA	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	NP_625259.1
6	GlgA	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	WP_078611866.1
7	GlgA	<i>Streptomyces canus</i>	WP_062048891.1
8	GlgA	<i>Clavibacter michiganensis</i>	WP_053774575.1
9	GlgA	<i>Rhodococcus fascians</i>	WP_032403020.1
10	GlgA	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	WP_059383062.1
11	GlgA 1	<i>Rhodococcus jostii</i>	ABG97751.1
12	GlgA 2	<i>Rhodococcus jostii</i>	ABG98234.1
13	GlgA	<i>Kocuria rhizophila</i>	WP_029603115.1
14	GlgA	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	WP_003855006.1
15	GlgM	<i>Mycolicibacterium smegmatis</i>	A0R2E2.1
16	GlgA	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	WP_134688005.1
17	GlgA	<i>Streptococcus mutans</i> UA159	Q8CWX0
18	GlgA	<i>Bacillus cereus</i>	WP_098345708.1
19	GlgA	<i>Bacillus thuringiensis</i>	WP_001991331.1
20	GlgA	<i>Bacillus subtilis</i>	WP_137200973.1
21	GlgA	<i>Streptococcus mitis</i>	WP_143952052.1
22	GlgA	<i>Lactococcus lactis</i>	WP_134794588.1
23	GlgA	<i>Clostridium perfringens</i>	WP_131441853.1
24	GlgA	<i>Clostridioides difficile</i>	WP_009892827.1
25	GlgA	<i>Lachnospiraceae bacterium</i>	WP_099450807.1
26	GlgA	<i>Ruminococcus flavefaciens</i> 007c	WP_019680984.1
27	GlgA	<i>Ruminococcus flavefaciens</i> 007c	EWM54456.1
28	GlgA	<i>Ruminococcus albus</i> ATCC 27210	WP_074959839.1
29	GlgA	<i>Ruminococcus albus</i> ATCC 27210	WP_074828078.1
30	GlgA	<i>Escherichia coli</i>	WP_136810921.1
31	GlgA	<i>Salmonella enterica</i>	WP_023183664.1
32	GlgA	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	WP_135713572.1
33	GlgA	<i>Serratia marcescens</i>	WP_115436607.1
34	GlgA	<i>Yersinia enterocolitica</i>	WP_050915673.1
35	GlgA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	WP_134598315.1
36	GlgA	<i>Rhizobiales bacterium</i>	WP_115036299.1
37	GlgA	<i>Pseudomonas viridiflava</i>	WP_122860962.1
38	GlgA	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	WP_134924452.1
39	GlgA	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	WP_131713425.1
40	GlgA	<i>Haemophilus haemolyticus</i>	WP_134078366.1
41	GlgA	<i>Nitrosomonas europaea</i>	Q82SP3.1
42	GlgA 1	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	WP_137087368.1

43	GlgA 2	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Q8UK38.2
44	GlgA 471	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	WP_038965823.1
45	GlgA 482	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	WP_011089199.1
46	GlgA 1	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	P74521.1
47	GlgA 2	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	P72623.1
48	GlgA 1	<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120	Q8YVU5.1
49	GlgA 2	<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120	Q8Z0Q9.1
50	GlgA 1	<i>Trichormus variabilis</i> ATCC 29413	Q3M9U1.1
51	GlgA 2	<i>Trichormus variabilis</i> ATCC 29413	Q3M3R4.1
52	GlgA	<i>Prochlorococcus marinus</i>	WP_012007425.1
53	GlgA	<i>Fischerella thermalis</i>	WP_102172200.1
54	SSasa 1	<i>Durio zibethinus</i>	XP_022738775.1
55	SSasa 2	<i>Durio zibethinus</i>	XP_022739289.1
56	SSasa 2	<i>Vigna radiata</i>	NP_001304209.1
57	SSasa 1	<i>Arachis hypogaea</i>	XP_025666504.1
58	SSasa 2	<i>Arachis hypogaea</i>	XP_025686051.1
59	SSasa 3	<i>Arachis hypogaea</i>	XP_025645888.1
60	SSasa 4	<i>Arachis hypogaea</i>	XP_025651158.1
61	SSasa 1	<i>Glycine max</i>	RZC18017.1
62	SSasa 2	<i>Glycine max</i>	RZC01460.1
63	SSasa 2	<i>Rosa chinensis</i>	XP_024181951.1
64	SSasa 1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9FNF2.1
65	SSasa 2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9MAC8.1
66	SSasa 1	<i>Prunus persica</i>	XP_007220640.1
67	SSasa 1	<i>Zea mays</i>	NP_001104880.2
68	SSasa 2	<i>Zea mays</i>	NP_001288582.1
69	SSasa	<i>Zea mays</i>	XP_020400389.1
70	SSasa	<i>Sorghum bicolor</i>	XP_021304395.1
71	SSasa	<i>Ananas comosus</i>	XP_020112542.1
72	SSasa	<i>Oryza sativa japonica</i>	XP_015614561.1
73	SSasa	<i>Elaeis guineensis</i>	XP_029119652.1
74	SSasa	<i>Brachypodium distachyon</i>	XP_014753091.1