

# CARACTERIZACIÓN DE POLISACÁRIDOS DE *Rhodococcus spp.*: AISLAMIENTO Y COMPARACIÓN CON AMINOGLICANOS OBTENIDOS POR ESTRATEGIAS DE GLICOBIOLOGÍA *cell-free* Del Predo, Sofía

Lab. de Enzimología Molecular, Instituto de Agrobiotecnología del Litoral CONICET-UNL

Director: Asencion Diez, Matías Damián

Co-directora: Iglesias, María Josefina

Área: Ciencias biológicas

Palabras claves: glicanos, glucógeno, glucosamina

## INTRODUCCIÓN

Los polisacáridos naturales como almidón, celulosa, quitina o quitosano, están ampliamente distribuidos en la biosfera y se consideran importantes recursos de biomasa. Constituyen, además, moléculas de potencial utilidad como biomateriales y hay un interés creciente en utilizar biopolímeros en aplicaciones donde se utilizan polímeros sintéticos tradicionales. En este contexto, los glucanos como almidón y glucógeno aparecen como una alternativa viable dado que son una materia prima abundante, renovable y biodegradable.

La glicobiología *cell-free* es un campo de reciente desarrollo que implica usar estrategias de biología sintética para la obtención *in vitro* de glicanos, que pueden ser oligo- o poli-sacáridos ausentes en la naturaleza, o difíciles de aislar a partir de fuentes naturales. Implica el uso de enzimas puras para concatenar pasos de glicosilación a través de reacciones en cascada.

El glucógeno es un polisacárido compuesto por unidades de glucosa unidas por enlaces  $\alpha$ -1,4 y presenta ramificaciones  $\alpha$ -1,6. Su estructura es óptima para su función metabólica y se acumula cuando el crecimiento se ve limitado por la falta de algún nutriente distinto al carbono. La presencia de glucógeno o poliglucanos similares se ha confirmado en más de 50 especies procariontas y arqueas.

La síntesis de glucógeno en bacterias por la vía clásica, ocurre mediante la utilización del dador glucosídico ADP-glucosa (ADP-Glc) para la elongación de la cadena glicosídica  $\alpha$ -1,4. Por otra parte, recientemente se descubrió en *Mycobacterium tuberculosis* una enzima que conforma una vía de síntesis de  $\alpha$ -glucanos alternativa. La nueva maltosiltransferasa (EC 2.4.99.16, GlgE), en lugar de utilizar ADP-Glc, utiliza maltosa-1P (Mal-1P) para extender las cadenas de glucano en dos unidades glucosídicas, y se ha demostrado que está presente en un 14% de los genomas procariontas conocidos. Una de las principales razones que dificultan la caracterización y el empleo de esta enzima es la disponibilidad y el costo del sustrato Mal-1P. Por ello, nosotros estudiamos la actividad GlgE en conjunto con la enzima maltosa-1P sintasa (EC 2.4.1.342, GlgM), enzima capaz de sintetizar el disacárido-1P a partir de ADP-Glc y Glc-1P, dos sustratos que son accesibles y útiles a pequeña escala.

Utilizando reacciones acopladas, se concluyó que la reacción de GlgE (de *Streptomyces coelicolor*, *Sco*) acoplada a GlgM de *Rhodococcus jostii* (*Rjo*) es una herramienta eficiente para generar *in situ* Mal-1P y caracterizar distintas maltosil transferasas GlgE.

El reciente descubrimiento de la promiscuidad enzimática de *Rjo*GlgM alentó a evaluar glucosamina-1P (GlcN-1P) como sustrato. En esta reacción alternativa, se genera un hetero-

Título del proyecto: ENZIMOLOGÍA BÁSICA Y APLICADA DE LA SÍNTESIS DE GLUCANOS: análisis del acople GlgM/GlgE

Instrumento: PIBAA

Año de convocatoria: 2022-2023

Organismo financiador: CONICET

Director/a: Asencion Diez, Matías

disacárido-1P formado por una unidad de Glc y otra de GlcN-1P, unidas por un enlace  $\alpha$ -1,4. Cabe destacar que esta molécula no puede conseguirse de otra manera ya que su aislamiento no ha sido reportado en la bibliografía.

En pos de desarrollar una herramienta glicobiológica para obtener moléculas de  $\alpha$ -1,4-glicanos modificadas con unidades de GlcN, se procedió a explotar la capacidad de las enzimas de utilizar sustratos alternativos. Así, se empleó la enzima *RjoGlgM*, que utiliza GlcN-1P eficientemente como aceptor glicosídico. Esta particularidad de usar sustratos alternativos es clave para modificar glicanos con unidades de GlcN. El disacárido-P formado se transloca a un glicano naciente mediante *ScoGlgE*.

Este proyecto está enfocado a profundizar el entendimiento del metabolismo del glucógeno y su interrelación con el de otros carbohidratos (glucosamina) y, además, implementar estrategias para la producción de biopolímeros con estructuras inexistentes en la naturaleza con potencial uso en el desarrollo de biomateriales. Los aspectos metabólicos relacionados a la utilización de GlcN en *Rhodococci* son importantes, dado que la captación del amino azúcar implicaría que éste se está catabolizando para generar precursores que permitan el crecimiento celular, aunque poco se sabe que ocurriría con el exceso del mismo.

### OBJETIVOS:

- Puesta a punto de métodos colorimétricos para la identificación y posterior análisis de glicanos procariotas, conteniendo tanto glucosa como glucosamina.
- Analizar comparativamente glicanos obtenidos por estrategias de glicobiología *cell-free* respecto de aquellos producidos *in vivo* por células de *Rhodococci*.

### METODOLOGÍA

Método colorimétrico de la genipina: En el tubo de reacción se colocan volúmenes iguales de una solución de genipina 0,5 mg/ml y de muestra a analizar, se calientan 30 minutos a 100°C y seguidamente se incuban 20 minutos en hielo. La genipina se une específicamente a los grupos aminos, formando un complejo de color azul que presenta un pico de absorbancia a 589 nm. La solución de genipina se prepara con agua destilada y se almacena a 4°C, siendo estable durante al menos 3 meses.

Para realizar el ensayo, se utilizaron 60 ul de muestra y 60 ul de genipina, obteniendo así un volumen final de 120 ul. Se tomó una alícuota de 100 ul para realizar la medición.

Método colorimétrico de la glucosa oxidasa: La glucosa es determinada por oxidación en una reacción catalizada por la enzima glucosa oxidasa (GOD), ya que presenta marcada especificidad por la D-glucosa. Como producto de esta reacción se forma ácido glucónico y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). El  $H_2O_2$  generado se mide cuantitativamente mediante una peroxidasa (POD) en presencia del sustrato cromogénico 4-aminofenazona y fenol. En estas condiciones, el  $H_2O_2$  forma una quinoneimina de color rojo, con un pico de absorción a 505 nm. La intensidad de color es proporcional a la concentración de glucosa de la muestra. Para dichas mediciones se utilizaron 70 ul de reactivo provisto por el fabricante (Wiener Lab) y 30 ul de la solución a analizar, obteniendo un volumen final de 100 ul.

Cultivo de microorganismos: El crecimiento de *R. jostii* y *R. fascians* se realizó en medio salino mínimo (MSM) suplementados con glucosamina u otras fuentes de carbono (sacarosa, glucosa, maltosa, glicerol o gluconato) a una concentración final de 1% p/v. Las células se cultivaron con agitación en condiciones aeróbicas, a 28-30 °C, empleando 50 ml de medio en erlenmeyers de 250 ml. Los cultivos se cosecharon (10 min a 5000xg) en etapas de crecimiento exponencial o estacionario y las células se enjuagaron con una solución isotónica, se centrifugaron nuevamente y el paquete celular se almacenó a -20°C hasta su posterior uso. Para la purificación de polisacáridos, se realizó primero un tratamiento alcalino al pellet celular proveniente de los cultivos en distintas condiciones (90 min a 100 °C en NaOH 1M). Luego de la neutralización, se realizó una precipitación etanólica (toda la noche a -20°C), centrifugación

(20 min a 25000 xg) y la masa obtenida se resuspendió en 100 µl agua. Este mismo paso de precipitación etanólica, centrifugación y resuspensión en agua se emplea para la recuperación de los glicanos sintetizados *in vitro* luego de las reacciones acopladas de *Rjo*GlgM y *Sco*GlgE (ver Figura 1). Los glicanos aminados se obtienen al reemplazar Glc-1P por GlcN-1P en el acople enzimático. A su vez, se pueden obtener oligosacáridos o polisacáridos ya sea que se parta desde maltosa o glucógeno, respectivamente.

La cuantificación de glucógeno implica un tratamiento (digestión) con 2 U de amiloglucosidasa (EC 3.2.1.3; Sigma Aldrich) en *buffer* acetato pH 4,5 durante 2 h a 55°C. La glucosa liberada se determina por el método específico de la glucosa oxidasa (Kit de Glicemia Enzimática – Wiener Lab).

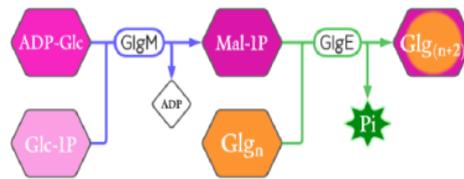


Figura 1: Acople I donde (*Rjo*)GlgM genera el sustrato de (*Sco*)GlgE, maltosa 1P, a partir de ADP-glucosa y glucosa-1P

## RESULTADOS Y CONCLUSIONES:

Para la identificación y el análisis comparativo de los glicanos obtenidos *in vivo* e *in vitro*, se puso a punto el método de genipina, a partir de la realización de curvas de calibrado con glucosamina y quitosano.

El método de genipina fue ensayado en relación genipina:muestra 1:1, 1,5:1, 2:1, 3:1, observándose que a mayor proporción de genipina la absorbancia no se modifica, por lo cual se seleccionó la relación 1:1 para el resto de los ensayos. Para corroborar la especificidad del método, se analizaron diferentes compuestos en las condiciones mencionadas. Se observó que solo las sustancias conteniendo glucosamina presentaron absorbancia. A partir de estos resultados, se realizaron curvas de calibrado para glucosamina (Figura 2) y quitosano. Se determinó que el método posee un comportamiento lineal de 5 mM y de 4 mg/ml respectivamente.

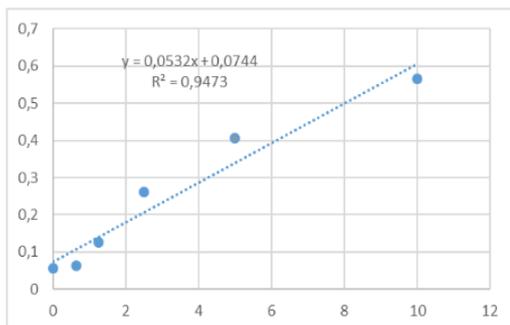


Figura 2: Curva de glucosamina + genipina

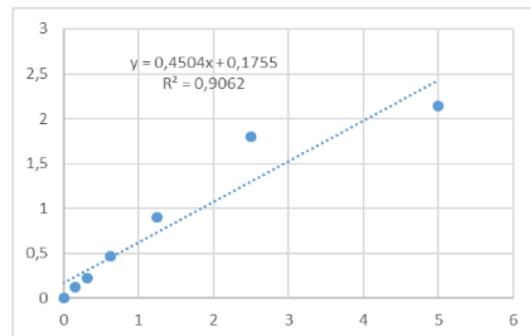


Figura 3: Curva de glucógeno digerido

De igual forma que con el método de la genipina, el de GOD/POD fue analizado también con diversos compuestos, para verificar la especificidad del mismo. Se pudo comprobar que, si bien este método puede detectar maltosa, es sumamente específico para glucosa, ya que cuando se ensayó una concentración de glucosa de 0.5 mg/ml la absorbancia fue 40 veces mayor que cuando se ensayó la misma concentración de maltosa. A partir de esto, se realizaron curvas de calibrado de glucosa, para determinar los respectivos rangos de linealidad.

Dado que el glucógeno no da positivo con el método de la glucosa oxidasa, se prosiguió a realizar una curva de calibrado a partir de soluciones de concentraciones conocidas del poliglucano, tratadas con amiloglucosidasa y midiendo la glucosa liberada a través del método de glucosa oxidasa (Figura 3). A partir de este análisis, determinamos que la curva es lineal hasta concentraciones de 2.5 mg/ml y que la mínima concentración detectada por este método es de 0.15 mg/ml para glucosa, 0.45 mg/ml para maltosa y para glucógeno digerido es de 0.05 mg/ml. Un resultado importante de estas medidas es que se comprobó que los sustratos de GlgE y GlgM no dan absorbancia utilizando este método, garantizando que se está midiendo específicamente la glucosa proveniente del polisacárido. Por otra parte, el método de genipina también es incapaz de reaccionar ante compuestos distintos de glucosamina. En conclusión, se pusieron a punto 2 métodos, uno específico para cuantificar glucosamina y otro para cuantificar glucosa, y que servirán para el análisis de los polisacáridos obtenidos tanto *in vitro* como *in vivo*.

Se realizó un pool de glucógeno, el mismo fue extraído de bacterias *R. jostii*, crecidas en fuente de carbono glucosa, sacarosa, maltosa, glicerol y gluconato, se purificó, precipitó, resuspendió y una fracción del mismo se digirió, obteniendo así unidades de glucosa, para luego cuantificar a través del método de glucosa oxidasa la concentración de glucógeno extraído. A partir de la absorbancia obtenida, utilizamos la curva de glucógeno digerido para determinar dicha concentración. Se determinó que la misma fue de 1,71 mg/ml. A la restante fracción de glucógeno purificado, precipitado y resuspendido, se la hizo reaccionar con genipina detectándose un pico de absorbancia a 600 nm, esto sugiere la presencia de grupos aminos en el polisacárido sin digerir de bacterias de este género. Cuando el mismo se digirió no logramos obtener valores de absorbancia que indiquen la presencia de glucosamina.

Un análisis similar se llevó a cabo con estrategias de glicobiología *cell-free*, realizadas *in vitro* como se detalló en metodología, siendo esta, una manera posible de determinar la presencia de glucosamina. Al polisacárido obtenido a partir de esta reacción, se lo precipitó, resuspendió y posteriormente se lo incubó con genipina, obteniendo así un pico de absorbancia a 600nm indicando la presencia de glucosamina. Empleando esta metodología de glicobiología *cell-free*, utilizando como sustratos glucógeno y GlcN-1P y posteriormente analizándolas con genipina, se obtiene como resultado reacción coloreada que absorbe a 600 nm. Esto indica que el método de glicobiología *cell-free* es eficiente para elongar polisacáridos con unidades de glucosamina.

## BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

**Asencion Diez MD, Demonte AM, Syson K, Arias DG, Gorelik A, Guerrero SA, Bornemann S, Iglesias AA.** 2015. Allosteric regulation of the partitioning of glucose-1-phosphate between glycogen and trehalose biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1850:13–21.

**Cereijo AE, Asencion Diez MD, Dávila Costa JS, Alvarez HM, Iglesias AA.** 2016. 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* 7:830.

**Cereijo A, Alvarez H, Iglesias A, Asencion Diez M.** 2020. Glucosamine-P and rhodococcal ADP-glucose pyrophosphorylases: A hint to (re)discover (actino)bacterial amino sugar metabolism. *Biochimie* 176:158–161.

**Cereijo AE, Kuhn ML, Hernández MA, Ballicora MA, Iglesias AA, Alvarez HM, Asencion Diez MD.** 2021. Study of duplicated galU genes in *Rhodococcus jostii* and a putative new metabolic node for glucosamine-1P in rhodococci. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1865.

**Cereijo AE, Ferretti MV, Iglesias AA, Alvarez HM, Asencion Diez MD.** 2024. Comparative analysis between two GT4 glycosyltransferases related to polysaccharide biosynthesis in *Rhodococcus jostii* RHA1. *Biological Chemistry*, 2024.