



ESTUDIO ESTRUCTURA-FUNCIÓN Y REGULACIÓN EN ENZIMAS DEL METABOLISMO DEL CARBONO Y DE LA GENERACIÓN DEL PODER REDUCTOR EN CÉLULAS AUTÓTROFAS

Robertino José Muchut

Doctorado en Ciencias Biológicas

Director: Dr. Sergio Adrián Guerrero

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

Fecha de la defensa: 28 de febrero de 2020

robertinomuchut@gmail.com

Resumen

Euglena gracilis es un protista unicelular fotosintético, perteneciente al filo Euglenozoa, capaz de crecer en condiciones auto-, hetero- y mixotróficas, con capacidad de sintetizar diversos bioproductos de interés comercial, siendo una excelente fuente de proteína dietaria, vitaminas, lípidos y paramilon. Los rendimientos de los diversos bioproductos en *E. gracilis* son dependientes de las condiciones de cultivo, resultando elevados en comparación con otros sistemas de microalgas, destacando el potencial uso a nivel bioindustrial y para futuros desarrollos biotecnológicos de *E. gracilis*. Esta microalga, acumula grandes cantidades del polisacárido de reserva paramilon, un β 1,3glucano, alcanzando valores superiores al 50% de su peso seco celular. Este polímero, se deposita como gránulos en el citosol y es utilizado como fuente de carbono y energía. El paramilon es de especial interés ya que se ha descrito como inmunoestimulante y bioactivo como antimicrobiano. Además, el paramilon acumulado en *E. gracilis*, mediante un proceso denominado “fermentación de ceras”, es movilizado hacia la síntesis de ceras cuando las células se encuentran en anaerobiosis, ausencia de una fuente de carbono externa y oscuridad. Permitiéndole obtener energía sin perder el carbono que fuera acumulado, dando lugar a rendimientos de ceras superiores al 50% de la biomasa seca.

En este contexto, se realizaron estudios bioquímicos en *E. gracilis*, relacionados a la partición del carbono en cuanto a la síntesis y degradación del paramilon. Abordando el análisis de la UDPglucosa pirofosforilasa (EC 2.7.7.9; UDPGlc PPasa) y la UDPazúcar pirofosforilasa (EC 2.7.7.64; UDPazúcar PPasa), así como también la paramilon sintasa (EC 2.4.1.34; PS) y una β 1,3glucanasa de la familia de glicosil hidrolasa 17 (EC 3.2.1.39; GH17). Los estudios *in vitro* se complementaron con análisis *in vivo*, y en conjunto permitieron aportar al conocimiento respecto al metabolismo del carbono en esta microalga.

Primeramente se caracterizaron los cultivos de *E. gracilis*, determinando los tiempos de duplicación, así como también la acumulación de paramilon y ceras en las diferentes condiciones de cultivo. El paramilon es sintetizado mediante la transferencia de una unidad de Glc a partir de UDPGlc a su extremo no reductor. Teniendo la UDPGlc PPasa un rol importante en la síntesis del paramilon y otras vías metabólicas en *E. gracilis*, al ser la enzima encargada de proveer las unidades de UDPGlc. Se caracterizó cinética y estructuralmente la UDPGlc PPasa obtenida en forma recombinante, exhibiendo la enzima una estructura funcional monomérica comparable a otras UDPGlc PPasas de protozoos. Se comprobó que la UDPGlc PPasa es regulada mediante un mecanismo post-traducciona l de tipo redox, tanto *in vitro* como *in vivo*. Se determinó también su ubicación subcelular como así también su funcionalidad *in vivo* mediante técnicas de silenciamiento, analizándola junto a la funcionalidad de la UDPazúcar PPasa dado que la misma podría ser capaz de catalizar el mismo paso metabólico que la UDPGlc PPasa en la producción de las unidades de UDPGlc necesarias para la síntesis de paramilon, la cual podría a su vez llegar a partir de la interconversión de la UDPGal en UDP-Glc generada por la UDPazúcar PPasa.

La PS, elonga el β 1,3glucano, utilizando UDPGlc como sustrato. La misma está anclada a la membrana que rodea al granulo de paramilon. Por lo tanto, con el objetivo de utilizar esta enzima como marcador subcelular, se produjo la expresión recombinante para utilizarla como antígeno en la generación de anticuerpos policlonales en el diseño de una herramienta de marcación sub-celular.

Para completar el metabolismo del paramilon, se debe tener en cuenta su degradación, existiendo diferentes endo- y exo- β 1,3glucanasas encargadas de hidrolizar los enlaces glucosídicos de este polímero. La caracterización cinética de la GH17, obtenida en forma recombinante, pudo hidrolizar tanto el paramilon, generando un aumento en el número de extremos reductores, como así también a partir del sustrato soluble laminarina, siendo 3 veces menos eficiente por el primero. Partiendo de la hipótesis de que la menor afinidad por paramilon se debe a su insolubilidad, se planteó la fusión de un dominio de unión a carbohidratos (CBM) que permita aumentar la afinidad de la enzima por el paramilon. En el análisis *in vivo* de células de *E. gracilis* silenciadas para esta GH17 presentaron una actividad β 1,3glucanasa inferior respecto al control.

Visto de manera global, tanto de la caracterización *in vitro* como *in vivo*, nos acercan a un entendimiento respecto a la partición del carbono en la síntesis y degradación del paramilon en *E. gracilis*. Asimismo, se logró la puesta a punto y generación de diversas herramientas para la utilización y manipulación de esta microalga de interés biotecnológico. En conjunto, el conocimiento desarrollado mediante ciencia básica para *E. gracilis*, será relevante para el diseño de estrategias para su utilización posibles desarrollos biotecnológicos.

Abstract

STUDY OF STRUCTURE-FUNCTION AND REGULATION IN ENZYMES OF CARBON METABOLISM AND THE GENERATION OF REDUCING POWER IN AUTOTROPHIC CELLS

Euglena gracilis is a photosynthetic unicellular protist, capable of growing under auto-, hetero- and mixotrophic conditions. *E. gracilis* can synthesize several bioproducts of interest including paramylon, a reserve polysaccharide. It is a β 1,3glucan, which has a special interest since it has been described as immunostimulant and bioactive as antimicrobial.

Studies on *E. gracilis*, related to carbon partition in terms of synthesis and degradation of paramylon were executed. In this context, a biochemical analysis of UDP-glucose pyrophosphorylase (EC 2.7.7.9; UDP-Glc PPase), UDP-sugar pyrophosphorylase (EC 2.7.7.64; UDP-sugar PPase), paramylon synthase (EC 2.4.1.34; PS) and a β -1,3-glucanase of the glycosyl hydrolase family 17 (EC 3.2.1.39; GH17) were carried out.

E. gracilis cells grown under different conditions were characterized by assessing paramylon accumulation. The recombinant UDP-Glc PPase was characterized in a kinetic, structural and regulatory manner. On the other hand, functionality was analyzed in vivo by silencing. In addition, the functionality of the UDPsugar PPase was analyzed together to UDPGlc PPase. The PS, elongate the β 1,3glucan and as it is anchored to membrane surrounding paramylon granules. It was used in the design of a subcellular labeling tool using polyclonal antibodies.

Different β 1,3glucanases influence paramylon degradation. Functionality, in vivo, GH17 was analyzed by silencing its translation. In addition, recombinant GH17 hydrolyzed both, paramylon and laminarin, being 3 times less efficient with first one.

Thus, in vitro studies were complemented with in vivo analysis, allowing together to contribute on knowledge regarding carbon metabolism in this photosynthetic microalgae *Euglena gracilis*.