

Resúmenes de Tesis: Doctorado en Ciencias Biológicas

Caracterización cinética, regulatoria y estructural de enzimas involucradas en el metabolismo de polisacáridos de reserva en bacterias

Matías D. Asención Diez

masencion@fbcb.un.edu.ar

Dr. Alberto A. Iglesias

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas

Laboratorio de Enzimología Molecular, Instituto de Agrobiotecnología del Litoral

Bioquímica y Ciencias Biológicas

Universidad Nacional del Litoral

Fecha de la defensa: 12/03/13

Resumen

La presencia de glucógeno se ha confirmado en más de 50 especies procariontas. En bacterias, el metabolismo de carbohidratos ocurre con características generales comunes; no obstante, algunos microorganismos presentan variaciones en las rutas metabólicas y las enzimas involucradas exhiben comportamientos distintivos. La acumulación de glucógeno es un hecho ampliamente caracterizado en bacterias Gram negativas, aunque en bacterias Gram-positivas es todavía un déficit.

En Gram-negativos, se han esclarecido las etapas de la síntesis del glucógeno y las enzimas involucradas en cada paso; así como también se ha puesto en evidencia que la ADP-glucosa pirofosforilasa (ADP-Glc PPasa) cataliza la activación del residuo glucosilo, siendo la enzima regulatoria en el camino de biosíntesis del glucógeno bacteriano. En lo que respecta a microorganismos del grupo Gram positivo, la información

es marcadamente menor. De hecho, entre los pocos estudios realizados se había sugerido que la síntesis de glucógeno, a diferencia de lo que ocurre en la mayoría de los organismos, carece de regulación. Por todo esto, en el presente trabajo de tesis se realizaron estudios a nivel enzimático que permitieron obtener información sobre la ocurrencia y regulación del metabolismo del glucógeno y otros oligosacáridos. Se estudiaron exhaustivamente las ADP-Glc PPasas procedentes de distintas bacterias Gram positivas. El estudio se extendió, en el caso de Actinobacterias, a otras enzimas relacionadas a la utilización de Glc-1P, como las UDP-Glc PPasas o a la utilización de los dadores glucosídicos, como las GSasas o la Tre-6Pasa micobacteriana.

En este sentido, los estudios se realizaron sobre microorganismos pertenecientes tanto al grupo Firmicutes (bajo contenido G+C), puntualmente *Streptococcus mutans*, como a Actinobacterias (alto contenido G+C), particularmente *Streptomyces coelicolor* y *Mycobacterium tuberculosis*.

Se clonaron los genes que codifican para las dos subunidades (GlgC y GlgD) que componen la ADP-Glc PPasa de *S. mutans*. Se expresaron en células de *Escherichia coli* en forma separada y conjuntamente mediante coexpresión con vectores compatibles o un plásmido de expresión policistronica. El análisis de la actividad enzimática

de los extractos celulares solubles permitió concluir que la subunidad GlgD aislada no es activa, a diferencia de la subunidad GlgC. La expresión conjunta de ambos genes tiene una actividad un orden de magnitud mayor. Se determinaron que las estructuras cuaternarias de ambas conformaciones activas es tetramérica. Se caracterizaron cinética y regulatoriamente ambas conformaciones, determinándose que la estructura GlgC/GlgD tiene una actividad un orden de magnitud y una afinidad 50 veces mayor por Glc-1P respecto del homotetrámero GlgC. Respecto a las propiedades regulatorias, se encontraron diferencias entre ambas conformaciones: el homotetrámero GlgC es activado por Fru-1,6-bisP mientras que GlgC/GlgD no; el heterotetrámero GlgC/GlgD es inhibido diferencialmente por PEP mientras que GlgC es insensible al PEP. Ambas conformaciones son inhibidas por P_i . La caracterización de la ADP-Glc PPasa de *S. mutans* demuestra que en Firmicutes, el paso clave en la síntesis de glucógeno estaría regulado no solo alostéricamente, sino a un nivel estructural, según la conformación que adopte la enzima. Esto, constituye una sustancial diferencia respecto a los antecedentes, dado que la única ADP-Glc PPasa heterotetramérica caracterizada resultó insensible a efectores.

En cuanto a las enzimas de bacterias de alto contenido G+C, en el caso de *S. coelicolor*, se clonó el gen que codifica para la ADP-Glc PPasa y mediante la coexpresión con chaperonas en células de *E. coli*, se obtuvo la proteína GlgC activa en cantidades suficientes como para realizar los estudios enzimáticos planteados en los objetivos. La caracterización de la enzima recombinante mostró propiedades cinético-regulatorias similares a las reportadas

para otras enzimas bacterianas y un comportamiento distintivo en cuanto a la especificidad de efectores. Efectivamente, la activación de la enzima de *S. coelicolor* por el fosfoenolpiruvato y la glucosa-6-fosfato no había sido descrita para otras ADP-Glc PPasas. El efecto de Glc6P es marcado en cuanto a las veces de activación y con elevada afinidad. Otro rasgo particular, es la inhibición por NADPH que modifica la activación por la Glc6P.

En bacterias Gram positivas la ADP-Glc PPasa posee propiedades regulatorias y/o estructurales características y diferentes a las encontradas para la enzima de las bacterias Gram negativas, las cianobacterias, las algas verdes y las plantas superiores.

Vistos de manera global, los resultados de este trabajo pueden utilizarse para acercarse a un mejor entendimiento del metabolismo de carbohidratos en bacterias Gram-positivas. Además, el estudio de la ADP-Glc PPasa de Actinobacterias y Firmicutes ha permitido encontrar nuevas propiedades regulatorias en esta familia de enzimas.

Kinetic, regulatory and structural characterization of enzymes involved in bacterial storage polysaccharides

Summary

The accumulation of glycogen has been relatively well characterized in Gram negative bacteria. It has been evidenced that ADP-glucose pyrophosphorylase (ADPGlc PPase) catalyzes the step of synthesis of the glycosyl donor for glycogen elongation, being 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. The steps concerning glycogen synthesis were elucidated in Gram-negative bacteria and it was established that the committed step is given by the ADP-Glc PPase, an allosteric enzyme regulated by molecules from the main carbon assimilation route in the organism. The experimental work of this thesis mainly involved studies on the occurrence and regulation of glycogen synthesis in Gram positive bacteria. The focus was the molecular cloning and characterization of ADPGlc PPase from: i) the Firmicutes group (low G+C content), which representative microorganism is *Streptococcus mutans*; and ii) those orga-

nisms with high G+C content, particularly the *Streptomyces coelicolor* and *Mycobacterium tuberculosis*. The most relevant contribution of this work relies in establishing that ADPGlc PPase in Gram positive bacteria possesses regulatory and structural properties distinctive from those found for the enzyme from Gram negative bacteria, cyanobacteria, green algae and higher plants. Additionally, in this work they were obtained key molecular tools for future studies on structure regulation-relationship, allowing reaching a more comprehensive understanding of the distinctive characteristics of the enzyme in the different natural sources.

Estudio de la respuesta inmune, innata y adquirida, en equinos infectados con el Virus de la Anemia Infecciosa Equina

Alejandra Bailat

abailat@fbc.unl.edu.ar

Dra. Ileana Malan Borel

Laboratorio de Inmunología Básica

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas

Universidad Nacional del Litoral

Fecha de la defensa: 01/03/2013

Resumen

El Virus de la Anemia Infecciosa Equina (VAIE) es un retrovirus que ocasiona una enfermedad persistente en equinos, cuya evolución es característica; de curso cíclico y dinámico, y culmina en una prolongada fase asintomática que perdura por el resto de la vida del huésped. Esta etapa de la Anemia Infecciosa Equina implica un estado de equilibrio permanente entre la infección viral y el sistema inmune del animal.

En equinos cursando la etapa de portador inaparente, se observó que una inmunodepresión transitoria traía como consecuencia la recrudescencia de la infección, aumentando la replicación viral y generando un nuevo pico febril. Sin embargo, al restituirse el sistema inmunológico, disminuía la viremia y los equinos volvían al estado asintomático. A partir de estas observaciones, se le asignó al sistema inmune un papel fundamental en el control de la replicación viral en este estadio de la infección. Sin embargo, los mecanismos inmunológicos involucrados en la manutención de este delicado equilibrio no están dilucidados.

El objetivo del presente trabajo consistió en analizar la participación de receptores celulares y citoquinas, pertenecientes tanto a la inmunidad innata como adaptativa, en