



## REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE GLUCÓGENO EN BACTERIAS: HACIA UN ENTENDIMIENTO DE LAS BASES MOLECULARES DE LA CATÁLISIS Y LA REGULACIÓN DE LA ADP-GLUCOSA PIROFOSFORILASA DE ORGANISMOS GRAM-POSITIVOS

**Antonela Estefanía Cereijo**

Doctorado en Ciencias Biológicas

Director: Dr. Alberto A. Iglesias

Co-Director: Dr. Matías D. Asencion Diez

Lugar de realización: Laboratorio de Enzimología Molecular, Instituto de Agrobiotecnología del Litoral (UNL-CONICET)

Fecha de defensa: 15 de mayo de 2020

antonelacereijo@gmail.com

### Resumen

El glucógeno es un polisacárido compuesto por unidades de glucosa unidas por enlaces  $\alpha 1,4$ , que presenta ramificaciones  $\alpha 1,6$ , cuya estructura está optimizada para su función metabólica. La acumulación de glucógeno ha sido ampliamente caracterizada en bacterias Gramnegativas, pero en bacterias Grampositivas los estudios en el tema son escasos.

Se caracterizaron en forma individual y conjunta las dos subunidades (GlgC y GlgD) que componen a la ADP-Glc PPasa de *R. albus*, perteneciente al grupo de los Clostridiales dentro de Firmicutes. Se estableció que las estructuras cuaternarias de GlgC y la co-expresante GlgC/GlgD es tetramérica, mientras que la conformación GlgD resultó ser monomérica. Se determinó que GlgC/GlgD tiene una actividad superior en comparación al homotetrámero GlgC. Respecto a las propiedades regulatorias, se encontraron al Pyr, PEP y Fru1,6P<sub>2</sub> como efectores de esta enzima, hallándose diferencias entre ambas conformaciones activas. De esta forma se demuestra que, en Firmicutes el paso clave en la síntesis de glucógeno estaría regulado no sólo alostéricamente, sino también a nivel estructural, según la conformación oligomérica que adopte la proteína activa.

En cuanto a las actinobacterias, hemos caracterizado la ADPGlc PPasa de *R. jostii*, una bacteria oleagínosa, la cual mostró propiedades cinético-regulatorias similares a las reportadas para otras enzimas bacterianas, aunque con un comportamiento diferencial en cuanto a la amplia diversidad de efectores que regulan su actividad. Una particularidad de la ADPGlc PPasa de *R. jostii* es la utilización de GlcN1P como sustrato alternativo, actividad que es además regulada en presencia de los efectores. En este sentido, la GlcN6P resultó activador de esta enzima, presentándose así la primera evidencia de este

metabolito como efector de una ADPGlc PPasa. Estos resultados son la primera evidencia de una relación entre el metabolismo del glucógeno y los aminoazúcares en estas bacterias.

Además, caracterizamos cinéticamente las dos UDPGlc PPasas (GalU1 y GalU2) y las dos glucógeno sintetas (GlgAb y GlgAc) de *R. jostii*. Tanto GalU1 como GalU2 fueron capaces de catalizar la formación de UDPGlc, siendo GalU2 26 veces más activa que GalU1 y presentando afinidades por los sustratos que se encuentran en el mismo orden de magnitud para ambas. Un análisis de utilización de sustratos alternativos por parte de estas dos UDPGlc PPasas de *R. jostii*, mostró que GalU2 tiene una actividad de un orden de magnitud superior en presencia de GlcN1P en comparación con Glc1P. Este novedoso resultado, en conjunto con lo mencionado anteriormente para GlgC, refleja la necesidad de profundizar en el rol de la GlcN1P en esta actinobacteria.

Por otra parte, la caracterización de GlgAb y GlgAc obtenidas en forma recombinante mostró que ambas fueron capaces de catalizar la elongación del glucano, siendo ambas específicas por el dador glucosídico ADP-Glc, mostrando GlgAc una actividad superior a GlgAb. Recientemente, se ha informado que la GlgA micobacteriana cataliza la síntesis de Mal1P a partir de Glc1P y ADPGlc. Al evaluar la actividad de formación de Mal1P por parte de ambas GlgAs de *R. jostii*, determinamos que GlgAc posee una actividad dos órdenes de magnitud superior para la síntesis del disacárido, en comparación con la elongación del glucano. Estos resultados, al igual que los obtenidos para las dos UDPGlc PPasas de *R. jostii*, ponen en evidencia que la duplicación génica presentada por esta bacteria, no representa necesariamente una redundancia funcional, ya que en ambos casos estudiados, hemos mostrado que las enzimas se especializaron para cumplir funciones diferenciales.

En conjunto con los resultados obtenidos *in vitro*, hemos realizado un estudio comparativo *in vivo* respecto a la partición del carbono y la acumulación de compuestos de reserva entre dos especies de *Rhodococcus*: *R. jostii* RHA1 y *R. fascians* F7. Los resultados indican una variabilidad generada en el contexto metabólico dependiendo la fuente de carbono proporcionada a estas especies de *Rhodococcus*. Asimismo, se observaron diferencias en los perfiles de acumulación de los compuestos de reserva evaluados (glucógeno, trehalosa y lípidos/TAG), tanto entre las dos especies rhodococcales estudiadas, así como también dependiendo de la fuente de carbono proporcionada o fase de crecimiento analizada.

Vistos de manera global, los conocimientos generados relacionados a la biosíntesis, regulación y relación de los principales compuestos de reserva en *Rhodococcus* spp. nos aportan una mejor comprensión de los contextos metabólicos de estas bacterias, los que resultan críticos para determinar las mejores condiciones de utilización de estos microorganismos como herramienta biotecnológica. El conocimiento básico en esta área es, y será, relevante en la incorporación de esta bacteria oleaginoso en la industria, para la producción (por ejemplo) de biocombustibles y biomateriales, así como para su utilización en procesos de biorremediación.

## Abstract

### **REGULATION OF GLYCOGEN SYNTHESIS IN BACTERIA: TOWARDS AN UNDERSTANDING OF THE MOLECULAR BASIS FOR THE CATALYSIS AND REGULATION OF THE ADP-GLUCOSE PYROPHOSPHORYLASE IN GRAM-POSITIVE**

It has been evidenced that ADP-glucose pyrophosphorylase is the key regulatory enzyme in the pathway for bacterial glycogen biosynthesis. Regarding Gram-positive microorganisms, the available information is scarce, and the understanding of the occurrence and regulation of the polysaccharide metabolism is far from complete. In this context, in the present thesis work we studied this key enzyme as an approach to the understanding of the occurrence and regulation of glycogen metabolism in Gram-positive. The study was extended (within Actinobacteria) to other enzymes involved in: (i) glucose-1P partitioning, like UDP-glucose pyrophosphorylase; or (ii) glycosyl donor utilization, like glycogen synthase belonging to *Rhodococcus* spp. Besides, we complemented the in vitro analysis, with in vivo studies about carbon partitioning and storage compounds synthesis in rhodococcal species.

In a whole view, the generated knowledge in this thesis work, both in vitro and in vivo, about the biosynthesis, regulation, and relation between the main storage compounds in *Rhodococcus* spp., allow a better understanding related to these bacteria metabolic context. Knowing these metabolic scenarios, would be critical to determine the best use conditions of these microorganisms as a biotechnological tool. Basic knowledge generated in this area will be relevant at industrial using of these oleaginous bacteria, for the production of biofuel and biomaterial, and even to propose its utilization in processes of bioremediation.