

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



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

Estudio de estructura-función y regulación en enzimas del metabolismo del carbono y de la generación del poder reductor en células autótrofas

Lic. Robertino José Muchut

Director: Dr. Sergio A. Guerrero

Laboratorio de Enzimología Molecular

Instituto de Agrobiotecnología del Litoral (UNL-CONICET)

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas

Universidad Nacional del Litoral

-2020-

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a las instituciones que hicieron posible el desarrollo de este trabajo de Tesis. A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral y al Instituto de Agrobiotecnología del Litoral por darme el espacio. Agradezco a CONICET por la beca doctoral otorgada que me permitió realizar este trabajo de tesis.

Quiero agradecer al Dr. Alberto A. Iglesias por permitirme ser parte de su grupo de trabajo en el Laboratorio de Enzimología Molecular, también agradecerle por la confianza puesta en mí, los comentarios y sugerencias que me ayudaron al desarrollo del trabajo durante estos años.

A mí director, el Dr. Sergio A. Guerrero por confiar en mí y darme la oportunidad de formar parte de su línea de investigación y dirigir este trabajo. Por todos sus aportes, consejos y exigencias que han impulsado el desarrollo de este trabajo de Tesis.

A los diferentes integrantes de los laboratorios del Instituto de Agrobiotecnología del Litoral por sus aportes, predisposición y equipamiento compartido que permitieron el desarrollo de este trabajo. Particularmente quiero agradecer a la Directora del IAL, Dra. Raquel L. Chan por su amabilidad y predisposición, como así también a Emilio por estar siempre disponible y ayudar a solucionar los problemas con diversos trámites.

A los compañeros del laboratorio, por las tantas horas compartidas y estar siempre presentes para los momentos serios de discusión de resultados y cuando las infinidad de veces las cosas no funcionan para dar sus aportes y posibles soluciones, como también los momentos de distensión extra-laboratorio compartidos.

Gracias a Ana, por ser la madre sustituta de todos en el lab. La persona que está siempre dispuesta a escuchar, y se preocupa por todos. Por las largas charlas compartidas de temas que mucha gente no comprende, y por supuesto las discusiones sobre las microalgas y las luchas con los cultivos y sus contaminaciones. Y no puedo olvidar el desafío de intentar transformarlas que lamentablemente no llegamos a concretar.. Por último, pero no por eso menos importante, gracias por los hidratos de carbono aportados que hacen mucho más llevaderos y felices los largos días de trabajo!!

A Diego, por las MUY largas discusiones que me ayudaron a mi formación y a pensar mejor cada ensayo en el día a día. Por todas las sugerencias y ayudas recibidas a lo largo de estos años, como así también todas las charlas que van desde la ciencia, funcionamiento del laboratorio, pasando por política hasta la vida cotidiana a altas horas de la noche mientras

terminábamos los ensayos. Y por inculcarnos a todos el orden y limpieza en el laboratorio y tu toc por alinear todo que nos deleita todos los días.

A Carlos, Matías y Vanesa por su colaboración y sugerencias a lo largo de estos años.

A los que estuvieron en los inicios de esta Tesis pero que hoy no se encuentran en el lab Anita, Ceci, Esteban, Vicky C, Mati y Nati. Anita, gracias por tus consejos con la parte redox y los infinitos momentos compartidos. Ceci por los momentos y experiencias compartidas en el área de las microalgas. Esteban por la colaboración con las ceras y tantos momentos compartidos tanto intra como extra lab. Vicky C o más conocida como niña mosca, por tantos momentos compartidos y tantas cervezas compartidas. Mati, por ser un gran compañero de laboratorio con tu personalidad particular. Nati, gran compañera de laboratorio y amiga, por tantos momentos únicos compartidos y tu infinidad de frases célebres que aún hoy seguimos recordando y riéndonos como el primer día!!

A los un poco más jóvenes “del otro lado”, algunos de los representantes de “los obtusos”, Bruno, Vicky y Romi. Por tantas discusiones y momentos compartidos tanto en el laboratorio como fuera del mismo. Especialmente a Romina por ser una gran amiga, con algunos toc’s particulares, y los tantos momentos compartidos tanto intra como extra-lab.

A los jóvenes de “este lado”, que felizmente integramos el grupo de “ridículos” que todos quieren ser parte Alem, Rodrigo, Franco y Nadia. Franco y Nadia, los más “nuevitos” de los becarios, por los tantos momentos compartidos en el laboratorio entre ensayos, mates, discusiones de resultados y obviamente temas varios, Franco por tus historias y Nadia por ser siempre la primera en ofrecerse para buscar agua para el mate. Alem y Rodri, los ya no tan “nuevitos” por ser grandes compañeros de laboratorio, por las tantas discusiones y miles de mates que hacen mucho más alegres el día a día. A Rodri particularmente por ser compañero Euglenoso, compartiendo los logros y derrotas!

A los nuevitos, Tomas, Pilar, Agustín, Emi, Sofía, Martin por los momentos compartidos.

Finalizando, quiero agradecer a dos personas que las considero muy especiales que me han acompañado durante estos años, pertenecientes al clan de “obtusos”, llevando sus doctorados junto a mí codo a codo adelante. Dani «la pululanasas» gran amiga minion, gracias por hacer tus rondas diarias pululando por el lab dándonos unos minutos de distracción y risas que hicieron este doctorado mucho más llevadero y gracias por tu toque artístico!!. Anto, sin lugar a dudas esto no hubiera sido lo mismo sin tu acompañamiento todos estos años. Mil gracias por toda la ayuda, discusiones, sugerencias y retos que me diste junto al acompañamiento día a día.

Por último quiero agradecer a mi familia por el acompañamiento brindado todos estos años.

GRACIAS!!

PUBLICACIONES

El presente trabajo de tesis fue desarrollado en el Laboratorio de Enzimología Molecular, del Instituto de Agrobiotecnología del Litoral y la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, bajo la dirección del Dr. Sergio A. Guerrero.

Parte de los resultados de esta Tesis fueron publicados en:

- RJ Muchut, RD Calloni, FE Herrera, SA Garay, DG Arias, AA Iglesias, SA Guerrero. *“Elucidating paramylon and other carbohydrate metabolism in Euglena gracilis: Kinetic characterization, structure and cellular localization of UDP-glucose pyrophosphorylase”*. BIOCHIMIE; Paris; (2018) vol. 154 p. 176-186. DOI: 10.1016/j.biochi.2018.09.006

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| RESUMEN | 1 |
| ABSTRACT | 6 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 10 |
| 1.1. Evolución: generación de las especies | 10 |
| 1.2. Microalgas | 13 |
| 1.3. <i>Euglena gracilis</i> , evolución y características | 15 |
| 1.3.1. Clasificación evolutiva | 15 |
| 1.3.2. Características del cultivo..... | 18 |
| 1.3.3. Morfología celular | 19 |
| 1.4. Acumulación de carbono en <i>Euglena gracilis</i> | 21 |
| 1.5. Metabolismo del carbono en <i>Euglena gracilis</i> | 24 |
| 1.5.1. Enzimas activas en carbohidratos..... | 24 |
| 1.5.2. Perfiles de nucleótidos-azúcar en <i>Euglena gracilis</i> | 25 |
| 1.6. Enzimas involucradas en la partición de la glucosa | 26 |
| 1.6.1. La familia de las NDP-azúcar pirofosforilasas..... | 27 |
| 1.6.1.1 La UDP-glucosa pirofosforilasa..... | 28 |
| 1.6.1.2. Las UDP-azúcar pirofosforilasas | 30 |
| 1.6.2. UDP-glucosa β -1,3-glucano glicosil transferasa | 30 |
| 1.6.3. β -1,3-glucanasas | 31 |
| 2. OBJETIVOS | 34 |
| 2.1. Objetivos generales | 34 |
| 2.2. Objetivos específicos..... | 34 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS | 35 |
| 3.1. Reactivos químicos y materiales | 35 |
| 3.2. Microorganismos, plásmidos, medios de cultivo y antibióticos | 35 |
| 3.2.1. Cepas bacterianas | 35 |
| 3.2.2 Microalgas | 36 |
| 3.2.3. Plásmidos..... | 36 |
| 3.2.4. Medios de cultivo | 38 |

| | |
|---|----|
| 3.2.5. Antibióticos | 38 |
| 3.3. Metodología utilizada en biología molecular | 38 |
| 3.3.1. Oligonucleótidos..... | 38 |
| 3.3.2. Extracción de ARN total..... | 40 |
| 3.3.3. Determinación de la concentración y pureza del ARN | 40 |
| 3.3.4. Reacción de la transcripción reversa del ARN..... | 40 |
| 3.3.5. Amplificación de ADN. Reacción en cadena de la polimerasa..... | 40 |
| 3.3.6. Purificación de ADN a partir de gel de agarosa | 41 |
| 3.3.7. Tratamiento con <i>Taq</i> ADN polimerasa | 41 |
| 3.3.8. Clonado de los genes amplificados por PCR..... | 41 |
| 3.3.9. Transformación de bacterias competentes..... | 42 |
| 3.3.10. Minipreparación de ADN plasmídico..... | 42 |
| 3.3.11. Secuenciación de ADN..... | 42 |
| 3.3.12. Digestión de ADN con enzimas de restricción..... | 43 |
| 3.3.13. Precipitación de ADN..... | 43 |
| 3.3.14. Ligación de fragmentos de ADN..... | 43 |
| 3.3.15. Síntesis de ARN doble cadena para ARN de interferencia | 44 |
| 3.3.16. Electroporación de células de <i>E. gracilis</i> para realizar ARN de interferencia | 45 |
| 3.3.17. Expresión de las proteínas recombinantes..... | 45 |
| 3.3.18. Purificación de las proteínas recombinantes | 45 |
| 3.4. Métodos bioquímicos básicos | 46 |
| 3.4.1. Electroforesis en gel de agarosa | 46 |
| 3.4.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida | 46 |
| 3.4.3. Electrotransferencia seguida de inmunodetección | 47 |
| 3.4.4. Cuantificación del contenido proteico | 48 |
| 3.4.5. Desalado y concentración de proteínas | 48 |
| 3.4.6 Extracto de proteínas de <i>E. gracilis</i> | 48 |
| 3.4.7 Cuantificación de tioles | 49 |
| 3.4.8 Ensayos de oxidación, alquilación y reducción..... | 49 |
| 3.5. Metodología de análisis enzimático | 49 |
| 3.5.1. Medida de actividad enzimática para NDP-azúcar pirofosforilasas..... | 49 |
| 3.5.2. Medida de actividad enzimática para β -1,3-glucanasas | 50 |
| 3.5.3. Determinación de parámetros cinéticos..... | 50 |
| 3.6. Cromatografía de exclusión molecular. Determinación de las masas moleculares | 51 |

| | |
|---|-----------|
| 3.7 Modelado Molecular | 51 |
| 3.8 Inmunolocalización celular por microscopía confocal..... | 52 |
| 3.9. Extracción y cuantificación de paramilon | 52 |
| 3.9.1. Extracción..... | 52 |
| 3.9.2. Cuantificación..... | 52 |
| 3.10. Extracción y tipificación de ceras | 53 |
| 3.10.1. Extracción..... | 53 |
| 3.10.2. Tipificación..... | 53 |
| 4. RESULTADOS..... | 55 |
| 4.1. <i>Euglena gracilis</i> , cultivos y almacenamiento de carbono | 55 |
| 4.1.1. Curvas de crecimiento | 55 |
| 4.1.2. Acumulación de paramilon..... | 57 |
| 4.1.3. Acumulación de ceras..... | 59 |
| 4.2. Partición del carbono en <i>E. gracilis</i> | 62 |
| 4.2.1. Caracterización <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> de la UDP-glucosa pirofosforilasa | 62 |
| 4.2.1.1. Clonado y expresión recombinante de la UDP-Glc PPasa..... | 63 |
| 4.2.1.2. Caracterización estructural UDP-Glc PPasa recombinante..... | 64 |
| 4.2.1.3. Caracterización cinética de la UDP-Glc PPasa recombinante | 65 |
| 4.2.1.4. Análisis de actividad UDP-Glc PPasa a extractos de <i>E. gracilis</i> | 67 |
| 4.2.1.5. Localización subcelular de la UDP-Glc pirofosforilasa de <i>E. gracilis</i> | 68 |
| 4.2.1.6. Regulación de la UDP-Glc PPasa | 71 |
| 4.2.1.7. Silenciamiento por ARN de interferencia | 88 |
| 4.2.2. Caracterización <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> de la UDP-azúcar pirofosforilasa | 94 |
| 4.2.2.1. Clonado y expresión recombinante de las UDP-azúcar PPasas | 94 |
| 4.2.2.2. Silenciamiento por ARN de interferencia | 101 |
| 4.2.2.3. Doble silenciamiento por ARN de interferencia | 106 |
| 4.3. Síntesis de compuestos de reserva de carbono en <i>E. gracilis</i> | 111 |
| 4.3.1. UDP-glucosa β -1,3-glucano glicosil transferasa | 111 |
| 4.4. Degradación de compuestos de reserva de carbono en <i>E. gracilis</i> | 117 |
| 4.4.1. Caracterización <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> de la β -1,3-glucanasa de la familia GH17 | 117 |
| 4.4.1.1. Clonado y expresión recombinante de la GH17..... | 117 |
| 4.4.1.2. Caracterización cinética de la GH17 recombinante | 118 |
| 4.4.1.3. Análisis de la actividad β -1,3-glucanasa a extractos de <i>E. gracilis</i> | 122 |
| 4.4.1.4. Silenciamiento por ARN de interferencia | 124 |

| | |
|------------------------------|------------|
| 5. DISCUSIÓN..... | 129 |
| 6. CONCLUSIONES..... | 144 |
| 7. BIBLIOGRAFIA | 148 |

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

| | |
|-----------------|---|
| β -Glc-1P | β -glucosa-1-fosfato |
| $\times g$ | fuerza centrífuga relativa |
| $^{\circ}C$ | grados Celsius |
| μl | microlitro |
| μm | micrómetro |
| μM | micromolar |
| μmol | micromol |
| aa | aminoácido |
| ADN | ácido desoxirribonucleico |
| ADNc | ácido desoxirribonucleico copia |
| ADP | adenosina-5'-difosfato |
| ADP-Glc PPasa | adenosina-5'-difosfo- α -glucosa pirofosforilasa |
| ADP-Glc | adenosina-5'-difosfo- α -glucosa |
| ADP-Rib | adenosina-5'-difosfo ribosa |
| ARN | ácido ribonucleico |
| ARNi | ácido ribonucleico de interferencia |
| ARNm | ácido ribonucleico mensajero |
| ATP | adenosina-5'-trifosfato |
| BSA | albúmina sérica bovina |
| CBM | módulo de unión a carbohidratos |
| cel | células |
| CO ₂ | dióxido de carbono |
| -CoA | coenzima A |
| CTP | citocina-5'-trifosfato |
| CyM | medio de cultivo Cramer y Myers |
| Cys | cisteína |
| CysNO | S-nitroso-cisteína |
| dATP | desoxi adenosina-5'-trifosfato |
| DMSO | dimetilsulfóxido |
| DTT | ditiotreitól |
| DO | densidad óptica |
| EGM | medio de cultivo <i>Euglena gracilis</i> |
| Fru-1P | fructosa-1-fosfato |
| Fru-6P | fructosa-6-fosfato |
| g | gramo |
| Gal | galactosa |
| Gal-1P | galactosa-1-fosfato |
| GalA-1P | ácido galacturónico-1-fosfato |
| GalT | galactose-1-fosfato uridililtransferasa |
| GDP-Man | guanósina-5'-difosfato- α -manosa |
| GH | glicosil hidrolasas |
| Glc | glucosa |

| | |
|-------------------------------|--|
| Glc-1P | α -glucosa-1-fosfato |
| Glc-6P | glucosa-6-fosfato |
| GlcA-1P | ácido glucurónico-1-fosfato |
| GlcN-1P | glucosamina-1-fosfato |
| GlcNAc-1P | N-acetilglucosamina-1-fosfato |
| GSSG | glutación disulfuro |
| GT | glicosil transferasas |
| GTP | guanosina-5'-trifosfato |
| h | hora |
| H ₂ O ₂ | peróxido de hidrógeno |
| IAM | iodoacetamida |
| IMAC | cromatografía de afinidad por metal inmovilizado |
| IPTG | isopropil- β -D-tiogalactopiranosido |
| K _{av} | coeficiente de partición |
| k _{cat} | constante catalítica |
| kDa | kiloDalton |
| L-Ara-1P | L-arabinosa-1-fosfato |
| LB | <i>Lysogeny Broth</i> |
| Leu | leucina |
| Man | manosa |
| Met | metionina |
| mg | miligramo |
| min | minuto |
| ml | mililitro |
| mM | milimolar |
| MMM | marcador masa molecular |
| MOPS | ácido 3-[N-morfolino] propano sulfónico |
| NDP-azúcar | nucleosido-5'-difosfo-azúcar |
| NDP-Glc | nucleosido-5'-difosfo-glucosa |
| NDP-Glc PPasa | nucleosido-5'-difosfo-glucosa pirofosforilasa |
| nm | nanómetro |
| nmol | nanomol |
| O ₃ | ozono |
| -P | éster fosfato |
| 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> |
| Pi | fosfato inorgánico |
| PPi | pirofosfato inorgánico |
| Rha | ramnosa |
| s | segundo |

| | |
|------------------|---|
| SDS | dodecil sulfato de sodio |
| TAE | solución Tris-acético-EDTA |
| TDP-Glc | timidina-5'-difosfo- α -glucosa |
| TRX | tiorredoxina |
| U | unidades internacionales de actividad enzimática |
| UDP | uridina-5'-difosfato |
| UDP-azúcar PPasa | uridina-5'-difosfo azúcar pirofosforilasa |
| UDP-Gal | uridina-5'-difosfo- α -galactosa |
| UDP-Gal PPasa | uridina-5'-difosfo galactosa pirofosforilasa |
| UDP-Glc | uridina-5'-difosfo- α -glucosa |
| UDP-Glc PPasa | uridina-5'-difosfo glucosa pirofosforilasa |
| UDP-GlcA | uridina-5'-difosfo- α -glucuronato |
| UDP-GlcNAc | uridina-5'-difosfo- α -N-acetilglucosamina |
| UDP-Xyl | uridina-5'-difosfo xilosa |
| UTP | uridina-5'-trifosfato |
| UV-C | radiación ultravioleta (280 a 100 nm) |
| v/v | volumen en volumen |
| V_{\max} | velocidad máxima |
| Xyl | xilosa |
| Xyl-1P | xilosa-1-fosfato |

RESUMEN

Los Euglenophyceae son organismos flagelados pertenecientes al filo protista Euglenozoa, el cual también incluye a los Kinetoplastea. Este filo se encuentra dentro del grupo Excavata, considerado como el más antiguo dentro de los eucariotas. *Euglena gracilis* es un protista fototrófico unicelular capaz de crecer en condiciones autotróficas, heterotróficas y mixotróficas y posee la capacidad de sintetizar diversos bioproductos de interés comercial. Esta microalga es una excelente fuente de proteína dietaria, vitaminas, lípidos y del β -1,3-glucano paramilon, únicamente encontrado en Euglenophyceae. Los rendimientos de estos diversos bioproductos en *E. gracilis*, crecidas en las diferentes condiciones, son elevados en comparación con los alcanzados en otros sistemas de microalgas, lo que destaca su potencial de uso a nivel bioindustrial y para futuros desarrollos biotecnológicos.

E. gracilis puede acumular grandes cantidades del polisacárido de reserva paramilon, un β -1,3-glucano, que puede constituir hasta el 90% de su peso seco celular. Este polímero, sintetizado únicamente por Euglenophyceae, se deposita como gránulos en el citosol y es fácilmente degradado para proveer una fuente de carbono ante situaciones adversas. Este poliglucano, al igual que otros β -1,3-glucanos, es de especial interés ya que se ha descrito como inmunoestimulante y bioactivo como antimicrobianos. Además, se ha demostrado que este 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 y ausencia de una fuente de carbono externa y oscuridad.

En este contexto, en el presente trabajo de tesis se realizaron estudios bioquímicos en *E. gracilis*, particularmente relacionados a la partición del carbono, la síntesis y degradación del principal polímero de reserva de carbono, el paramilon. Concretamente, se abordó el análisis de la UDP-glucosa pirofosforilasa (EC 2.7.7.9; UDP-Glc PPasa) y la UDP-azúcar pirofosforilasa (EC 2.7.7.64; UDP-azúcar PPasa), ambas relacionadas a la partición del carbono en *E. gracilis*, así como también la paramilon sintasa (EC 2.4.1.34; PS) y una β -1,3-glucanasa de la familia de glicosil hidrolasa GH17, involucradas en la síntesis y degradación del poliglucano, respectivamente. Los estudios *in vitro* se complementaron con análisis *in vivo*, los que en conjunto permitieron aportar al conocimiento respecto al metabolismo del carbono en esta microalga.

Primeramente se caracterizaron los cultivos de *E. gracilis* crecida en condiciones autotróficas, heterotróficas y mixotróficas, mediante la determinación de los tiempos de

duplicación, así como también el análisis de la acumulación de paramilon y ceras en las diferentes condiciones de cultivo. Se determinó que la acumulación del β -1,3-glucano en *E. gracilis* cultivada en forma autotrófica, alcanza valores cercanos al 35% de su peso seco celular, mientras que los niveles cuantificados en células crecidas en condición heterotrófica, con el agregado de glucosa como fuente de carbono externa, ascienden a valores superiores al 50% del peso seco celular. Acorde a lo mencionado anteriormente, *E. gracilis* posee la capacidad de sintetizar ceras como almacenamiento de carbono, a través de un mecanismo denominado fermentación de ceras que ocurre en condiciones de anaerobiosis. De esta forma, el paramilon acumulado en condición auto- o heterotrófica, es movilizado a ceras ante una condición de hipoxia, oscuridad y carencia de una fuente de carbono externa. Los resultados exhiben un rendimiento de ceras cercano al 25% y 50% respecto a la biomasa seca, para células de *E. gracilis* provenientes de cultivo heterotrófico y autotrófico, respectivamente, y posteriormente expuestos a estas condiciones adversas. Estos valores se correlacionan con los niveles de paramilon cuantificado en cada una de las condiciones de cultivo. De esta manera se corrobora no sólo la acumulación de ceras ante una condición de anaerobiosis, sino también la movilización del paramilon sintetizado en condiciones favorables, hacia la producción de ceras. Así, la caracterización de los cultivos de *E. gracilis* realizados en nuestro laboratorio nos permitió, además de verificar datos de la bibliografía, generar el conocimiento y estandarización de este cultivo, lo que aporta a la utilización de esta microalga como modelo de estudio.

El paramilon es sintetizado mediante la transferencia de una unidad de Glc a partir de UDP-Glc a su extremo no reductor. En este sentido, la UDP-Glc PPasa juega un rol importante para la síntesis del paramilon y otras vías metabólicas en *E. gracilis*, ya que es la enzima encargada de proveer esas unidades de UDP-Glc. Se realizó la caracterización cinética de la *Egr*UDP-Glc PPasa obtenida en forma recombinante, cuyos resultados exhiben que la enzima posee una estructura funcional monomérica y propiedades cinéticas que la hacen comparable con otras UDP-Glc PPasas de eucariotas, principalmente de protozoos, previamente caracterizadas. Además, esta enzima tuvo la capacidad de sintetizar UDP-Gal, alternativamente a UDP-Glc, aunque con una eficiencia de un orden de magnitud inferior. La *Egr*UDP-Glc PPasa es regulada mediante un mecanismo post-traducciona l de tipo redox, tanto *in vitro* como *in vivo*, siendo inactivada en condiciones oxidantes, mientras que el agregado de agentes reductores revierte la inhibición generada por los oxidantes ensayados. Una evaluación de los niveles de proteínas y actividad de la *Egr*UDP-Glc PPasa, realizada sobre extractos de *E. gracilis* crecidas en condiciones autotróficas, muestra que no existen mayores variaciones respecto del ciclo de luz/oscuridad, indicando que esta enzima no sería regulada acorde al ciclo circadiano celular.

Asimismo, el análisis de localización sub-celular, determinó que la *Egr*UDP-Glc PPasa se encuentra dispersa en el citosol, así como también se evidenciaron elevados niveles en el flagelo de la célula, lugar donde la síntesis de UDP-Glc sería necesaria para dar lugar a la generación de glicoproteínas y oligosacáridos.

Además del estudio de las propiedades cinéticas realizado *in vitro*, se llevó a cabo el silenciamiento de la *Egr*UDP-Glc PPasa mediante ARNi en células de *E. gracilis*. En este sentido, las células silenciadas mostraron una notable disminución en la actividad UDP-Glc PPasa en comparación con el control, aunque la presencia de esta proteína fue indetectable mediante ensayos de inmunodetección realizados sobre esas mismas muestras. Los niveles de paramilon determinados sobre las células silenciadas fueron un 70% inferior a las células control, indicando que aún en ausencia de la *Egr*UDP-Glc PPasa se estaría acumulando una fracción importante de este polímero de reserva. En conjunto, los resultados podrían estar sugiriendo la presencia de otra enzima con capacidad de catalizar la síntesis de UDP-Glc en *E. gracilis* que pueda estar supliendo la actividad UDP-Glc PPasa ante una disminución de sus niveles intracelulares.

Las UDP-azúcar PPasas, a diferencia de las UDP-Glc PPasas en las que el producto principal es la UDP-Glc, pueden producir un amplio repertorio de UDP-azúcares, participando así en la partición del carbono intracelular. En el presente trabajo de tesis se llevó cabo la amplificación del gen, clonado y expresión recombinante de una de las dos UDP-azúcar PPasas presentes en *E. gracilis*. Aunque se evaluaron diversas condiciones, no se ha detectado actividad UDP-azúcar PPasa en esta proteína, lo que impidió realizar su caracterización cinética *in vitro*. Sin embargo, se avanzó en el análisis de funcionalidad *in vivo* de esta, mediante su silenciamiento mediante ARNi sobre *E. gracilis*. Las células que presentan una disminución en los niveles intracelulares de la *Egr*UDP-azúcar PPasa, exhibieron un 40% menos de actividad medida con Gal-1P y UTP, respecto del control, indicando que esta enzima catalizaría *in vivo* la formación de UDP-Gal. A su vez, la acumulación de paramilon en estas células silenciadas para la *Egr*UDP-azúcar PPasa, presentó una disminución de un 25% respecto al control, indicando una leve influencia de esta enzima en proporcionar unidades glucosídicas para la generación del polímero de reserva en *E. gracilis*. Por su parte, un doble silenciamiento de la *Egr*UDP-Glc PPasa y la *Egr*UDP-azúcar PPasa en forma simultánea, condujo a una acumulación de paramilon levemente menor a las células individualmente silenciadas para la UDP-Glc PPasa. De esta forma, y considerando la capacidad de la UDP-Glc PPasa de catalizar también la síntesis de UDP-Gal, podríamos sugerir una interconexión entre ambas pirofosforilasas estudiadas, donde la faltante de una podría ser compensada con la actividad de

la otra. Asimismo, mediante una interconversión de los UDP-azúcares generados, éstos podrían canalizarse para suplir la deficiencia generada por la faltante de alguna de estas PPasas.

El último paso en la síntesis de paramilon es catalizado por la paramilon sintasa, enzima encargada de elongar el β -1,3-glucano, utilizando UDP-Glc como sustrato. Dada la dificultad en la obtención de esta enzima completa en forma soluble y activa, por su característica de poseer al menos 16 dominios transmembrana, en el presente trabajo de tesis hemos llevado a cabo la expresión recombinante de su principal dominio soluble. Esto se realizó con el objetivo de utilizarlo como antígeno en la generación de anticuerpos policlonales que puedan ser posteriormente utilizados como una herramienta de localización sub-celular. La bibliografía ha postulado la presencia de esta *EgrPS* anclada a la membrana que rodea al gránulo de paramilon, por lo que la obtención de una herramienta de marcación subcelular como la aquí postulada podría ser utilizada no sólo para determinar los gránulos de paramilon, sino también en la búsqueda y/o identificación de otras proteínas que puedan estar asociadas a la síntesis o degradación del principal polímero de reserva en *E. gracilis*.

Finalmente, para completar el metabolismo del paramilon en esta microalga, se debe tener en cuenta su degradación y posterior movilización del carbono hacia otros destinos metabólicos. Existen diferentes endo- y exo- β -1,3-glucanasas encargadas de hidrolizar los enlaces glucosídicos de estos polímeros como el paramilon. La caracterización cinética de la *EgrGH17*, obtenida en forma recombinante, indica que la misma es capaz de hidrolizar el polímero, generando un aumento en el número de extremos reductores a partir del sustrato soluble laminarina, así como también a partir del paramilon insoluble, siendo 3 veces menos eficiente por este último. Partiendo de la hipótesis de que la menor afinidad por paramilon se debe a su insolubilidad, se planteó la fusión de la *EgrGH17* a un dominio de unión a carbohidratos (CBM). La evaluación cinética de esta enzima fusionada no presentó mayores diferencias respecto de la enzima individual. Las células de *E. gracilis* silenciadas mediante ARNi para esta *EgrGH17* presentaron una actividad β -1,3-glucanasa 20% inferior al control. Esto tendría sentido considerando el amplio repertorio de glucanasas presentes en *E. gracilis*, las cuales estarían supliendo esta actividad ante la carencia o disminución de una de ellas.

Visto de manera global, los conocimientos generados en este trabajo de tesis, tanto de la caracterización *in vitro* como *in vivo*, nos acercan a un entendimiento respecto a la partición del carbono y la síntesis del principal compuesto de reserva en *E. gracilis*. Asimismo, se exhibe 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*, es y será relevante para el diseño de estrategias para su

utilización biotecnológica, con la posibilidad incluso de realizar enfoques de ingeniería metabólica, permitiendo su incorporación en la industria para la producción de diversos productos de valor agregado.

ABSTRACT

The Euglenophyceae are flagellated organisms belonging to the Euglenozoa phylum, which also includes the Kinetoplastea. The Euglenozoa phylum belongs to the Excavata group, considered the oldest within the eukaryotes. *Euglena gracilis* is a unicellular phototrophic protist capable of growing in autotrophic, heterotrophic and mixotrophic conditions and has the ability to synthesize various bioproducts of commercial interest. *E. gracilis* is an excellent source of dietary protein, vitamins, lipids and β -1,3-glucan paramylon, only found in Euglenophyceae. The yields of these various bioproducts in *E. gracilis* grown under different conditions are high compared to those achieved in other microalgae systems, which highlights their potential for use at the bioindustrial level and for future biotechnological developments.

E. gracilis can accumulate large amount of the paramylon reserve polysaccharide, a β -1,3-glucan, reaching yields up to 90% of its dry cell weight. Paramylon is synthesized only by Euglenophyceae, is deposited as granules in the cytosol and is easily degraded to provide a carbon source in adverse situations. This polyglucan, like other β -1,3-glucans, is of special interest since they have been described as immunostimulants and antimicrobial bioactives. In addition, it has been shown that the paramylon accumulated in *E. gracilis*, through a process called wax ester fermentation, carbon is mobilized towards the synthesis of wax esters when cells are in anaerobiosis and without an external carbon source in darkness.

In this context, the present thesis work, biochemical studies in *E. gracilis* were carried out, particularly related to the carbon partitioning, synthesis and degradation of the main carbon reserve polymer, paramylon. Specifically, the analysis of the UDP-glucose pyrophosphorylase (EC 2.7.7.9; UDP-Glc PPase) and the UDP-sugar pyrophosphorylase (EC 2.7.7.64; UDP-sugar PPase), both related to the carbon partition in *E. gracilis*, as well as paramylon synthase (EC 2.4.1.34; PS) and a β -1,3-glucanase of the GH17 glycosyl hydrolase family, involved in the synthesis and degradation of polyglucan respectively were discussed. *In vitro* studies were complemented with *in vivo* analysis, which together allowed us to contribute to the knowledge regarding carbon metabolism in this microalgae.

In first place, *E. gracilis* cultures grown under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic conditions were characterized by determining the duplication times, as well as the analysis of the accumulation of paramylon and wax esters in the different culture conditions. Accumulation of β -1,3-glucan in autotrophically grown *E. gracilis* was determined to reaches values close to 35% of its cell dry weight. While levels quantified in cells grown in heterotrophic condition,

with addition of glucose as external carbon source, paramylon increased to values greater than 50% of the cellular dry weight. According to the aforementioned, *E. gracilis* has the ability to synthesize wax esters as carbon storage through a mechanism called wax ester fermentation and it occurs under anaerobic conditions. In this way, the paramylon accumulated in an auto- or heterotrophic condition is mobilized to wax ester in response to a condition of hypoxia, darkness and lack of an external carbon source. Results show a yield of wax ester close to 25% and 50% respect to dry biomass, for *E. gracilis* cells from autotrophic and heterotrophic culture respectively, and subsequently exposed to these adverse conditions. These values correlates with paramylon levels quantified in each of the culture conditions. In this way, it is corroborated not only the accumulation of wax esters after an anaerobic condition, but also the mobilization of the paramylon synthesized in favorable conditions towards the production of wax esters. Thus, the characterization of the *E. gracilis* cultures carried out in our laboratory allowed us in addition to verifying data from the bibliography, to generate the knowledge and standardization of this culture, which contributes to the use of this microalgae as a study model.

Paramylon is synthesized by transferring a unit of Glc from UDP-Glc to its non-reducing end. In this sense, the UDP-Glc PPase plays an important role for the synthesis of paramylon and other metabolic pathways in *E. gracilis*, because it is the enzyme responsible for providing those units of UDP-Glc. The kinetic characterization of the *Egr*UDP-Glc PPase obtained in recombinant form was performed. Results shows the enzyme has a monomeric functional structure and kinetic properties that make it comparable with other UDP-Glc PPases of eukaryotes, mainly of protozoa previously characterized. In addition, this enzyme has the ability to synthesize UDP-Gal, alternatively to UDP-Glc, although with an efficiency of an order of magnitude lower. The *Egr*UDP-Glc PPase is regulated by a post-translational redox mechanism, both *in vitro* and *in vivo*, being inactivated under oxidizing conditions, while the addition of reducing agents reverses the inhibition generated by the oxidants tested. Levels of protein and activity of the *Egr*UDP-Glc PPase were performed on extracts of *E. gracilis* grown under autotrophic conditions. It shows there are no major variations respect to the light/dark cycle. This indicated that the *Egr*UDP-Glc PPase would not be regulated according to circadian cell cycle. The subcellular localization analysis determined the *Egr*UDP-Glc PPase is dispersed in the cytosol as well as high levels in the flagella of the cell, where the synthesis of UDP-Glc would be necessary to give rise to the generation of glycoproteins and oligosaccharides.

In addition to the study of the kinetic properties for recombinant protein *in vitro*, silencing assay for the *Egr*UDP-Glc PPase was carried out by means of RNAi in *E. gracilis* cells. In this sense, silenced cells showed a marked decrease in UDP-Glc PPase activity compared to the

control, although the presence of this protein was undetectable by western-blot tests performed on those same samples. Paramylon levels determined on the silenced cells were 70% lower than control cells, indicating that even in the absence of the *Egr*UDP-Glc PPase an important fraction of this reserve polymer would be accumulating. Taken together, these results could be suggesting the presence of another enzyme capable of catalyzing the synthesis of UDP-Glc in *E. gracilis* that may be supplying the UDP-Glc PPase activity in the face of a decrease in its intracellular levels.

UDP-sugar PPases, unlike UDP-Glc PPases in which the main product is UDP-Glc, it can produce a wide repertoire of UDP-sugars, thus participating in the partition of intracellular carbon. In the present thesis work the amplification of the gene, cloned and recombinant expression of one of the two UDP-sugar PPases present in *E. gracilis* was carried out. Although various conditions were evaluated, no UDP-sugar PPase activity were detected in this enzyme, which avoided its kinetic characterization *in vitro*. However, progress was made in the analysis of its functionality *in vivo* through its silencing by means of RNAi on *E. gracilis*. Cells shows a decrease in intracellular levels of the *Egr*UDP-sugar PPase, by exhibiting 40% less activity measured with Gal-1P and UTP compared to the control, indicating this enzyme would catalyze the formation of UDP-Gal *in vivo*. In turn, the accumulation of paramylon in silenced cells for the *Egr*UDP-sugar PPase, showed a 25% decrease with respect to the control, indicating a slight influence of this enzyme in providing glycosidic units for the generation of the reserve polymer in *E. gracilis*. On the other hand, a double silencing of the *Egr*UDP-Glc PPase and the *Egr*UDP-sugar PPase simultaneously, led to a slightly smaller accumulation of paramylon to the individually silenced cells for the UDP-Glc PPase. In this way, and considering the ability of the UDP-Glc PPase to also catalyze the synthesis of UDP-Gal, we could suggest an interconnection between both pyrophosphorylases studied, where the lack of one could be compensated with the activity of the other. Also, through an interconversion of the UDP-sugars generated, these could be channeled to replace the deficiency generated by the lack of any of these PPases.

The last step in the synthesis of paramylon is catalyzed by paramylon synthase, an enzyme responsible for elongating β -1,3-glucan, using UDP-Glc as a substrate. Given the difficulty in obtaining this complete enzyme in soluble and active form, due to its characteristic of having at least 16 transmembrane domains, in the present thesis we have carried out the recombinant expression of its main soluble domain. This was done with the objective of using it as an antigen in the generation of polyclonal antibodies that can be subsequently used as a subcellular localization tool. The bibliography has postulated the presence of this *Egr*PS anchored to the

membrane that surrounds the paramylon granule, so obtaining a subcellular marking tool such as the one postulated here, could be used not only to determine the paramylon granules, but also in the search and/or identification of other proteins that may be associated with the synthesis or degradation of the main reserve polymer in *E. gracilis*.

Finally, to complete the metabolism of paramylon in this microalgae, its degradation and subsequent mobilization of carbon to other metabolic destinations must be taken into account. There are different endo- and exo- β -1,3-glucanases responsible for hydrolyzing the glycosidic bonds of these polymers such as paramylon. The kinetic characterization of the *EgrGH17* obtained in recombinant form, indicates that it is capable of hydrolyzing the polymer, generating an increase in the number of reducing ends from the soluble laminarin substrate, as well as from the insoluble paramylon, being 3-fold less efficient for the latter. Starting from the hypothesis that the lower affinity for paramylon is due to its insolubility, the fusion of the *EgrGH17* to a carbohydrate binding module (CBM) was proposed. The kinetic evaluation of this chimeric enzyme did not show major differences with respect to the wild-type enzyme. The *E. gracilis* cells silenced by RNAi for this *EgrGH17* had a β -1,3-glucanase activity 20% lower than the control. This would make sense considering the wide repertoire of glucanases present in *E. gracilis*, which would be supplying this activity due to the lack or decrease of one of them.

In a global view, the knowledge generated in this thesis, both *in vitro* and *in vivo* characterization, brings us closer to an understanding regarding carbon partition and the synthesis of the main reserve compound in *E. gracilis*. In addition, the adjustment and generation of various tools for the use and management of this microalgae of biotechnological interest is shown. Together, the knowledge developed through basic science for *E. gracilis*, is and will be relevant for the design of strategies for its biotechnological use, with the possibility of even carrying out metabolic engineering approaches, allowing its incorporation into the industry for the production of various value-added products.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Evolución: generación de las especies

En la naturaleza existe una gran variedad de organismos que provienen de un largo proceso evolutivo. La evolución, en biología, se puede explicar cómo una serie de cambios que ocurren a lo largo del tiempo en el perfil genético de una población de individuos, que les permite adaptarse a distintos ambientes. Estos cambios pueden, con el paso del tiempo, llevar a los organismos a diferenciarse en nuevas especies generando así la aparición de novedades evolutivas.

Charles Darwin (1809-1882) no fue el primero en exponer una teoría sobre la evolución, pero si se le atribuye el primer relato convincente y maduro respecto a esto. Además, él fue el primero capaz de proporcionar un mecanismo plausible para explicar cómo las especies pueden cambiar: la selección natural. Sin embargo, en Darwin, apareció tal idea por vez primera en 1838, después de leer el “Ensayo sobre el principio de la población” (1798) de Thomas Malthus (religioso y economista del siglo XIX). Malthus señalaba que era un principio de la naturaleza, que los organismos vivos produzcan más individuos de los que normalmente se espera sobrevivan, hasta alcanzar la madurez que les permita reproducirse. Esto ayudó a Darwin a percibir un punto importante: podría haber selección entre la descendencia que sobrevive y la que perece. El principio de la selección natural no fue solamente de él, ya que el naturalista Alfred Russel Wallace (1823-1915), inspirado también en la obra de Malthus, lo detectó independientemente en la misma época. Wallace no conocía a Darwin, pero supo de su reputación como naturalista y le envió en 1858 su breve ensayo “*On the Tendency of Varieties to Depart Indefinitely from the Original Type*”, donde se explicaban los principios de la selección natural, sin saber que Darwin ya los había dilucidado. Al principio Darwin estaba desconcertado, pero Charles Lyell y Joseph Hooker, quienes simpatizaban con sus ideas, arreglaron todo para que ese mismo año se publicara una memoria conjunta de Darwin-Wallace sobre la selección natural en el *Journal of the Linnean Society* [1].

Al año siguiente, en 1859, Darwin publicó “*The Origin of Species*” donde relataba su teoría de la evolución luego de las observaciones realizadas en su largo viaje (1832-1837) a bordo del *Beagle*, y después de haber analizado minuciosamente durante varios años las muestras adquiridas durante el viaje, conjuntamente con las observaciones que habían informado otros naturalistas.

No fue sino hasta el siglo XX cuando fuimos capaces de apreciar cabalmente el genio de la tenacidad de Darwin, ya que la genética, la observación de campo y la investigación de laboratorio nos han demostrado el poder explicativo de sus teorías. Ha quedado en claro, que la síntesis del trabajo de Darwin sobre la selección natural y la obra de Gregor Mendel sobre la genética (1866), donde explicaba la teoría de la herencia (obra que era desconocida por Darwin), ofrecen un cuadro coherente e inteligible sobre el cambio evolutivo [1].

Sentadas las bases, los datos morfológicos, paleontológicos y las técnicas modernas, como las de biología molecular, han permitido recolectar evidencias claras y concretas de que todos los organismos vivos provienen de un ancestro común, y no han hecho más que reforzar las observaciones a la naturaleza, realizadas durante miles de años por los naturalistas. Es así que hoy en día podemos llegar a comprender por qué dentro de la extraordinaria diversidad de organismos, a simple vista tan dispares como las bacterias, las plantas y los animales, éstos presentan una gran cantidad de características básicas conservadas entre sí, con una importante constancia de los mecanismos fundamentales [2].

Pero, ¿cómo se generó este organismo primitivo del cual descienden todos los otros? Si intentamos explicarlo en muy pocas palabras y de manera sencilla podemos referir a que inicialmente, en aquel mundo prebiótico inorgánico, comenzaron a aparecer sistemas de flujos químicos que dieron lugar a los precursores orgánicos, los cuales permitieron el desarrollo de un proto-organismo a partir de la materia disponible en la superficie terrestre milenaria. Más específicamente, estos primeros proto-organismos se encontraban adheridos a las superficies rocosas en contacto con el mar [3, 4]. Luego, la evolución a lo largo de miles de millones de años, permitió la formación de un organismo unicelular que fue adaptándose a las modificaciones del medio ambiente y fue divergiendo en distintos tipos de organismos procariotas unicelulares, con mejores aptitudes para sobrevivir en ese medio ambiente modificado. Algunos de los organismos pudieron abandonar el mar y adaptarse a la vida sobre la superficie terrestre, lo cual fue ampliando la diversidad de especies [5].

En un comienzo, los organismos unicelulares fueron estrictamente procariotas anaerobios, pero en cierto momento ocurrieron eventos de endosimbiosis que permitieron la formación de organelas intracelulares (como las mitocondrias y cloroplastos) y la aparición de los primeros organismos unicelulares eucariotas [6]. A partir de allí, los organismos eucariotas unicelulares continuaron evolucionando para generar no sólo la aparición de otros organismos unicelulares eucariotas, sino que además, a lo largo de su evolución, se fueron asociando con otras células y así comenzaron a aparecer organismos pluricelulares estrictamente aeróbicos [5]. De estos organismos pluricelulares, las plantas y animales lograron desarrollar una alta

complejidad, siendo capaces de ir especializando diferentes subgrupos de células y generando así distintos tipos de tejidos y órganos. Los tejidos y órganos que conforman un organismo no funcionan como entidades aisladas, sino que se mantienen en estricta comunicación e interacción, funcionando de manera coordinada para mantener con vida al organismo completo [5].

Es de destacar que en los primeros mil millones de años de la Tierra, la vida ocurría estrictamente en un ambiente anaeróbico, en una atmósfera con alta cantidad de N_2 y CO_2 , pero muy poca cantidad de O_2 [7]. Sin embargo, la ocurrencia de todo este proceso evolutivo, desde la aparición de organismos aeróbicos unicelulares hasta, la aparición de plantas y animales, no podría haber sido posible sin el aumento de la concentración de O_2 libre en la atmósfera. Este fue un cambio fundamental que modificó de manera relevante el medio ambiente primitivo. Esto no sucedió de manera espontánea, sino que se debió a la presencia de las cianobacterias, que fueron los primeros organismos fotosintéticos que habitaron y habitan la superficie terrestre siendo una de las fuentes principales de O_2 libre en nuestro planeta [7, 8]. El advenimiento de la fotosíntesis oxigénica fue, probablemente, el segundo evento más importante de la historia de nuestro planeta luego de la aparición de la vida misma [9].

Las cianobacterias, organismos procariontes unicelulares que pueden vivir aeróbica o anaeróbicamente, tuvieron la ventaja y capacidad de poder utilizar el CO_2 atmosférico y la energía solar para sintetizar compuestos orgánicos (azúcares), liberando al medio ambiente O_2 como parte del proceso de fotosíntesis [10]. A medida que pasó el tiempo, el O_2 fue primero depositado como óxidos metálicos en las rocas que observamos aún hoy en día. Luego, cuando este proceso ya se había completado, el O_2 se fue acumulando en la atmósfera. La acumulación atmosférica de O_2 tuvo inicialmente al menos dos ventajas: I)- permitió la formación de la capa de ozono (O_3) que protege a los organismos vivos de la irradiación UV-C, lo cual puede haber ayudado a que los organismos vivos ancestrales abandonen el mar y comiencen a colonizar la tierra; y II)- removió las grandes cantidades de hierro en estado ferroso (Fe^{2+}) presentes en el medio ambiente acuático formando complejos férricos insolubles que fueron precipitando, dejando actualmente sólo trazas de hierro soluble en el mar [7, 11]. A pesar de estas ventajas, el O_2 fue tóxico para los organismos anaerobios de ese entonces, promoviendo que algunos de ellos se recluyeran a microambientes anoxigénicos, mientras que otros evolucionaron y comenzaron a desarrollar defensas antioxidativas que los protegieran de la toxicidad del O_2 . Estos organismos, que pudieron tolerar el O_2 , lo incluyeron en reacciones metabólicas [7], lo que les permitió utilizar cadenas de transporte de electrones con el O_2 como aceptor final, facilitando una eficiente producción de energía. Este cambio hacia un metabolismo aeróbico,

generó un aumento de los rendimientos en moléculas de ATP, que podían obtenerse a partir de sustancias alimenticias tales como la glucosa (Glc), en unas 15 veces [7].

La evolución hacia una producción de energía eficiente permitió el desarrollo de organismos multicelulares complejos como las plantas superiores y los animales. Las plantas superiores, relacionadas evolutivamente con las cianobacterias, son organismos formados por distintos tipos de órganos, los que a su vez están compuestos por diferentes tipos de tejidos y células [5].

1.2. Microalgas

Las microalgas son un gran y diverso grupo de microorganismos comprendiendo protistas eucariotas fotoautotróficos y cianobacterias procariotas (también conocidas como algas verdes-azules). Estos microorganismos contribuyen con la mitad de la fotosíntesis global, y son virtualmente encontrados en nichos eufóticos [12], comprendiendo la fuente de la cadena alimenticia para más del 70% de la biomasa del mundo. Las microalgas pueden ser cultivadas fotosintéticamente, utilizando energía solar y CO₂ como fuente de carbono, en lagunas poco profundas, estanques de canales en tierras marginales o estanques cerrados.

Se clasifican en más de una docena de grupos, basados principalmente en la composición de pigmentos, el perfil de productos de almacenamiento y la diversidad de características ultra-estructurales. Las familias de los diversos grupos de microalgas, y sus relaciones con otros grupos taxonómicos, se han determinado utilizando diversas técnicas de biología molecular [13, 14].

El proceso evolutivo que condujo a la aparición de eucariotas fotosintéticos comienza con la captación endosimbiótica de una cianobacteria (procariotas que realizan fotosíntesis oxigénica) por parte de un eucariota heterotrófico. De esto derivan los llamados plástidos primarios (fotosintéticos) encontrados en algas (verdes y rojas) y en plantas superiores [15]. En este proceso evolutivo, las algas, algunos protozoos y las diatomeas ocupan una posición de relevancia. Así, las diatomeas son producto de lo que se conoce como endosimbiosis secundaria, siendo el resultado de que una célula eucariota heterotrófica haya sido invadida por un eucariota fotosintético, probablemente un alga roja [16–18]. La endosimbiosis secundaria también dio lugar a otra serie de organismos y a determinar relaciones evolutivas estrechas entre células autótrofas y heterótrofas. Así, por ejemplo, los eucariotas verdes del orden Euglenales son producto de una endosimbiosis secundaria, a diferencia de las anteriores, en este caso la endosimbiosis se dio con un alga verde [19]. Además, los Euglenales están relacionadas con tripanosomátidos y otros protozoos, que experimentaron un proceso similar pero que, a

continuación, perdieron el cloroplasto, manteniendo un número importante de enzimas relacionadas con el metabolismo fotosintético del carbono [20]. Estas variaciones en el proceso evolutivo hacen que en los diferentes organismos se encuentren enzimas que catalizan reacciones similares pero que están reguladas según el contexto metabólico particular al cual son funcionales.

Las microalgas fueron la base de la vida del desarrollo de nuestro planeta y tienen muchas ventajas para poder convertirse en uno de los pilares básicos para poder alimentar a toda la humanidad en el futuro. Su rápido crecimiento y su facilidad para adaptarse a diversos medios pueden permitir la producción a gran escala. Además, poseen compuestos importantes desde el punto de vista nutricional y también sustancias de actividad biológica que pueden ayudarnos a prevenir enfermedades. Las microalgas, son micro-organismos fotosintéticos capaces de producir alimento a partir de sustancias inorgánicas, siendo imprescindibles en el mantenimiento de la vida en la Tierra, proporcionando compuestos orgánicos de alto valor nutricional y oxígeno para soportar al resto de la vida del planeta.

Aunque no seamos conscientes, las microalgas son el primer eslabón de la cadena trófica y por ello suponen una pieza esencial en nuestras vidas. Son las encargadas de proporcionarnos, mediante la fotosíntesis, el 70% del oxígeno que respiramos, además de ser motores de creación de alimento a partir de la absorción de luz, dióxido de carbono, fósforo y algunos metales.

La producción de biomasa de microalgas, probablemente, sea la mejor alternativa viable frente a los recursos fósiles para la producción de combustibles y productos químicos. En los últimos años, el interés en la biomasa obtenida a partir de microalgas ha crecido, tanto en el campo de la investigación básica, como aplicada. En cuanto a sus aplicaciones, éstas van desde la producción de biomasa simple para alimento, hasta la obtención de productos de alto valor para ser utilizados en cosmeceútica y nutracéutica, aunque para la mayoría de ellas el mercado aún está en desarrollo. Actualmente se busca convertir la biomasa en productos químicos de valor agregado y biocombustibles en biorrefinerías que utilizan diferentes tecnologías [21]. Teniendo en cuenta la enorme biodiversidad de las microalgas y el desarrollo de la ingeniería genética, este grupo de organismos representa una de las fuentes más prometedoras de nuevos productos. Ellas presentan características únicas, constituyendo un valioso material de estudio para alcanzar un mayor conocimiento de su diversidad.

1.3. *Euglena gracilis*, evolución y características

1.3.1. Clasificación evolutiva

Dentro del reino Protozoa, el filo Euglenophyta o Euglenozoa se conforma de un grupo diverso de organismos eucariotas que habrían surgido hace mil millones de años o más, antes del origen de las plantas y animales. En su mayoría son flagelados unicelulares y dado que la mayoría de esta especie son no fotosintéticos, se los ha clasificado tanto con plantas como con animales, hasta incluso, se los reconoció como un reino separado “*Euglenozoa*” [22].

La investigación taxonómica de los Euglenophyceae data de 1830 cuando Ehrenberg estableció el género *Euglena* [23]. La mayor parte de la historia de los Euglenophyta es la crónica de los linajes fagotróficos y osmotróficos. La adquisición del cloroplasto ocurrió cuando un Euglenozoa fagotrófico, capaz de ingerir presas eucariotas, envolvió una célula de alga fotosintética y adoptó su cloroplasto y maquinaria fotosintética. Evidencia molecular más actual [24, 25] respaldaron las primeras hipótesis [19] que sugirieron que los Euglenozoa obtuvieron sus cloroplastos a través de la endosimbiosis secundaria con una alga verde y extendieron esta hipótesis para incluir que, el donante de algas verdes, probablemente era un alga similar a *Pyramimonas* (Prasinophyceae). Las algas pertenecientes al grupo de las prasinofitas ocupan una posición en la base del linaje de algas verdes y tienen características morfológicas que representan más estrechamente la primer alga verde [26]. La endosimbiosis secundaria podría haber ocurrido poco después de la divergencia de las prasinofitas o mucho más tarde, por lo que se desconoce en forma exacta cuando surgieron los primeros Euglenozoa fotosintéticos. Sin embargo, se estimó que la divergencia de las algas verdes y rojas se originó hace alrededor de 1500 millones de años [27], lo que establece el punto de tiempo más temprano en el que podría haber ocurrido la endosimbiosis secundaria [28].

Como se mencionó previamente, debido a que los Euglenozoa adquirieron su cloroplasto de un antepasado de algas verdes, no es sorprendente que la pigmentación sea muy similar al plástido de algas verdes al tener clorofilas a, b, β -caroteno y varias xantofilas. Sin embargo, hay varias diferencias notables, las algas verdes producen almidón, un polímero de Glc unidos por enlaces α -1,4 que se almacena en el cloroplasto, mientras los Euglenales fotosintéticos y no fotosintéticos producen *paramylon* o paramilon, polímero de Glc unidos por enlaces β -1,3 no ramificado, presente en el citoplasma y no el cloroplasto [29]. Esta diferencia en el tipo de polímero generado, sugiere que la habilidad de síntesis de paramilon debe haber sido previa a la adquisición del cloroplasto [30]. Además, otra característica diferencial es el *eyespot*, estigma o mancha ocular que se encuentra en el extremo anterior de la célula en Euglenales no está

asociada con el cloroplasto, como lo está en las algas verdes. Por lo tanto, aunque el cloroplasto fue adquirido de un alga verde, desde entonces se han producido cambios, posiblemente a través de endosimbiosis adicionales al principio del desarrollo del plástido [28].

En la Figura 1 se esquematiza la filogenia de eucariotas y procariotas, además de las endosimbiosis primarias y secundarias que dieron lugar a la formación de las microalgas fotosintéticas. El filo Euglenozoa o Euglenophyta perteneciente al reino Protozoa, no solo comprende a los Euglenophyceae, sino que también incluye tanto a los Kinetoplastea (flagelados de vida libre y parásitos como *Trypanosoma*, agentes causantes de tripanosomiasis africana y enfermedad de Chagas en seres humanos), como a los Diplonemea (flagelados marinos de vida libre). El soporte para que estos organismos sean agrupados de forma conjunta con los Euglenophyceae, proviene de diversas evidencias morfológicas, moleculares y filogenéticas. Estos poseen crestas mitocondriales discoideas y aparatos de alimentación característicos [31, 32], presentan una base nucleotídica inusual “J” en el ADN nuclear [33] y adicionan un fragmento de ARN no codificante en el extremo 5' del ARN a prácticamente todos los ARN mensajeros citosólicos mediante *trans-splicing* [34, 35]. Sin embargo, se cree que a diferencia de los Euglenophyceae, los flagelados antes mencionados, perdieron el cloroplasto pero retuvieron varios genes, encontrados en peroxisomas especializados conocidos como glicosomas ausentes en el resto de los eucariotas incluidos los Euglenales [18].

Análisis moleculares y morfológicos muestran que los Euglenozoa son miembros de un gran grupo conocido como Excavata [36], indicando que el inicio de los eucariotas, está ubicado con el grupo Excavata siendo Euglenozoa el primer grupo que se separó del linaje evolutivo principal de los eucariotas, como se observa en la Figura 1 [37]. La mayor parte del conocimiento sobre los protistas del grupo Euglenales, viene de extensos estudios del modelo fotosintético en la especie *Euglena gracilis*, cuya clasificación taxonómica, de acuerdo al contexto evolutivo antes descrito, se detalla en la Tabla 1. Dentro del grupo Euglenales hay miles de especies, las cuales difieren substancialmente de *E. gracilis* en morfología o modo de nutrición. Euglenales es un grupo monofilético de células de vida libre flageladas (en la mayoría con dos flagelos) en ambientes predominantemente acuáticos.

rojas, el principal huésped fotosintético; y el endosimbionte fotosintético primario, relacionado con las cianobacterias, obtenido del alga verde [38].

Tabla 1: Clasificación taxonómica de *E. gracilis*.

| | |
|-------------|------------------------------|
| Dominio: | Eukarya |
| Reino: | Protozoa |
| Supergrupo: | Excavata |
| Filo: | Euglenophyta o Euglenozoa |
| Clase: | Euglenophyceae |
| Orden: | Euglenales |
| Familia: | Euglenaceae |
| Género: | <i>Euglena</i> |
| Especie: | <i>Euglena gracilis</i> |

Adaptado de Cavalier-Smith 2002 [36] y www.itis.gov

1.3.2. Características del cultivo

Las microalgas proliferan de manera más eficiente que las plantas superiores, y pueden usarse como un recurso para obtener grandes cantidades de biomasa cuando se les proporciona un ambiente adecuado [43]. Se las puede cultivar en sitios que no se utilizan para la agricultura, asegurando así que no compitan con los recursos agrícolas existentes.

Desde hace varios años se han llevado a cabo diferentes estudios sobre la viabilidad de utilizar microalgas como fuente de alimento, incluso en posibles crisis alimentarias, sería una alternativa que permitiría sobrellevar la situación [44]. Las diferentes microalgas presentan sistemas metabólicos distintivos, por lo tanto, se podría seleccionar una que produzca una sustancia particular de interés, que normalmente es difícil de obtener a partir de otras fuentes como plantas superiores, y utilizarse para obtener de forma más eficiente estos productos deseados. La búsqueda de aplicaciones industriales para las microalgas del género *Euglena* comenzó más tarde respecto a otras especies, siendo alrededor de la década del '70 cuando las investigaciones sobre el valor nutricional de *Euglena* comenzaron a hacerse visibles, con informes sobre su contenido de proteínas y calidad de sus aminoácidos. Esta microalga no solo se destacó por su calidad proteica, sino también por poseer todas las vitaminas esenciales (particularmente grandes cantidades de vitamina E) y ácidos grasos poliinsaturados nutricionalmente importantes [45–47]. Además, trabajos recientes han demostrado la diversidad de funciones del polisacárido de reserva, paramilon en cuanto a sus propiedades inmunomodulatorias [48–50].

Entre otras ventajas de *E. gracilis* mas allá de los productos que se pueden obtener a partir de su biomasa, es la facilidad que presenta para ser cultivada en una gran amplitud de condiciones. De forma autotrófica, con CO₂ y luz solar (o artificial) como únicas fuentes de carbono y energía; de forma mixotrófica, con alguna fuente de carbono externa, en presencia de luz; o de forma heterotrófica, con una fuente carbono externa, en oscuridad. Dentro de la amplia variedad de compuestos orgánicos que pueden ser utilizadas por *E. gracilis* como fuente de carbono podemos mencionar la glucosa, lactato, acetato, etanol, glutamato, serina, glicina, entre otros [51]. Además de la diversidad de condiciones de cultivos, *E. gracilis* puede crecer en líquidos contaminados, tolerando un amplio rango de pH, como así también la presencia de metales pesados, siendo de esta forma no solo útil para la obtención de diferentes compuestos de interés, sino también para biorremediación [52].

Recientemente, los cultivos de microalgas han cobrado interés en la obtención de compuestos de alto valor agregado, siendo el cultivo de *E. gracilis* un recurso adecuado para la obtención de diversos compuestos como α -tocoferol (Vitamina E), paramilon, ceras, ácidos grasos poliinsaturados, biotina y aminoácidos que son utilizados en la producción de cosmecéuticos, nutracéuticos, alimentos y biocombustibles. Además, *E. gracilis* posee mayor productividad fotosintética (60 veces mayor) que el arroz, y la eficiencia de conversión de CO₂ en O₂ es 2 veces mayor que en *Chlorella* [53], destacándose la potencia de esta microalga como herramienta para la producción/obtención de compuestos de valor agregado en la industria. Particularmente, la parte comercial de la industria se basa en el denominado “5F” (del inglés: *Food, Fiber, Feed, Fertilizer y Fuel*) que hace referencia al uso de la biomasa para alimento, fibra, alimentación animal, fertilizantes y combustibles, lo que asegura un amplio repertorio de usos para la biomasa, características que *E. gracilis* es capaz de cumplimentarlas, haciendo redituable su utilización [54].

1.3.3. Morfología celular

Las células de *E. gracilis* son de aproximadamente 50 μm de largo x 10 μm de ancho, al no presentar la célula una pared rígida, la forma que adopta es altamente flexible, desde esféricas hasta forma de husillo alargado. Por debajo de la membrana plasmática, el cuerpo de la célula se encuentra recubierto de una película proteica, denominada *pelicle*, la que consta de estructuras longitudinales entrelazadas que pueden deslizarse una respecto de la otra, permitiendo la adopción de diversas formas por parte de la célula [55].

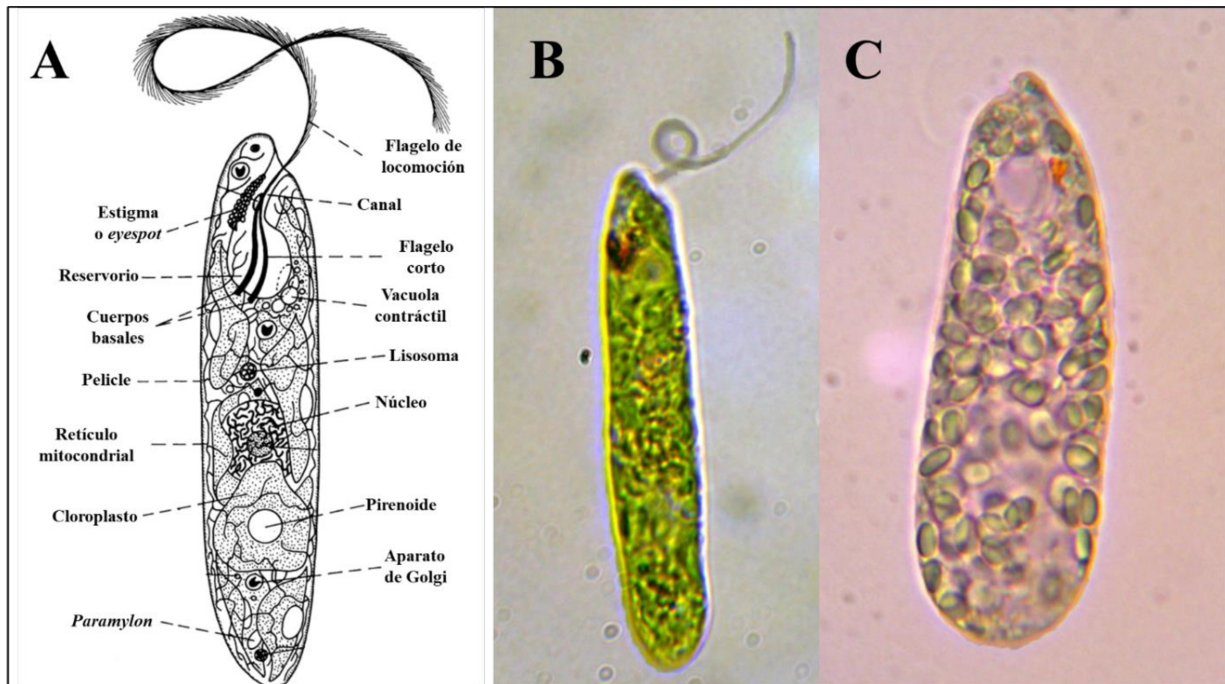


Figura 2: Células de *E. gracilis*. **A:** Esquema de la célula en la que se destacan las principales partes y organelas. Adaptada del libro “*The Biology of Euglena*” Buetow [56]. **B:** Célula de *E. gracilis* crecida en condiciones autotróficas. **C:** Célula de *E. gracilis* crecida en condición heterotrófica.

En la Figura 2 pueden apreciarse las diferentes estructuras celulares de *E. gracilis*. La célula de esta microalga presenta una invaginación en la parte anterior de la célula, que consiste de un canal tubular y un reservorio, similar a los citosomas encontrados en otros protozoos, relacionado con la obtención de alimento por fagotrofia [56, 57]. Asociado a este reservorio, se encuentra una vacuola contráctil, la cual se cree estaría involucrada en la osmoregulación [55]. Asimismo, en la pared dorsal del reservorio, se encuentran dos flagelos con características diferenciales, uno que emerge del canal y es utilizado para la movilidad o locomoción de la célula, mientras que el otro es corto y no alcanza a emerger del reservorio [56]. En la parte anterior de la célula, cercano al reservorio, se encuentra además una estructura roja o naranja, conocido como estigma o *eyespot*, siendo esta la característica que le dio el nombre de *Euglena* a estos microorganismos. El estigma es una estructura cuyo interior se encuentra lleno de carotenoides, siendo el principal la anteraxantina. Esta estructura posee la función de ser fotorreceptora, habiéndose encontrado que cuando la estructura del estigma es afectada por la presencia de antibióticos, las células disminuyen la fototaxis [55]. Otras estructuras que se pueden observar en células de *E. gracilis* son los cloroplastos, las mitocondrias, aparatos de Golgi y gránulos de paramylon que se encuentran dispersos en toda la célula.

1.4. Acumulación de carbono en *Euglena gracilis*

Como se mencionó previamente, *E. gracilis* produce y acumula un polisacárido de reserva denominado *paramylon* o paramilon, el cual es un polímero lineal de unidades de Glc unidas por enlaces β -1,3, que contendrían no más de 700 unidades de Glc polimerizadas [58]. El paramilon fue descubierto en 1850 por Gottlieb, quien determinó que era isomérico respecto al almidón, pero que no se teñía con solución de yodo [59]. Más tarde, Kreeger y Meeuse (1952) y Clarke y Stone (1960) identificaron las uniones β -1,3 presentes en el polímero [60]. Dentro de los β -glucanos encontrados en la naturaleza, la mayoría presentan ramificaciones o diversidad de tipos de enlaces como los β -1,3 y β -1,6 encontrado en las paredes celulares de hongos, β -1,3 y β -1,4 encontrado en cereales [61]. Contrariamente, en *E. gracilis* se encuentran en el paramilon únicamente los enlaces β -1,3, lo que le da una característica diferencial a este organismo. El polisacárido es guardado como carbono de reserva en gránulos que presentan un alto grado de cristalinidad con una compleja estructura de fibrillas, compuestas de hélices triples no ramificadas [62], rodeadas por una membrana del tipo bicapa lipídica [63]. En la Figura 3 se puede observar esquemáticamente la estructura de los gránulos de paramilon. Por la alta cristalinidad presentada por los gránulos, se los cataloga como únicos a lo largo de los diferentes carbohidratos utilizados como compuestos de reserva tanto en plantas como en algas [62]. En crecimiento autotrófico, las células de *E. gracilis* acumulan los gránulos de paramilon predominantemente cerca de la región pirenoide, fuera de los cloroplastos [64], mientras que en condiciones de cultivo heterotrófico en oscuridad, en la cual los cloroplastos no se encuentran desarrollados (proplástidos), los gránulos de paramilon se encuentran distribuidos a lo largo de todo el citoplasma celular. Además cabe destacar que en condiciones heterotróficas se logra una mayor acumulación de paramilon (alrededor de 6 veces) [65], alcanzando valores de 90% respecto de la biomasa seca, dependiendo de la condición de cultivo [66].

En uno de los primeros estudios realizados sobre la síntesis de paramilon, Marechal y Goldemberg, demostraron que la UDP-glucosa (UDP-Glc) es el sustrato preferencial para la síntesis del polímero [65, 67], encontrándose además que la enzima encargada de su síntesis se encuentra en la membrana que rodea al gránulo de paramilon [60]. Las características de las enzimas involucradas en la síntesis de este polímero de reserva serán descriptas más adelante.

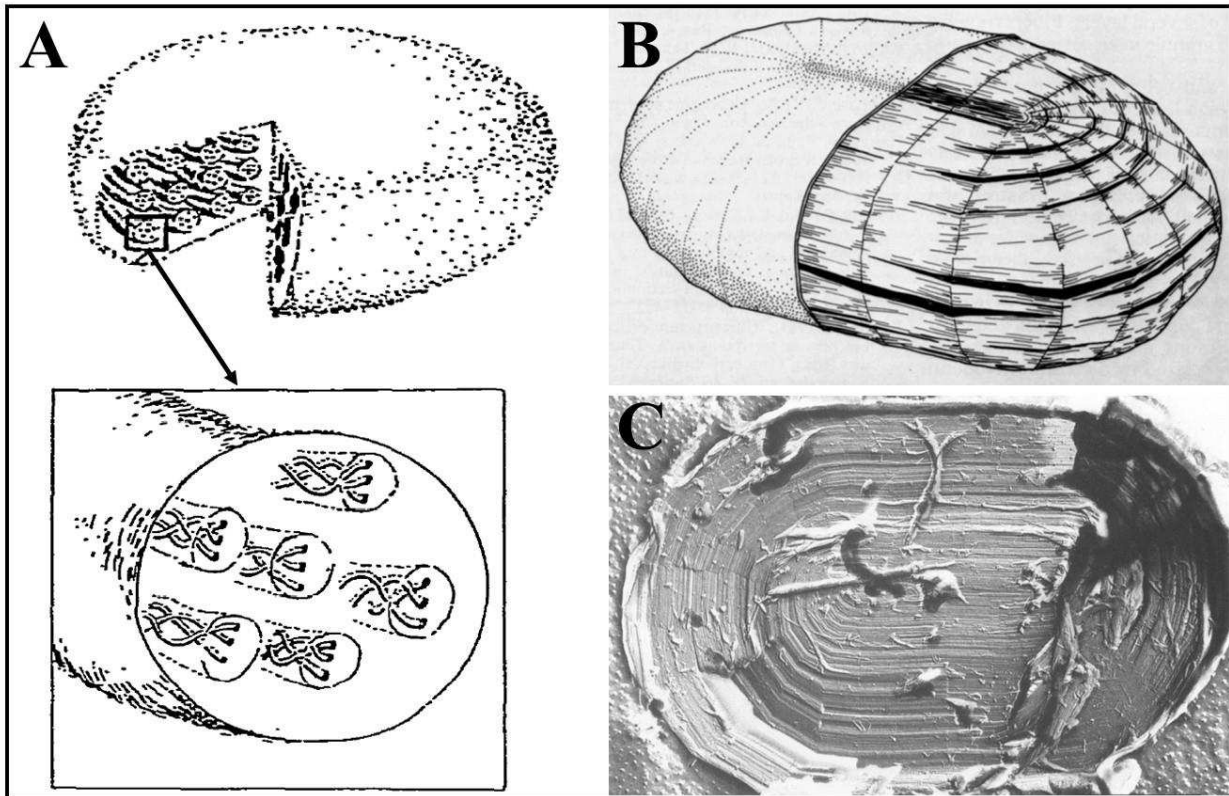


Figura 3: Gránulos de paramilon. **A:** Representación esquemática del gránulo mostrando las fibrillas compuestas de las hélices triples. Adaptado de Marchessault y Deslandes 1979 [62]. **B:** Modelo que muestra la composición de capas con fibras que lo atraviesan en un patrón concéntrico general con dos tipos de segmentos, cuñas y sólidos rectangulares. Adaptado de Kiss y colaboradores 1987 [29]. **C:** Microfotografía electrónica de un gránulo de paramilon maduro con alto grado de orden de las fibrillas. Adaptado de Kiss y colaboradores 1988 [68].

El paramilon no es la única forma de reserva de carbono que posee *E. gracilis*, aunque es la principal forma de acumulación de carbono cuando la célula se encuentra en ambiente aeróbico [69]. En condiciones de anaerobiosis y oscuridad, *E. gracilis* canaliza el carbono disponible, vía degradación del paramilon, a la síntesis de otro compuesto de reserva, las ceras. Cuando las células son sometidas a condiciones de anaerobiosis, el paramilon acumulado es rápidamente degradado con la ayuda de endo- y exo- β -1,3-glucanasas y la consiguiente generación de ATP a través de la glucólisis. *E. gracilis* al igual que plantas superiores, presenta una fosfofructoquinasa dependiente de pirofosfato (EC 2.7.1.90) además de la clásica fosfofructoquinasa dependiente de ATP (EC 2.7.1.11) lo que le permite la fosforilación de la fructosa-6P (Fru-6P) en fructosa-1,6bisP (Fru-1,6bisP), con el ahorro de una molécula de ATP, lo cual es crucial considerando el estado de anaerobiosis, al final de la glucólisis [70]. El piruvato generado continúa su vía en la mitocondria, donde se da la síntesis del acetil-CoA y propionil-CoA como dadores de 2 y 3 carbonos, respectivamente, dando lugar a la formación del acil-CoA, que seguidamente pasa al citosol [71]. La biosíntesis de ceras comprende dos

pasos consecutivos más, la reducción del acil-CoA a alcohol de cadena larga, y la subsecuente esterificación del alcohol a un ácido graso de cadena larga en el citosol celular [72], para dar lugar a la síntesis de ceras como producto final en la generación de energía en anaerobiosis [73]. De este modo, este sistema permite la obtención de energía mediante un metabolismo denominado “fermentación de ceras”.

Este tipo de fermentación es único, en el que se obtiene un producto final de mayor masa molecular, que a su vez es insoluble en agua y se acumula en la célula durante la anaerobiosis, sin secretarse al medio, permaneciendo en el citoplasma celular como un sólido suspendido [74]. Este tipo de fermentación presenta una ventaja respecto a las fermentaciones “tradicionales” en la que se produce etanol o lactato como producto final, ya que al ser estos productos solubles en agua pueden ser dañinos al acumularse en las células, por lo que deben eliminarse con la consecuente pérdida de carbono.

La acumulación de ceras se ha visto que puede alcanzar valores superiores al 50% respecto de la biomasa seca [69]. Las mismas están compuestas por ácidos grasos y alcoholes con cadenas de entre 10 a 18 carbonos de longitud, siendo predominante el ácido mirístico y el alcohol miristílico (ambos de 14 carbonos), seguido por cadenas de 13 y 15 carbonos [75].

Además del aprovechamiento de los diferentes compuestos producidos por *E. gracilis*, cuyos beneficios han sido mencionados previamente, cabe aclarar que, tanto el paramilon como las ceras, poseen una gran variedad de utilidades. Entre ellas podemos mencionar las propiedades benéficas como inmunoestimulante del paramilon [76, 77], siendo también utilizado como precursor para la síntesis de nuevos biomateriales. El paramilon, por ser un polímero con enlaces β -1,3 presenta una estructura de hélices única, la cual permite obtener materiales con propiedades mecánicas y térmicas diferenciales respecto de otros polisacáridos. Además, realizando modificaciones al paramilon, como acetilación o esterificación, dan lugar a la obtención de nuevos materiales termoplásticos con características diferenciales, incluso, utilizando las mismas ceras producidas por *E. gracilis* para la obtención de esteres de cadena larga [78–82]. En cuanto a las ceras en sí mismas, poseen un gran potencial para utilizarlo como biocombustible por el largo de las cadenas, tanto del ácido graso como del alcohol, haciéndolo idóneo para la producción de biodiesel y combustibles para usos particulares, como por ejemplo combustibles para aviones [83].

Considerando el porcentaje respecto de la biomasa seca que las células de *E. gracilis* pueden acumular de cualquiera de estos compuestos, dependiendo de la condición en la que se encuentre, hace de este organismo una fuente potencial para la obtención, tanto de estos compuestos de reserva que presentan una variada utilidad, como así también los restantes

productos antes mencionados, como por ejemplo el α -tocoferol. Hay que considerar además, que a partir de la misma biomasa celular, podría extraerse más de un compuesto, permitiendo reducir costos y ampliar las ganancias, haciendo del cultivo de esta microalga un gran potencial con amplio aprovechamiento biotecnológico.

1.5. Metabolismo del carbono en *Euglena gracilis*

La secuenciación del genoma de *E. gracilis* aún no se encuentra disponible, dada la dificultad en el ensamblado del mismo por el tamaño y heterocigosidad [84]. Sin embargo, a partir de trabajos de secuenciación de transcriptomas en esta especie, se ha revelado la enorme capacidad metabólica de este organismo. De hecho, *E. gracilis* posee más genes de los que son evidentes en el genoma humano [85]. Es particularmente notable el gran número de enzimas activas en carbohidratos (CAZymes, por su siglas en inglés correspondiente a *Carbohydrates Active enZymes*) comparable en número a animales multicelulares, y mucho más alto que otras algas unicelulares [86]. Los trabajos de transcriptomas actuales [85, 87], han enriquecido considerablemente los conocimientos previos sobre las enzimas del metabolismo del carbono, que habían sido escasamente estudiados a partir de las purificaciones y caracterizaciones de las mismas extraídas de fuente [88].

1.5.1. Enzimas activas en carbohidratos

A partir de los trabajos de transcriptoma de *E. gracilis*, se observó la presencia de más CAZymes que en otras algas para las cuales el genoma se encuentra secuenciado, aunque menos que en plantas superiores terrestres, las cuales requieren complejas paredes celulares que permitan el crecimiento. A su vez, se ha observado un mayor número de enzimas activas en carbohidratos que en otros Euglenozoa secuenciados, como *Trypanozoma brucei* y *Leishmania braziliensis*. Uno de los mayores cambios en *E. gracilis*, en comparación con los organismos antes mencionados, es la faltante de enzimas involucradas en la biosíntesis de α -glucanos y un incremento en las enzimas involucradas en la síntesis de β -glucanos [85]. Esto refleja la utilización del paramilon, un β -1,3-glucano insoluble [89], como polisacárido de reserva, en contraparte a los glucanos unidos por enlaces α -1,4/6, utilizados comúnmente como reserva de energía y carbono en plantas, animales y bacterias (almidón y glucógeno, respectivamente). A partir de los transcriptomas, también se encontraron enzimas para las vías metabólicas principales, incluyendo la glucolítica y gluconeogénica, ciclo del ácido cítrico y la vía de las pentosas fosfatos, como así también enzimas de la vía de síntesis carotenoides y el ciclo de Calvin, requerido para la fotosíntesis. Además se demostró un amplio repertorio de enzimas

involucradas al metabolismo de los β -1,3-glucanos, entre los cuales podemos mencionar la presencia de transcritos para familias de glicosiltransferasas (GT) de las familias 2 y 48 (GT2 y GT48), la familia de las glicosil hidrolasas (GH) de las familias 1, 2, 3, 5, 17, 30, 55, 64 y 81 [85] y más recientemente, se ha descrito una β -1,3-glucano fosforilasa, la cual se clasificó en una nueva familia, GH149 [90].

1.5.2. Perfiles de nucleótidos-azúcar en *Euglena gracilis*

Tal como ocurre en otros organismos, la maquinaria de glicosilación en *E. gracilis* depende de la habilidad de producir unidades de “azúcar activada”, conocidas como nucleótidos-azúcar (NDP-azúcar) [91]. Con el fin de determinar la composición y cantidad de estos NDP-azúcar O'Neill y colaboradores [86] realizaron un ensayo a partir del cual determinaron que la UDP-Glc es el más abundante entre los NDP-azúcar encontrados (Tabla 2). Este resultado es consistente con su rol en la biosíntesis del mayor compuesto de reserva de carbono que es el paramilon y además, por su función central, como precursor para otros nucleótidos azúcar. Otro fin que posee la UDP-Glc es en la generación del antioxidante ácido ascórbico, para el cual se han descrito tres posibles vías diferentes de biosíntesis [85]. También se ha encontrado, aunque en muy baja cantidad ADP-Glc, el cual es utilizado normalmente para la síntesis de α -glucanos como almidón y glucógeno en otros organismos. Este tipo de glucanos se encuentra ausente en *Euglena*, pero en este caso particular podría estar involucrado en la síntesis de trehalosa [92]. Además, es conocido que la superficie de *E. gracilis* contiene Glc, galactosa (Gal), manosa (Man), fucosa, xilosa (Xyl) y ramnosa (Rha) [93], habiéndose encontrado el respectivo nucleótido-azúcar para cada uno ellos, como se detalla en la Tabla 2 [86]. Entre los principales NDP-azúcares encontrados, además del mayoritario UDP-Glc, podemos mencionar UDP-Gal, TDP-Glc, UDP-Xyl, UDP-N-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc), UDP-GlcA, GDP-Man, entre otros (Tabla 2).

Tabla 2: Perfil de NDP-azúcares en extractos de *E. gracilis* de cultivo en condición mixotrófica (nmol/g pellet). Adaptado de O'Neill 2017 [86].

| | |
|--------------------------|-------|
| UDP-Glc: | 142.8 |
| TDP-Glc: | 36.6 |
| UDP-Gal: | 25.8 |
| UDP-Xyl: | 15.8 |
| ADP-Rib: | 14.8 |
| UDP-GlcA: | 12.5 |
| UDP- β -Arabinosa: | 12.3 |
| GDP- β -fucosa: | 11.9 |
| UDP-GlcNAc: | 9.9 |
| UDP- β -Rha: | 6.3 |
| ADP-Glc: | 6.0 |
| GDP-Man: | 2.9 |

1.6. Enzimas involucradas en la partición de la glucosa

Dentro de una célula ocurren una elevada cantidad de reacciones químicas en forma simultánea; pero estas reacciones siguen determinadas pautas que las organizan en procesos coherentes y funcionan en forma secuencial para generar uno o varios productos específicos. El metabolismo puede definirse entonces, 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 enzimas que constituyen las vías metabólicas [94].

La glucosa-1P (Glc-1P) es un metabolito que se encuentra en bajas concentraciones intracelulares, ya que por acción de la fosfoglucomutasa es convertida a glucosa-6P (Glc-6P), en una reacción reversible pero desplazada hacia la formación de esta última [95, 96]. La Glc-1P es además sustrato de NDP-glucosa pirofosforilasas (NDP-Glc PPasas) que derivan al metabolito a la producción de distintos NDP-Glc, los cuales son luego sustratos en las reacciones de diferentes glicosiltransferasas que canalizan la síntesis de oligosacáridos, polisacáridos y otros glicoconjugados [97]. De esta forma, la utilización de NDP-Glc por distintas enzimas determinará la producción de compuestos con funciones celulares diferentes relacionadas con: la bioenergética (almacenamiento de polisacáridos [98, 99]), la síntesis de compuestos de pared [100], la producción de polisacáridos estructurales y de secreción [101, 102] y la interconversión de hidratos de carbono [103, 104]. En eucariotas, los distintos NDP-Glc derivados también están involucrados en el proceso de glicosilación de proteínas

[105]. A partir de esto, queda claro que la caracterización de las NDP-Glc PPasas y de las respectivas glicosiltransferasas es relevante para entender el metabolismo (y su regulación) de los hidratos de carbono en el organismo respectivo y las derivaciones funcionales de los mismos.

1.6.1. La familia de las NDP-azúcar pirofosforilasas

La biosíntesis de glucósidos típicamente comienza con el derivado químico de la condensación de la Glc-1P (u otro azúcar-1P) y un nucleósido-monofosfato (a partir de su correspondiente nucleósido-trifosfato, NTP). Esta reacción, que en general depende de un metal divalente, es catalizada por una nucleotidiltransferasa (también denominada como NDP-azúcar PPasa, EC 2.7.7.-) y procede con la pérdida concomitante de pirofosfato [106]. Las estructuras tridimensionales de muchas enzimas de esta clase han sido resueltas, incluyendo timidiltransferasas (EC 2.7.7.24; [107–109]); uridiltransferasas (UDP-Glc PPasas, EC 2.7.7.9; [110–113]), adeniltransferasa (ADP-Glc PPasa, EC 2.7.7.27; [114, 115]), entre otras. A pesar de la gran diversidad existente a nivel de estructura primaria (los miembros de la familia presentan relativamente baja identidad de secuencia) y cuaternaria (se han descrito formas mono-, di-, tetra-, hexa-, y octaméricas), las nucleotidiltransferasas comparten una organización de dominio similar y características estructurales comunes:

- Tienen un dominio catalítico N-terminal conservado, presentan un plegamiento de tipo GT-A [106] que consiste de una estructura tipo Rossmann $\alpha/\beta/\alpha$.

- En general el sitio activo se encuentra en una hendidura profunda formada por la lámina β central y dos hélices α [106]. Dentro de este sitio activo, se hallan residuos conservados entre las enzimas de la familia, que interaccionan de forma similar con sus respectivos sustratos. Un ejemplo de esto es el motivo rico en glicina GXG(T/S)R, que está presente en todas las pirofosforilasas descritas hasta el momento y se ha identificado como parte del sitio de unión al NTP [114, 116–120].

- Típicamente, las nucleotidiltransferasas utilizan un mecanismo secuencial bi-bi ordenado, donde se une primero el NTP. La reacción catalizada sigue un mecanismo SN₂, con el ataque nucleofílico del azúcar-1P al fosfato α del NTP [108, 109, 118, 121, 122].

- Utilizan como cofactor esencial un metal divalente, generalmente Mg²⁺, 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 pirofosfato (PPi) saliente durante la reacción [109, 117].

1.6.1.1 La UDP-glucosa pirofosforilasa

La enzima UDP-Glc PPasa (UTP: α -D-Glc-1P uridililtransferasa; EC 2.7.7.9) cataliza la conversión de Glc-1P y UTP en UDP-Glc con la liberación de PPi, en presencia de un catión divalente, como ya ha sido establecido para otras nucleotidililtransferasas. La enzima está presente en prácticamente todas las células, generalmente formando una estructura multimérica de unidades idénticas. Su ubicuidad incluye plantas, animales y microorganismos en general. Las UDP-Glc PPasas de eucariotas son diferentes a las de origen bacteriano ya que presentan, como máximo, 10% de identidad en sus secuencias aminoacídicas, es decir, son significativamente divergentes desde el punto de vista evolutivo [123] y no se encuentran relacionadas a nivel de estructura tridimensional [124–126]. Las UDP-Glc PPasas derivadas de organismos procariotas contienen alrededor de 300 aminoácidos mientras que aquellas provenientes de organismos eucariotas poseen alrededor de 500 residuos. Existe una marcada diferencia entre las enzimas de organismos procariotas y eucariotas a nivel de los aminoácidos que están involucrados en la catálisis y en la unión a los sustratos [127].

Como ya se ha mencionado las UDP-Glc PPasas de organismos eucariotas presentan una marcada diferencia en la secuencia de aminoácidos en comparación a las enzimas de bacterias, siendo proteínas no homólogas a pesar de catalizar la misma reacción. Otra característica distintiva es la estructura cuaternaria adoptada: las UDP-Glc PPasas procariotas forman principalmente homotetrámeros, mientras que en animales y levaduras las proteínas funcionales se encuentran formando complejos octaméricos [128] y en plantas y protozoos la forma enzimáticamente activa es monomérica [119, 129–133].

La UDP-Glc es un intermediario clave en el metabolismo de carbohidratos, principalmente en la síntesis de oligo- y poli-sacáridos en diferentes organismos eucariotas. Por ejemplo, en protozoos parasíticos la UDP-Glc PPasa cumple un rol esencial en la virulencia de los mismos. En estos microorganismos, distintos monosacáridos activados, ya sea UDP-Glc u otros UDP-azúcares para los cuales es requerida la producción de este compuesto (por ejemplo UDP-Gal), son utilizados en la formación de glicoconjugados importantes en la interacción patógeno-hospedador [119, 132–134] o en la producción de polímeros estructurales (celulosa) durante el enquistamiento, que permiten la supervivencia del parásito [135]. En plantas, la enzima cobra especial importancia debido su rol primario en la biosíntesis y partición de la sacarosa, este compuesto actúa como la principal forma de transporte de carbono en estos organismos [123]. En tejidos animales y hongos las funciones de la UDP-Glc PPasa están asociadas a la partición de hexosas-P entre las distintas vías metabólicas como la N-glicosilación de proteínas y la síntesis de polisacáridos estructurales y de reserva [128, 136–

138]. A diferencia de lo que ocurre en eucariotas fotosintéticos (y bacterias), la síntesis de glucógeno en eucariotas heterótrofos ocurre mediante la utilización de UDP-Glc como donador del grupo glucosilo (y no ADP-Glc). Por lo que esta enzima cobra una relevancia central en la vía de acumulación de fuente de carbono y energía en animales, hongos, levaduras y algunos protozoos.

Distinto a lo que sucede en la ruta metabólica en plantas y bacterias, en eucariotas heterótrofos el punto de regulación de la biosíntesis de glucógeno no se encuentra a nivel de la producción del azúcar activado y, de acuerdo a lo informado hasta el momento, la UDP-Glc PPasa no es una enzima regulada alostéricamente por metabolitos. En cambio, se ha informado sobre la regulación de la enzima por distintos tipos de modificaciones post-traduccionales. Por ejemplo en plantas, donde la UDP-Glc PPasa adopta una conformación monomérica activa, se ha descrito que la formación de estructuras oligoméricas superiores sería un mecanismo para la inactivación de la enzima [123, 129, 130]. Se ha informado que la UDP-Glc PPasa de levaduras es fosforilada por una quinasa implicada también en la regulación de la actividad de la glucógeno sintasa [139, 140]. Si bien esta fosforilación no alteró la actividad de la enzima, la falta de fosforilación *in vivo* llevó a una síntesis inadecuada de los β -glucanos de la pared celular, a lo cual se sumó un incremento en la acumulación de glucógeno [141]. Coherente con esto, la enzima fosforilada fue localizada en la membrana plasmática (donde ocurre la síntesis de β -glucanos), mientras que la enzima desfosforilada permanecía en el citoplasma (donde es sintetizado el glucógeno) [141]. De esta forma, los estudios muestran que la canalización de la UDP-Glc hacia destinos específicos parecería ser alcanzado mediante el control de la localización de la enzima involucrada en su síntesis. Por otro lado, en nuestro grupo de trabajo se ha demostrado que la UDP-Glc PPasa de *Entamoeba histolytica* está finamente regulada por modificaciones post-traduccionales de tipo redox, provocada por metabolitos críticos del medio intracelular [133]. Este tipo de modulación de la actividad es determinante para la distribución de los carbohidratos en diferentes destinos metabólicos del parásito.

En los últimos años han sido resueltas las estructuras cristalinas de UDP-Glc PPasas de diferentes organismos [119, 128, 132, 137, 142] que han permitido una mejor comprensión de estas proteínas. Las UDP-Glc PPasas eucariotas presentan un dominio central constituido por un núcleo hidrofóbico altamente conservado donde se localiza el sitio activo de la enzima. Hacia los extremos N- y C-terminales, éstas se encuentran menos conservadas, observándose mayores diferencias entre estos dominios, lo cual podría estar implicado en la diversidad estructural y funcional encontrada en las enzimas de los organismos eucariotas [128, 143].

1.6.1.2. Las UDP-azúcar pirofosforilasas

En comparación a las UDP-Glc PPasas, las UDP-azúcar PPasas (UTP:azúcar-1P uridililtransferasa EC 2.7.7.64) fueron identificadas más recientemente en plantas de *Arabidopsis* y *Pisum sativum* [144–146]. Existen sin embargo, algunos trabajos previos descritos sobre extractos de plantas, pero cuyas actividades UDP-azúcar PPasa fueron atribuidas a otras proteínas [147]. Esta enzima ha sido identificada en plantas, parásitos eucariotas y algunas bacterias, aunque hasta el momento, no han sido identificadas en vertebrados [148, 149]. La UDP-azúcar PPasa comúnmente cataliza una reacción reversible con un amplio rango de azúcares-1P (Glc-1P, Gal-1P, GlcA-1P, GalA-1P, L-Ara-1P, Xyl-1P) y UTP para dar los correspondientes UDP-azúcar y PPI.

Los genes identificados de UDP-Azúcar PPasa codifican para proteínas de aproximadamente 65-70 kDa [144, 145, 150], existiendo hasta el momento una estructura cristalizada, correspondiente a la UDP-azúcar PPasa de *L. major* [151]. La proteína es activa como monómero, siendo similar a las UDP-Glc PPasa en cuanto a los dominios estructurales, presentando una región central con el plegamiento de tipo Rossmann y conteniendo el sitio activo flanqueado por los dominios característicos N- y C-terminales [151]. En cuanto al estudio de las funciones catalizadas por las UDP-azúcar PPasa, se han realizado ensayos de sobreexpresión de esta proteína en plantas, así como también la búsqueda de fenotipos *knock down* con el fin de evidenciar efectos sobre las plantas. Sin embargo, en ninguno de los casos, con cantidades aumentadas o disminuidas de esta enzima, fue posible observar diferencias en el fenotipo, inclusive en diferentes especies de plantas [146, 152, 153]. Respecto a los avances en estudios realizados en protistas, se ha visto que en *L. major* la delección de la UDP-Glc PPasa conduce a un fenotipo leve, con actividad residual posiblemente debido a la presencia de la UDP-azúcar PPasa [154]. Estos resultados demostrarían la capacidad de utilizar diversos azúcares-1P por parte de las UDP-azúcar PPasas, generando una compensación en la actividad delecionada en cada caso.

1.6.2. UDP-glucosa β -1,3-glucano glicosil transferasa

Los primeros trabajos sobre el estudio de las β -1,3-glucano sintasas fueron llevados a cabo en *E. gracilis* [65, 67]. Como se mencionó previamente, *E. gracilis* produce un polímero lineal β -1,3-glucano de unidades de Glc, denominado *paramylon* o paramilon como compuesto de reserva de carbono intracelular [155]. Se ha demostrado que en primer lugar es sintetizado como microfibrillas de un tamaño lateral de 3-4 nm que se acumulan en gránulos inmaduros de baja cristalinidad [29, 68]. Durante la maduración de los gránulos, se cree, las microfibrillas de

paramilon se alinean para formar matrices discretas altamente ordenadas que se caracterizan por una alta cristalinidad [62, 68, 156]. Estos gránulos se encuentran rodeados por una membrana que posee una organización similar a la membrana plasmática, como se muestra en la Figura 3 [63].

Todas las β -glucano sintasas conocidas son enzimas de transmembrana, por lo que normalmente, para ensayar su actividad enzimática se utilizan fracciones particuladas o se extrae las enzimas con detergentes [60, 65, 67]. Los primeros trabajos publicados sobre la paramilon sintasa demostraron la posibilidad de sintetizar *in vitro* β -1,3-glucano a partir de extractos de *E. gracilis* libres de células [65, 67]. Posteriormente, en publicaciones más recientes, demostraron que la paramilon sintasa se encuentra unida a la membrana que rodea al gránulo y que es una enzima compleja, con una masa molecular de ~670 kDa en la que se incluyen dos péptidos de unión a UDP-Glc de 37 y 54 kDa [60].

Estudios enzimáticos revelaron que la paramilon sintasa es una uridina difosfato (UDP) glucosa- β -1,3-glucano β -3-glucosiltransferasa (EC 2.4.1.34), utilizando específicamente UDP-Glc como sustrato [65, 67]. Es conocido que las β -1,3-glucano sintasas se encuentren en complejos multiproteicos, debido a que generalmente los enriquecimientos en esta enzima contienen varias proteínas de diversos tamaños moleculares. Sin embargo, no existe evidencia que todas las proteínas se encuentren físicamente asociadas como complejos, además de desconocerse si todas son necesarias para producir la catálisis. Recientemente, a partir de un trabajo de transcriptoma, se pudieron encontrar dos genes candidatos a codificar la paramilon sintasa [87], que posteriormente se confirmaría su función por estudios de *knock down* mediante ensayos de ARN de interferencia en el que encontraron afectado los niveles de acumulación de paramilon [157].

1.6.3. β -1,3-glucanasas

Existe una amplia distribución y diversidad de roles asignados a los β -1,3-glucanos y polisacáridos relacionados en sistemas biológicos los cuales se encuentran bien documentados. En algunos sistemas, los β -1,3-glucanos son transitorios, por ejemplo la callosa en plantas, la cual se ha visto que se acumula en ciertas condiciones y en otras su acumulación puede verse reducida. En otros organismos, los β -1,3-glucanos actúan como compuestos de reserva de carbono intracelular, en otros, forman parte de los componentes de las paredes celulares. Cualquiera sea el destino final de estos glucanos, si existe una acumulación y degradación, indicarían que existe la presencia de las β -1,3-glucanos hidrolasas operando en estos sistemas [158].

Al analizar las enzimas que despolimerizan los β -1,3-glucanos, es necesario considerar enzimas que hidrolizan una variedad de tipos de enlaces entre los residuos β -glucosilos. Entre ellas, están las enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces glucosídicos a través de un patrón de acción del tipo endo- o exo-. Las endo- β -1,3-glucanasas hidrolizan enlaces β -1,3 internos aleatoriamente generando oligosacáridos, mientras que las exo- β -1,3-glucanasas hidrolizan desde los extremos de los polímeros u oligosacáridos [159]. Para lograr la hidrólisis completa de estos oligosacáridos, generalmente se requieren varios tipos de enzimas. En algunos casos actúan también β -glucosidasas, siendo el sustrato principal de estas enzimas los disacáridos, producto de las enzimas primero descritas. Alternativamente, también se pueden encontrar β -glucano fosforilasas, estas enzimas llevan a cabo su catálisis mediante la fosforólisis del polímero, para dar lugar a la correspondiente azúcar-1P y el polímero con una unidad menos del azúcar [160].

Particularmente, las enzimas con actividad hidrolítica de β -1,3-glucanos del tipo endo-, tradicionalmente se han clasificado dentro del grupo EC 3.2.1.39, el cual es representativo de familias de GH16, GH17, GH55, GH64 y GH81 de acuerdo a la base de datos CAZy (www.cazy.org) [161]. Las endo- β -1,3-glucanasas de la familia GH17 de plantas han sido ampliamente estudiadas, centrándose en su actividad antifúngica hidrolizando las paredes de los hongos patógenos de plantas [158]. Sin embargo, muy poco es conocido sobre glucanasas de otros organismos como *E. gracilis*, microalga que acumula carbono en forma de β -1,3-glucano, por lo que este tipo de enzimas cobran gran importancia al momento de intentar comprender como se produce la degradación del paramilon en el interior celular. A partir de trabajos de transcriptoma se ha podido identificar posibles transcritos que codificarían para 17 diferentes miembros pertenecientes a la familia GH81, 3 transcritos que corresponderían a la familia GH17 y solo 1 miembro para la familia de GH64 en *E. gracilis*, todas ellas del tipo endo-glucanasa [85].

Cuando se habla de proteínas que de una forma u otra deben interaccionar con sustratos principalmente insolubles, como lo es el paramilon, es esperable encontrar que estas proteínas contengan dominios de unión a carbohidratos (o CBM del inglés *Carbohydrate Binding Modules*) que faciliten el acercamiento de la enzima al sustrato. Estos CBM son dominios no catalíticos, normalmente presentes en enzimas de las diferentes familias de GH. Se definen libremente como secuencias de aminoácidos contiguos que forman una entidad no catalítica, con un plegado independiente dedicado al reconocimiento y unión de carbohidratos. Pueden

clasificarse funcionalmente de acuerdo a las propiedades estructurales del ligando objetivo, aunque normalmente son agrupados en familias de acuerdo a la secuencia aminoacídica [162].

Curiosamente, a partir del trabajo de transcriptoma, en *E. gracilis* hasta el momento solo se han encontrado 4 CBM, lo cual podría considerarse un número bajo si se compara con los 126 CBM presentes en *Arabidopsis* o 40 CBM en humanos. Si se analizan otros miembros Euglenozoa como *T. brucei* y *L. braziliensis*, solo contienen un CBM cada uno, lo cual a su vez es sensato al considerar que son organismos que viven en hospederos animales y por lo tanto no necesitarían mecanismos complejos de degradación de carbohidratos [85]. El CBM que se encuentra conservado a lo largo de los Euglenozoa, corresponde al de la familia 48, el cual se encuentra asociado con la unión a glucógeno, a pesar de que *E. gracilis* no produce ni utiliza glucógeno. *E. gracilis* también codifica una quitinasa GH18 que presenta un CBM de la familia 18 dirigido a quitina, con una potencial función en la degradación de quitina extracelular. También se ha encontrado una expansina, fusionada con un dominio CBM de la familia 63, de unión a celulosa, que estaría involucrada en la descompactación de la arquitectura de glucanos de paredes celulares [163]. Por último, el restante CBM pertenece a la familia 57, se encuentra fusionado a proteínas escasamente estudiadas hasta el momento, aunque se cree tendrían la capacidad de unirse a N-glicanos [164].

La información disponible en la bibliografía en cuanto a los CBM presentes en *E. gracilis*, al momento es escasa y es necesario profundizar en su función y utilidad en este organismo, el que a su vez presenta un amplio repertorio enzimático comparado a otras microalgas. Sin embargo, es intrigante que ante la formación de un polímero de reserva de carbono intracelular insoluble no se haya encontrado, al menos hasta el momento, enzimas que presenten CBM de unión a β -1,3-glucanos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos generales

El objetivo propuesto para el trabajo de esta tesis doctoral es el estudio del metabolismo de los hidratos de carbono, principalmente la partición de la Glc para la síntesis y degradación de polisacáridos estructurales y de reserva de un eucariota fotosintéticos, *Euglena gracilis*. Se propone realizar la caracterización a nivel bioquímico, enzimático y celular de distintas enzimas relacionadas al metabolismo de síntesis y degradación del paramilon y del metabolismo dependiente del glutatión. Se realizará el clonado molecular de genes y la producción por expresión recombinante y con alto grado de pureza de enzimas involucradas en pasos claves. Los resultados serán analizados en forma comparativa con las características de estas proteínas en el escenario evolutivo que abarca procariotas, protistas y plantas superiores.

2.2. Objetivos específicos

1. Identificar los genes que codifican para enzimas del metabolismo del carbono y del metabolismo redox en *Euglena gracilis*, expresar las enzimas como proteínas recombinantes utilizando *Escherichia coli* como sistema de expresión, purificar cromatográficamente cada una de las proteínas recombinantes y caracterizar cinéticamente la enzima pura. Las enzimas a analizar serán:

- UDP-glucosa pirofosforilasa
- UDP-azúcar pirofosforilasa
- UDP-glucosa β -(1,3)-glucano glicosil transferasa
- β -(1,3)-glucanasa

2. Analizar mediante microscopía de alta resolución la ubicación subcelular de cada una de las enzimas en estudio, con el objeto de obtener información que, integrando los resultados obtenidos en los estudios cinéticos, nos permitirá comprender la funcionalidad a nivel celular de estos sistemas enzimáticos.

3. Realizar ensayos de interferencia de ARN (ARNi) para cada una de las enzimas a los efectos de evaluar la importancia que tienen en la síntesis del polisacárido y/o en la regulación metabólica de la partición del carbono.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

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 este trabajo se obtuvieron comercialmente de las siguientes compañías:

- ✓ *Componentes de medios de cultivos*: Britania, Cicarelli, Anhedra.
- ✓ *Reactivos de biología molecular*: Promega, Invitrogen, Fermentas, Novagen, Genbiotech, New England BioLabs.
- ✓ *Materiales utilizados en la purificación de proteínas y otros reactivos relacionados a proteínas*: GE Healthcare.
- ✓ *Filtros y columnas de desalado*: Millipore, Bio-Rad.
- ✓ *Reactivos químicos*: Sigma-Aldrich, Merck, Genbiotech.
- ✓ *Oligonucleótidos sintéticos*: GBT Genbiotech
- ✓ *Genes sintéticos*: Bio Basic Inc.

3.2. Microorganismos, plásmidos, medios de cultivo y antibióticos

3.2.1. Cepas bacterianas

Para el clonado de los diferentes genes y la expresión recombinante de las distintas proteínas caracterizadas en este trabajo de tesis, se emplearon las cepas de *E. coli* y los plásmidos que se disponen en nuestro grupo de trabajo, según lo detallado a continuación.

- ✓ *Escherichia coli* **Top10 F'**: [*lacI^q*Tn10(*Tet^R*)] *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *deoR* *araD139* Δ (*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* (*Str^R*) *endA1* *nupG*. Esta cepa fue empleada durante las etapas de biología molecular para generar las distintas construcciones génicas.
- ✓ *Escherichia coli* **BL21 (DE3)**: F⁻ *ompT* *hsdS* (*r⁻* *m⁻*) *gal* *dcm* (DE3). Se empleó para la expresión recombinante.
- ✓ *Escherichia coli* **TunnerTM (DE3)**: F⁻ *ompT* *hsdS* (*r⁻* *m⁻*) *gal* *dcm* *lacY1* (DE3). Esta cepa se empleó como alternativa a *E. coli* BL21 (DE3).
- ✓ *Escherichia coli* **BL21 (DE3) B834**: es una cepa deficiente en proteasas y auxotrofo para metionina. Posee una copia cromosomal del gen de la T7 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.

- ✓ *Escherichia 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* (gen *argU*, que reconoce los codones de arginina AGA y AGG, gen para el ARNt *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 T7 inducible con IPTG. La cepa es resistente a cloranfenicol (Cm).
- ✓ *Escherichia coli* **Rossetta (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 ARNt para AGG/AGA (Arg), AUA (Ile), CUA (Leu), CCC (Pro) y GGA (Gly) en un plásmido compatible (ColE1) resistente a cloranfenicol (Cm).
- ✓ *Escherichia coli* **SHuffle T7**: son células derivadas de la cepa de *E. coli* K12. Expresan constitutivamente una copia cromosomal de 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 T7.

3.2.2 Microalgas

- ✓ *Euglena gracilis* UTEX 753 proveniente del Centro de Cultivo Algal de la Universidad de Texas (USA).

3.2.3. Plásmidos

Vector de clonado de los productos de PCR generados con *Taq* ADN polimerasa o alternativamente generados con *Pfu* polimerasa o *Phusion* polimerasa:

- ✓ Vector pGEM[®]-T Easy (Promega), vector de clonado para productos de PCR generados con *Taq* ADN polimerasa. Presenta marcador de selección con resistencia a ampicilina.
- ✓ Vector pENTR/D-TOPO (Invitrogen) vector de clonado para productos de PCR con extremos romos (provenientes de *Phusion* o *Pfu* polimerasa). Además permite el clonado direccionado cuando se adiciona la secuencia CACC en el extremo 5' de la secuencia nucleotídica. Presenta marcador de selección con resistencia a kanamicina.
- ✓ Vector pEASY[®]-Blunt (Trans), vector de clonado para productos de PCR con extremos romos (provenientes de *Phusion* o *Pfu* polimerasa). Presenta dos marcadores de selección con resistencia a ampicilina y kanamicina.

Vectores de expresión de sistemas bacterianos de *E. coli*. Todos los vectores mencionados a continuación son inducibles con IPTG:

- ✓ Vectores de la serie Duet (Novagen), estos vectores poseen dos sitios de múltiple clonado (SMC), con un promotor T7 y una secuencia de unión a ribosoma en cada uno para permitir la co-expresión de dos genes, quedando de este modo ambos genes de interés bajo el control transcripcional del promotor T7 y el operador lac. Además, los vectores de esta serie son compatibles entre ellos permitiendo la co-transformación. De esta serie se utilizó los vectores pETDuet-1 y pRSFDuet-1 inducibles por IPTG. Poseen marcador de selección por resistencia a antibióticos, en el caso de pETDuet-1 a ampicilina, mientras que el plásmido pRSFDuet-1 confiere resistencia a kanamicina.
- ✓ Vector pET28(c+) (Novagen), vector inducible por IPTG que permite incorporar una etiqueta de poli-histidinas (His-x6) en el extremo N-terminal de la proteína para facilitar su posterior purificación. Posee marcador de selección que confiere resistencia a kanamicina.
- ✓ Vector pET24a (Novagen) vector inducible por IPTG que permite incorporar una etiqueta de poli-histidinas (His-x6) en el extremo C-terminal de la proteína. El marcador de selección otorga resistencia a kanamicina.
- ✓ Vector pMAL-C-TEV, equivalente al pMAL-C (New Englando BioLabs) modificado para contener un sitio de corte para la TEV proteasa, gentilmente cedido por Dr. Wulf Blankenfeldt del Centro Helmholtz para la Investigación de Infecciones, Alemania.

3.2.4. Medios de cultivo

Bacterias:

-Lysogeny Broth (LB) (extracto de levadura 5 g/l; tripteína bacteriológica 10 g/l y NaCl 10 g/l).

-LB-agar. Medio LB suplementado con agar-agar 1,6% (p/v).

Microalgas:

-Cramer & Myers (CyM) [165] (mg/l):

| | | |
|-------------------------------|-----------------|-------|
| Citrato de sodio | $C_6H_5O_7Na_3$ | 800 |
| Fosfato monobásico de potasio | KH_2PO_4 | 1000 |
| Fosfato dibásico de amonio | $(NH_4)_2HPO_4$ | 1000 |
| Sulfato de magnesio | $MgSO_4$ | 200 |
| Cloruro de calcio | $CaCl_2$ | 20 |
| Sulfato férrico | $Fe_2(SO_4)_3$ | 3 |
| Sulfato de zinc | $ZnSO_4$ | 0.4 |
| Cloruro de manganeso | $MnCl_2$ | 1.8 |
| Molibdato de sodio | Na_2MoO_4 | 0.02 |
| Cloruro de cobalto | $CoCl_2$ | 1.8 |
| Sulfato de cobre | $CuSO_4$ | 0.02 |
| Tiamina | Vitamina B1 | 0.01 |
| Cianocobalamina | Vitamina B12 | 5E-04 |

-EGM (*Euglena gracilis medium*) UTEX (mg/l):

| | | |
|-----------------------------|---------------------------|------|
| Acetato de sodio trihidrato | $NaC_2O_2H_3 \cdot 3H_2O$ | 1000 |
| Peptona de carne | | 1000 |
| Tripton | | 2000 |
| Extracto de levadura | | 2000 |
| Cloruro de calcio | $CaCl_2$ | 10 |

3.2.5. Antibióticos

- ✓ Ampicilina. Concentración final 100 µg/ml.
- ✓ Kanamicina. Concentración final 50 µg/ml.
- ✓ Cloranfenicol. Concentración final 50 µg/ml.

3.3. Metodología utilizada en biología molecular

Las técnicas estándares de microbiología y biología molecular fueron realizadas, fundamentalmente, según los protocolos ya establecidos [166].

3.3.1. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos cebadores se diseñaron convenientemente teniendo en cuenta secuencias disponibles en las bases de datos de los trabajos de transcriptomas publicados,

principalmente del John Innes Centre (<https://jicbio.nbi.ac.uk/euglena>) [85]. Además, en el diseño de los oligonucleótidos se tuvo en cuenta la adición de sitios blanco para enzimas de restricción en los extremos 5' y 3' del gen para su posterior subclonado en los vectores de expresión. En el caso de los oligonucleótidos utilizados para los ensayos de ARN de interferencia, los mismos presentan en el extremo 5' la secuencia promotora de la T7 polimerasa necesario para la síntesis *in vitro* de ARNdc. Los cebadores utilizados se detallan en la tabla 3.

Tabla 3: Oligonucleótidos utilizados para amplificar los genes en estudio. Los sitios de restricción se encuentran subrayados en la secuencia nucleotídica.

| Nombre | Secuencia (5'-3') | Sitio restricción | Tm (°C) |
|------------------|-------------------------------------|-------------------|---------|
| EgrgalUfow | <u>CATATGGCTGACCTTTTTTCGC</u> | <i>NdeI</i> | 52,4 |
| EgrgalUrev | <u>GTCGACCTACAGTTCCACCTTGGTG</u> | <i>SalI</i> | 61,0 |
| EgrUSP283fow | <u>CATATGGAGAAGTTACCCTCCGATGC</u> | <i>NdeI</i> | 59,5 |
| EgrUSP283rev1 | <u>GTCGACTTAGGCACTTGACCCCACTCG</u> | <i>SalI</i> | 65,8 |
| EgrUSP283rev2 | <u>GTCGACTCACAGAGATGGCTCATCAATG</u> | <i>SalI</i> | 61,4 |
| EgrUSP934fow | <u>CATATGGCGGTGCTGCCGCCCGGG</u> | <i>NdeI</i> | 67,6 |
| EgrUSP934rev | <u>GTCGACTCACCCCGGCTCGTCCACCACG</u> | <i>SalI</i> | 70,2 |
| EgrUSP934fowint | GAGGCCATAGGCGCCATCTGCCGC | - | 65,9 |
| EgrUSP934revint | GCGGCAGATGGCGCCTATGGCCTC | - | 65,9 |
| EgrGH81-1fow | <u>CCATGGACCTCTGCACGTA</u> CTTCGCC | <i>NcoI</i> | 64,3 |
| EgrGH81-1fowint1 | GCTCAGGCGATTCCCTCCCGGGG | - | 64,2 |
| EgrGH81-1revint1 | CCCCGGGAAGGAATCGCCTGAGC | - | 64,2 |
| EgrGH81-1fowint2 | GTTCCAACAATGCCAAGTATTTTG | - | 52,3 |
| EgrGH81-1revint2 | CAAATACTTGGCATTGTTGGAAC | - | 52,3 |
| EgrGH81-1rev | <u>CTCGAGGTCCAGGGTGTGGTAGCCC</u> | <i>XhoI</i> | 65,9 |
| EgrGH81-2fow | <u>CATATGCCGCCCGCGGTGCCCGCGG</u> | <i>NdeI</i> | 70,8 |
| EgrGH81-2fowint1 | GGCTCATCCGCCTTGCCCTGTGC | - | 64,2 |
| EgrGH81-2revint1 | CGACAAGGCAAGGCGGATGAGGCC | - | 64,2 |
| EgrGH81-2fowint2 | CCGGCTGGTACCAGAGTGCGGC | - | 64,2 |
| EgrGH81-2revint2 | GCCGCACTCTGGTACCAGCCGG | - | 64,2 |
| EgrGH81-2fowint3 | GCGGATGAGGAGTGCGAAGACACCG | - | 64,2 |
| EgrGH81-2revint3 | CGGTGTCTTCGCACTCCTCATCCGC | - | 64,2 |
| EgrGH81-2rev | <u>GTCGACTCAGCCCCGAGCTCCGGAGG</u> | <i>SalI</i> | 70,4 |
| EgrGH17fow | <u>CATATGACGGAGCTGGGATGGAATATC</u> | <i>NdeI</i> | 59,7 |
| EgrGH17rev | <u>GTCGACTTAGACGCTGGAACAGGTGGC</u> | <i>SalI</i> | 64,3 |
| Oligo dT18 | TTTTTTTTTTTTTTTTTTT | | 27,5 |

3.3.2. Extracción de ARN total

A partir de un cultivo de células de *E. gracilis* crecidas en la condición deseada se cosecharon aproximadamente 1,5 millones de células por centrifugación a 2000 ×g durante 5 min y se extrajo el ARN total utilizando el sistema comercial *EasyPure RNA kit* (TRANS) siguiendo el protocolo establecido en el mismo. El producto obtenido fue luego cuantificado y almacenado a -80°C hasta su utilización.

3.3.3. Determinación de la concentración y pureza del ARN

La calidad e integridad del ARN obtenido fue examinada en geles de agarosa 1 % (p/v) mediante la visualización de las bandas de ARN ribosomal. La concentración del mismo fue determinada en espectrofotómetro NanoDrop™ 2000 (Thermo).

3.3.4. Reacción de la transcripción reversa del ARN

Alícuotas de ARN total obtenido de las diferentes extracciones fueron utilizadas para la síntesis de la primera hebra de ADNc. Para este paso se utilizó la *RevertAid Reverse Transcriptase* (Thermo Scientific) polimerasa siguiendo el protocolo indicado por el fabricante para muestras de alto contenido de GC y utilizando oligonucleótido dT₁₈ (Tabla 3).

El ADNc obtenido fue almacenado a -20 °C hasta su utilización. Se usó 1 µl de la reacción como molde para las reacciones de PCR en volúmenes de 25 µl.

3.3.5. Amplificación de ADN. Reacción en cadena de la polimerasa

Para la amplificación se utilizaron oligonucleótidos específicos especificados en la Tabla 3, que además permiten la incorporación de sitios de restricción adecuados para el posterior clonado en los vectores de expresión. Además en algunos casos, se diseñaron oligonucleótidos internos con la finalidad de lograr amplificar los genes completos por partes que luego se unirían mediante la técnica de “superposición y extensión”.

En general, la mezcla de reacción (25 µl) contenía: 1 µl de ADNc como molde, 0.5 µM de cada oligonucleótido, 0,2 mM de cada dNTP, 2,5 mM MgCl₂ y 1 U *Phusion* ADN polimerasa (New England BioLabs). Las condiciones de ciclado de PCR se realizó según lo indicado en la Tabla 4, usando un termociclador T100™ *Thermal Cycler* (Bio-Rad). Las mezclas de reacción se separaron electroforéticamente en gel de agarosa al 1% (p/v) y se purificaron a partir del gel, para luego ligarlas al vector de clonado. Para el cálculo de la T_A óptima, se utilizó el servidor de New England BioLabs en: <http://tmcalculator.neb.com/#!/main>.

Tabla 4: Programa general de PCR utilizando *Phusion* polimerasa.

| | | |
|---------------------|--------------------------|-------------------------|
| Desnaturalización | 30 s a 98 °C | 1 ciclo |
| I-Desnaturalización | 10 s a 98 °C | 35 ciclos (I+II+III) |
| II-Apareamiento | 30 s a T _A °C | |
| III-Elongación | 30 s/kb a 72 °C | |
| Elongación final | 10 min a 72 °C | 1 ciclo |

3.3.6. Purificación de ADN a partir de gel de agarosa

Para purificar fragmentos de ADN a partir del gel de agarosa se utilizó el sistema *Wizard[®]SV gel & PCR Clean up system* (Promega), siguiendo el protocolo especificado en el fabricante.

3.3.7. Tratamiento con *Taq* ADN polimerasa

La amplificación de ADN con la enzima *Phusion* ADN polimerasa no proporciona al amplicón las desoxi-adenosinas libres en ambos extremos, necesarios para el clonado en el vector pGEM[®]-T Easy. De esta manera, para poder insertar los fragmentos amplificados en este vector de clonado, a una alícuota del producto de PCR ya purificado se le realizó un tratamiento con *Taq* ADN polimerasa a 70 °C durante 30 min en el medio detallado en la Tabla 5.

Tabla 5: Composición de la mezcla de reacción para el tratamiento con *Taq* ADN polimerasa

| | |
|----------------------------|--------|
| <i>Buffer Taq</i> 10X | 1 µl |
| MgCl ₂ 25 mM | 1 µl |
| Producto de PCR purificado | 6,5 µl |
| dATP 2 mM | 1 µl |
| <i>Taq</i> ADN polimerasa | 0,5 µl |

3.3.8. Clonado de los genes amplificados por PCR

Los genes amplificados por PCR se clonaron en el vector pGEM[®]-T Easy (Promega) adecuado para ser mantenidos, secuenciados y luego subclonados en los vectores de expresión correspondientes. Para el clonado de los genes amplificado con *Phusion* ADN polimerasa, se ligó al vector pGEM[®]-T Easy previo tratamiento con *Taq* ADN polimerasa. Alternativamente también se utilizó el vector de clonado para extremos romos pENTR/D-TOPO (Invitrogen) y pEASY-Blunt (TRANS) para los genes mayores a 1800 pb donde la eficiencia de ligación al

vector pGEM[®]-T Easy resultaba muy baja. En ambos casos las reacciones se realizaron siguiendo las indicaciones especificadas por el fabricante.

3.3.9. Transformación de bacterias competentes

Para permitir la incorporación de ADN plasmídico exógeno, las células de *E. coli* se hicieron competentes utilizando el método de CaCl₂. Los pasos seguidos se indican a continuación. Un cultivo crecido durante toda la noche en medio LB se diluyó 1/50 en medio de cultivo fresco y se creció a 37 °C hasta una DO₆₀₀~0,4; se tomaron alícuotas de 1 ml en tubos *ependorf* de 1,5 ml, se centrifugaron a 5000 ×g por 5 min y las células se resuspendieron en 500 µl de solución ST1 [10 mM MOPS-NaOH pH 7,0; 10 mM KCl]. Se volvió a centrifugar a 5000 ×g por 5 min, para luego resuspender las células en 500 µl de solución ST2 [100 mM MOPS-NaOH pH 6,5; 10 mM KCl; 100 mM CaCl₂] e incubarlas durante 15 min en hielo. Las células se centrifugaron nuevamente a 5000 ×g por 5 min y se resuspendieron en 100 µl de ST2. A las células competentes se les agregaron entre 2-5 µl de plásmido o de mezcla de ligación y se incubaron en hielo durante 60 min. Se realizó un choque térmico a 42 °C durante 40 s y luego se recuperaron las células adicionando 1 ml de medio LB e incubando durante 60 min a 37 °C. Por último las células se volvieron a centrifugar a 5000 ×g durante 5 min, se resuspendieron en los 100 µl remanentes y se sembraron en placas de LB-agar suplementado con el/los antibióticos correspondientes para permitir la selección de las células transformadas. Las placas se incubaron toda la noche a 37 °C y se seleccionaron clones para continuar con el análisis.

3.3.10. Minipreparación de ADN plasmídico

Para la extracción de ADN plasmídico a partir de células transformadas de *E. coli*, los clones de interés se repicaron en 4 ml de medio LB líquido suplementado con el antibiótico correspondiente y se cultivaron toda la noche a 37 °C. Las células se cosecharon por centrifugación a 3000 ×g durante 10 min y se extrajo el ADN plasmídico utilizando el sistema comercial *EasyPure Plasmid MiniPrep Kit* (TRANS), siguiendo el protocolo establecido en el mismo. La obtención del plásmido se corroboró por electroforesis en gel de agarosa.

3.3.11. 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, de una concentración aproximada de 100 µg/µl se envió a la empresa MacroGen Inc (Corea) para ser secuenciada de forma automatizada utilizando oligonucleótidos específicos que hibridan en una región del plásmido cercana al sitio de inserción del gen.

3.3.12. Digestión de ADN 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 permitirán 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 comúnmente contenían: 1 a 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. Esta mezcla se incubó 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 como se indica en el punto 3.4.6.

3.3.13. Precipitación de ADN

La precipitación de ADN se utiliza para eliminar todos los componentes no deseados de la mezcla de reacción durante el procesamiento químico del polímero. En nuestro 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 agregaron dos volúmenes de etanol (absoluto) y 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3 M. La mezcla se incubó a 4 °C toda la noche. Posteriormente, se centrifugó la mezcla de precipitación a 15000 ×g durante 15 min a 4 °C, se eliminó el sobrenadante, el precipitado de ADN se lavó con etanol 70% (v/v), se dejaron evaporar los restos de etanol 15 min a 25 °C y, por último, se resuspendió el ADN en H₂O Milli-Q esterilizada.

3.3.14. Ligación de fragmentos de ADN

Para ligar el gen de interés y el vector de expresión correspondiente, ambos digeridos con las mismas enzimas de restricción, se utilizó la enzima T4 ADN ligasa (Promega). La mezcla de reacción contenía típicamente una relación molar 3:1 de inserto:vector, que se incubó 5 min a 60 °C y luego se enfrió rápidamente en hielo. Posteriormente, se agregó a ese mismo tubo una cantidad adecuada de *buffer* de reacción 10 X que provee el fabricante y 2 U de T4 ADN ligasa. La mezcla final se incubó durante 16 h a 16 °C. Para obtener los clones de expresión, con la mezcla de ligación se transformaron células competentes de *E. coli* Top10 F', se seleccionaron los clones que poseían el inserto por análisis de restricción y con los clones seleccionados se transformaron las células de *E. coli* escogidas para la expresión de la proteína recombinante.

3.3.15. Síntesis de ARN doble cadena para ARN de interferencia

A partir de la secuencia codificante del gen de interés, se diseñan oligonucleótidos que permitan amplificar fragmentos de tamaños cercano a 400 pb. Al par de oligonucleótidos se les adiciona en el extremo 5' la secuencia promotora para la T7 ARN polimerasa (TAATACGACTCACTATAGGG). En la Tabla 6 se muestra la secuencia de los oligos utilizados para la síntesis de ARNdc. De este modo, al realizar la PCR, el fragmento de ~400 pb deseado quedará flanqueado por las secuencias promotora de la T7 ARN polimerasa en ambos extremos. Así se utilizará el producto de PCR como molde para la reacción *in vitro* de la T7 ARN polimerasa (TRANS) de acuerdo a especificaciones del fabricante. Finalizada la reacción, se adiciona ADNasa con el fin de degradar el ADN utilizado como molde y se procede a realizar un paso de purificación para obtener el ARNdc libre del ADN utilizado como molde con el uso del kit *Easy Pure RNA kit Purification* (TRANS) siguiendo las especificaciones del fabricante. El ARNdc se almacena a -80°C hasta su utilización en la electroporación de células de *E. gracilis* para realizar silenciamiento mediante ARN de interferencia.

Tabla 6: Secuencia de oligonucleótidos utilizados para producir el molde de ADN para la síntesis del ARNdc. En negrita se encuentra resaltado la secuencia T7 promotora

| Secuencia oligonucleótidos (5'-3') | |
|------------------------------------|---|
| EgrUDPGlcPPasaARNi1fow | TAATACGACTCACTATAGGG ACCCTGTTGGCACAAACCGTGG |
| EgrUDPGlcPPasaARNi1rev | TAATACGACTCACTATAGGG CGCCAACAACCTGGTCAAGTTTCCC |
| EgrUDPGlcPPasaARNi2fow | TAATACGACTCACTATAGGG CGCATCCTGTCTTACTTCGC |
| EgrUDPGlcPPasaARNi2rev | TAATACGACTCACTATAGGG CGAAGCGGGTGC GCGGTAC |
| EgrUSPARNi1fow | TAATACGACTCACTATAGGG ATCATGACGTCGGATGACAC |
| EgrUSPARNi1rev | TAATACGACTCACTATAGGG TCAACATTAAGAGTCAGAGG |
| EgrUSPARNi2fow | TAATACGACTCACTATAGGG TCAAGTGCCTAATTTTG |
| EgrUSPARNi2rev | TAATACGACTCACTATAGGG CGTCGCATTTCAAACCTG |
| EgrGH17ARNi1fow | TAATACGACTCACTATAGGG TGACGGTGTCCAACCTCACCATCG |
| EgrGH17ARNi1rev | TAATACGACTCACTATAGGG GCCTCTGTCTCAGGACTGGGTCC |
| EgrGH17ARNi2fow | TAATACGACTCACTATAGGG ATTGTCTCGGTGAGACTGGCTGGC |
| EgrGH17ARNi2rev | TAATACGACTCACTATAGGG ACGCTGGAACAGGTGGCCACC |

3.3.16. Electroporación de células de *E. gracilis* para realizar ARN de interferencia

A partir de un cultivo en crecimiento exponencial de *E. gracilis* se toman 1.10^6 células, seguidamente se procede a realizar dos lavados con la solución de electroporación *MAX Efficiency™ Transformation Reagent for Algae* (Invitrogen), luego se resuspende las células en 400 μ l de la solución, se adicionan ~ 10 μ g de ARNdc y se procede a la electroporación utilizando una cubeta de 2 mm de separación (400 μ l de volumen), resistencia infinita, 450 V, 75 μ F. Se realizan 2 pulsos con descanso de 15 s. Seguidamente se colocan las células en frasco T, llevando el cultivo a 3 ml de medio CyM suplementado con 0,5% de Glc durante 2 días hasta recuperación de las células. Pasado este tiempo, se puede cambiar el medio de cultivo de acuerdo a los requerimientos del ensayo.

3.3.17. Expresión de las proteínas recombinantes

Para expresar las proteínas recombinantes se transformaron células de *E. coli* BL21 (DE3) con las construcciones correspondientes, utilizando el método de transformación por CaCl_2 . Luego, las células transformadas se repicaron a medio LB líquido suplementado con el antibiótico adecuado según correspondía y se incubaron en agitación a 37 °C hasta su saturación. El cultivo anterior se utilizó para inocular 1 l de medio de cultivo LB. El medio de cultivo inoculado se incubó a 37 °C en agitador orbital a 180 rpm hasta alcanzar una $\text{DO}_{600} \sim 0,8$, momento en el cual se agregó el inductor IPTG a una concentración final de 0,4 mM. Luego de la inducción, las células continuaron cultivándose a 20 °C en agitador orbital a 180 rpm durante 16 h. Para cosechar las células, se centrifugó el cultivo a 5000 \times g durante 10 min y se conservaron a -20°C hasta su uso.

3.3.18. Purificación de las proteínas recombinantes

Todas las proteínas recombinantes se expresaron como proteínas que tenían fusionada una etiqueta de poli-histidinas en el extremo N-terminal de las mismas. La etiqueta de poli-histidinas permite la purificación de las proteínas recombinantes por cromatografía de afinidad por metal inmovilizado (IMAC). En cada caso, las células se resuspendieron en una cantidad adecuada de *buffer* (ver en el capítulos de resultados el *buffer* utilizado en cada caso) se sometieron a lisis con un procesador ultrasónico de alta intensidad *VibraCell™ VCX 130* (Sonics). La suspensión resultante se centrifugó a 20000 \times g durante 15 min a 4 °C para separar la fracción soluble de los detritos celulares y el resto de los componentes insolubles. La fracción soluble se sembró en una columna de IDA- Ni^{2+} (GE Healthcare) previamente equilibrada con el mismo *buffer*. Finalizada la siembra, la columna se lavó con *buffer* de siembra y luego para

la elusión de las proteínas retenidas se realizaron un gradiente de concentración de imidazol (0-300 mM) en *buffer*. A las fracciones que contenían la proteína de interés se les agregó glicerol 10% (v/v) (concentración final), se fraccionaron en pequeñas alícuotas y se conservaron a -80 °C. Las proteínas así conservadas mantuvieron su actividad biológica al menos durante 2 meses.

Alternativamente, en el caso de la expresión de la proteína fusionada a MBP, se procedió de igual modo hasta la obtención de la fracción soluble del extracto crudo. En este caso, se utilizó una columna de amilosa, que fue equilibrada utilizando el mismo *buffer* que en la cromatografías IMAC-Ni²⁺ pero sin el agregado de imidazol. Finalizada la siembra, se lavó abundantemente con *buffer* y posteriormente se procedió a la elusión utilizando el *buffer* de siembra con el agregado de 10 mM de maltosa que permite, por competencia, la elusión de la proteína de interés. De igual modo que lo explicado anteriormente, a las fracciones que contenían la proteína de interés se les agregó glicerol 10% (v/v) (concentración final), se fraccionaron en pequeñas alícuotas y se conservaron a -80 °C. Las proteínas así conservadas mantuvieron su actividad biológica al menos durante 2 meses. Cabe aclarar que también, de forma alternativa se realizó la digestión con TEV proteasa, que permite la separación de la proteína de fusión (MBP) de la enzima de interés.

3.4. Métodos bioquímicos básicos

3.4.1. Electroforesis en gel de agarosa

La electroforesis de fragmentos de ADN fueron resueltos por electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) en solución TAE 1X (40 mM Tris-HCl pH 8,0; 40 mM ácido acético; 1 mM EDTA) con la adición de Gel Green a una concentración final de 0,3 µg/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[®]Cell GT (Bio-Rad) para la corrida propiamente dicha. Los fragmentos se visualizaron en un transiluminador UltraSlim Led illuminator 470 nm (MaestroGen).

3.4.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida

La electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) se realizó siguiendo la técnica descrita por [167]. La concentración de acrilamida del gel de apilamiento fue de 4%, mientras que la concentración del gel de separación fue de 10-15%. Las muestras fueron desnaturalizadas antes de su siembra mediante el agregado de *buffer* de siembra SDS-PAGE 4X [SDS 1% (p/v), 2-mercaptoetanol 100 mM, en Tris-HCl 50 mM pH 6,8] y su posterior calentamiento a 100 °C durante 5 min. Una vez

sembradas las muestras, la corrida electroforética se realizó aplicando una corriente de intensidad constante de 25 mA por cada placa, en *buffer* de corrida [Tris-base 0,3% (p/v), glicina 1,44% (p/v), SDS 0,1% (p/v)], empleando un equipo Mini Protean II (Bio-Rad). Finalizada la corrida electroforética, las proteínas en el gel se visualizaron por tinción con *Coomassie*[®] *Brilliant Blue* R-250 en una solución de metanol 30% (v/v) y ácido acético 10% (v/v); y su posterior decoloración en una solución de metanol 5% (v/v) y ácido acético 7,5% (v/v). También se utilizó SDS-PAGE en condiciones no reductoras, utilizando el mismo procedimiento descrito con la omisión del agente reductor en el *buffer* de siembra. En el caso de PAGE en condiciones nativas se omitió la adición de SDS tanto en el *buffer* de siembra como en los geles poliacrilamida. En este caso la concentración de monómero utilizado fue de 7% p/v y se utilizó tinción con *Coomassie*[®] *Brilliant Blue* R-250 para la visualización de las proteínas en el gel [168].

3.4.3. Electrotransferencia seguida de inmunodetección

Finalizada la separación electroforética, se efectuó la electrotransferencia sobre una membrana de nitrocelulosa (GE Healthcare) durante 35 min a 200 mA en un equipo semi-seco (Analytik Jena). La solución empleada contenía Tris-base 25 mM, glicina 192 mM y etanol 20% (v/v). La membrana de nitrocelulosa transferida se bloqueó con una solución de leche descremada al 5% (p/v) en *buffer* PBS-Tween (8 g.l⁻¹ NaCl, 0.2 g.l⁻¹ KCl, 1.44 g.l⁻¹ Na₂HPO₄, 0.24 g.l⁻¹ KH₂PO₄, pH 7.4, 0,05% v/v Tween 20), incubándose 1 h a 25 °C. Luego, la membrana se incubó con el anticuerpo primario en solución PBS-leche descremada 1% (p/v) durante 1 h a 25 °C o, eventualmente, toda la noche a 4°C. Los anticuerpos fueron generados en conejo en el Centro de Experimentaciones Biológicas y Bioterio, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNL, Argentina; acorde a lo descrito anteriormente [169]. Entre cada paso, la membrana fue enjuagada con 3 lavados con *buffer* PBS-Tween 20 de 5 min cada uno.

Posteriormente, la membrana se incubó con una dilución 1/10000 en PBS 1X del anticuerpo secundario (anti-IgG totales de conejo, Sigma) conjugado a peroxidasa de rábano picante (HRP) durante 1 h a 25 °C. El revelado se llevó a cabo utilizando el método de quimioluminiscencia. Posterior a la incubación con el anticuerpo secundario, se embebió la membrana con una solución de *SuperSignal West Pico* (Thermo). 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.

3.4.4. Cuantificación del contenido proteico

Para determinar la concentración de las proteínas totales presentes en las muestras se utilizó la técnica de [170], utilizando como patrón una solución de BSA (Sigma-Aldrich). Las lecturas de absorbancia se realizaron a 595 nm en un espectrofotómetro *S-26 Spectrophotometer* (Boeco). Alternativamente se realizó cuantificación del contenido proteico midiendo absorbancia a 280 nm.

3.4.5. Desalado 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) de MWCO apropiado para cada proteína y se procedió según las indicaciones del fabricante.

También se utilizó para el desalado mini-columnas BioGel P6 (Bio-Rad) siguiendo las indicaciones del fabricante.

3.4.6 Extracto de proteínas de *E. gracilis*

Extractos proteicos de *E. gracilis* fueron preparados resuspendiendo células en *buffer* de lisis (50 mM MOPS-NaOH pH 8,0, 1 mM EDTA, coctel inhibidor de proteasas) y se sometieron a lisis con un procesador ultrasónico de alta intensidad VibraCell™ VCX 130 (Sonics) por un total de tiempo de 2 min. La suspensión resultante se centrifugó a 20000 ×g durante 15 min a 4 °C para separar la fracción soluble de los detritos celulares y el resto de los componentes insolubles. Las fracciones solubles fueron utilizadas para medidas de actividad enzimática y/o para electroforesis en gel de poliacrilamida seguidas de inmunodetección.

En el caso particular del análisis de fraccionamiento, se siguió el mismo procedimiento hasta la disrupción celular por sonicado como fue explicado previamente. Luego, el lisado se centrifuga por 60 min a 14.000 × g a 4°C. La fracción soluble fue tratada con 8 mM CaCl₂ (para la precipitación de vesículas y microsomas) y la fracción insoluble fue tratada con 100 mM Na₂CO₃, pH 11.0 (para la solubilización de proteínas asociadas a membranas). Seguidamente se dejó incubar las muestras por 30 min at 4°C. A continuación las muestras fueron centrifugadas por 30 min at 14,000 × g [171]. Nuevas fracciones solubles e insoluble fueron obtenidas de ambas muestras. Todas las fracciones fueron posteriormente analizadas por ensayos de western-blot, utilizando sueros policlonales específicos para las proteínas buscadas.

3.4.7 Cuantificación de tioles

DTNB (5,5'-ditiobis-2-ácido nitrobenzoico) se utilizó para la cuantificación de tioles libres en muestras de la proteína pura producida de forma recombinante previamente tratado con diamida, H₂O₂, IAM, DTT o en ausencia de los agentes previamente descritos [172].

3.4.8 Ensayos de oxidación, alquilación y reducción

La oxidación o alquilación de los residuos de cisteína de la enzima producida de forma recombinante y pura fueron llevadas a cabo incubando la enzima (7 µM) a 25°C en *buffer* A utilizando diferentes concentraciones de diamida, H₂O₂, glutatión oxidado (GSSG), S-nitrosocisteína (CysNO) o iodoacetamida (IAM). Alícuotas fueron tomadas a diferentes tiempos de incubación, diluídas y ensayadas para actividad enzimática. Los datos fueron comparados con controles a los que no se adicionó agentes oxidantes o alquilantes bajo las mismas condiciones, considerándose la actividad de los mismos como 100% para cada uno de los ensayos llevados a cabo. Los datos experimentales obtenidos son resultados de al menos tres ensayos independientes con reproducibilidad dentro de ±10%.

Para la remoción del exceso de los agentes reactivos, la enzima (como se especificó previamente) fue diluida a un factor final de 100.000 o desalada utilizando mini columna de desalado Bio-gel P6 (Bio-Rad). Además las mismas muestras fueron utilizadas para corridas en el gel de poliacrilamida tanto en condiciones nativas como desnaturalizantes (con el agregado o no de reductor).

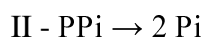
3.5. Metodología de análisis enzimático

Para ensayar la actividad de la enzima en sentido se hizo uso de la reacción colorimétrica basada en la propiedad que tiene el Pi de formar el complejo de color fosfo-molibdato-Verde de Malaquita, el cual es cuantificable espectrofotométricamente a 630 nm. La formación del complejo ocurre al agregar una cantidad adecuada de una solución de Verde de Malaquita y molibdato de amonio que detiene la reacción forma el complejo con el Pi producido en la reacción enzimática [173]. Una unidad de actividad (U) se define como la cantidad de enzima necesaria para producir 1 µmol de producto en 1 min bajo las condiciones específicas para cada ensayo.

3.5.1. Medida de actividad enzimática para NDP-azúcar pirofosforilasas

Este método, desarrollado en nuestro laboratorio, se basa en la cuantificación de Pi mediante una reacción de color con el complejo Verde de Malaquita-molibdato de amonio. El Pi medido es generado a expensas de la reacción acoplada de la hidrólisis enzimática del PPi,

producto de la reacción de síntesis de NDP-Glc [173]. Las reacciones acopladas del método son:



La medida de actividad se realizó a 37 °C en un volumen final de 50 µl, donde la mezcla de reacción estándar contiene: 50 mM MOPS pH 8,0; MgCl₂ 10 mM, BSA 0,2 mg/ml, pirofosfatasa inorgánica de levadura (pirofosfato:fosfohidrolasa, EC: 3.6.1.1), obtenida en nuestro laboratorio 0,5 U/ml, NTP y la muestra en una dilución adecuada. El ensayo se inició con el agregado de Azúcar-1P y se realizó durante el tiempo necesario para obtener una señal adecuada, usualmente 10 min, sin alcanzar un consumo de sustratos mayor al 5%. La reacción se detuvo con la adición de 375 µl del reactivo de color, seguido por el agregado de 50 µl de citrato de sodio 34% (p/v). Una alícuota de 250 µl de esta mezcla se dispensó en policubetas de ELISA y se determinó la absorbancia a 630 nm en un lector de ELISA Microplate photometer Multiskan Ascent (Thermo Scientific). Paralelamente a la determinación, se estableció una curva de calibrado con testigos de PPi y se obtuvo el factor de conversión de DO a nmoles.

El reactivo de color se preparó mezclando 3 volúmenes de Verde de Malaquita (Sigma) al 0,045% (p/v) y 1 volumen de molibdato de amonio 4,2% (p/v) en HCl 5 N. Luego de homogeneizar durante 20 min y filtrar, a 5 ml de la solución obtenida se le adicionaron 100 µl de Tween 20 al 2% (v/v).

3.5.2. Medida de actividad enzimática para β-1,3-glucanasas

La actividad β-1,3-glucanasa se llevó a cabo mediante la cuantificación de azúcares reductores utilizando la técnica de Somogyi-Nelson [174]. La medida de actividad se llevó a cabo en volumen final de 50 µl en las que se utilizó una dilución adecuada de enzima, junto con *buffer* HAc/Ac⁻ 100 mM de diferentes valores de pH y como sustrato se utilizó laminarina (polímero β-1,3-glucosa con algunas ramificaciones β-1,6) el cual es soluble en soluciones acuosas y alternativamente se utilizó paramilon (polímero β-1,3-glucosa sin ramificaciones) insoluble en soluciones acuosas. Las medidas se realizaron en termobloques agitados en el caso de las medidas con paramilon (HCM-100Pro Dragon Lab) que permiten mantener en agitación la muestra durante la incubación. Los valores obtenidos de azúcares reductores por la técnica de Somogyi-Nelson fueron comparados con una curva de calibrado de Glc.

3.5.3. Determinación de parámetros cinéticos

Los parámetros cinéticos V_{\max} y $S_{0,5}$ (siendo este último la concentración de sustrato a la que se alcanza el 50% de la velocidad máxima, V_{\max}) fueron determinados realizando ensayos

donde se hizo variar la concentración de uno de los sustratos, manteniendo los otros a concentraciones fijas y saturantes (a menos que se indique lo contrario). Los datos cinéticos obtenidos se graficaron como velocidad inicial en $U \cdot mg^{-1}$, versus la concentración del sustrato variable en mM o $mg \cdot ml^{-1}$. Los parámetros cinéticos fueron calculados mediante ajuste por regresión no lineal utilizando la ecuación de Hill y el programa informático Origin™ 8.0. Los valores obtenidos implican un promedio de un mínimo de tres juegos de determinaciones independientes de los parámetros que fueran reproducibles dentro de un marco de variación de $\pm 10\%$.

3.6. Cromatografía de exclusión molecular. Determinación de las masas moleculares

La cromatografía de exclusión molecular se utilizó con fines analíticos para la determinación de la MM de las distintas proteínas. En el equipo *ÄKTA Explorer* (GE Healthcare) se conectó una columna Tricorn 10/300 (GE Healthcare) cargada con resina Superdex G-200 (GE Healthcare). Las corridas se realizaron a 0,75 ml/min en *buffer A*. Se empleó para la calibración de la columna un conjunto de patrones de MM conocida (GE Healthcare). Los estándares analizados incluyeron: tiroglobulina (669 kDa), ferritina (440 kDa), aldolasa (158 kDa), conalbúmina (75 kDa), ovoalbúmina (44 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa), ribonucleasa (13,7 kDa) y apoprotinina (6,5 kDa). El volumen muerto de la columna se determinó empleando una solución de Azul de Dextrano. Las masas moleculares se determinaron por interpolación de la curva logarítmica, donde se grafica el log de la MM de los marcadores comerciales vs K_{av} . K_{av} se obtiene a partir de la siguiente ecuación: $K_{av} = (V_e - V_o) / (V_c - V_o)$; donde V_e es el volumen de elusión, V_o es el volumen muerto y V_c es el volumen de columna.

3.7 Modelado Molecular

La búsqueda de moldes o templados acordes se realizó utilizando la herramienta de Swiss Model Workspace [175]. A partir de los resultados arrojados por el software se seleccionó la mejor opción de las diferentes opciones de cristales resueltos de proteínas homologas. Las secuencias de los templados seleccionados fueron alineados utilizando el programa HHBlits [176] y al menos 10 diferentes modelos fueron obtenidos utilizando el software Modeller 9.15 [177, 178]. Especial atención fue tenido en cuenta para evitar *gaps* dentro de estructuras secundarias. El mejor modelo se estableció a partir del análisis del mejor puntaje global de *Verify3D* [179], mayor puntaje de *z-DOPE* [180] y de *QMEAN* [181].

Se utilizó como molde la estructura cristalina resuelta de la UDP-glucosa pirofosforilasa de *Leishmania major* (código PDB, 4m2a) que mostró homología a la *Egr*UDP-Glc PPasa con alto porcentaje de identidad (54%) [142].

3.8 Inmunolocalización celular por microscopía confocal

Células de cultivos de *E. gracilis* obtenidas por crecimiento autotrófico o heterotrófico fueron lavadas por 15 min a temperatura ambiente en PBS y fijadas con 4% (v/v) de formaldehído. Posteriormente al lavado, se permeabilizaron y bloquearon durante 3 h en un medio que contenía PBS suplementando con 0,1% (v/v) Tween 20 y 3% (p/v) BSA. Seguidamente las muestras fueron incubadas con el anticuerpo policlonal primario (dilución 1/100) y posteriormente con anticuerpo secundario marcado con fluoróforo Cy3 (dilución 1/500). Todas las incubaciones fueron realizadas a 4°C durante 6 h. Después del lavado, las muestras fueron montadas en los portaobjetos con una solución de montaje conteniendo *ProLong antifade* (Thermo). Seguidamente para la visualización de las muestras se utilizó el microscopio confocal Leica TCS SP8 ubicado en el SeCeGrIn del Centro Científico Tecnológico (CCT-Santa Fe).

3.9. Extracción y cuantificación de paramilon

3.9.1. Extracción

Para la extracción de paramilon se cosecharon células por centrifugación y se realizaron 3 lavados sucesivos de las células con H₂O. Seguidamente se resuspendieron en H₂O nuevamente (a razón de ~500 µl/1,5.10⁶ cel) y se procedió al sonicado durante 5 min. Seguidamente se procede a centrifugar para separar la fracción soluble de la insoluble a 5000 × g durante 5 min. Se descarta el sobrenadante y se procede a realizar lavados del pellet con H₂O hasta observar que el sobrenadante queda traslucido. Por último, para eliminar contaminantes insolubles en agua, se realizan 3 lavados con una mezcla de hexanos:agua (1;1). Finalmente, se repiten nuevamente 3 lavados con H₂O, y se descarta el sobrenadante. De esta forma con el paramilon obtenido se lleva a estufa hasta pesada constante.

3.9.2. Cuantificación

Para la cuantificación de paramilon se adaptó la técnica de fenol-ácido sulfúrico de Dubois 1956 [182]. A 50 µl de la muestra incógnita de paramilon (previamente purificado), se le adicionan 2 µl de fenol al 80% (p/v) en H₂O, seguidamente se procede al agregado de 250 µl de ácido sulfúrico concentrado. Se homogeniza y se incuba durante 10 min a 40°C. Por último,

se dispensan 250 μl en placa de 96 pocillos y se lee a 492 nm. Las absorbancias obtenidas se compararon con una curva de calibrado de glucosa o paramilon.

3.10. Extracción y tipificación de ceras

3.10.1. Extracción

Para la obtención de las ceras de *E. gracilis* se procedió a realizar una extracción de lípidos totales siguiendo el protocolo de Bligh y Dyer [183] y Ryckebosch y colaboradores [184] con algunas modificaciones. Se partió de un cultivo de células de *E. gracilis* que se encontraban en condición de anaerobiosis. Estas células fueron colectadas por centrifugación a $5000 \times g$ durante 5 min. Seguidamente se procedió a realizar 3 lavados con H_2O con la finalidad de eliminar restos de medio de cultivo. Posteriormente, se realizaron 3 extracciones sucesivas con cloroformo:metanol, disminuyendo el volumen de cloroformo en cada nueva etapa de extracción (3:1, 2:1 y 1:1), durante 120, 30 y 30 min respectivamente. Al final de cada etapa, se realizó una centrifugación a $4000 \times g$ durante 5 min para lograr una adecuada separación de las fases. Se colectó la fracción orgánica y se dejó evaporando la misma a temperatura ambiente bajo campana hasta sequedad.

Por último, se realizó la purificación de ceras realizando 4 lavados con etanol durante 10-15 min, centrifugando a $20000 \times g$ por 6 min y descartando la fracción soluble. Finalmente, las ceras fueron acondicionadas mediante 3 lavados con metanol durante 10 min, centrifugando a $20000 \times g$ por 6 min y se descartó la fracción soluble.

3.10.2. Tipificación

Para la tipificación de la composición de las ceras, se procedió a realizar la transesterificación con metanol e hidróxido de potasio (KOH) como catalizador, adicionando en un tubo *ependorf* 50 μl de cera, 120 μl de metanol y 2 μl de KOH (5 M), manteniendo la reacción a 60°C durante 2 h. Luego, se realizó centrifugación a $20000 \times g$ por 6 min y se descartó el sobrenadante. Para los patrones de ácidos grasos fue necesario realizar la conversión a esteres. Para ello, se hizo la esterificación con metanol y ácido sulfúrico (H_2SO_4) como catalizador, adicionando en un tubo *ependorf* 20 mg de ácido graso, 61 μl metanol y 2 μl de H_2SO_4 (5 M) manteniendo la reacción a 60°C durante 2 h. Luego, se realizó una centrifugación a $20000 \times g$ por 6 min y se descartó la fracción soluble.

Las muestras esterificadas y transesterificadas fueron analizadas mediante un cromatógrafo gaseoso (Shimadzu GC-2014), equipado con una columna DB-23 de 30 m de longitud y 0,32 mm de diámetro interno (Agilent J&W) y un detector de ionización de llama (FID), y operado con el programa: 2 min a 30°C , calentamiento a $15^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ hasta 150°C

manteniendo 4 min, calentamiento a $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ hasta 200°C , manteniendo 4 min, calentamiento a $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ hasta 220°C , manteniendo finalmente durante 10 min.

Los tiempos de retención obtenidos en las muestras de ceras fueron comparados a patrones de alcoholes de 12, 13, 14, 15 y 16 carbonos. Como así también se utilizaron patrones de ácidos grasos (esterificados, en forma de metil ésteres) de 12, 13, 14, 15, 16 y además se utilizó como patrones el ácido oleico, linoleico y linoléico.

4. RESULTADOS

4.1. *Euglena gracilis*, cultivos y almacenamiento de carbono

La producción de biomasa es, probablemente, la mejor alternativa viable frente a los recursos fósiles para la obtención de combustibles y productos químicos. En estos últimos años, los cultivos de microalgas, han resultado un factor a tener en cuenta cuando se piensa en la obtención de biomasa, no solo por su potencial como combustible, sino también por los diferentes metabolitos de considerable valor agregado que contienen, y cuyo mercado se encuentra en auge actualmente. En este sentido, el desarrollo de tecnologías ha permitido optimizar la obtención de diversos compuestos de interés a partir de diferentes organismos como las microalgas.

La ventaja de las microalgas para la obtención de biomasa es su bajo costo, dado que se cultivan en medios minerales sencillos, obteniendo la energía y el carbono de la radiación solar y el CO₂ atmosférico. Existen diferentes especies que han sido propuestas como idóneas para este tipo de desarrollos, cada una con cualidades diferenciales y/o metabolitos secundarios. Las particularidades de estas microalgas las hacen propicias para desarrollos que permitan obtener otros productos, además de la biomasa, haciéndolas redituables por la amplia gama de productos generados [52].

En este contexto, y teniendo en cuenta la versatilidad metabólica encontrada en *E. gracilis*, se opta por este organismo como modelo de estudio, dado su amplio espectro como potencial productora de metabolitos de interés, principalmente el paramilon y las ceras. El entendimiento respecto a la síntesis y regulación de las enzimas involucradas en las diferentes vías metabólicas, permitiría el diseño y desarrollo de técnicas que permitan optimizar la síntesis de los compuestos de interés, redirigiendo el carbono asimilado hacia la síntesis de productos particulares, generando así una herramienta de elevado interés biotecnológico.

4.1.1. Curvas de crecimiento

Para el desarrollo de este trabajo de tesis se utilizó la cepa de *E. gracilis* UTEX 753 con la cual se realizó la optimización de los medios de cultivos y condiciones de crecimiento acorde a las instalaciones presentes en nuestro laboratorio. Los crecimientos se realizaron en el medio salino CyM [165], tanto para el cultivo en condiciones autotróficas como mixotróficas y heterotróficas. El crecimiento autotrófico se llevó a cabo en medio CyM sin suplementar, en cámara de cultivo con ciclo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad, con una intensidad de luz de 60-80 $\mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y una temperatura de 23 ± 2 °C. Por su parte, se utilizó este mismo

medio salino, suplementado con fuentes de carbono como glucosa al 1% (p/v), para cultivos en condiciones mixotróficas y heterotróficas, en presencia de luz y oscuridad, respectivamente. Para el caso de los cultivos desarrollados en oscuridad, la temperatura utilizada fue de 28°C. Alternativamente, para el crecimiento en condición heterotrófica se utilizó el medio EGM (*Culture Collection of Algae and Protozoa*) a base de extracto de levadura, peptona de carne y tripteína bacteriológica. En todos los casos, se utilizó como concentración inicial de inóculo $5 \cdot 10^4$ cel.ml⁻¹.

En las diferentes condiciones antes mencionadas, se realizaron las curvas de crecimiento correspondientes que nos permitieron conocer los tiempos y fases del crecimiento de *E. gracilis* en cada caso. Al analizar las curvas de crecimiento mostradas en la Figura 4 se observa que, dependiendo del medio de cultivo y la condición (ciclo luz/oscuridad u oscuridad), se presentan diferencias en el tiempo de crecimiento y densidades celulares alcanzadas, siendo en el medio CyM suplementando con Glc 1% (p/v) donde se obtienen las mayores densidades celulares, independientemente de la condición de luz u oscuridad (Figura 4B y 4D).

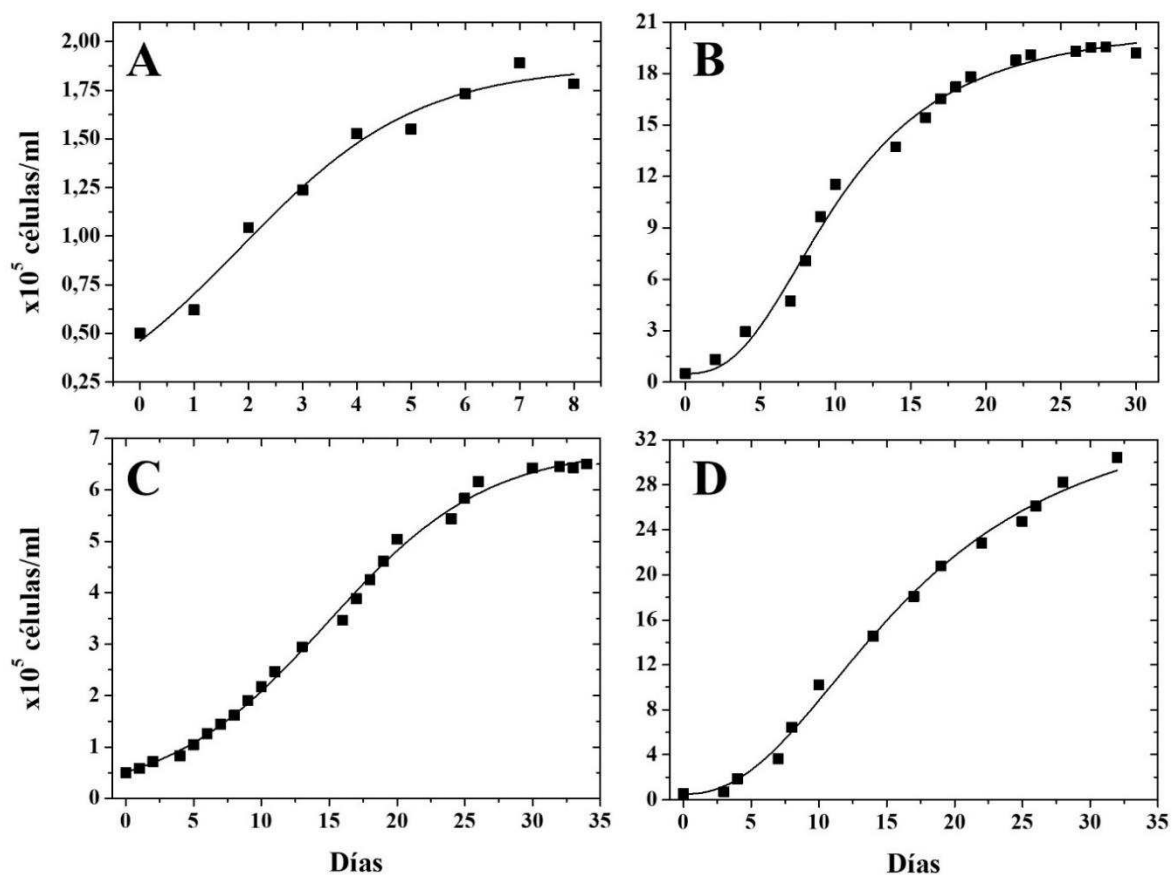


Figura 4: Curvas de crecimiento de *E. gracilis*. **A:** medio de cultivo EGM en oscuridad. **B:** medio de cultivo CyM suplementado con glucosa 1% (p/v) en condición de oscuridad. **C:** medio de cultivo autotrófico CyM. **D:** medio de cultivo CyM suplementado con glucosa 1% (p/v) con ciclo de luz/oscuridad.

En lo que respecta a los crecimientos en condición heterotrófica, analizamos comparativamente el medio EGM y el CyM suplementado con Glc, ambos en oscuridad. Los cultivos en medio EGM (Figura 4A) presentaron un ciclo más corto, en el que el crecimiento exponencial de las células se extiende hasta el quinto día, entrando en fase estacionaria a los 7-8 días. De este modo, resultó, en un ciclo de cultivo de 8-9 días de duración, desde el momento de la inoculación hasta alcanzar la fase estacionaria, con un tiempo de duplicación de 2 días. En comparación con las demás condiciones ensayadas, el crecimiento en medio EGM, se presenta como un ciclo corto de cultivo.

Contrariamente, cuando se utilizó el medio de cultivo CyM suplementado con Glc 1% (p/v) en oscuridad (Figura 4B), el ciclo fue más largo, alcanzando la fase estacionaria a los 30 días. En estas condiciones el tiempo de duplicación del cultivo fue de 2 días, al igual que en EGM, aunque se obtuvo un mayor número de células por unidad de volumen que los alcanzados con el medio EGM. Los rendimientos en cantidad células obtenidos con el medio EGM resultaron ser muy bajos, lo que limita el tamaño de muestra a obtener en los ensayos, y dificulta considerablemente la calidad de los resultados. En vista de esto, se optó por utilizar la condición de cultivo en medio CyM suplementado con Glc 1% (p/v) para los ensayos realizados en cultivos heterotróficos.

Para los cultivos en condiciones autotróficas, la bibliografía menciona mayoritariamente el medio CyM, dado que es uno de los pocos que no posee alguna fuente de carbono agregada. En nuestros ensayos, el cultivo autotrófico realizado con un ciclo de luz/oscuridad de 16/8 h, utilizando el medio CyM, dio como resultado un ciclo de cultivo de aproximadamente 35 días, alcanzando la fase estacionaria a los 30 días desde la inoculación, con un tiempo de duplicación determinado en 4,5 días (Figura 4C).

Por último, para el cultivo en condiciones mixotróficas, se utilizó el medio CyM suplementado con Glc 1% (p/v) en presencia de luz (ciclo de luz/oscuridad de 16/8 h), situación en la que se determinó un tiempo de duplicación de 3,5 días. En esta condición se obtuvo la mayor densidad celular al final del ciclo ($30 \cdot 10^5 \text{ cel. ml}^{-1}$) a los 32 días iniciado el cultivo, siendo esta 4 veces mayor que la alcanzada en condición autotrófica y 1,5 veces mayor que en la condición heterotrófica (Figura 4D).

4.1.2. Acumulación de paramilon

Tal como se mencionó en la introducción *E. gracilis* crecido en condiciones aeróbicas, acumula el carbono en forma de paramilon, polímero de glucosa lineal unido por enlaces glucosídicos β -1,3 sin ramificaciones. De acuerdo a la bibliografía, se ha informado que la

cantidad de paramilon acumulado en la célula depende principalmente del medio de cultivo, pudiendo alcanzar valores de hasta 90% respecto de la biomasa seca cuando es crecido en condiciones heterotróficas con adecuada fuente de carbono [66, 69]. En este contexto, hemos realizado la extracción de paramilon sobre cultivos en condición autotrófica y heterotrófica. En el último caso, como se mencionó en el apartado anterior, utilizamos células crecidas en medio CyM suplementado con Glc 1% (p/v).

En la Figura 5 se muestra la textura que presenta el paramilon extraído a partir de células de *E. gracilis*, el cual se puede describir como polvo seco de color blanco. Los resultados obtenidos de la cuantificación de este poliglucano, muestran rendimiento de entre 30-35% respecto de la biomasa seca para las células crecidas en condiciones autotróficas sin el agregado de fuentes de carbono externa, valores que resultaron comparables con otros trabajos previamente informados [69]. El paramilon extraído a partir de cultivos crecidos en condiciones heterotróficas, suplementado con Glc, mostró rendimiento en torno al 42-51% respecto de la biomasa seca. Estos valores son comparables a los obtenidos por Matsuda y colaboradores [69], quienes han informado un rendimiento de 58% en paramilon respecto de la biomasa seca en condición heterotrófica del cultivo. En conjunto, podemos decir que nuestros resultados son similares a los hallados en la bibliografía para esta microalga, crecida tanto en condiciones autotróficas como heterotróficas. En este sentido es importante remarcar que los rendimientos en torno al 90% de paramilon respecto de la biomasa seca informados anteriormente se obtuvieron en ensayos realizados con cepas mutantes en cloroplasto [66], mientras que en este trabajo de tesis se utilizó una cepa salvaje.



Figura 5: Paramilon obtenido de la extracción a partir del cultivo en condiciones heterotróficas.

4.1.3. Acumulación de ceras

Como se mencionó anteriormente, el paramilon no es la única reserva de carbono que posee *E. gracilis*, sino que también poseen la capacidad de sintetizar ceras como almacenamiento de carbono. Cuando los cultivos de *E. gracilis* se desarrollan en condición aeróbica, (en medio autotrófico o heterotrófico), las ceras ocupan solo un muy pequeño porcentaje del peso celular total [69]. Frente a una limitación del oxígeno disponible, el metabolismo de *E. gracilis* cambia considerablemente, produciendo una movilización del carbono acumulado como paramilon hacia la producción de ceras [71]. Es así que, de ser un compuesto minoritario en la célula, pasa a ser el principal componente de la masa celular. Este mecanismo conocido como “fermentación de ceras” permite a las células de *E. gracilis* obtener energía (ATP) a través de la glucólisis, sin necesidad de perder el carbono que se acumuló mientras las condiciones fueron favorables. De esta manera, son capaces de “sobrevivir” hasta que las condiciones sean mejores. Cuando el cultivo vuelve a encontrarse en condiciones de aerobiosis, las ceras son degradadas y el carbono se redirigirá hacia la formación de paramilon nuevamente.

Para la determinación del contenido de ceras en *E. gracilis*, se utilizaron células crecidas en condiciones autotróficas y heterotróficas, en medio CyM sin suplementar (en ciclo luz/oscuridad) y suplementado con Glc 1% (p/v) en oscuridad, respectivamente. A partir de estos cultivos de *E. gracilis*, una vez alcanzada la fase estacionaria de crecimiento, se procedió a la cosecha de las células, y lavado de las mismas con el medio CyM (estéril), manteniendo en todo momento las condiciones de esterilidad. En el caso del cultivo heterotrófico los lavados se realizaron para la eliminar los diversos compuestos liberados del cultivo en su proceso de crecimiento, así como también para eliminar el resto de la fuente de carbono que aún podría quedar de manera residual. La eliminación de la fuente de carbono en la que fue crecida *E. gracilis* es de vital importancia, ya que para lograr una óptima acumulación de ceras es necesario, además de la anaerobiosis, que no haya presencia de alguna fuente de carbono externa. Una vez realizado el proceso de lavado, las células se resuspendieron en medio CyM, se colocaron nuevamente en el recipiente de cultivo, realizando el llenado completo del mismo con medio CyM (sin fuente de carbono agregada en ambos cultivos) reduciendo totalmente la posibilidad de transferencia de gases en el interior, con la finalidad de lograr la anaerobiosis. Además cada recipiente conteniendo los cultivos en anaerobiosis, se mantuvieron en oscuridad.

Transcurrido 7 días de cultivo en anaerobiosis, se volvió a cosechar cada cultivo de células con la finalidad de realizar la extracción de lípidos totales y la determinación de ceras. En la Figura 6 se muestra en forma representativa una de las alícuotas de ceras obtenidas. A

partir de estas extracciones se pudo obtener como resultado un rendimiento entre 42-45% de ceras respecto de la biomasa seca para los cultivos crecidos de forma heterotrófica. Mientras que por su parte, en las células provenientes del cultivo autotrófico, el rendimiento fue menor, alcanzando el 25% de ceras respecto de la biomasa seca. Esto resulta lógico si, consideramos que la producción de ceras en *E. gracilis* se genera a partir de una movilización del paramilon presente en la célula, como se detalló previamente. En las determinaciones del contenido de paramilon mostradas previamente, determinamos una menor acumulación del mismo cuando las células fueron crecidas en condiciones autotróficas, lo cual repercute directamente en la cantidad de ceras producidas por estas células una vez generada la anaerobiosis.



Figura 6: Alícuota de ceras extraídas del cultivo heterotrófico, previo a la transesterificación.

Por último, con la finalidad de evaluar la composición de las ceras extraídas en estas condiciones se procedió a realizar una tipificación de los ácidos grasos y alcoholes de cadena larga que componen estas ceras. Para esto, fue necesario llevar a cabo una transesterificación de las ceras y así obtener los correspondientes ácidos grasos (como metil ésteres) y alcoholes de cadena larga constituyentes de las ceras, los cuales se utilizaron para realizar el análisis mediante cromatografía gaseosa. Este ensayo nos permitió determinar el largo de las cadenas carbonadas, comparando con patrones, y así conocer la composición de las ceras generadas por *E. gracilis* en las dos condiciones de cultivo analizadas, resultados que se detallan en la Tabla 7. A partir de este análisis se pudo determinar que, del total de ceras extraídas en ambas condiciones de cultivo ensayadas, los componentes mayoritarios de las mismas son las moléculas de 14 carbonos, tanto para el alcohol (alcohol miristílico), como para el ácido graso (ácido mirístico), siendo esta proporción mayor en el cultivo heterotrófico en comparación con el autotrófico. Este resultado es coincidente con informes previos hallados en la bibliografía [71]. Asimismo, se observa una elevada proporción de cadenas con 12 átomos de carbono, mientras que por el contrario el porcentaje de ceras con cadenas de 13 carbonos es minoritario, siendo incluso indetectables en células provenientes del cultivo heterotrófico. Estos resultados muestran que existen diferencias en el tipo de cera sintetizado por *E. gracilis*, dependiendo la condición de crecimiento utilizada previo a la anaerobiosis.

Tabla 7: Composición del largo de las cadenas (alcohol y ácido graso) de las ceras obtenidas de la anaerobiosis del cultivo autotrófico y heterotrófico. Porcentaje relativo al total de lípidos extraídos.

| | Autotrófico (%) | Heterotrófico (%) |
|-----------------------|------------------------|--------------------------|
| Inferior a C12 | 24,8 | 13,3 |
| C12 | 11,4 | 22,5 |
| C13 | 5,1 | 0,0 |
| C14 | 13,1 | 36,4 |
| C15 | 10,2 | 9,1 |
| C16 | 6,9 | 6,8 |
| Superior a C16 | 28,5 | 11,9 |

4.2. Partición del carbono en *E. gracilis*

4.2.1. Caracterización *in vivo* e *in vitro* de la UDP-glucosa pirofosforilasa

Tal como se mencionó en la introducción, el dador de unidades de glucosa para la síntesis de paramilon es la UDP-Glc [67], cuya síntesis es catalizada por la UDP-Glc PPasa (EC 2.7.7.9). Este metabolito necesario para la acumulación de carbono se encuentra en un punto central, común a distintas rutas metabólicas, por lo que se destaca su importancia en el metabolismo general del carbono en *E. gracilis*. En la Figura 7 se muestra un esquema metabólico resumido, en el que se visualizan los puntos de origen del carbono en *E. gracilis* y su direccionamiento hacia la síntesis de UDP-Glc. Este dador glucosídico representa un nodo central, a partir del cual puede ser dirigida a diversas rutas metabólicas, siendo su principal destino, la síntesis del paramilon, seguido de su utilización para la síntesis de otros oligo- y poli-sacáridos, como también la interconversión en otros UDP-azúcares. Además, recientemente, se ha evidenciado que la UDP-Glc es utilizada para la biosíntesis de ácido ascórbico, resultando esta su principal ruta de síntesis [185].

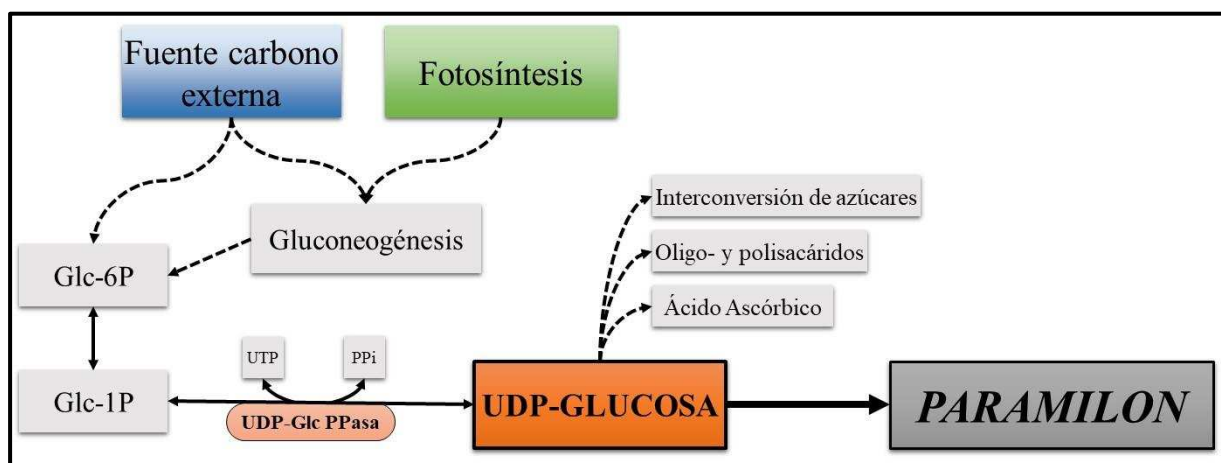


Figura 7: Esquema metabólico simplificado de síntesis y utilización de la UDP-Glc *E. gracilis*.

Es válido destacar que el nucleótido azúcar UDP-Glc se encuentra en niveles considerables en *E. gracilis*, siendo el mayoritario intracelularmente respecto de los restantes NDP-azúcares estudiados. De acuerdo a los resultados publicados por O'Neill y colaboradores, en el que detectaron y cuantificaron los diferentes NDP azúcares presentes en cultivos de *E. gracilis* [86], se determinó una elevada predominancia de la UDP-Glc, siendo su concentración un orden de magnitud superior que los restantes NDP-azúcares analizados.

Dado el contexto antes presentado, nos propusimos entender el funcionamiento y regulación de la UDP-Glc PPasa de *E. gracilis* (*Egr*UDP-Glc PPasa), enzima que cumpliría un rol crítico en esta microalga, dada la importancia de su producto de reacción como metabolito

de partida hacia diversas vías metabólicas. Para esto, plantemos obtener esta enzima en forma recombinante y caracterizarla en sus propiedades cinéticas, regulatorias y estructurales. Primeramente, se procedió a la identificación de la secuencia codificante para esta enzima, para lo cual nos basamos en el trabajo de transcriptoma de O'Neill y colaboradores [85] en <http://jicbio.nbi.ac.uk/euglena>. Del análisis de este estudio, encontramos un transcripto identificado como “lighth_10179”, que codifica para una UDP-Glc PPasa de 459 aminoácidos. Al compararla con otros protozoos, mostró una identidad de 51,2% respecto a la UDP-Glc PPasa de *L. major* [131], de 50.7% con la de *T. brucei* [132] y de 29.9% en comparación a la enzima de *G. lamblia* [186].

4.2.1.1. Clonado y expresión recombinante de la UDP-Glc PPasa

El gen codificante para la UDP-Glc PPasa de *E. gracilis* se obtuvo mediante síntesis *de novo* (Bio Basic Inc.), de acuerdo a la información del transcripto detallada anteriormente. 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 *HindIII*, que fueron posteriormente utilizadas para el subclonado del gen en el vector de expresión pET28c, el cual permite obtener altos niveles de expresión de la enzima en forma recombinante, fusionada a una etiqueta de histidinas en el extremo N-terminal, lo cual facilita su purificación mediante cromatografía de pseudoafinidad por metal inmovilizado (IMAC).

Con la construcción [pET28c/*Egr*UDP-Glc PPasa], se procedió a la transformación de células competentes de *E. coli* BL21 (DE3) que permiten la expresión recombinante de la enzima. Las células transformantes 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 con 0,2 mM de IPTG a 25°C durante toda la noche resultó exitosa para la obtención de la *Egr*UDP-Glc PPasa. Seguidamente se procedió al escalado, en las mismas condiciones antes ensayadas, seguido de purificación por cromatografía IMAC-Ni²⁺ siendo este único paso suficiente para la obtención de la enzima purificada a homogeneidad electroforética Figura 8. Con las muestras conteniendo la mayor actividad se realizó un *pool*, se suplementó con 20% (v/v) de glicerol y se almacenó a -80°C para su posterior análisis.

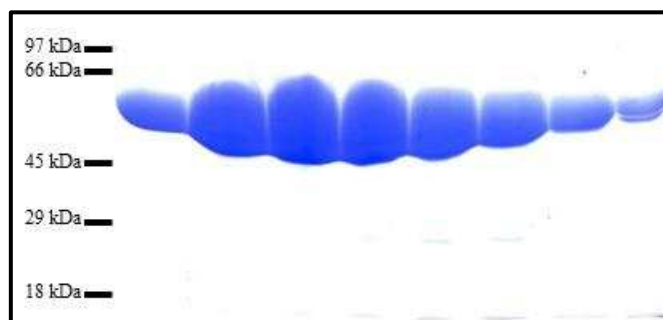


Figura 8: SDS-PAGE (12%) de las eluciones obtenidas en la purificación por IMAC-Ni²⁺ de la *Egr*UDP-Glc PPasa recombinante.

4.2.1.2. Caracterización estructural UDP-Glc PPasa recombinante

Con la UDP-Glc PPasa obtenida de forma recombinante y purificada, de acuerdo a su migración en un SDS-PAGE (Figura 8), pudo comprobarse que su monómero posee una masa molecular ~50 kDa, coincidente con la secuencia aminoacídica informada. Para determinar su estructura cuaternaria, se realizó una cromatografía de exclusión molecular (Superdex 200) en la que se observó que la *Egr*UDP-Glc PPasa eluyó en un único pico, cuyo volumen de elución se corresponde con una masa molecular de ~64 kDa. Teniendo en cuenta la masa molecular teórica del monómero, se pudo determinar que la *Egr*UDP-Glc PPasa presenta una estructura monomérica. Esto resulta compatible con lo informado para otras UDP-Glc PPasas provenientes de protozoos como *L. major* [131] y *G. lamblia* [186] en los que se ha encontrado que la estructura cuaternaria funcional de las UDP-Glc PPasa, al igual que en el caso de plantas es monomérica [119, 129–133, 186]. En animales y levaduras por el contrario la enzima funcional se encuentra formando complejos octaméricos [128]. Cabe aclarar que, tanto en el SDS-PAGE como en la cromatografía de exclusión molecular debe considerarse la masa adicionada por la etiqueta de poli-histidinas y los aa que se adicionan en el extremo N-terminal.

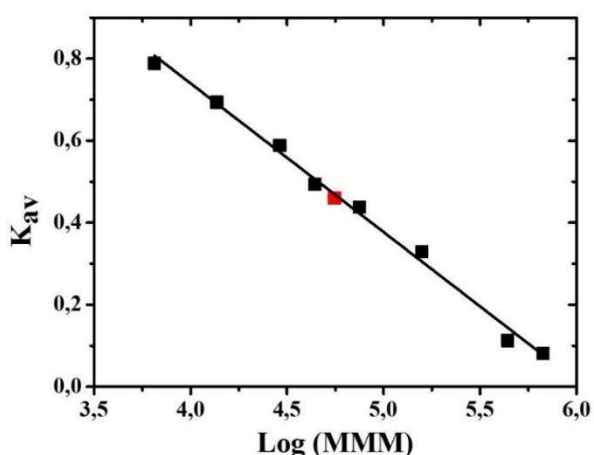


Figura 9: Curva de calibrado para determinación de masa molecular por cromatografía de exclusión molecular. ■: Patrones de masa molecular (ver sección 3.6 de Materiales y Métodos). ■: *Egr*UDP-Glc PPasa producida de forma recombinante.

4.2.1.3. Caracterización cinética de la UDP-Glc PPasa recombinante

En cuanto a la caracterización cinética de la *Egr*UDP-Glc PPasa, se determinaron los parámetros cinéticos ($S_{0,5}$, V_{max} y n_H) a partir de las curvas de saturación de los sustratos UTP y Glc-1P, como se muestra en la Figura 10. Los valores obtenidos se detallan en la Tabla 8. Con valores de $S_{0,5}$ de 0,17 mM y 0,24 mM por UTP y Glc-1P respectivamente, las afinidades por ambos sustratos se encuentran en el mismo orden de magnitud, presentando una cinética hiperbólica (Figura 10/Tabla 8). Estos valores de $S_{0,5}$ son comparables con los obtenidos en otras enzimas homólogas de protozoos como *G. lamblia* y *E. histolytica* y *L. major*. Sin embargo, se encontró una V_{max} considerablemente mayor ($3350 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$) para la enzima de *E. gracilis* comparado a las $400 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ de *G. lamblia* [186] y $95 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ de *E. histolytica* [133], lo que la ubica entre uno y dos órdenes de magnitud por encima, mientras que comparada a la UDP-Glc PPasa de *L. major* solo resultó 2,3 veces mayor, siendo la enzima de *L. major* con la cual presentó mayor porcentaje de identidad a nivel de estructura primaria.

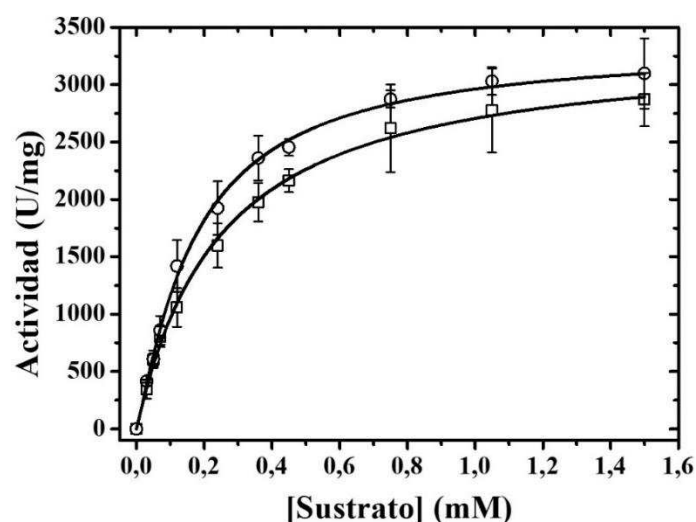


Figura 10: Curva de saturación de sustratos para la *Egr*UDP-Glc PPasa recombinante. □: Glc-1P; ○: UTP.

Además de realizar la caracterización cinética con los sustratos naturales de la enzima, se evaluó la capacidad de la *Egr*UDP-Glc PPasa de utilizar otros NTPs y azúcares-1P como sustratos alternativos a UTP y Glc-1P, respectivamente. Para este ensayo se probaron ATP, GTP, CTP y TTP como NTPs alternativos, encontrándose actividad únicamente cuando se reemplazó el UTP por TTP y en presencia de Glc-1P. Asimismo, se evaluaron diferentes azúcares-1P, entre ellos Man-1P, Gal-1P, GlcN-1P, GalN-1P, GlcNAc-1P, Fru-1P y β -Glc-1P, pudiéndose detectar actividad enzimática cuando se utilizó Gal-1P y Man-1P como azúcares-1P alternativos a la Glc-1P, en presencia de UTP. Se caracterizaron cinéticamente estos sustratos alternativos, realizando las curvas de saturación correspondiente como se muestra en la Figura 11 y los resultados obtenidos se detallan en la Tabla 8.

Tabla 8: Parámetros cinéticos de la *Egr*UDP-GlcPPasa recombinante.

| | $S_{0,5}$ (mM) | n_H | V_{max} (U.mg ⁻¹) | k_{cat} (s ⁻¹) | $k_{cat}/S_{0,5}$ (M ⁻¹ s ⁻¹) |
|---------------|-------------------|-------------|------------------------------------|---------------------------------|---|
| Glc-1P | 0,24 ± 0,01 | 1,01 ± 0,03 | 3350 | 2792 | 116,3 x 10 ⁵ |
| UTP | 0,172 ± 0,004 | 1,16 ± 0,03 | | | |
| TTP | 0,28 ± 0,01 | 1,40 ± 0,09 | 230 | 192 | 6,8 x 10 ⁵ |
| Gal-1P | 0,80 ± 0,02 | 1,49 ± 0,04 | 315 | 263 | 3,3 x 10 ⁵ |
| Man-1P | > 4 | n.d. | 203* | 169* | < 0,4 x 10 ⁵ |

*Obtenido de la velocidad máxima aparente alcanzada a 10 mM Man-1P.

n.d.: no determinado

La afinidad por TTP resultó 1,5 veces inferior a la observada para el UTP, mientras que el $S_{0,5}$ por Gal-1P es 3 veces mayor que el determinado para Glc-1P (Tabla 8). Aun así, comparando las eficiencias catalíticas, se observa que es de entre dos y tres órdenes de magnitud inferior cuando se utilizan los sustratos alternativos, siendo la velocidad final alcanzada de 230 U.mg⁻¹ para el TTP y 315 U.mg⁻¹ para la Gal-1P, lo que representa un valor menor al 10% que la V_{max} obtenida con UTP y Glc-1P (Tabla 8). En el caso de la Man-1P presenta un comportamiento diferente, ya que para la determinación de los parámetros no fue posible alcanzar el nivel de saturación utilizando Man-1P y UTP como sustratos, inclusive cuando se ensayaron concentraciones de hasta 10 mM de Man-1P (Figura 11). Motivo por el que no se pudo determinar un valor de $S_{0,5}$ para este sustrato alternativo y la velocidad informada es aparente.

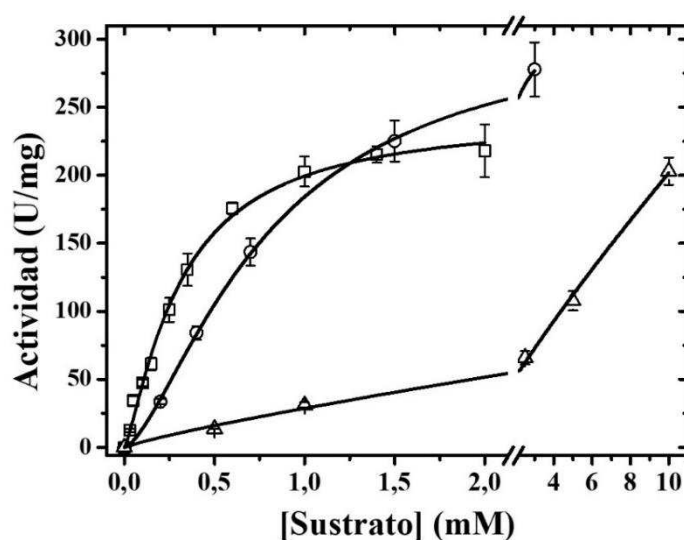


Figura 11: Curva de saturación de sustratos alternativos a Glc-1P y UTP para la *Egr*UDP-Glc PPasa recombinante. □: TTP; ○: Gal-1P; △: Man-1P. La curva de TTP se realizó en presencia de 1,5 mM de Glc-1P, mientras que cuando se evaluaron los azcares-1P, se utilizó 1,5 mM de UTP.

4.2.1.4. Análisis de actividad UDP-Glc PPasa a extractos de *E. gracilis*

Con el objetivo de evaluar el direccionamiento de la Glc-1P hacia la síntesis de UDP-Glc en células de *E. gracilis* crecidas en condiciones autotróficas, evaluamos la actividad UDP-Glc PPasa en extractos de esta microalga. Para esto, se partió de cultivos crecidos en condiciones autotróficas, con ciclo de luz oscuridad 16/8 h a una temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$. Se cosecharon células cada 2 horas por un periodo de 24 horas, a modo de conseguir muestras a lo largo de todo un día, obteniéndose 8 muestras correspondientes a momentos de luz y 4 de oscuridad. Estas muestras fueron guardadas a -80°C hasta el momento de su procesamiento en forma simultánea.

Las células fueron resuspendidas en un *buffer* adecuado (ver sección 3.4.6) con el agregado de inhibidor de proteasas. De este modo las muestras fueron sonicadas y luego se centrifugó a $20.000\times g$ durante 15 min a 4°C , para separar la fracción soluble de la insoluble. A partir de las fracciones solubles se realizaron medidas de actividad enzimática y ensayo de western blot, acorde a lo detallado en Materiales y Métodos.

A partir de los resultados obtenidos se observa que no hubo mayores variaciones de la actividad a lo largo del día, obteniéndose en promedio $1,7 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$, ya sea analizando el día completo o los períodos de luz y oscuridad por separado. Esto indicaría, que la *Egr*UDP-Glc PPasa no sería una enzima regulada por el ciclo luz/oscuridad como ocurre por ejemplo en plantas con las ADP-Glc PPasas [187], ya que no existe una variación en su actividad determinada por el ciclo luz/oscuridad. Complementando las medidas de actividad enzimática, se realizó un ensayo de western-blot sobre estos mismos extractos de *E. gracilis*, utilizando anticuerpos policlonales específicos anti-UDP-Glc PPasa de *E. gracilis*, (acorde a lo descrito en Materiales y Métodos). El resultado del western-blot mostrado en la Figura 12, aporta evidencia respecto a que la cantidad de UDP-Glc PPasa presente en los extractos obtenidos se mantienen prácticamente invariables a lo largo del día y durante el período de oscuridad. Esto sería coincidente con los resultados de actividad obtenidos, corroborando así que esta enzima no estaría siendo afectada por los ciclos de luz/oscuridad.

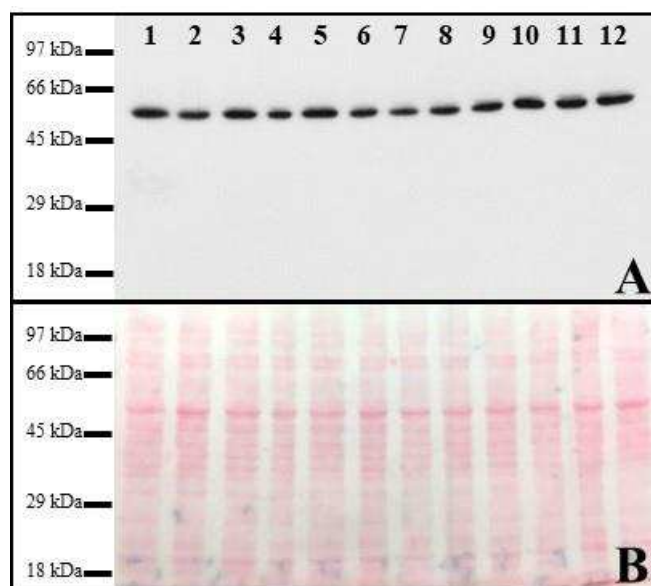


Figura 12: **A** Western-blot con anticuerpos específicos anti UDP-Glc PPasa. Se utilizaron extractos solubles de *E. gracilis* en condición autotrófica, tomadas cada 2 horas durante período de 24 horas. Muestras 1 a 8 corresponden al periodo de luz y de 9 a 12 al periodo de oscuridad. **B** Control de carga con *Rojo Ponceau*.

4.2.1.5. Localización subcelular de la UDP-Glc pirofosforilasa de *E. gracilis*

Con el propósito de dilucidar si la localización subcelular de la *Egr*UDP-Glc PPasa es en el citosol o asociada a algún sistema de membranas, como es el caso particular de la UDP-Glc PPasa de *T. brucei* que se la ha encontrado en los glicosomas de la célula [132], se realizaron cultivos de *E. gracilis* y se llevaron a cabo dos experimentos que se describen a continuación:

1- Se realizó un fraccionamiento celular, cuyo resultado se analizó mediante SDS-PAGE, seguido de western-blot, con anticuerpos anti-*Egr*UDP-Glc PPasa, que se muestra en la Figura 13. Para realizar este fraccionamiento, primeramente se produjo una disrupción celular mediante sonicado, a partir de la cual se obtuvieron dos fracciones, soluble e insoluble. A la fracción soluble se le adicionó 8 mM de CaCl_2 , lo cual permite precipitar membranas microsomaes presentes en esta fracción [188], obteniendo así una nueva fracción soluble (Figura 13, carril 3) y otra insoluble con la fracción microsomal (Figura 13, carril 4). A partir de la fracción insoluble inicial, obtenida por centrifugación posterior a la disrupción inicial por sonicado, se le realizó un tratamiento con 100 mM Na_2CO_3 pH 11, lo que permite la separación de las proteínas/enzimas que están asociadas a membrana, obteniéndose nuevamente dos fracciones. Por un lado, una soluble, en la que se encuentran todas las proteínas asociadas a membranas (Figura 13, carril 5) y por otro, la fracción insoluble en la que se encuentran todo el resto de proteínas que están presentes en sistemas de membranas (Figura 13, carril 6). En la Figura 13B, se encuentra el ensayo de western-blot en el que se realizó la inmunodetección de

la *Egr*UDP-Glc PPasa sobre las muestras del fraccionamiento. Del análisis del mismo, se detecta señal únicamente en la primera fracción soluble (Figura 13B, carril 3), mientras que, en el resto de las fracciones, tanto la insoluble como la microsomal, no se evidencia la presencia de esta enzima. Mediante este ensayo se pudo corroborar que la UDP-Glc PPasa está presente en la fracción soluble citosólica de *E. gracilis*.

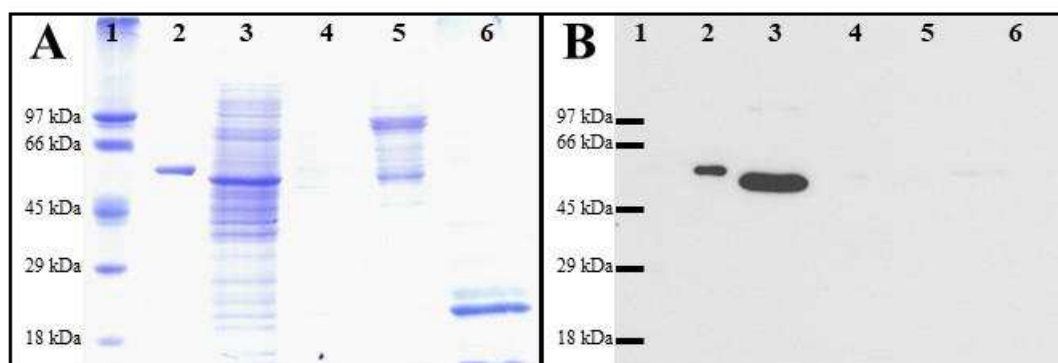


Figura 13: Análisis electroforético en SDS-PAGE de fracciones solubles e insoluble de *E. gracilis*. **A.** SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie. **B.** Western-blot del SDS-PAGE mostrado en (A) revelado con anticuerpos específicos policlonales contra *Egr*UDP-Glc PPasa. **Carril 1**, marcadores de masa molecular. **Carril 2**, *Egr*UDP-Glc PPasa recombinante purificada (500 ng en A y 1 ng en B). **Carril 3**, fracción soluble post tratamiento con CaCl_2 . **Carril 4**, fracción microsomal (insoluble del tratamiento con 8mM CaCl_2). **Carril 5**, fracción soluble del tratamiento con 100mM Na_2CO_3 pH 11.0. **Carril 6**, fracción insoluble del tratamiento con 100mM Na_2CO_3 pH 11.0.

2- Para corroborar lo observado en el fraccionamiento celular anteriormente detallado, se realizaron ensayos de microscopia confocal sobre cultivos en condiciones autotróficas y heterotróficas, con el fin de visualizar la localización de la *Egr*UDP-Glc PPasa en la célula. Para poder llevar a cabo esta experiencia primero fue necesario realizar la búsqueda de posibles fluoróforos a utilizar como conjugados para los anticuerpos secundarios, dado que *E. gracilis* además de clorofila presenta varios pigmentos en el interior celular que dan lugar a fluorescencia a diferentes rangos del espectro visible. Una vez realizado este análisis de emisión de fluorescencia propia de *E. gracilis*, se pudo comprobar que el fluoróforo Cy3 es adecuado para dicha técnica dado que su espectro de fluorescencia se encuentra en un mínimo de la fluorescencia propia presentada por la célula.

En la Figura 14 se visualiza tanto la célula proveniente del cultivo en condición autotrófica como la obtenida de la condición heterotrófica. En las fotografías se puede percibir la señal generada por la UDP-Glc PPasa marcada con anticuerpos primarios específicos contra esta enzima y anticuerpos secundarios conjugados a Cy3 que dan la fluorescencia (color verde en la Figura 14), a lo largo de todo el citosol celular. En la imagen se aprecia que la señal no se

encuentra asociada a microsomas o sistemas de membranas, siendo estos resultados coincidentes con el fraccionamiento celular mostrado en la Figura 13. Además de visualizarse señal a lo largo de toda la célula, se destaca una fuerte señal de marcación en el flagelo de la célula, independientemente de la condición de cultivo analizada. Particularmente, la marcada señal en el flagelo concuerda con lo descrito por Chen y Bouck sobre la presencia de glicosil transferasas en el flagelo de *E. gracilis*, en el que la síntesis de UDP-Glc sería necesario para dar lugar a la síntesis de glicoproteínas y oligosacáridos generados en el flagelo de la célula [189]. Además de la fluorescencia generada por la marcación de la enzima en estudio, puede apreciarse (en rojo) la fluorescencia emitida por la clorofila, la cual es fácilmente visible en la célula proveniente del cultivo autotrófico. Por el contrario, la célula de la condición heterotrófica no presenta esta fluorescencia ya que este cultivo se encontraba en oscuridad, y por lo tanto no hay desarrollo del cloroplasto (manteniéndose como pro-plástido) con la consecuente carencia en la producción de clorofilas.

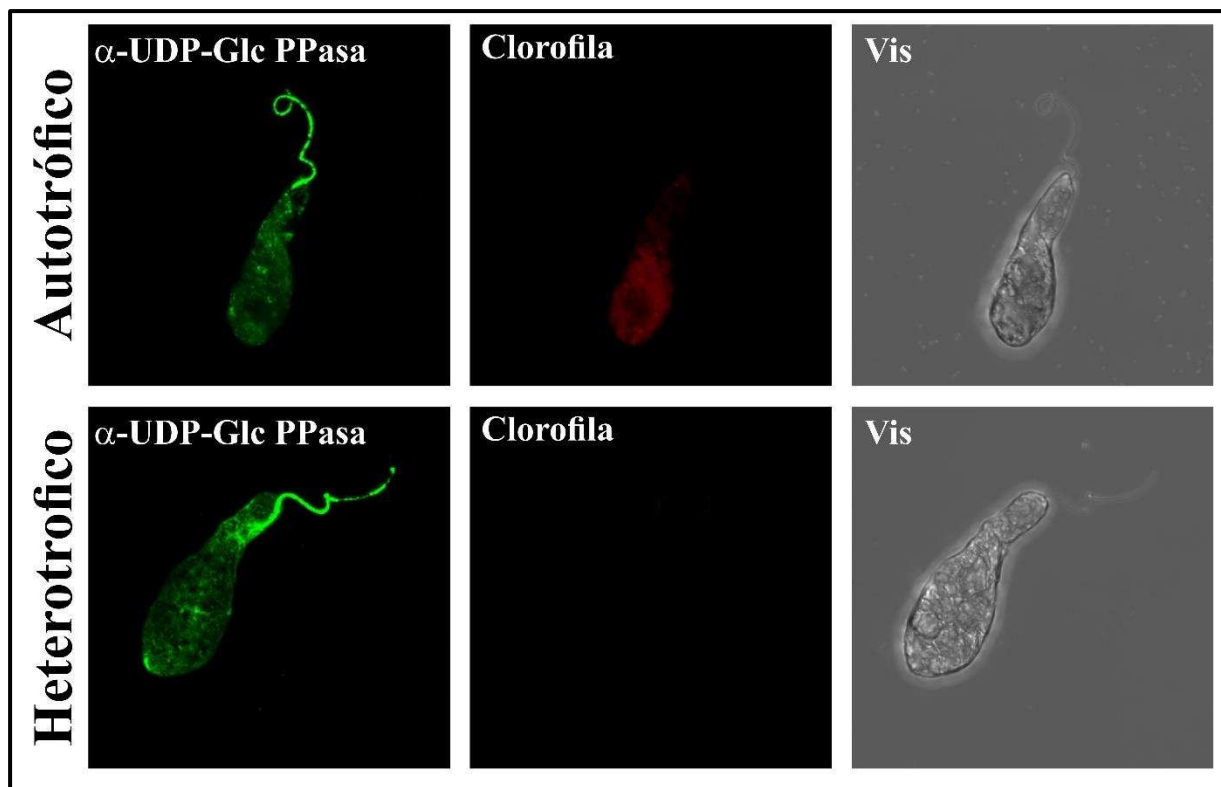


Figura 14: Proyección máxima de imágenes de microscopía confocal. Se utilizaron células de *E. gracilis* crecidas en condiciones autotróficas y heterotróficas en medio CyM y CyM suplementando con Glc 1% (p/v) respectivamente. Ambas muestras fueron tratadas con anticuerpos primarios contra *Egr*UDP-Glc PPasa y anticuerpos secundarios conjugados a Cy3 (α -UDP-GlcPPasa, verde). Fluorescencia de clorofila (Clorofila, rojo). Luz transmitida (Vis, gris).

4.2.1.6. Regulación de la UDP-Glc PPasa

La UDP-Glc PPasa de los diferentes organismos estudiados hasta el momento se han destacado por no presentar regulación del tipo alostérico, a diferencia de lo que ocurre en las ADP-Glc PPasas de organismos tanto procariotas como eucariotas, en las que se ha estudiado minuciosamente el efecto de diferentes metabolitos relacionados a vías centrales de utilización del carbono y energía, los cuales producen una activación o inhibición en la actividad enzimática de las ADP-Glc PPasas [98].

Al ensayar la actividad *Egr*UDP-Glc PPasa en presencia de metabolitos tales como Fru-6P, Glc-6P, 3P-glicerato, Fru-1,6-bisP, AMP y Pi, indicadores de niveles altos o bajos de energía intracelular, se pudo comprobar fehacientemente la ausencia de regulación del tipo alostérico, al igual que el resto de las UDP-Glc PPasas informadas hasta el momento [190].

Sin embargo, a pesar de no presentar regulación alostérica, se pudo detectar en *E. gracilis*, como ocurre en otros organismos, una regulación redox de la actividad UDP-Glc PPasa. En este sentido, se ha evidenciado que cuando la enzima se encuentra en un entorno oxidante se produce una disminución de la actividad UDP-Glc PPasa y que al volver a un estado reductor, la capacidad catalítica perdida puede ser recuperada [133, 186]. Ante este precedente encontrado y estudiado en nuestro grupo de trabajo en la enzima de organismos relacionados con *E. gracilis* se ha decidido ensayar si la *Egr*UDP-Glc PPasa presenta un efecto similar ante la condición redox en la que se encuentre. Se sabe que los aminoácidos que contienen azufre pueden ser modificados por este tipo de mecanismo y, de esta forma, modular la actividad de la enzima. La Figura 15 muestra un alineamiento realizado entre la enzima de *E. gracilis* estudiada en este trabajo de tesis, y organismos relacionados filogenéticamente (*T. cruzi*, *T. brucei*, *L. major*) y otros organismos pertenecientes al reino de los protozoos (*E. histolytica*, *G. lamblia*,). La *Ehi*UDP-Glc PPasa contiene cinco residuos de cisteína (Cys) y once de metionina (Met), de los cuales en nuestro grupo se ha demostrado que sólo los residuos Cys108, Cys378 y Met106 serían críticos para la modulación redox de la actividad de esta enzima [133]. En comparación, la *Gla*UDP-Glc PPasa (compartiendo 33% de identidad con la enzima homóloga de *E. histolytica*) contiene catorce residuos de cisteína y nueve de metionina, mientras que la enzima de *E. gracilis* presenta 7 cisteínas y 14 metioninas y posee un 30% de identidad con la de *E. histolytica*. En la Figura 15 se encuentran señalizadas con flechas rojas los residuos claves, implicados en la regulación redox de *Ehi*UDP-Glc PPasa. Estos aminoácidos están presentes en la *Gla*UDP-Glc PPasa (Cys92, Cys362 y Met90, respectivamente) y en la *Egr*UDP-Glc PPasa presenta la Met79 y la Cys357 (equivalente a la Met106 y Cys 378 de *E. histolytica* respectivamente) sin embargo, en el lugar equivalente a la

Cys108 de *E. histolytica*, *E. gracilis* presenta una Lys81. A pesar de la ausencia de una de las Cys que estaría involucrada en el proceso de regulación mediante óxido-reducción, acorde a las enzimas ya estudiadas, se procedió a analizar si diversos agentes redox podrían ejercer algún efecto sobre la actividad de la *Egr*UDP-Glc PPasa en estudio, tal como se pudo comprobar con la enzima de *E. histolytica* y *G. lamblia*.

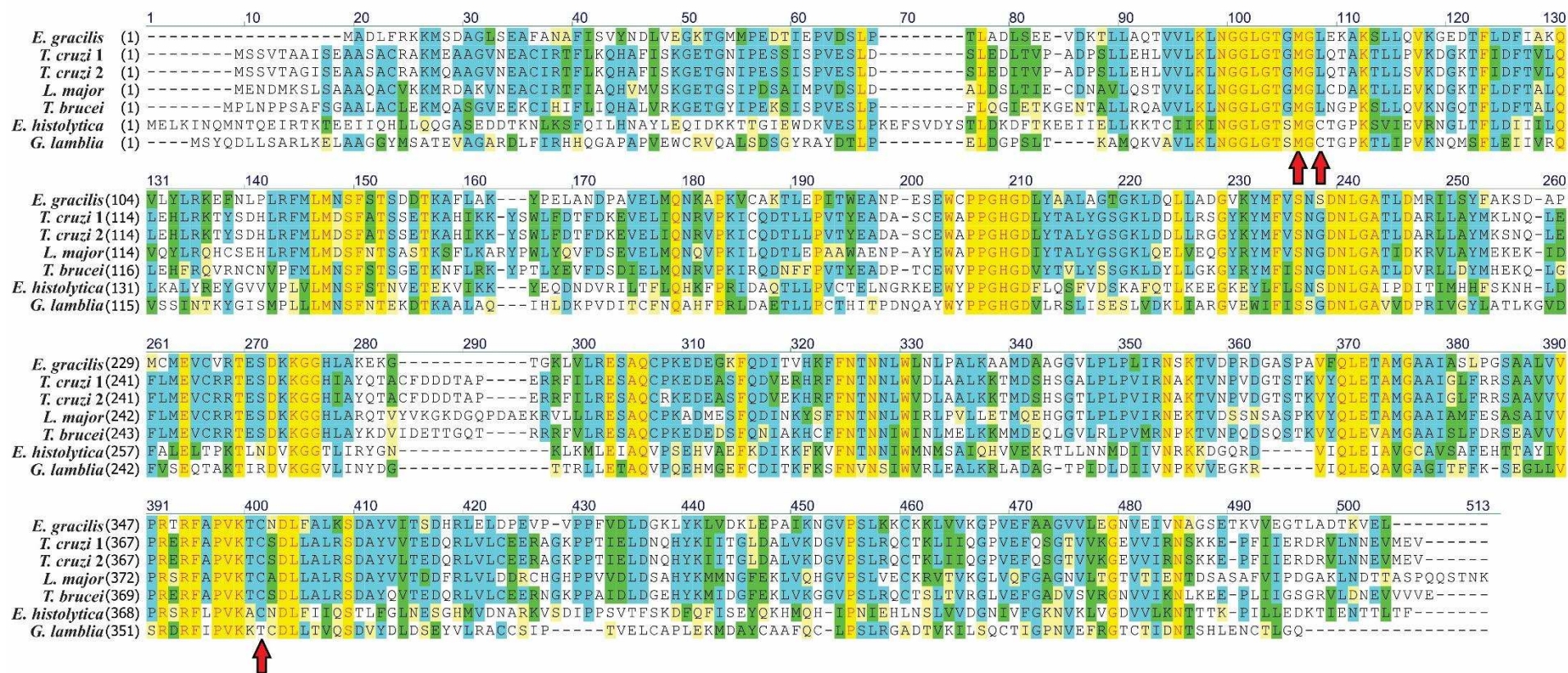


Figura 15: Alineamiento de secuencia de aminoácidos de UDP-Glc PPasas. *Euglena gracilis*; *Trypanozoma cruzi*-1 (XP_808700.1); *Trypanozoma cruzi*-2 (XP_808500.1); *Leishmania major* (XP_001682505.1); *Trypanozoma brucei* (CBJ20765.1); *Entamoeba histolytica* (XP_652750.2); *Giardia lamblia* (XP_001706597.1). Residuos de Cys y Met involucrados en la regulación redox se encuentran indicados con flechas rojas.

A. Oxidación de la *Egr*UDP-Glc PPasa con diamida o H₂O₂ y reducción con DTT

Para determinar si las reacciones de óxido-reducción podrían modificar la actividad de la enzima recombinante *Egr*UDP-Glc PPasa, se procedió a realizar en primer lugar un ensayo de oxidación y posterior reducción utilizando agentes químicos. En este caso, se utilizó diamida y H₂O₂ como agentes oxidantes y DTT como reductor, tres reactivos ampliamente utilizados para evaluar el efecto redox sobre la actividad de distintas enzimas [133, 186]. Para realizar el estudio, la enzima se oxidó alternativamente por preincubación con diamida o H₂O₂ a 25° C, en una relación agente:enzima de 100:1 para diamida y 1000:1 para H₂O₂. De esta mezcla de reacción se tomaron alícuotas a distintos tiempos durante 30 minutos, se diluyeron apropiadamente y se ensayó la actividad enzimática, para así evaluar el efecto de la oxidación sobre la funcionalidad catalítica. Pasado el tiempo de incubación con oxidante, se eliminó el agente oxidante mediante ultrafiltración y se adicionó a la mezcla un volumen mínimo de DTT para alcanzar una relación final de 5000 veces la concentración de enzima. Se continuó incubando la reacción, tomando alícuotas a distintos tiempos, diluyéndolas y midiendo su actividad, para evaluar de esta forma el efecto de la reducción sobre la actividad *Egr*UDP-Glc PPasa tratada con H₂O₂ como con diamida. En la Figura 16 se muestra cómo la actividad de la UDP-Glc PPasa fue modificada en presencia de oxidantes y reductor. Se pudo detectar una notable pérdida de actividad enzimática con el aumento del tiempo de incubación con el oxidante, tanto con diamida como con H₂O₂, presentando aproximadamente 40% de actividad remanente luego de 30 minutos de incubación, respecto del control (en ausencia de oxidante) que mantuvo su actividad durante todo el periodo de incubación (Figura 16). A su vez, la inhibición producida por ambos agentes oxidantes, pudo ser revertida en presencia de un agente reductor como el DTT, obteniéndose una mayor recuperación conforme avanza el tiempo de incubación, hasta alcanzar la recuperación de prácticamente el 100% de la actividad de *Egr*UDP-Glc PPasa a los 30 minutos de agregado el agente reductor, DTT en este caso particular (Figura 16). El fenómeno aquí observado es comparable al informado previamente por Ebrecht y colaboradores, así como por Martínez y colaboradores para la UDP-Glc PPasa de *G. lamblia* y *E. histolytica*, respectivamente [133, 186]. En estas enzimas, 3 aminoácidos están involucrados en un mecanismo de regulación redox de la actividad enzimática (Cys108, Cys378 y Met106 para la enzima de *E. histolytica*). Sobre estos residuos aminoacídicos actúan los agentes oxidantes y reductores.

En *E. gracilis*, sin embargo, la UDP-Glc PPasa no tiene la Cys equivalente a la Cys108 de *E. histolytica*. encontrándose una Leu en esa posición, lo que abre nuevos interrogantes respecto a lo que podría estar ocurriendo ante la ausencia de uno de los aminoácidos que, se ha

informado está involucrado en esta regulación redox de la UDP-Glc PPasa en otros protozoos, y como se estaría produciendo esta regulación en *E. gracilis*.

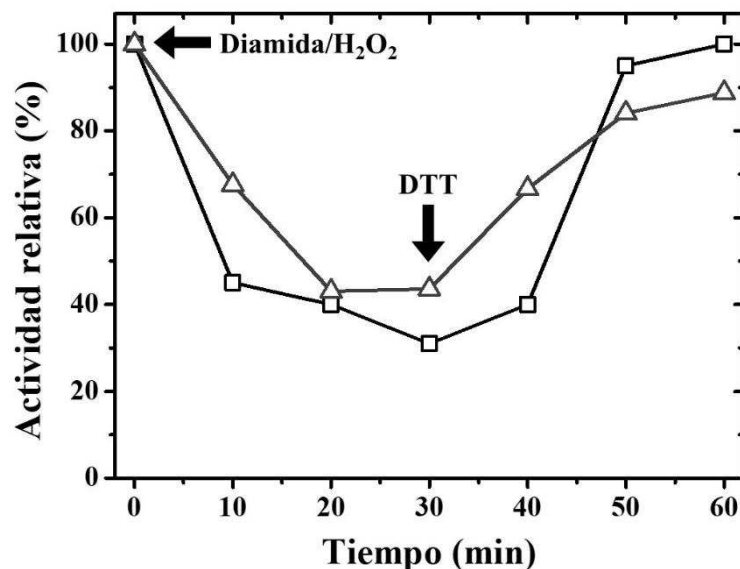


Figura 16: Actividad *Egr*UDP-GlcPPasa luego de la oxidación y reducción con agentes redox. La actividad enzimática se cuantificó durante 30 min en presencia de diamida o H₂O₂. Seguidamente, se agregó DTT sobre la enzima oxidada, y se midió actividad durante 30 min. La actividad se relativizó al control de la enzima sin tratar (3350 U.mg⁻¹). □: Diamida. △: H₂O₂.

Frente a la necesidad de responder estos nuevos interrogantes planteados, se decidió ensayar, mediante cromatografía de exclusión molecular, si la incubación con oxidante, además de producir una pérdida en la actividad, genera un cambio a nivel estructural. Cuando la *Egr*UDP-Glc PPasa se incubó con diamida en una relación de 100:1 diamida respecto a la enzima, durante 30 minutos y a 25°C, se pudo observar cómo además de la pérdida de actividad, hay un cambio en la estructura tridimensional de la enzima, produciendo un cambio en el radio de Stokes y por lo tanto, una diferencia en el perfil de elusión de la cromatografía, resultado que se muestra en la Figura 17. En la Figura 17A se observa el perfil correspondiente a la UDP-Glc PPasa de *E. gracilis* sin tratamiento, la que presenta un volumen de elusión de 16,6 ml correspondiente con una masa molecular de ~64 kDa. En la Figura 17B, se presenta el perfil de elusión de la proteína tratada con diamida, en el cual la elusión ocurre a un menor volumen y con un perfil no definido, en el que se alcanzan a apreciar dos picos de elusión principales a 14,0 y 16,0 ml, coincidentes con masas moleculares de 187 kDa y 82 kDa, respectivamente. Posteriormente, a otra alícuota de esta misma muestra tratada con diamida, se le agregó el reductor DTT. En este caso, además de recuperarse la actividad enzimática, en el cromatograma obtenido (Figura 17C) se observa un perfil de elusión idéntico al obtenido para la *Egr*UDP-Glc PPasa sin tratar (Figura 17A). Los resultados aquí enunciados indican que la

oxidación por parte de la diamida, genera un cambio en la conformación de la estructura de la enzima de *E. gracilis*, llevando a la formación aparente de estructuras monoméricas con mayor radio de Stokes y formaciones oligoméricas diversas, dada la poca definición de los picos de elusión observados en el cromatograma de la Figura 17B. Esto se correlaciona a su vez, con una pérdida en la actividad de la enzima posterior al tratamiento con diamida, acorde a nuestros resultados presentados previamente.

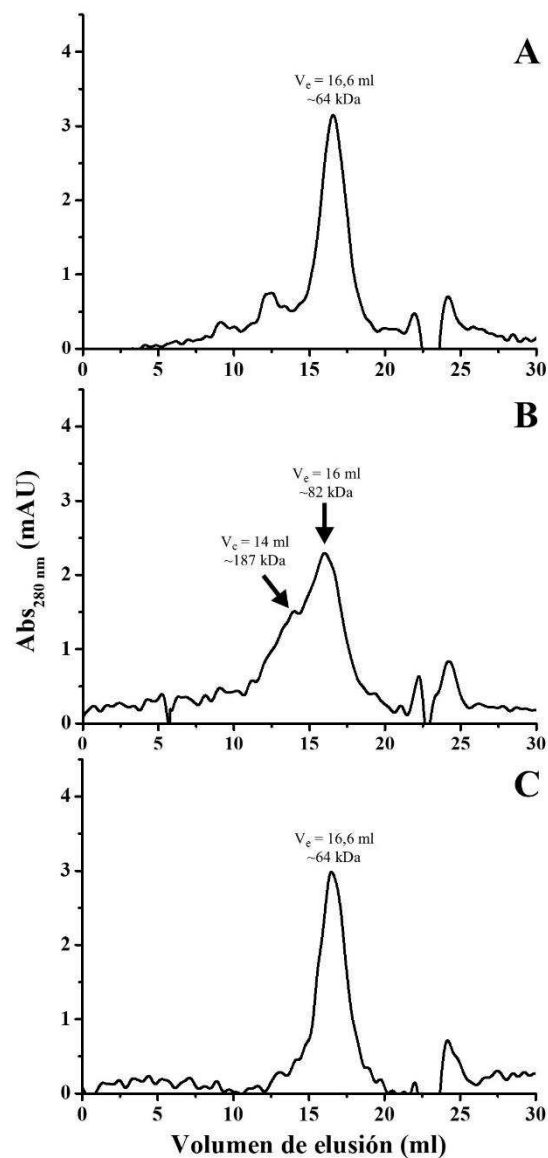


Figura 17: Perfiles de cromatografía de exclusión molecular. Ensayos realizados a la *Egr*UDP-Glc PPasa recombinante: control (A), incubada 30 minutos con diamida (B), incubada 30 minutos con ditioneitol post tratamiento con diamida (C).

B. Oxidación y reducción de la UDP-Glc PPasa por compuestos de relevancia fisiológica

En la búsqueda de una mejor comprensión de lo observado en respuesta a agentes químicos oxidantes y reductores, se optó por probar oxidantes fisiológicos, como el H_2O_2 , el glutatión oxidado (GSSG) y la nitrosocisteína (CysNO), con la finalidad de descartar que lo presentado anteriormente corresponda a artefactos y no presente relación lo realizado *in vitro* con lo que podría ocurrir en el interior de la célula de *E. gracilis*. En este sentido, se llevaron a cabo ensayos de oxidación con diamida, H_2O_2 , GSSG y CysNO, junto a un control sin agregado de agentes y un control al que se le adicionó DTT. Además, como los aminoácidos involucrados en esta regulación redox serían Cys, se adicionó un tubo en el que se agregó un agente alquilante (iodoacetamida, IAM), compuesto que bloquea/alquila los grupos tioles de las Cys.

Se realizó la incubación de la enzima con cada uno de los agentes arriba enunciados y luego, se procedió a medir la actividad enzimática. En la Figura 18 se muestra el histograma de las actividades enzimáticas obtenidas en este ensayo, donde se observa una disminución en la actividad con todos los agentes utilizados (a excepción del DTT que mantuvo la actividad del control). El GSSG es el que menos disminuyó la actividad, dejando ~60% de actividad remanente, seguido por el H_2O_2 (~30% de actividad remanente), mientras que la diamida, CysNO y la iodoacetamida produjeron una mayor disminución de la actividad de la *Egr*UDP-Glc PPasa, presentando una actividad remanente menor al 20%. Procediendo de igual modo a los ensayos previamente detallados, posterior a la oxidación, se produjo la reducción mediante el agregado del agente químico DTT, con el cual la actividad de la enzima se recuperó a valores cercanos al 100%. De los resultados aquí expuestos, es interesante destacar que el agente alquilante IAM, agente bloqueante de grupos tioles, produjo un efecto sobre la enzima en estudio comparable a los producidos por los otros agentes oxidantes ensayados. Esto estaría indicando que la función catalítica de la *Egr*UDP-Glc PPasa está asociada a los grupos tioles de las Cys, pudiendo ser éstas las mencionadas anteriormente o alguna de las 7 Cys presentes en esta enzima de *E. gracilis*. El rol específico de cada Cys presente en esta UDP-Glc PPasa, se podría completar mediante estudio de mutagénesis en futuros análisis de esta enzima.

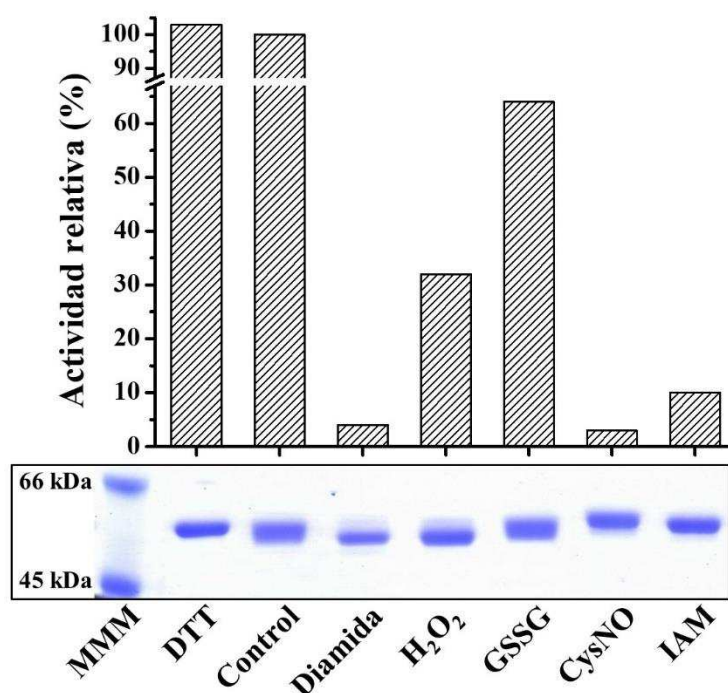


Figura 18: Histograma de actividad relativa de la UDP-Glc PPasa y gel SDS-PAGE no reductor. La *Egr*UDP-Glc PPasa fue incubada durante 30 minutos con una relación de 200:1 [agente redox:enzima] (ambos en μM) de los diferentes agentes: ditioneitol (DTT), diamida, peróxido de hidrógeno (H_2O_2), glutatión oxidado (GSSG), S-nitrosocisteína (CysNO) y iodoacetamida (IAM), en comparación con la enzima sin tratar (Control). Marcadores de masa molecular (MMM).

Adicionalmente, una alícuota de las muestras tratadas con los diversos agentes redox, se utilizaron para realizar una corrida electroforética en gel SDS-PAGE no reductor. A partir del mismo se evidenció que el tratamiento con diamida y H_2O_2 produce una migración ligeramente mayor que la muestra no tratada. Esta diferencia en el tamaño aparente de la molécula, indicaría que la oxidación de la enzima podría involucrar la formación de un puente disulfuro intramolecular (no intermolecular, debido a que en el SDSP-PAGE no reductor no se visualizaron bandas a mayores masas moleculares, descartando así la formación de oligómeros unidos por puentes disulfuro), mediante un enlace covalente entre dos residuos de Cys del polipéptido, dando lugar a la formación de estructuras más compactas, modificando el radio de Stokes y, consecuentemente, alterando la movilidad electroforética respecto del control sin tratar (ver Figura 18). Por el contrario, el tratamiento con GSSG, CysNO o IAM no produjeron cambios en el perfil de migración en el SDS-PAGE no reductor, comparado con el control sin tratar (Figura 18), indicando que estos agentes producen una pérdida en la actividad de la *Egr*UDP-Glc PPasa, sin generar un cambio a nivel estructural.

Teniendo en cuenta que el DTT es un reductor químico, se evaluó el efecto de un reductor fisiológico, para lo que se utilizó la tiorredoxina (TRX) de *E. coli* (reducida químicamente), producida en forma recombinante. Los resultados observados en la Figura 19 indican que, similar a lo obtenido con el DTT, se produce una recuperación de la actividad de la *Egr*UDP-Glc PPasa previamente tratada con oxidantes. Siendo posible recuperar el 100% de la actividad enzimática cuando la misma fue incubada con diferentes concentraciones de TRX reducida, como se evidencia en el histograma de la Figura 19. En conjunto, el hecho que diversos efectores redox del tipo fisiológico como H₂O₂, GSSG, CysNO y TRX, generen un cambio y/o modulación en la actividad de la *Egr*UDP-Glc PPasa, refuerza la hipótesis planteada respecto a que esta UDP-Glc PPasa puede ser regulada *in vivo* de forma redox en *E. gracilis*.

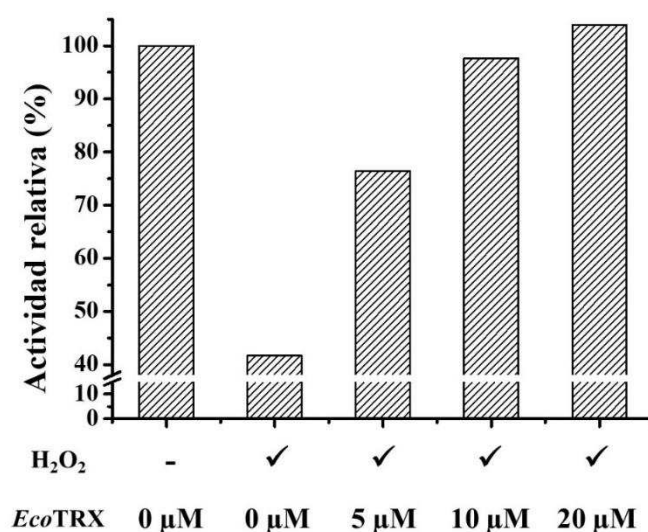


Figura 19: Histograma de actividad relativa de la UDP-Glc PPasa. Actividad sobre alícuotas de *Egr*UDP-Glc PPPasa oxidada con H₂O₂ y seguidamente reducidas con diferentes concentraciones de tiorredoxina reducida de *E. coli*. El 100% de actividad enzimática corresponde a 3350 U.mg⁻¹ en las condiciones control sin el agregado de agente oxidante.

Con el objetivo de profundizar en el análisis del efecto de oxido-reducción sobre la UDP-Glc PPasa de *E. gracilis*, y como se ven involucrados los grupos tioles presentes en la enzima, se realizó la cuantificación química de grupos tioles libres presentes en la *Egr*UDP-Glc PPasa, utilizando el reactivo químico DTNB [172, 191]. Para la enzima sin tratar (control), o tratada con DTT, se determinó la presencia de 7 grupos tioles libres por molécula (ver Tabla 9), lo que coincide con el número de cisteínas presentes en la estructura primaria de la *Egr*UDP-Glc PPasa. Luego de los tratamientos con diamida, H₂O₂, o IAM, permanecieron detectables por esta técnica 2 tioles por molécula (Tabla 9). Este resultado nos sugiere que 5 de los 7 residuos de cisteínas presentes en la enzima, serían propensos a la oxidación y/o alquilación por los diferentes agentes ensayados.

Tabla 9: Cuantificación de tioles de la *Egr*UDP-Glc PPasa. La enzima fue incubada con diferentes agentes (relación agente:enzima de 5000 DTT, 500 diamida, 2000 H₂O₂ y 1000 IAM) durante 30 min a 25°C.

| Muestra | Relación [tioles/enzima] |
|-------------------------------|-----------------------------|
| Control | 6,3 ± 0,6 |
| DTT | 6,8 ± 0,8 |
| Diamida | 1,7 ± 0,3 |
| H ₂ O ₂ | 1,8 ± 0,3 |
| IAM | 2,4 ± 0,3 |

Los resultados hasta aquí enunciados, indican que los grupos tioles de residuos críticos de Cys son importantes para la actividad de la *Egr*UDP-Glc PPasa, donde la oxidación o alquilación de dichos residuos provocan una pérdida de la actividad enzimática, posiblemente por la formación de un puente disulfuro entre las cisteínas propias del polipéptido que permiten, en algunos casos, una migración diferencial en gel SDS-PAGE no reductor (Figura 18).

Si retomamos la comparación de secuencias proteicas realizada entre la *Egr*UDP-Glc PPasa, en comparación con las homólogas de *E. histolytica* y *G. lamblia* (Figura 15), se evidencia que la enzima de *E. gracilis* carece de la Cys en la posición equivalente a la Cys108 de *E. histolytica* que, de acuerdo a estudios previos, se encontraría involucrada en la regulación redox de la enzima en este protozoo [133]. Esto nos lleva a plantear el interrogante respecto a si la carencia de este residuo de Cys en la enzima de *E. gracilis*, podría ser reemplazado por otro residuo de Cys presente en la molécula.

C. Modelado molecular de la UDP-Glc PPasa

En búsqueda de respuestas para los interrogantes desencadenados a partir de los resultados expuestos en el punto anterior, se procedió a la construcción de un modelo de la *Egr*UDP-Glc PPasa, mediante modelado molecular por homología, que nos permita comprender mejor el efecto de los oxidantes sobre la enzima. Para el modelado, se utilizó como molde la estructura resuelta por cristalografía de rayos X de la UDP-Glc PPasa de *L. major* (PDB ID 4m2a; la cual posee un 54% identidad con *Egr*UDP-Glc PPasa) [142].

En la Figura 20 se muestra la estructura de la enzima utilizada como molde (Figura 20A) y el modelo de *Egr*UDP-Glc PPasa resultante (Figura 20B). El modelo tridimensional obtenido, fue sometido a diversos validadores a modo de asegurar que el mismo sea correcto. Se utilizó

Verify3D en el cual se obtuvo una puntuación de 90,63 [179], mientras que en *QMEAN* el puntaje obtenido fue de -1,72, mostrando en conjunto una buena puntuación en cuanto a los validadores estructurales [181]. Por último, analizando el gráfico de *Ramachandran*, solo el 0,7% de los aminoácidos se encuentran en un área no adecuada [192]. A partir de los resultados obtenidos con los validadores, y dada la elevada identidad entre ambas enzimas, podemos asegurar que el modelo resultante es confiable.

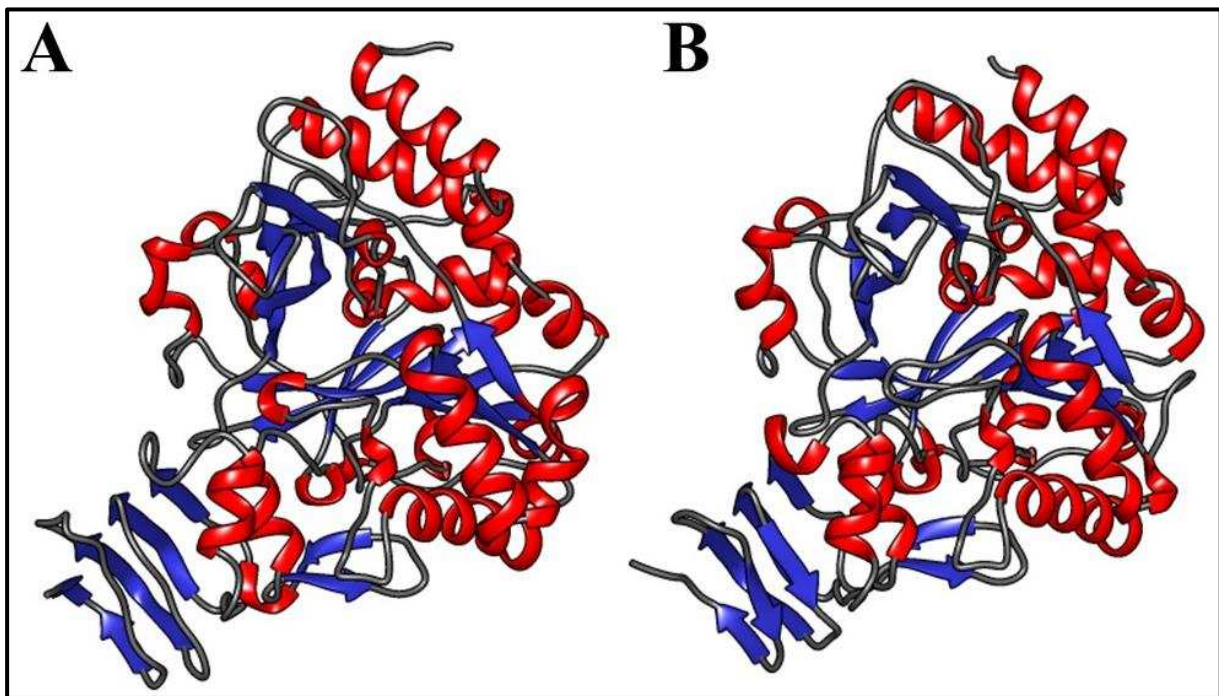


Figura 20: Modelado molecular por homología para la *Egr*UDP-Glc PPasa. **A:** Estructura cristalina de la UDP-Glc PPasa de *L. major* (PDB ID: 4m2a) utilizado como molde. **B:** Modelo obtenido de la UDP-Glc PPasa de *E. gracilis* mediante modelado por homología.

Sobre el análisis de la estructura, en primer lugar se buscaron los posibles residuos de Cys que se encuentren suficientemente cercanos para estar involucradas en la formación de un puente disulfuro. Luego de un análisis metódico *in silico*, se comprobó que ninguno de los 7 residuos de Cys presentes en la *Egr*UDP-Glc PPasa se encontrarían a una distancia acorde para la formación del puente disulfuro intracatenario, como se visualiza en la Figura 21A. Este hecho, refuta nuestra primera hipótesis respecto a que el proceso de oxidación produciría la formación de puentes disulfuro intracatenarios. De acuerdo al alineamiento de secuencias presentado anteriormente (Figura 15), la *Egr*UDP-Glc PPasa carece de un residuo de Cys en la posición 81, que sería el equivalente a la Cys108 de *E. histolytica*, y en su lugar se encuentra un residuo de leucina. Estructuralmente, esta Leu81, se posiciona cercana a la Cys357, equivalente a la Cys378 de *E. histolytica*, tal como se aprecia en la Figura 21B. Asimismo, en el modelo resultante de la *Egr*UDP-Glc PPasa presentado en la Figura 21B, se muestra el

residuo Met79, equivalente a la Met106 de *E. histolytica*. Cabe recordar que la Met es un residuo posible de ser modificado por oxido-reducción y por lo tanto estar involucrado en esta regulación como fuera demostrado por Martínez y colaboradores [133]. A pesar de las diferencias estructurales encontradas entre la enzima de *E. gracilis* y *E. histolytica* y la carencia del residuos de Cys cuyo rol en la regulación redox ha sido demostrada en *E. histolytica*, los resultados cinéticos obtenidos para *Egr*UDP-Glc PPasa, indican una modulación de la actividad enzimática de acuerdo a los estados de óxido-reducción, resultados que son comparables a lo observado para la enzima de *E. histolytica* y *G. lamblia* [133, 186]. Esto nos lleva a considerar que la función regulatoria de esta Cys ausente en la enzima de *E. gracilis*, podría ser reemplazada por alguna de las 6 Cys restantes presentes en la proteína, o incluso involucrando a un par de residuos de Cys diferentes a los informados para la UDP-Glc PPasa de *E. histolytica* [133]. Sin embargo, los resultados encontrados *in silico* a partir del análisis del modelo generado, muestran que la distancia entre las Cys presentes en *Egr*UDP-Glc PPasa no es adecuada para formar puentes disulfuro. Por este motivo, plantemos la necesidad de profundizar este estudio, con el fin de comprender el fenómeno observado, tanto respecto a la disminución de actividad frente a una oxidación, y posterior recuperación ante la presencia de agentes reductores químicos o fisiológicos, como así también comprender el fenómeno de migración anómala observado en el SDS-PAGE no reductor.

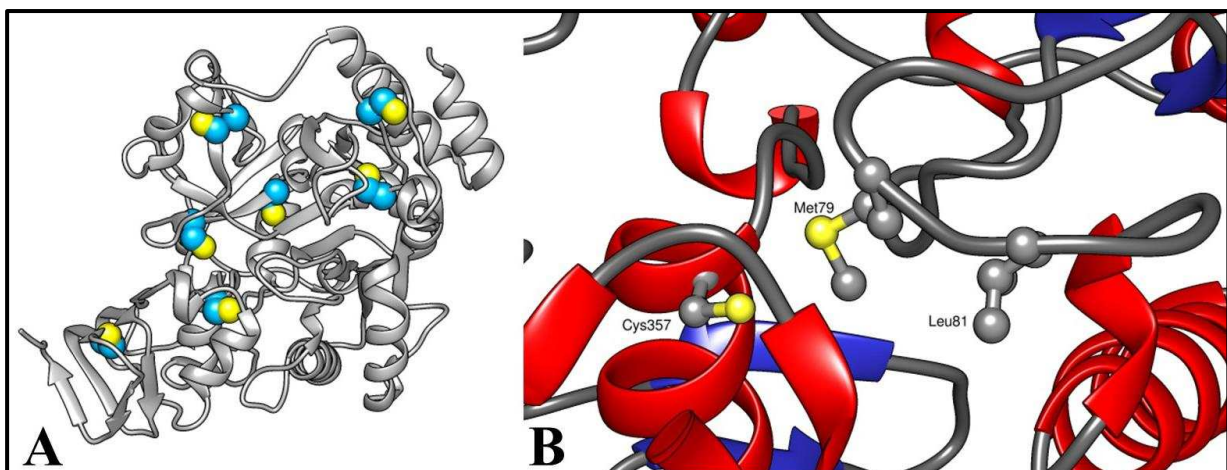


Figura 21: Análisis de los residuos de cisteína en la *Egr*UDP-Glc PPasa. **A:** Modelo de la UDP-Glc PPasa de *E. gracilis* en la que se muestran los 7 residuos de Cys presentes en la molécula. **B:** Se indican los aminoácidos de la UDP-Glc PPasa de *E. gracilis* en las posiciones equivalentes a las Cys108, Cys378 y Met106 en *E. histolytica* que se ha demostrado están involucradas en la regulación redox[133].

D. La *Egr*UDP-Glc PPasa adopta diferentes conformaciones luego de la modificación redox, tanto *in vitro* como *in vivo*

Podría asumirse que la oxidación de los grupos sulfhidrilos de los residuos de Cys en la *Egr*UDP-Glc PPasa se produce de forma aleatoria entre las 5 Cys reactivas presentes, llevando a la formación de derivados del ácido sulfénico. Estos últimos grupos añadirían cargas negativas a la estructura proteica, cambiando la relación carga:masa y/o induciendo cambios conformacionales localizados, lo que explicaría la mayor migración observada, para las muestras tratadas con diamida y H₂O₂, en el SDS-PAGE no reductor descrito anteriormente (Figura 18). Cabe aclarar que los ácidos sulfénicos de los grupos R de las Cys son factibles de ser reducidas por DTT y otros agentes reductores [193] lo que sería coincidente con la recuperación tanto de la estructura observada en la enzima de *E. gracilis* como de la actividad.

Para profundizar en el entendimiento respecto a cómo influyen los oxidantes sobre la *Egr*UDP-Glc PPasa, se realizaron ensayos redox tanto *in vitro* como *in vivo*. Los resultados obtenidos del tratamiento de la enzima con H₂O₂ o IAM, son coherentes con aquellos observados en las cromatografías de exclusión molecular descritas anteriormente. Al incubar la enzima frente a concentraciones crecientes de H₂O₂ (0 a 14 mM) o IAM (0 a 7 mM), se pudo visualizar en corridas de PAGE nativo perfiles de migraciones atípicas, exhibiendo bandas a diferentes alturas, todas mayores a la control (Figura 22A/B). Esto respondería a un cambio en la masa y/o en la relación carga:masa, con una probable formación de oligómeros. Ambas modificaciones químicas (oxidación/alquilación) de la enzima, fueron acompañadas por la pérdida de actividad enzimática, como se muestra en la Figura 22C y 22D. En conjunto, estos resultados sugieren que la oxidación o alquilación de los grupos tioles reactivos modificarían la estructura tridimensional de la *Egr*UDP-Glc PPasa, acompañado de una pérdida funcional. Estas modificaciones incluirían la formación de diversas formas de monómeros, enzimáticamente inactivos y con radios de Stokes diferentes, los cuales podrían interaccionar entre ellos dando lugar a oligómeros de diferentes masas y relaciones de carga:masa (Figura 22A y 22B).

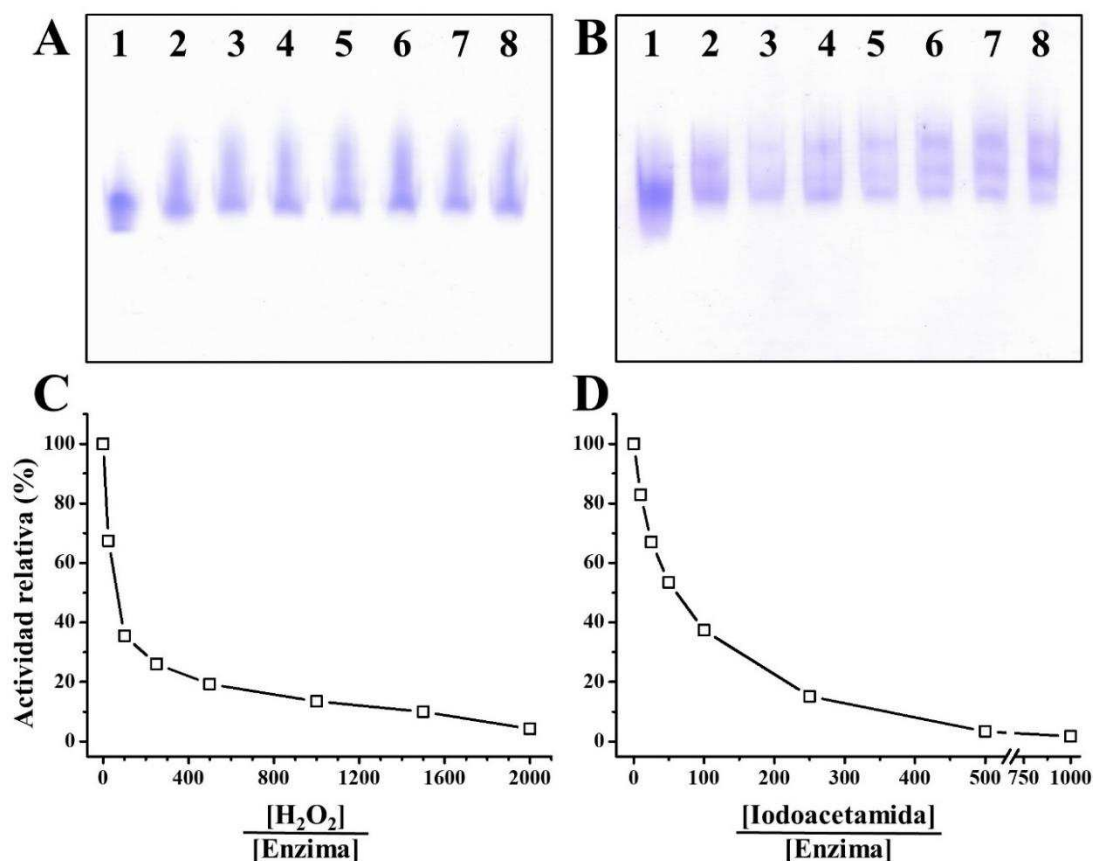


Figura 22: Evaluación de la *Egr*UDP-GlcPPasa recombinante purificada e incubada a diferentes concentraciones de H₂O₂ e IAM. **A.** PAGE nativo de la enzima post incubación con concentraciones crecientes de H₂O₂. El ensayo se realizó en ausencia de H₂O₂ como control **carril 1**; y relaciones [H₂O₂]:[enzima] (ambos en μM) de 25 **carril 2**, 100 **carril 3**, 250 **carril 4**; 500 **carril 5**; 1000 **carril 6**; 1500 **carril 7**; 2000 **carril 8**. **B.** PAGE nativo de la enzima post incubación con concentraciones crecientes de IAM. El ensayo se realizó en ausencia de IAM como control **carril 1**; y relaciones [Iodoacetamida]:[enzima] (ambas en μM) de 10 **carril 2**; 25 **carril 3**; 50 **carril 4**; 100 **carril 5**; 250 **carril 6**; 500 **carril 7**; 1000 **carril 8**. **C.** Actividad relativa (%) de las muestras corridas en A. **D.** Actividad relativa (%) de las muestras correspondientes a B. La actividad de las diferentes muestras se relativizó al control sin tratamiento en cada caso (3500 U.mg⁻¹).

Este mismo fenómeno de retraso en PAGE nativo parece ocurrir *in vivo* en cultivos axénicos de *E. gracilis* en condiciones control y estresados con H₂O₂ (Figura 23). Las fracciones solubles de extractos crudos de *E. gracilis* fueron obtenidos a partir de cultivos axénicos en condiciones autotróficas y heterotróficas suplementadas con Glc 1% (p/v). En el caso de los cultivos en condición heterotrófica, se ensayó no solo en condiciones de estrés por H₂O₂, sino que también se probaron condiciones de anaerobiosis, en el cual, para uno de los cultivos se mantuvo la fuente de carbono, y en el otro se utilizó solamente el medio salino en ausencia de fuente de carbono. A partir de las muestras de los diferentes cultivos, con o sin estresar, se realizaron corridas en PAGE nativo y SDS-PAGE no reductor, ambos seguidos de

electrotransferencia a membrana de nitrocelulosa y posterior inmunodetección utilizando anticuerpos policlonales específicos contra la *Egr*UDP-Glc PPasa, Figura 23A y 23B, respectivamente. En el análisis del western-blot sobre el PAGE nativo (Figura 23A) puede visualizarse un patrón similar al obtenido en la Figura 22 para los ensayos *in vitro* realizados con la enzima recombinante, en las que se evidencian bandas que se corresponden a la formación de monómeros con relaciones carga:masa alteradas respecto del control. Estos monómeros alterados, pueden encontrarse a su vez formando oligómeros de diferentes tamaños, resultando en un número indefinido de asociación de moléculas que pueden diferir en el grado de oxidación resultante dando lugar a un patrón impreciso, lo que se evidencia tanto para las muestras *in vivo* como *in vitro* (Figura 22A y 23A). Del ensayo *in vivo* se observa una menor diferencia con respecto a sus correspondientes controles, sin embargo, en las muestras provenientes de cultivos estresados (por agregado de H₂O₂ o anaerobiosis) el patrón de migración de la UDP-Glc PPasa se encuentra más esparcido hacia la formación de estructuras de mayor masa molecular (Figura 23A).

A partir del análisis de la Figura 23B se puede concluir que la formación de estos oligómeros de diferentes masas moleculares, por la asociación de monómeros con diversos grados de oxidación, se da por interacciones del tipo no covalentes, dado que en el western-blot del SDS-PAGE no reductor solo se pudo evidenciar una única banda definida a la altura correspondiente al monómero. Esto nos lleva a pensar que posiblemente la modificación de los grupos reactivos de las Cys reactivas presentes en la *Egr*UDP-Glc PPasa, conduce a una modificación estructural en la enzima que da lugar a la formación de oligómeros sin la formación de interacciones covalentes como los puentes disulfuro. Finalmente, en la Figura 23C se puede observar cómo, el estrés generado en el cultivo autotrófico conlleva a una notable disminución en la actividad UDP-Glc PPasa, mostrando en las condiciones de mayor estrés un 50% de actividad remanente respecto de la muestra control. Por su parte, en el caso del cultivo heterotrófico tratado con H₂O₂, no se observó una disminución de la actividad enzimática, sino que por el contrario, se pudo detectar una mayor cantidad de enzima, es visible en ambos western-blot (Figura 23A y 23B, carril 5), manteniendo una actividad similar al control. Este resultado nos lleva a pensar que en esta condición, una forma de sobrellevar el estrés podría ser el aumento de síntesis de la UDP-Glc PPasa, sin embargo para confirmar esta hipótesis sería necesario abarcar el estudio de esta enzima intracelularmente con mayor profundidad. Contrariamente al estrés producido por H₂O₂ sobre el cultivo heterotrófico de *E. gracilis*, la generación de un entorno anaeróbico en estas células, muestra que existe la

formación de estructuras oligoméricas con la consecuente pérdida de la actividad (Figura 23), de forma similar a lo que ocurre en el cultivo autotrófico sometido a estrés.

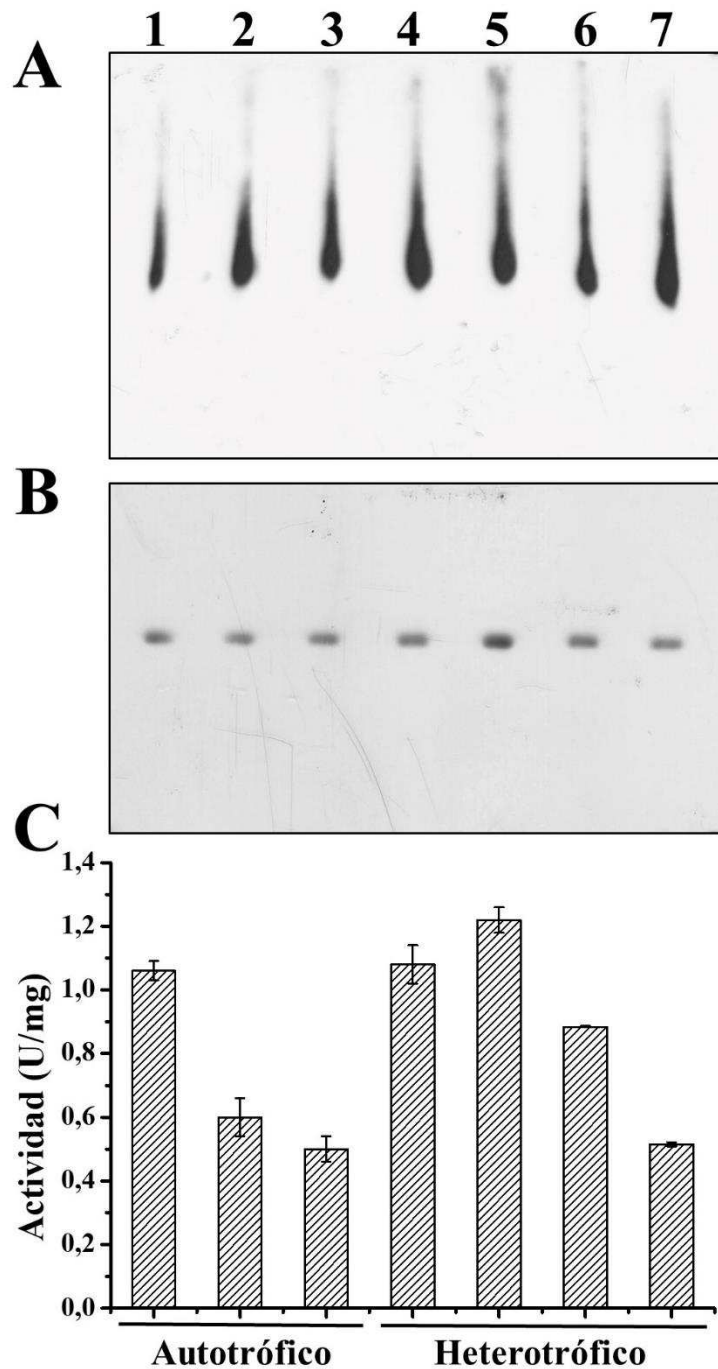


Figura 23: Evaluación redox de la *Egr*UDP-Glc PPasa in vivo. Ensayos de western-blot de (A) PAGE nativo, (B) SDS-PAGE no reductor; y (C) actividad UDP-Glc PPasa de la fracción soluble de extractos de células de *E. gracilis*. **Carril 1**, células control autotrófico ($1,06 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$); **carril 2**, células autotróficas tratadas con $250 \text{ mM H}_2\text{O}_2$ ($0,6 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$); **carril 3**, células autotróficas tratadas con $500 \text{ mM H}_2\text{O}_2$ ($0,5 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$); **carril 4**, células control heterotrófico ($1,08 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$); **carril 5**, células heterotróficas tratadas con $250 \text{ mM H}_2\text{O}_2$ ($1,22 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$); **carril 6**, células heterotróficas en condiciones anaeróbicas (medio CyM suplementado con $1\% \text{ Glc}$) ($0,88 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$); **carril 7**, células heterotróficas en condiciones anaeróbicas (medio CyM sin suplementar con fuente de carbono) ($0,52 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$)

Con los resultados aquí presentados, hemos demostrado que la UDP-Glc PPasa de *E. gracilis*, de forma similar a lo descrito para la enzima homóloga en *E. histolytica* y *G. lamblia*, podría ser regulada en forma redox tanto *in vitro* como *in vivo*. La enzima de *E. gracilis*, como se describió anteriormente, carece de uno de los residuos de Cys, que ha sido informado como clave en este tipo de regulación para la UDP-Glc PPasa de organismos relacionados [133, 186]. No obstante, nuestros resultados ponen en evidencia que la actividad de la *Egr*UDP-Glc PPasa podría ser regulada *in vivo*, mediante un mecanismo de oxidación y reducción que lleva a la pérdida de función de la enzima ante la presencia de agentes oxidantes y que ante reductores químicos como el DTT, o reductores fisiológicos como la TRX, es capaz de recuperar su actividad. Frente a la imposibilidad de la formación de puentes disulfuro, dada por las distancias encontradas en el modelado molecular realizado, entre las Cys presentes en la UDP-Glc PPasa de *E. gracilis*, nos lleva a concluir que la inactivación de esta enzima se daría por la formación de derivados del ácido sulfénico en los residuos de Cys oxidados. Esto produciría un cambio conformacional en la enzima, lo que conlleva a la formación de diversos oligómeros que presentan diferentes grados de oxidación, razón por la que no se obtienen bandas definidas en las migraciones en PAGE nativo. La modificación producida aleatoriamente en las Cys reactivas, daría lugar a la formación de estas estructuras complejas, las que se mantienen unidas por interacciones no covalentes como fuera demostrado mediante el análisis en SDS-PAGE no reductor. Además, el hecho que la IAM (agente alquilante) afecta a la proteína de forma similar a lo que ocurre con el H₂O₂, es otro indicio que los grupos tioles presentes en las Cys serían las principales involucradas en este fenómeno encontrado.

Pero, ¿la formación de los oligómeros, tendría alguna función adicional o solo es parte de la inactivación de la enzima? Es una pregunta que por el momento permanece sin una respuesta certera. Con la finalidad de analizar si la formación de estos oligómeros produciría una acumulación de esta enzima en alguna zona particular de la célula, realizamos un ensayo de microscopía confocal sobre alícuotas de los cultivos de *E. gracilis* sometidos a diferentes condiciones de estrés. Este ensayo no mostró diferencia respecto a la localización subcelular de la UDP-Glc PPasa entre las células control y las células estresadas, permaneciendo la señal hallada dispersa en todo el citosol celular, inclusive en el flagelo, como fuera previamente mostrado en este trabajo de tesis. Por lo tanto, se desconoce aún si la formación de los oligómeros tiene una función asociada o es simplemente una consecuencia del cambio en la conformación de la enzima, por la oxidación de al menos 5 de los 7 residuos de Cys presentes en la *Egr*UDP-Glc PPasa.

4.2.1.7. Silenciamiento por ARN de interferencia

Para avanzar hacia una mayor comprensión sobre la importancia de la UDP-Glc en el metabolismo del carbono en *E. gracilis*, se trabajó en el silenciamiento de la *EgrUDP-Glc PPasa* mediante ARN de interferencia (ARNi), con la finalidad de disminuir de la cantidad de enzima circundante y observar el posible efecto generado sobre el normal funcionamiento de la célula y en la acumulación de paramilon. Para realizar esta técnica de ARNi, la cual ha sido previamente utilizada con éxito para silenciar diferentes proteínas/enzimas en *E. gracilis* [157, 194–201], fue necesario obtener de fuente la secuencia codificante de la enzima en estudio dado que el gen para la expresión recombinante de esta UDP-Glc PPasa había sido sintetizado *de novo* a partir de la secuencia proteica, con codones optimizados para la expresión en *E. coli*.

Partiendo de un cultivo en condición autotrófica, se realizó la extracción de ARN total, al cual se le evaluó su calidad. Con este ARN total se procedió a la obtención del ADNc, mediante retro-transcripción, acorde a lo descrito en Materiales y Métodos y, seguidamente se realizó la PCR utilizando los oligonucleótidos EgrgalUfow y EgrgalUrev, detallados en la Tabla 3 de Materiales y Métodos, con el fin de amplificar el gen codificante para la *EgrUDP-Glc PPasa*. Con el producto de PCR amplificado, se procedió al clonado en el vector de clonado pGEM-T easy, y posterior secuenciación para corroborar la correcta secuencia nucleotídica del fragmento amplificado.

Sobre la secuencia de ADN codificante para la enzima en estudio, se diseñaron dos pares de oligonucleótidos que permitan obtener dos fragmentos de alrededor de 400 pb. Estos oligonucleótidos, además de contar con la secuencia codificante para amplificar el fragmento deseado, poseen en sus extremos 5' la secuencia promotora para la T7 ARN polimerasa (Tabla 6 de Materiales y Métodos, EgrUDPGlcPPasaARNi1fow/rev, EgrUDPGlcPPasaARNi2fow/rev), necesaria para la generación *in vitro* del ARN doble cadena (ARNdc). Cada producto de PCR de 400 pb obtenido, fue utilizado como molde para la síntesis *in vitro* de su correspondiente ARNdc utilizando la T7 ARN polimerasa. Estos productos (ARNdc), se purificaron del resto de ADN utilizado como molde y se utilizaron en la electroporación de las células de *E. gracilis*, para producir el silenciamiento de la esta UDP-Glc PPasa, mediante la disminución de su ARNm. Brevemente, en la técnica de silenciamiento por ARNi, el ARNdc (generado *in vitro*) ingresa al interior celular y es tomado por la maquinaria propia de la célula produciendo el procesamiento necesario para generar el silenciamiento del ARNm blanco [38]. Cabe destacar que este mecanismo de silenciamiento tiene ventajas en cuanto a su facilidad, ya que no es necesario establecer líneas de cultivos silenciadas, sin embargo como contrapartida el

silenciamiento es temporal, siendo el mismo funcional por aproximadamente 30 días, tiempo a partir del cual comienzan a recuperarse los niveles normales de transcritos y por lo tanto el de la proteína silenciada.

Una cantidad aproximada de 1×10^6 células de un cultivo en crecimiento exponencial de *E. gracilis* fueron electroporadas con alrededor de 20 μg de ARNdc (10 μg de cada fragmento). Se utiliza la mezcla de los dos fragmentos de 400 pb de ARNdc para aumentar la eficiencia de la interferencia. El ARNdc una vez que ingresa a la célula es tomado por la maquinaria de procesamiento de ARN propia de la célula y produce la interferencia, disminuyendo así la cantidad del ARN mensajero blanco y consecuentemente reduciendo los niveles de la proteína temporalmente, con una duración de la interferencia estimada entre 30 a 45 días. Para realizar una evaluación de los efectos producidos por el silenciamiento de la UDP-Glc PPasa en *E. gracilis*, hemos tomados muestras de las células post-electroporación, cada 7 días por un periodo de 28 días. Los resultados exhiben que el empleo de esta técnica ha resultado exitoso, permitiéndonos disminuir la actividad UDP-Glc PPasa en los extractos de *E. gracilis*, como se muestra en el histograma de la Figura 24A. Asimismo, mediante ensayos de western-blot con anticuerpos específicos contra la *Egr*UDP-Glc PPasa, se observa una desaparición prácticamente total de la señal correspondiente a esta enzima por un periodo de 7 a 28 días posterior a la electroporación (Figura 24B). Durante los primeros 7 días se ha evidenciado una disminución en los niveles de enzima, hasta llegar a cantidades prácticamente indetectables, lo que perdura hasta aproximadamente los 28 días desde la electroporación, tiempo en cual comienza a visualizarse una ligera recuperación en la cantidad de UDP-Glc PPasa en los extractos solubles de *E. gracilis* (Figura 24B). Esto fue además corroborado a nivel de transcritos, ya que cuando se realizó retro-transcripción seguida de PCR con oligonucleótidos específicos, sobre extracciones de ARN total de las células silenciadas, no fue posible amplificar del gen codificante de la UDP-Glc PPasa, como se muestra en la Figura 25.

A partir de estas experiencias de puesta a punto de la técnica en el laboratorio descriptas anteriormente, se estableció como criterio general que, desde el momento de la electroporación, se deja transcurrir una semana para darle tiempo al cultivo de recuperarse, y por otro lado que el efecto del ARNi sea evidente, de forma tal de no tener resultados sesgados. Asimismo, este tiempo trascurrido desde la electroporación, permite mantener un número adecuado de células que admita la toma de muestra a lo largo de todo el periodo del experimento realizado. Como se observa en la Figura 24A, al medir actividad UDP-Glc PPasa a las fracciones solubles de los extractos crudos de *E. gracilis* tratados con el ARNdc, se evidencia una clara disminución de la actividad enzimática, llegando a valores de entre un 20-25% de la actividad, en comparación

al control (células que fueron electroporadas en ausencia de ARNdc), siendo mayor la diferencia entre los 7 a 21 días post-electroporación (Figura 24A). En concordancia con lo observado en los ensayos de western-blot, se evidencia una ligera recuperación de la actividad UDP-Glc PPasa a partir del día 28, tiempo en el cual se exhibe una leve aparición de una señal correspondiente a esta enzima en la inmunodetección (Figura 24). Como se mencionó previamente, la técnica de ARNi no elimina por completo la presencia de la proteína en estudio, sino que produce una disminución temporal de la misma, observándose una recuperación pasados los 30-45 días posteriores a la electroporación.

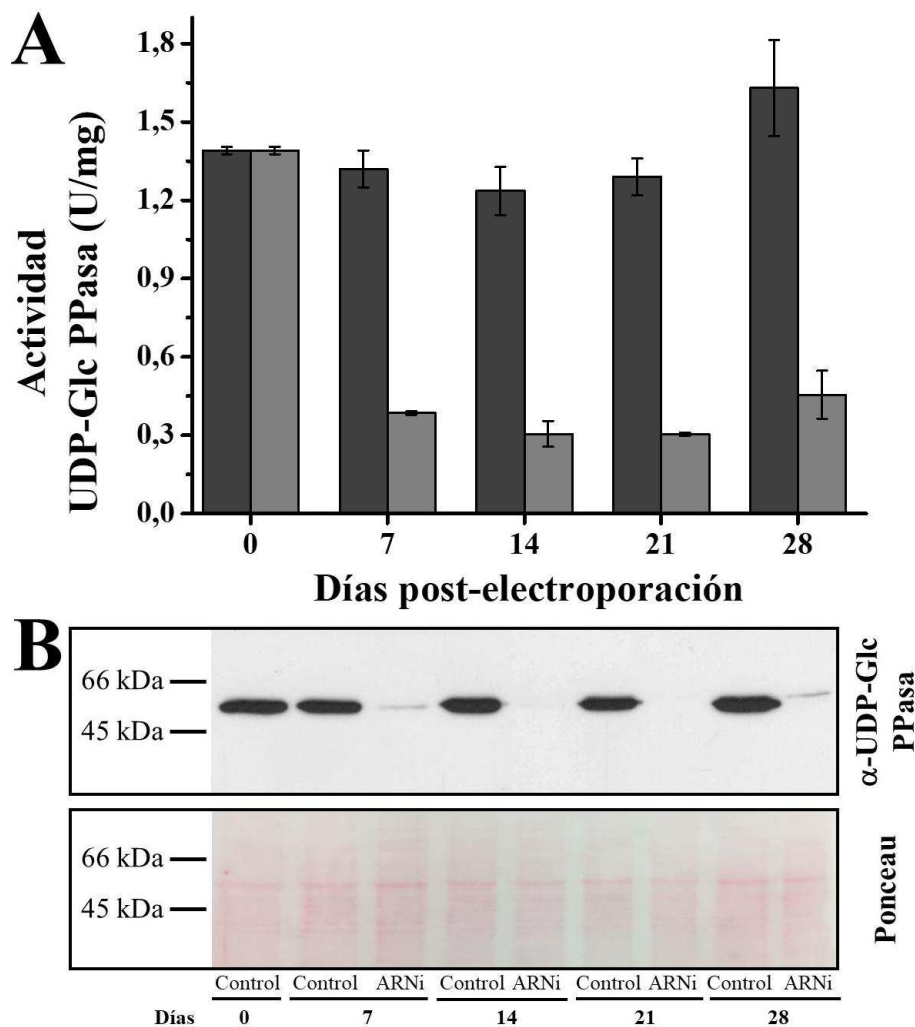


Figura 24: Ensayos de silenciamiento por ARNi de la *Egr*UDP-Glc PPasa. Se tomaron muestras de *E. gracilis* electroporadas sin ARNdc (control) y electroporadas con ARNdc, cada 7 días, durante un periodo de 0-28 días posteriores a la electroporación. Con los extractos solubles de cada muestra se realizó la medida de actividad enzimática UDP-Glc PPasa (A) y western-blot (B) con anticuerpos específicos anti-*Egr*UDP-Glc PPasa. Se muestra la tinción con Ponceau de la membrana como control de carga.

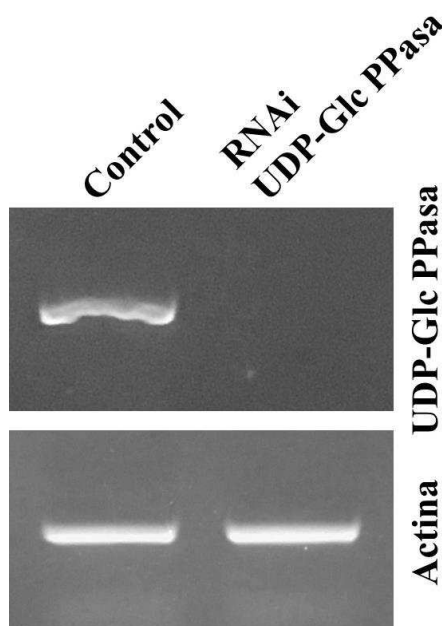


Figura 25: Gel de agarosa de RT-PCR. Se realizó extracción de ARN total de muestra control y silenciamiento de UDP-Glc PPasa a 15 días post-electroporación, se amplificó un fragmento de actina como control.

Como se mencionó en la introducción, el paramilon es el compuesto de reserva de carbono en *E. gracilis*, para cuya síntesis utiliza el dador glucosídico UDP-Glc, metabolito generado por la UDP-Glc PPasa. A modo de evaluar el impacto producido por la disminución en los niveles de la *Egr*UDP-Glc PPasa en la producción de UDP-Glc y la consecuente acumulación de paramilon, nos propusimos cuantificar este polímero intracelular en las células silenciadas en esta enzima. A partir de las muestras de *E. gracilis* tomadas para la medida de actividad enzimática mostrada previamente, se utilizó la fracción insoluble para la cuantificación del paramilon acumulado. Para esto, primero fue necesario purificar el paramilon del resto de los componentes presentes en la fracción insoluble, como proteínas y restos de membranas, acorde a lo descrito en Materiales y Métodos. Posteriormente se utilizó la técnica de fenol-sulfúrico para la cuantificación del paramilon de acuerdo a DuBois [182], sin embargo, fue necesario realizar algunas modificaciones para adaptarlo a los tamaños de muestras utilizados. En la Figura 26 se muestran los resultados obtenidos a partir de las cuantificaciones de paramilon, relativizadas a las muestras control sin silenciar. En el histograma se puede visualizar una disminución en las cantidades de paramilon acumulado en las muestras tratadas con el ARNi respecto de la muestra control, dejando en evidencia que la síntesis se ha visto afectada en el periodo que la *Egr*UDP-Glc PPasa se encontraba silenciada. Al mismo tiempo, a partir del día 28 posterior a la electroporación, se observa un leve incremento en las cantidades de paramilon, análogamente a lo informado para la actividad enzimática y los ensayos de western-blot en los extractos solubles (Figura 24). Resultados similares fueron observados

cuando se realizó silenciamiento a la UDP-Glc PPasa de *Phaeodactylum tricornutum* (Diatomea) en los que encontró una disminución en el carbono acumulado en forma de crisolaminarin (equivalente a paramilon en *E. gracilis*), demostrando la importancia de la enzima en la síntesis de UDP-Glc para su posterior direccionamiento a la acumulación del carbono [202] tal como se encontró en *E. gracilis*.

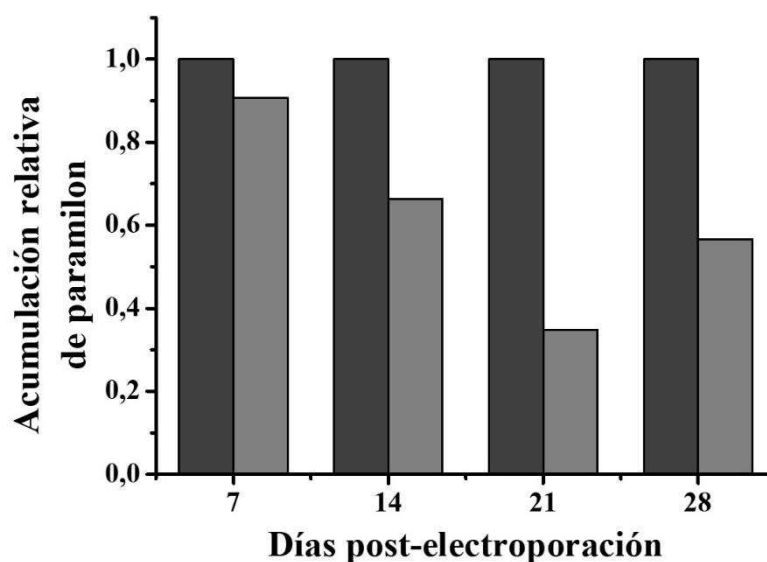


Figura 26: Acumulación relativa de paramilon en células de *E. gracilis* tratadas con ARNdc y células control. Los valores son relativos al control del correspondiente día de toma de muestra. Barras grises corresponden al paramilon acumulado en células de *E. gracilis* tratadas con ARNdc, y barras gris oscuro corresponden células control.

En conjunto, nuestros resultados permitieron comprobar *in vivo* la importancia de la UDP-Glc PPasa en la vía de síntesis de paramilon en *E. gracilis*, ya que la disminución en la actividad de esta enzima lleva aparejada una disminución en el carbono acumulado como β -1,3-glucano. A pesar de visualizar una disminución del paramilon acumulado durante el periodo de duración del ARNi, es importante remarcar el hecho de que existe una actividad UDP-Glc PPasa remanente (alrededor del 20% respecto del control). Además, hay que considerar las limitaciones de la técnica en cuanto al carácter transiente de la disminución de la expresión de la enzima. Sin embargo, al observar el western-blot (Figura 24A) la disminución de la *Egr*UDP-Glc PPasa alcanza niveles inferiores al límite de detección, lo que nos lleva a preguntarnos si la cantidad de enzima remanente (por debajo del límite de la inmunodetección) es suficiente para mantener un 20% de actividad enzimática residual.

En este sentido, y por el análisis antes expuesto, se piensa en la posibilidad, ante una faltante de la actividad enzimática de la *Egr*UDP-Glc PPasa, al estar silenciada, que la misma pueda ser reemplazada por otra enzima. En este punto, nos pusimos a analizar posibles vías

alternativas que puedan sortear la limitante en la producción de UDP-Glc o sustrato similar. Al revisar la bibliografía, Goldemberg [67] menciona que la paramilon sintasa es capaz de utilizar ADP-Glc como sustrato con un 25% de efectividad respecto al uso de UDP-Glc. Al realizar una búsqueda *in silico*, para la enzima ADP-Glc PPasa (EC 2.7.7.27), sobre los trabajos de transcriptomas publicados de *E. gracilis* no se obtuvieron resultados favorables; sin embargo O'Neill y colaboradores reportaron la presencia de ADP-Glc en niveles relativamente bajos comparado a otros NDP-azúcar [86]. En este contexto, una posibilidad a ser considerada es la síntesis de UDP-Gal, tercer NDP-azúcar en mayor concentración dentro de *E. gracilis* de acuerdo a O'Neill [86], metabolito que en conjunto con la Glc-1P y en presencia de la enzima galactosa-1P uridililtransferasa (GalT, EC 2.7.7.12) produce una interconversión dando lugar a UDP-Glc y Gal-1P, siendo esta enzima parte de la conocida vía de Leloir [103]. Mediante esta ruta se podrían estar generando las unidades de UDP-Glc necesarias para la síntesis de paramilon. Sin embargo, si se considera que la actividad remanente medida en las muestras del ensayo de ARNi antes descrito, corresponde a una enzima que puede generar UDP-Glc, con la capacidad de utilizar Glc-1P. En este punto, se hipotetiza la presencia de una UDP-azúcar pirofosforilasa, la cual estaría generando por un lado UDP-Glc, así como también unidades de UDP-Gal, que posteriormente pueden ser interconvertidas, como se mencionó previamente. En la siguiente sección se describe la información y caracterización llevada adelante sobre posibles UDP-azúcar PPasas encontradas en *E. gracilis*.

4.2.2. Caracterización *in vivo* e *in vitro* de la UDP-azúcar pirofosforilasa

Como se mencionó en la sección anterior, los NDP-azúcar cumplen funciones importantes en las células por ser sustratos de diferentes glicosiltransferasas en muchos organismos. Las mismas están involucradas en diversas vías metabólicas que comprenden desde la síntesis de polímeros de reserva de carbono (por ejemplo glucógeno en animales y levaduras, o almidón en plantas), compuestos estructurales (celulosa en plantas y bacterias), precursores para la síntesis de diversos oligo- y polisacáridos, glicoproteínas, glicolípidos y otros compuestos glicosilados [149, 203–206]. La síntesis de los distintos NDP-azúcar es llevada a cabo por diversas NDP-azúcar pirofosforilasas. Dentro de esta familia de enzimas, la ADP-Glc PPasa, encargada de la síntesis de ADP-Glc ha sido estudiada con gran profundidad tanto en procariotas como eucariotas [98, 99]. En el mismo sentido, el estudio de UDP-Glc PPasas de diversos organismos que incluyen tanto plantas, animales y bacterias como protozoos parasíticos, ha sido ampliamente abordado con el transcurrir de los años, encontrándose vasta información respecto a su expresión, regulación, características enzimáticas y estructurales [133, 186, 207–209].

Las UDP-azúcar PPasas, a diferencia de las UDP-Glc PPasas en las que el producto principal es la UDP-Glc, pueden producir un repertorio mayor de UDP-azúcares: UDP-Glc, UDP-Gal, UDP-GlcA, UDP-GalA, UDP-Ara, UDP-Xyl, entre otros [144–146]. La bibliografía disponible sobre la UDP-azúcar PPasa es más reciente y menos amplia en comparación con la UDP-Glc PPasa, habiendo sido identificadas principalmente en plantas, parásitos eucariotas y algunas especies bacterianas, aunque hasta el momento no ha sido informado su presencia en vertebrados [210]. Sin embargo, aún resta mucho por aprender/comprender sobre estas enzimas y sus funciones, así como la razón de esta posible redundancia de actividades enzimáticas presentadas por la UDP-Glc PPasa y la UDP-azúcar PPasa y las ventajas que tendría para los organismos poseer ambas enzimas. En este contexto, nos propusimos analizar la presencia de secuencias correspondientes a posibles UDP-azúcar PPasas en *E. gracilis*, cuyo estudio contribuya al conocimiento respecto a la partición del carbono en esta microalga.

4.2.2.1. Clonado y expresión recombinante de las UDP-azúcar PPasas

A partir de la discusión planteada en la sección previa, surgió la necesidad de investigar la existencia de otra vía en *E. gracilis* que pueda suplir la síntesis de UDP-Glc cuando se produce una disminución en la actividad UDP-Glc PPasa. Por este motivo, se emprendió la búsqueda de genes candidatos a codificar para UDP-azúcar PPasas en esta microalga, mediante un análisis del trabajo de transcriptoma publicado por O'Neill y colaboradores [85]. Para esto

nos basamos en la secuencia de una UDP-azúcar PPasa informada para *L. major*, la que fue encontrada en una mutante de UDP-Glc PPasa por Damerow y colaboradores [211].

Como resultado de esta búsqueda *in silico* se hallaron dos transcritos candidatos a codificar para posibles UDP-azúcar PPasas en *E. gracilis*, “*comp23283*” y “*comp119934*”, las que presentan un 60% de identidad entre ellas, a nivel de secuencia proteica, y alrededor de un 30% respecto de la enzima de *L. major* utilizada como templatado para realizar la búsqueda. En la Figura 27 muestra un apilamiento de ambas secuencias de transcritos. El primero de los transcritos (*comp23283*), de acuerdo a su secuencia nucleotídica y marco de lectura, codificaría para una proteína de 370 aa (Figura 27, resaltado en celeste), a pesar de presentar un transcripto lo suficientemente largo para codificar una proteína de ~600 aa. Sin embargo, la presencia de un codón *stop* conlleva a una proteína trunca, con una faltante hacia el extremo C-terminal. Por su parte, *comp119934*, de acuerdo a su marco de lectura, codificaría para una proteína completa de 600 aa. Aun así se optó por continuar con ambas secuencias dados los valores de identidad y de *e-value* encontrados. Para esto se diseñaron oligonucleótidos (EgrUSP283fow, EgrUSP283rev1 y EgrUSP934fow, EgrUSP934rev), que permitan la amplificación del fragmento codificante para la proteína de 370 aa en el primer caso y de 600 aa en el segundo, los que se detallan en la Tabla 3 de Materiales y Métodos.

A partir de cultivos de *E. gracilis* crecidos en condiciones autotróficas en ciclo de luz/oscuridad 16/8 h, se procedió a la toma de una muestra durante la fase de luz y se realizó la extracción de ARN total, seguido de la síntesis de ADNc por retro-transcripción, con posterior amplificación por PCR de los fragmentos de ADN deseados. Se ha logrado amplificar exitosamente la secuencia correspondiente al transcripto *comp23283*, mientras que hasta el momento de la escritura de esta tesis no ha sido posible obtener el fragmento de secuencia identificado como *comp119934*, a pesar de haberse ensayado diversas condiciones de amplificación, como así también cultivos en diferentes condiciones. Por este motivo, los resultados descriptos a continuación corresponden al transcripto denominado como *comp23283*.

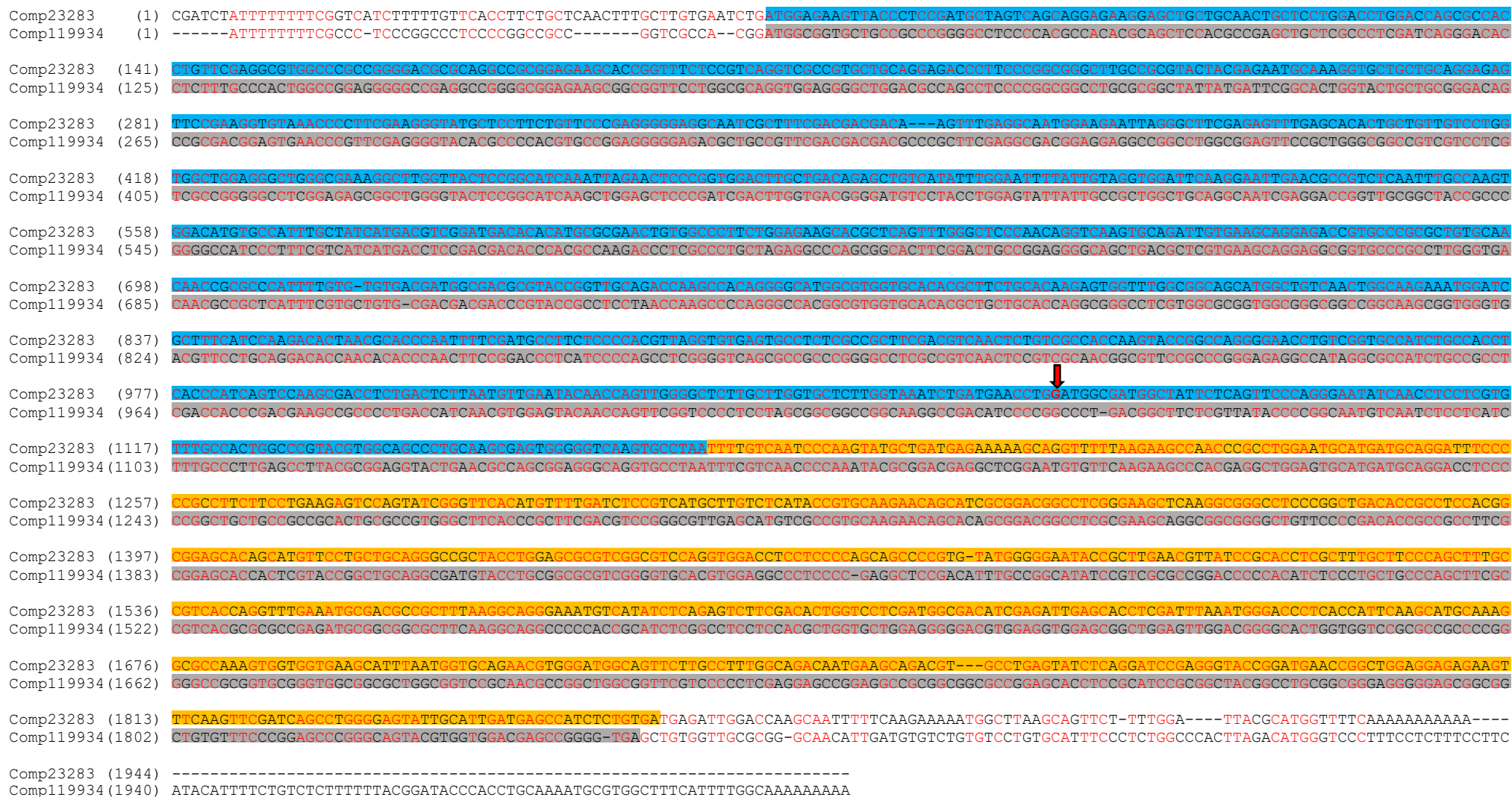


Figura 27: Alineamiento de secuencia de nucleótidos de ARNm. Secuencias codificantes para dos posible UDP-azúcar PPasas en *E. gracilis comp23283* y *comp119934*. Se encuentran resaltados los ORF. En naranja se resalta el nuevo ORF encontrado para *comp23283* a partir de la discrepancia con la secuencia obtenida del transcriptoma. La flecha roja indica el nucleótido extra que produce un cambio en el marco de lectura con la consecuente terminación prematura de la traducción.

Primeramente se obtuvo el fragmento de ADN codificante para los 370 aa que correspondían al marco de lectura informado en el transcriptoma. Sin embargo, cuando se realizó la secuenciación del mismo para asegurar su correcta identidad, se encontró una discrepancia respecto de la secuencia publicada en el trabajo de transcriptoma. Del resultado de secuenciación se observa que en el fragmento amplificado por PCR habría un nucleótido menos respecto al transcripto informado, lo que produce un cambio en el marco de lectura. Al eliminar este nucleótido (indicado con flecha roja en la Figura 27), el nuevo ORF (marco abierto de lectura, del inglés *Open Reading Frame*) codifica para una proteína de 599 aa coincidente con las UDP-azúcar PPasas publicadas, las que tienen un tamaño cercano a ~600 aa. Este nuevo fragmento de 230 aa del extremo C-terminal de la proteína, generado por el cambio en el marco de lectura, posee el mismo grado de identidad con la enzima de *L. major* que presentaba el fragmento de 370 aa del N-terminal informado inicialmente, indicando que la correcta secuencia para esta UDP-azúcar PPasa de *E. gracilis* sería la que codifica para la proteína de 599 aa (Figura 27, resaltada en naranja). En base a esto, se procedió al diseño de un nuevo oligonucleótido (EgrUSP283rev2, Tabla 3 de Materiales y Métodos), que permita la amplificación completa de la secuencia codificante para los 599 aa. Una vez amplificado el nuevo fragmento y corroborada su secuencia mediante secuenciación, se subclonó al vector de expresión pET28c, utilizando las enzimas de restricción *NdeI/SalI*, cuya secuencia de corte se fue incorporada en los oligonucleótidos utilizados para la amplificación (Tabla 3 – Materiales y Métodos). A continuación, con la construcción [pET28c/EgrUSP23283] se transformaron células de *E. coli* BL21 (DE3) para la expresión heteróloga recombinante de esta UDP-azúcar PPasa de *E. gracilis*.

Se crecieron las células de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas en medio LB y se realizó un ensayo de expresión, utilizando 0,5 mM de IPTG como inductor, una temperatura de 25°C, durante 16 h. Las células se colectaron por centrifugación, se rompieron mediante ultrasonido, se separaron las fracciones solubles e insolubles, las cuales se sembraron en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 10%). Como resultado de esto se observó una sobreexpresión de la enzima en la fracción insoluble, formando cuerpos de inclusión, como se muestra en la Figura 28. Considerando la posibilidad de una expresión baja en la fracción soluble, no detectada mediante el SDS-PAGE, evaluamos la actividad enzimática en estas mismas fracciones, las cuales no presentaron actividad UDP-azúcar PPasa, confirmando su expresión exclusivamente en la fracción insoluble.

La dificultad en la obtención de proteínas solubles en *E. coli* es un problema frecuente para genes provenientes de organismos con alto contenido G+C en su genoma, como es el caso

de *E. gracilis* [212]. 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 pET28c), 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, hemos ensayado diversas variantes en las condiciones de expresión, modificando los parámetros antes mencionado. Sin embargo, en todos los casos la proteína se obtuvo con muy buenos rendimientos pero dando lugar a la producción de cuerpos de inclusión, análogo a lo observado anteriormente Figura 28.

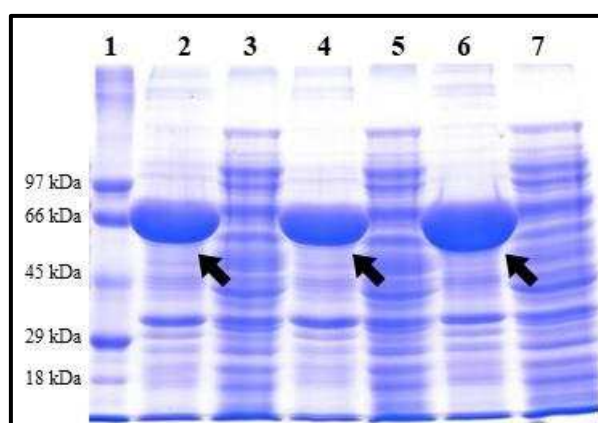


Figura 28: Perfil electroforético (SDS-PAGE 10%) del ensayo de expresión de 3 clones diferentes de la *Egr*UDP-azúcar PPasa 23283 en *E. coli* BL21 (DE3). La inducción se realizó durante 16 h, a 25°C, con una concentración de inductor de 0,5 mM. Las flechas indican la sobreexpresión de la UDP-azúcar PPasa en la fracción insoluble. **Carril 1:** Marcadores de masa molecular. **Carril 2:** Fracción insoluble clon 1. **Carril 3:** Fracción soluble clon 1. **Carril 4:** Fracción insoluble clon 2. **Carril 5:** Fracción soluble clon 2. **Carril 6:** Fracción insoluble clon 3. **Carril 7:** Fracción soluble clon 3.

Teniendo en cuenta que en este caso particular, la secuencia del gen fue obtenida de fuente a partir de un organismo con alto contenido G+C en su genoma, y no por síntesis *de novo* con codones optimizados para la expresión en *E. coli*, es posible que los codones utilizados por el mismo sean diferentes a los que emplean con mayor frecuencia las células de *E. coli* al momento de realizar la traducción. Existen diferentes cepas de *E. coli* modificadas para ser utilizadas en estos casos de marcada insolubilidad. Algunas de ellas poseen codones adicionales que favorecen la síntesis adecuada de la proteína de interés, mientras que otras fueron modificadas para ayudar al correcto plegamiento de las proteínas en síntesis. En vista de esto, y con el objetivo de optimizar la expresión para la obtención de la *Egr*UDP-azúcar PPasa soluble, se procedió a realizar ensayos de expresión en otras cepas de *E. coli* con características diferentes a las *E. coli* BL21 (DE3). Se utilizaron las cepas de *E. coli* Codon Plus RIL y Rosetta, descritas en 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[213–215]. Los resultados obtenidos exhiben que aun utilizando estas cepas diferenciales, no se logró obtener la enzima de forma soluble y activa, obteniendo nuevamente formación de cuerpos de inclusión en la fracción insoluble como se muestra en el SDS-PAGE de la Figura 29. Otra alternativa para abordar este inconveniente es la co-expresión con proteínas 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 [216, 217], inclusive se las ha utilizado para obtener enzimas solubles en nuestro grupo de trabajo [218]. De esta forma, se evaluó la solubilidad de la *Egr*UDP-azúcar PPasa cuando es co-expresada con distintas chaperonas de *E. coli*. A tal efecto se utilizó un sistema de plásmidos que portan genes codificando diferentes proteínas chaperonas (Takara Bio Inc). Se transformaron células de *E. coli* BL21 (DE3) con la construcción [pET28c/*Egr*UDP-azúcar PPasa23283] 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, temperaturas y concentraciones de inductor), utilizando IPTG para inducir la proteína de interés y L-arabinosa como inductor de las proteínas chaperonas. A pesar de las diversas condiciones de expresión analizadas, con las diferentes variantes de proteínas chaperonas, en todos los casos se obtuvo la enzima de forma insoluble. A modo representativo en la Figura 29, se presentan los perfiles electroforéticos de dos casos de co-expresión con chaperonas.

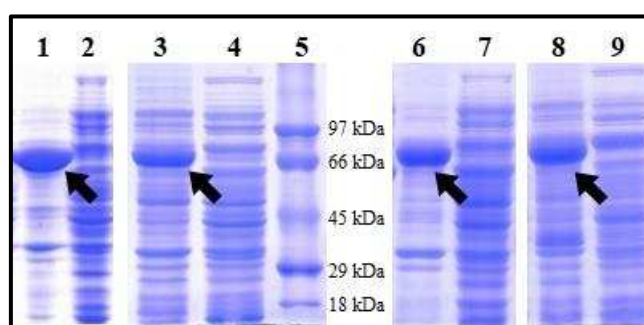


Figura 29: Perfil electroforético (SDS-PAGE 10%) de ensayos de expresión de *Egr*UDP-azúcar PPasa en diferentes cepas de *E. coli* y mediante co-expresión con chaperonas.: **Carril 1** fracción insoluble y **Carril 2** fracción soluble de *E. coli* Rossetta (DE3). **Carril 3** fracción insoluble y **Carril 4** fracción soluble de *E. coli* Codon Plus (DE3). **Carril 5:** Marcadores de masa molecular. **Carril 6** fracción insolubles y **Carril 7** fracción solubles de *E. coli* BL21 (DE3) co-expresadas con chaperonas *groES* y *groEL*. **Carril 8** fracción insolubles y **Carril 9** fracción solubles de *E. coli* BL21 (DE3) co-expresadas con chaperonas *dnaK*, *dnaJ*, *grpE*. Las flechas indican la sobreexpresión de la UDP-azúcar PPasa en las fracciones insolubles.

Alternativamente, otra forma de propiciar la expresión soluble de una proteína recombinante, es mediante la fusión a otra proteína. Para esto procedimos al clonado del gen codificante de la *Egr*UDP-azúcar PPasa23283 en el vector pMALTEV (vector pMALc modificado para adicionar un sitio de corte para la proteasa TEV – ver Materiales y Métodos), generando la construcción [pMALTEV/*Egr*UDP-azúcar PPasa] con la que se transformaron células de *E. coli* BL21 (DE3). Esto permite fusionar nuestra proteína de interés a la MBP (proteína de unión a maltosa, del inglés *Maltose Binding Protein*) de 43 kDa, que se ha utilizado eficientemente para la producción de proteínas en forma soluble en nuestro grupo [219]. Crecimos las células transformadas en medio LB y realizamos la inducción con 0,2 mM de IPTG a 18°C durante 16 h. Posteriormente realizamos la disrupción celular mediante sonicado, separamos las fracciones solubles e insolubles, las que analizamos mediante SDS-PAGE. Como se observa en la Figura 30, con este sistema hemos logrado obtener la UDP-azúcar PPasa de *E. gracilis* de forma soluble fusionada a MBP.

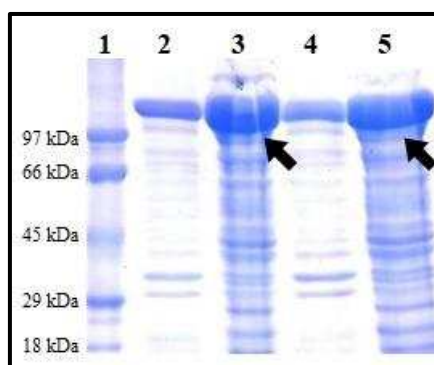


Figura 30: Ensayo de expresión de dos clones en *E. coli* BL21 (DE3) de UDP-azúcar PPasa fusionada a MBP. **Carril 1:** Marcador de masa molecular. **Carril 2:** Fracción insoluble clon 1. **Carril 3:** Fracción soluble clon 1. **Carril 4:** Fracción insoluble clon 2. **Carril 5:** Fracción soluble clon 2. Las flechas indican la sobreexpresión de la UDP-azúcar PPasa fusionada a MBP en las fracciones solubles.

Habiéndose encontrado una condición que permite la obtención de la UDP-azúcar PPasa de *E. gracilis* de forma soluble, se procedió al escalado del cultivo utilizando las condiciones de inducción antes mencionadas, para la posterior purificación y caracterización de la enzima. La purificación se realizó utilizando una columna de amilosa, a la cual se une la MBP a la que está fusionada la proteína de interés y luego de un exhaustivo lavado se produce la elusión mediante la adición de maltosa 10 mM. A continuación, sobre la purificación resultante, se realizó la escisión de la proteína de fusión mediante digestión con TEV proteasa seguido de una cromatografía de exclusión molecular (Materiales y Métodos), obteniéndose así la *Egr*UDP-azúcar PPasa purificada, en ausencia de la fusión de MBP. En las eluciones obtenidas de cada uno de los pasos de purificación se realizó la medida de actividad UDP-azúcar PPasa,

utilizando UTP y Gal-1P como sustratos, así como también se ensayaron UTP y Glc-1P como sustratos alternativos. Sin embargo, no fue posible detectar actividad enzimática en ninguna de todas las etapas de la purificación realizadas, inclusive luego de la digestión con TEV proteasa, ya que en primer lugar consideramos que la falta de actividad podría deberse a la proteína de fusión que imposibilitaba el correcto funcionamiento de esta UDP-azúcar PPasa. Igualmente, hemos ensayado tanto la purificación en diferentes especies *buffer* como el agregado de agentes reductores como DTT, diferentes condiciones (especies *buffer*, pH, presencia o ausencia de reductor) en la reacción de medida de actividad. En todos los casos evaluados, la enzima no presentó actividad detectable, lo cual nos impidió llevar a cabo la caracterización cinética *in vitro* de esta UDP-azúcar PPasa de *E. gracilis*, en la cual se sigue trabajando en la optimización de la expresión soluble y activa de esta enzima.

4.2.2.2. Silenciamiento por ARN de interferencia

Para sobrellevar el impedimento de realizar la caracterización *in vitro* de esta enzima y con el objetivo de profundizar el entendimiento de las funciones llevadas a cabo por esta posible *EgrUDP-Azúcar PPasa*, estudiamos su funcionamiento *in vivo*. De esta forma evaluamos si la actividad de esta enzima en *E. gracilis*, podría estar reemplazando en parte la función de la UDP-Glc PPasa cuando la misma se encuentra silenciada, como se hipotetizó anteriormente (Sección 4.2.1.7). Para esto llevamos a cabo ensayos de ARNi en el que silenciamos el ARNm codificante para la *EgrUDP-azúcar PPasa23283*, con el fin de analizar si existe tal efecto de compensación de la actividad planteada.

Utilizando el fragmento amplificado (ORF completo) de fuente y secuenciado de *comp23283*, se procedió de igual modo a lo descrito en la sección anterior, diseñando oligonucleótidos que permitan amplificar dos fragmento de ~400 pb de esta secuencia, en cuyos extremos 5' se adicionó la secuencia promotora para la T7 ARN polimerasa, la que permitirá la síntesis *in vitro* del ARNdc. Cabe recordar que el uso de dos fragmentos complementarios a la secuencia a silenciar, aumenta la eficiencia de la técnica. A su vez, dado que no se pudo obtener la secuencia codificante del transcripto *comp119934* mediante PCR, a partir del alineamiento entre *comp23283* y *comp119934*, se seleccionó la región con mayor identidad entre ellas, a nivel de secuencia nucleotídica (Figura 27), de la cual se seleccionaron las 400 pb a ser amplificadas para el ARNi. De esta forma, podríamos incrementar las chances de silenciar las dos posibles UDP-azúcar PPasas presentes en *E. gracilis*. Los oligonucleótidos diseñados son *EgrUSPARNifow1/rev1* y *EgrUSPARNifow2/rev2*, cuya secuencia se detalla en la Tabla 6 de Materiales y Métodos.

Con el ARN_{dc} se electroporaron las células de *E. gracilis* crecidas en condiciones autotróficas, realizando el control correspondiente, en el que se procedió de igual modo pero en ausencia de ARN_{dc}, acorde a lo descrito en Materiales y Métodos. Del cultivo se tomó una muestra inicial, previa a la electroporación, y luego se realizó una toma de muestra cada 7 días durante un periodo de 28 días posteriores a la electroporación. Se realizó la ruptura celular mediante sonicado de todas las muestras, con posterior separación de las fracciones soluble e insoluble por centrifugación. Sobre la fracción soluble se determinó actividad enzimática UDP-azúcar PPasa utilizando como sustratos UTP + Gal-1P y, alternativamente, se ensayó la actividad utilizando UTP + Glc-1P. Como se mencionó anteriormente se sabe que las UDP-azúcar PPasa presentan una promiscuidad por los diferentes azúcar-1P tal como fuera evidenciado previamente en la caracterización de otras UDP-azúcar PPasas de diferentes organismos [145, 211]. Por este motivo, sumado a la carencia de datos cinéticos de esta enzima debido a que no se ha podido llevar a cabo la caracterización cinética de la proteína recombinante, es que realizamos las medidas de actividad de las células silenciadas tanto en presencia de Gal-1P como Glc-1P.

En la Figura 31 se aprecian las diferencias en los niveles de actividad de la muestra silenciada cuando se utilizó como sustrato Gal-1P, en comparación con el control (Figura 31A), alcanzando una actividad entre 40-50%, respecto del control. Esta disminución en la actividad UDP-azúcar PPasa en las muestras silenciadas, indica que el ensayo fue exitoso, logrando disminuir los niveles de esta enzima en *E. gracilis*. Por su parte, al realizar la medida de actividad con Glc-1P como sustrato, no hubo diferencia entre las muestras silenciadas y el control (Figura 31B). En parte, estos resultados sugieren que una disminución de la UDP-azúcar PPasa intracelular no provocaría una deficiencia en la capacidad de la célula para sintetizar UDP-Glc mientras que sí existiría una menor síntesis de UDP-Gal.

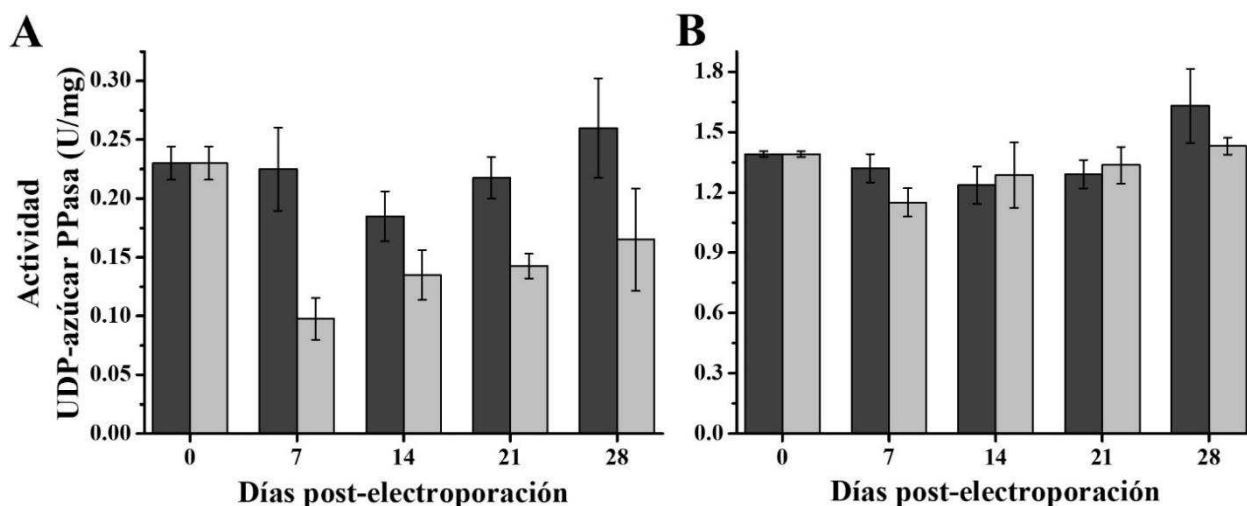


Figura 31: Ensayos de silenciamiento por ARNi de la *Egr*UDP-azúcar PPasa. Se tomaron muestras de *E. gracilis* electroporadas sin ARNdc (control, barras gris oscuro) y electroporadas con ARNdc contra UDP-azúcar PPasa (barras gris claro), cada 7 días, durante un periodo de 0-28 días posteriores a la electroporación. Con los extractos solubles de cada muestra se realizó la medida de actividad enzimática utilizando UTP + Gal-1P como sustratos (A) y utilizando UTP + Glc-1P como sustratos (B).

Nuevamente, cabe recordar que esta técnica de ARNi genera un silenciamiento transiente del blanco molecular en estudio. Al mismo tiempo debe tenerse en cuenta que podría estar presente la enzima codificada por el transcripto *comp119934*, ya que no podemos asegurar que por haber utilizado la región de mayor identidad entre *comp23283* y *comp119934* para la construcción del ARNdc, estemos afectando a ambos ARNm. Al momento de la escritura de esta tesis, aún no contamos con los anticuerpos policlonales específicos contra una de las UDP-azúcar PPasa (identificada como *comp23283*) de *E. gracilis*, la cual hemos logrado obtener en forma recombinante con alto grado de pureza, aunque no ha sido posible detectarle actividad en las diversas formas ensayadas. Por este motivo, no hemos podido evidenciar una disminución en los niveles de esta UDP-azúcar PPasa mediante western-blot, que se correlacionen con la baja en la actividad enzimática de los extractos de *E. gracilis* silenciado. Sin embargo, se pudo confirmar por PCR la desaparición del ARNm a partir de la extracción de ARN total, seguido de RT-PCR, de las células silenciadas, como se muestra en la Figura 32.

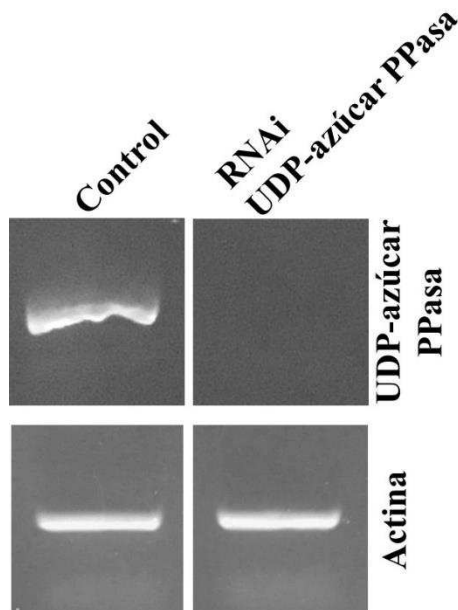


Figura 32: Gel de agarosa de RT-PCR. Se realizó extracción de ARN total de muestra control y silenciamiento de UDP-azúcar PPasa a 15 días post-electroporación, se amplificó un fragmento de actina como control.

Siguiendo el mismo análisis que para el caso del ARNi realizado para la UDP-Glc PPasa (Sección 4.2.1.7), a partir de la fracción insoluble de las células silenciadas para esta UDP-azúcar PPasa²³²⁸³, analizamos la cantidad de paramilon acumulado. Los resultados se muestran en la Figura 33 donde se observa que existe una ligera diferencia en los niveles de paramilon de las células silenciadas respecto al control, la cual se incrementa a medida de transcurre el periodo de interferencia del ARN. Este resultado es llamativo si lo analizamos en comparación con las medidas de actividad de las células silenciadas mostradas anteriormente, ya que solo se observaron cambios en la actividad enzimática cuando se utilizó Gal-1P como sustrato, mientras que en presencia de Glc-1P, que da lugar a la formación de UDP-Glc (sustrato para la síntesis de paramilon), no hubo diferencias significativas (Figura 31). Debe considerarse que la disminución en la cantidad de paramilon acumulada en estas células silenciadas para UDP-azúcar PPasa es menor que la exhibida previamente cuando se realizó la interferencia para la UDP-Glc PPasa.

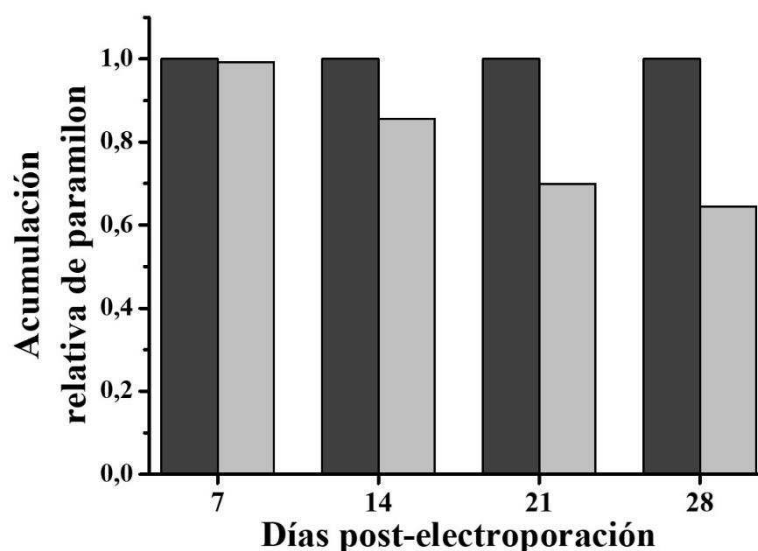


Figura 33: Acumulación relativa de paramilon en células de *E. gracilis* tratadas con ARNdc y células control. Los valores son relativos al control del correspondiente día de toma de muestra. Barras gris claro corresponden al paramilon acumulado en células de *E. gracilis* tratadas con ARNdc, y barras gris oscuro corresponden células control.

En conjunto, estos resultados en cuanto a la acumulación del paramilon en las células silenciadas para la UDP-azúcar PPasa, en relación a los niveles de actividad ensayados en estas mismas muestra, nos llevan a plantear nuevos interrogantes: ¿la UDP-azúcar PPasa estaría proporcionando unidades de UDP-Glc para la síntesis de paramilon? y/o, ¿la UDP-Glc PPasa se encargaría de suplir la producción de UDP-Gal y otros UDP-azúcares, ante la faltante o deficiencia en la UDP-azúcar PPasa, y por este motivo se presenta una disminución en el paramilon acumulado? Estos procesos podrían ocurrir por el empleo de un sustrato diferente al preferencial (Glc-1P para la UDP-Glc PPasa y Gal-1P en la UDP-azúcar PPasa). De hecho, la caracterización cinética de la UDP-Glc PPasa de *E. gracilis* presentada en este trabajo de tesis, mostró que esta enzima exhibió actividad en presencia de Gal-1P, siendo la misma 10 veces menor a la ensayada con Glc-1P, aunque con afinidades por ambos sustratos en el mismo orden de magnitud (Tabla 8). Como se mencionó anteriormente, no fue posible aun obtener la UDP-azúcar PPasa en forma recombinante y activa para completar un análisis cinético de la enzima, por lo que no podemos conocer qué tipo de azúcares-1P utiliza. Asimismo, se podría hipotetizar una interconversión entre UDP-Glc y UDP-Gal, por la acción de la galactosa-1P uridililtransferasa (GalT, EC 2.7.7.12), de acuerdo a la reacción: $UDP-Glc + Gal-1P \rightarrow Glc-1P + UDP-Gal$. Sin embargo, a través de un análisis del transcriptoma de *E. gracilis*, solo se ha podido identificar la presencia fragmentos incompletos que podrían codificar para un homólogo de GalT.

Para encontrar las respuestas a estos interrogantes se deberían plantear nuevos objetivos y ensayos que puedan generar información que resulte en una mejor comprensión respecto de los mecanismos de regulación y partición del carbono en *E. gracilis*. En parte, para intentar acercarnos a las respuestas de estos nuevos interrogantes, nos propusimos llevar a cabo un ensayo de doble interferencia de ARN, para silenciar en forma simultánea la UDP-Glc PPasa y la UDP-azúcar PPasa y analizar los efectos producidos en esta microalga.

4.2.2.3. Doble silenciamiento por ARN de interferencia

En la búsqueda de profundizar en la comprensión respecto de la partición del carbono en las células de *E. gracilis* y cómo se encuentran involucradas y/o relacionadas la UDP-Glc PPasa y la UDP-azúcar PPasa en estudio, realizamos un ensayo de ARNi doble en el que buscamos disminuir las cantidades de UDP-Glc PPasa y UDP-azúcar PPasa presente en las células de forma simultánea.

Para este experimento se colocaron 10 µg de ARNdc correspondientes a cada uno de los ARNm blanco y se procedió a la electroporación de igual modo que lo realizado para los ARNi individuales, descritos anteriormente. Continuando el mismo perfil de análisis mostrado hasta el momento, evaluamos la actividad enzimática en los extractos solubles de las células de *E. gracilis*, utilizando Glc-1P o Gal-1P en presencia de UTP como sustratos. En la Figura 34 se muestran comparativamente los resultados obtenidos para los silenciamientos individuales y doble generados en las células de *E. gracilis*. A partir de estos ensayos se observa que en líneas generales, la actividad en las células que presentan el silenciamiento simultáneo de ambas enzimas, los valores de actividad son similares o inferiores respecto a los silenciamientos individuales. Acorde a lo expuesto anteriormente, cuando se analiza la actividad enzimática utilizando Glc-1P como sustrato, sería esperable que el efecto de disminución de la actividad, sea más marcado sobre las células que poseen silenciada la expresión de UDP-Glc PPasa, mientras que en presencia de Gal-1P esta diferencia sería más pronunciada en las que poseen silenciada la expresión UDP-azúcar PPasa, diferenciándose así por la afinidad presentada por cada enzima a los diferentes azúcares-1P.

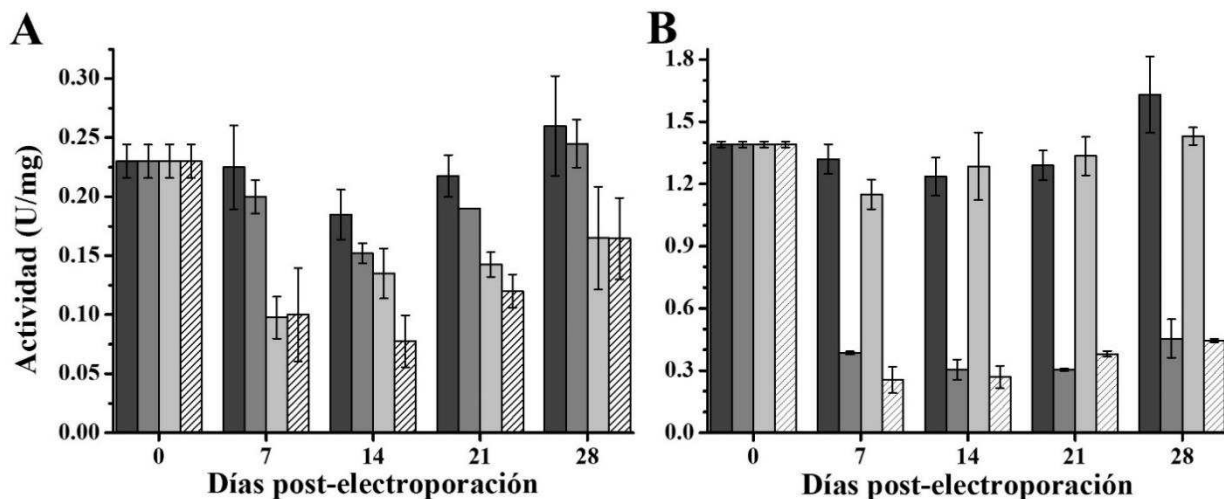


Figura 34: Ensayos de silenciamiento por ARNi simple y doble de la *Egr*UDP-Glc PPasa y la *Egr*UDP-azúcar PPasa. Se tomaron muestras de *E. gracilis* electroporadas sin ARNdc (control, barras gris oscuro), electroporadas con ARNdc contra UDP-Glc PPasa (barras gris), electroporadas con ARNdc contra UDP-azúcar PPasa (barras gris claro) y electroporadas con doble ARNdc contra UDP-Glc PPasa y UDP-azúcar PPasa (barras blancas con rayas), cada 7 días, durante un periodo de 0-28 días posteriores a la electroporación. Con los extractos solubles de cada muestra se realizó la medida de actividad enzimática utilizando UTP + Gal-1P como sustratos (A) y utilizando UTP + Glc-1P como sustratos (B).

En la Figura 34A, se observa que al utilizar Gal-1P en la medida de actividad enzimática, las fracciones solubles de los extractos de *E. gracilis* tratados con ARNi contra la UDP-Glc PPasa, no presentan diferencia, o es mínima respecto a los controles. Mientras que, en las muestras que presentan silenciada la UDP-azúcar PPasa hay una diferencia significativa, disminuyendo la actividad enzimática entre un 40-60% respecto del control (Figura 34A). Por su parte, cuando el silenciamiento se realizó en forma simultánea para la UDP-Glc PPasa y la UDP-azúcar PPasa, el efecto hallado en la actividad en presencia de Gal-1P fue similar al obtenido en las células tratadas con el ARNi contra la UDP-azúcar PPasa (Figura 34A). Por el contrario, en el histograma de la Figura 34B, se muestra que cuando a estas mismas muestras se les ensayó actividad enzimática utilizando Glc-1P como sustrato, se observa una marcada disminución en la actividad de las células que poseen la UDP-Glc PPasa silenciada, llegando a valores en torno al 25% respecto de la actividad en las muestras control. Como se mostró previamente, las muestras tratadas con ARNi contra UDP-azúcar PPasa, medidas en presencia de Glc-1P, no presentan variaciones respecto del control, mientras que al analizar el doble silenciamiento, los valores de actividad obtenidos son similares al de las muestras tratadas con ARNi contra UDP-Glc PPasa (Figura 34B).

Resumiendo, de la comparación entre las medidas de actividad realizadas a las muestras tratadas con ARNi, en forma individual o simultánea, para estas dos enzimas involucradas en

la partición del carbono (a nivel de las hexosas-1P) en *E. gracilis*, observamos un comportamiento similar entre la doble silenciada y la que posee el ARNi simple contra UDP-Glc PPasa, cuando se utiliza Glc-1P como sustrato. Por el contrario, si la medida se realiza en presencia de Gal-1P, la que presenta el silenciamiento simultáneo de ambas enzimas, se comporta de manera semejante a las células que presentan el ARNi para la UDP-azúcar PPasa. Como conclusión, a partir de la Figura 34 se puede decir que *in vivo*, la Glc-1P sería utilizada principalmente por la UDP-Glc PPasa, direccionándola hacia la síntesis de UDP-Glc, dador glucosídico necesario para la síntesis del paramilon, compuesto de reserva de carbono en *E. gracilis*. Contrariamente, la Gal-1P presente en la célula sería preferencialmente utilizada por la UDP-azúcar PPasa y en menor medida por la UDP-Glc PPasa, siendo esto coincidente con nuestros resultados de caracterización cinética *in vitro*. Sin embargo, ¿qué sucede cuando esta situación de deficiencia en estas enzimas ocurre en un sistema complejo, como el interior de la célula de *E. gracilis*? Es importante plantearnos este interrogante, principalmente considerando que los productos de cualquiera de estas dos enzimas en estudio, pueden ser utilizados por diversas vías metabólicas, generando así un amplio número de destinos finales para estos UDP-azúcares.

Una forma de analizar si el principal destino del *pool* de azúcares-1P se mantiene inalterado ante la deficiencia de una o ambas enzimas en estudio, es analizar la acumulación de paramilon. Como se describió previamente, se determinó la acumulación de paramilon en las muestras tratadas con ARNi simples para la UDP-Glc PPasa y la UDP-azúcar PPasa, y además cuando se realizó el silenciamiento de ambas enzimas en forma simultánea. En la Figura 35, se muestran comparativamente la acumulación relativa de paramilon, respecto al control, presentada por las distintas muestras silenciadas.

Del análisis de la Figura 35 se encuentra que, entre las células silenciadas individualmente para cada una de estas enzimas, el mayor detrimento en la acumulación de paramilon se da con las muestras provenientes del silenciamiento de la expresión de UDP-Glc PPasa, llegando a acumular a los 21 días post-electroporación, menos del 40% del paramilon medido en las células control. Esto refuerza la hipótesis previa respecto a que esta enzima sería la principal encargada de proveer las unidades de UDP-Glc para la síntesis del polímero de reserva en *E. gracilis*. Por su parte, la disminución en la síntesis de paramilon en las células que tienen silenciada la UDP-azúcar PPasa es menor, presentando una a los 21-28 días post-electroporación, una acumulación de alrededor del 60-70% del paramilon medido en células control (Figura 35). Las células de *E. gracilis* que presentan el silenciamiento simultáneo de ambas enzimas, acumularon entre un 40% y un 50% menos de paramilon respecto del control

(Figura 35), siendo en algunos casos esta acumulación incluso menor a la presentada por las células con ARNi contra la UDP-Glc PPasa.

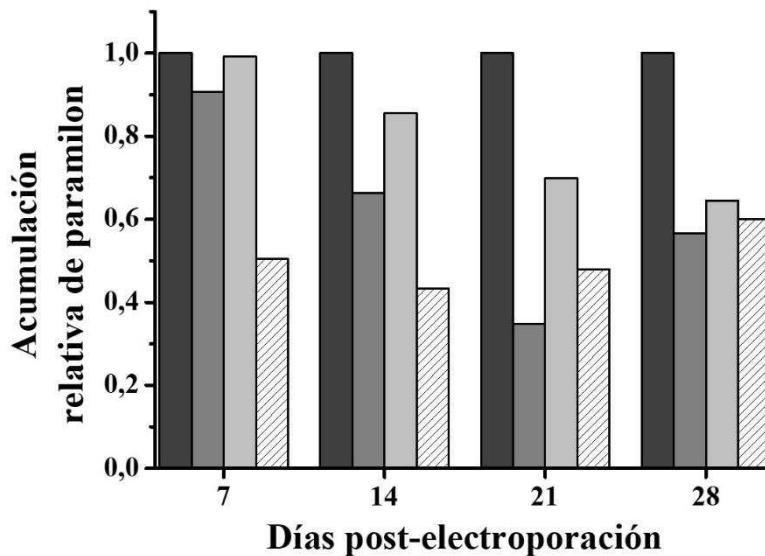


Figura 35: Acumulación relativa de paramilon en células de *E. gracilis* control (gris oscuro); tratadas con ARNi contra UDP-Glc PPasa (gris); tratadas con ARNi contra UDP-azúcar PPasa (gris calro) y ARNi doble (blanco con rayas). Los valores son relativos al control del correspondiente día de toma de muestra.

Observando en conjunto estos resultados se podría hacer el siguiente análisis: ante una disminución en los niveles de UDP-Glc PPasa, se ve directamente afectada la síntesis del compuesto de reserva (paramilon) en *E. gracilis*, indicando que esta enzima sería la principal encargada de la generación del dador glucosídico UDP-Glc, necesario para su síntesis. Por el otro lado, al silenciarse solamente la UDP-azúcar PPasa, cuyo principal producto es la UDP-Gal, la disminución en la acumulación de paramilon es menor (comparada a las que poseen ARNi para la UDP-Glc PPasa). Podría sugerirse en este caso que el producto de la reacción catalizada por la UDP-Glc PPasa, estaría siendo desviado hacia otras vías anteriormente alimentadas por la UDP-azúcar PPasa. Cabe recordar que, acorde a nuestros ensayos de caracterización *in vitro*, la *Egr*UDP-Glc PPasa es capaz de utilizar Gal-1P, además de Glc-1P, por lo que ante una falta de la UDP-azúcar PPasa, podría estar direccionando una fracción del carbono disponible en la célula hacia otros destinos diferentes a la síntesis de paramilon. Esto resulta en que, en el interior celular, estaría ocurriendo una desviación del destino “normal” del UDP-azúcar producido por cada una de estas enzimas, hacia una compensación en el faltante UDP-azúcar respectivo, repercutiendo así en la cantidad final de paramilon acumulado. Finalmente, cuando se genera un silenciamiento simultáneo de estas enzimas, las células acumularon menos paramilon que las silenciadas de forma independiente. Esto tendría sentido dado que en este caso estarían afectadas, tanto la principal enzima

involucrada en la producción de las unidades de UDP-Glc para la síntesis del polímero, así como también la posible vía alternativa de generación de diversos UDP-azúcar, que podría suplir la faltante del dador glucosídico.

En conjunto, con los resultados presentados hasta aquí, se pudo corroborar *in vivo* la importancia de la UDP-Glc PPasa para la vía de síntesis de paramilon, donde una disminución en la actividad de esta enzima lleva aparejado un detrimento en el carbono acumulado. Además, se ha evidenciado una posible interconexión entre ambas pirofosforilasas estudiadas en este trabajo de tesis. Postulándose que ante la disminución en la actividad de una de ellas, la otra podría estar compensando esta carencia mediante la síntesis de productos alternativos. Esto se correlaciona con los resultados obtenidos *in vitro*, en los que determinamos que la *Egr*UDP-Glc PPasa utiliza Gal-1P como sustrato, alternativamente a la Glc-1P. La afinidad por el primero es ligeramente menor, sin embargo *in vivo*, ante el silenciamiento de la UDP-azúcar PPasa se estaría produciendo una acumulación de su sustrato, Gal-1P, el cual podría ser convertido en UDP-Gal por la UDP-Glc PPasa. En contraparte, un escenario similar se podría sugerir frente a una deficiencia en la actividad UDP-Glc PPasa. Asimismo, se sugiere que, acorde a lo postulado anteriormente, se produzca una interconversión de estos UDP-azúcares, por acción de la enzima GalT. De esta forma, se canalizaría el producto de la enzima no silenciada, hacia la generación del UDP-azúcar que se encuentre en defecto, y así suplir en parte la faltante de la enzima cuya actividad esté disminuida.

4.3. Síntesis de compuestos de reserva de carbono en *E. gracilis*

4.3.1. UDP-glucosa β -1,3-glucano glicosil transferasa

Es bien conocido que la síntesis de β -glucanos ocurre en un gran número de protozoos, siendo las enzimas encargadas de su síntesis sólo estudiada en un limitado número de especies. Los primeros trabajos fueron llevados a cabo, casualmente, en *E. gracilis* [65, 67]. Como se mencionó en la sección Introducción, *E. gracilis* produce un polímero lineal β -1,3-glucano compuesto de unidades de Glc denominado *paramylon* o paramilon como principal compuesto de reserva de carbono intracelular en condiciones aeróbicas [155], siendo este polímero identificado inicialmente por Gottlieb en el año 1850 [59]. Se ha demostrado que el poliglucano es en primer lugar sintetizado como microfibrillas de un tamaño lateral de 3-4 nm, que se acumulan en gránulos inmaduros de baja cristalinidad [29, 68]. Durante la maduración de estos gránulos se cree, las microfibrillas de paramilon se alinean para formar matrices discretas altamente ordenadas que se caracterizan por una elevada cristalinidad [62, 68, 156], dando así lugar a los gránulos maduros que se encuentran rodeados por una membrana que posee una organización similar a la membrana plasmática [63]. Los gránulos de paramilon se encuentran en todos los Euglenophyceae, pero su tamaño, forma y número varían ampliamente dependiendo de la especie, por lo que ha sido utilizado como criterio para la clasificación junto a la morfología y estructura de los cloroplastos, de los Euglenophyceae [220].

Las imágenes de microscopía electrónica sugieren que hay dos organelas diferentes involucradas en la síntesis de paramilon y su contribución depende de las condiciones nutricionales. En condiciones autotróficas, los gránulos de paramilon se ubican en el citoplasma, adyacentes al pirenoide de los cloroplastos encerrados por membrana [221]. Contrariamente, bajo condiciones de cultivo heterotróficas, las mitocondrias presentan grandes vesículas, a cuya membrana estarían asociados los gránulos de paramilon, que serían posteriormente liberados al citoplasma [222].

Todas las β -glucano sintasas conocidas son enzimas de transmembrana, por lo que normalmente para ensayar su actividad enzimática se utilizan fracciones particuladas o se extrae estas enzimas con detergentes [60, 65, 67]. Los primeros trabajos publicados sobre la paramilon sintasa demostraron la posibilidad de sintetizar *in vitro* β -1,3-glucano a partir de extractos de *E. gracilis* libres de células [65, 67]. Sin embargo, debieron pasar algunos años hasta confirmar que la paramilon sintasa se encuentra unida a la membrana que rodea al gránulo del β -glucano [60]. Estudios enzimáticos posteriores, realizados sobre la enzima purificada de fuente,

revelaron que la paramilon sintasa es una UDP glucosa- β -1,3-glucano β -3-glucosiltransferasa (EC 2.4.1.34), que utiliza específicamente UDP-Glc como sustrato [65, 67].

Durante el desarrollo de esta tesis, se publicaron dos trabajos de transcriptomas de *E. gracilis* [85, 87], a partir de los cuales se pudieron identificar transcriptos candidatos a codificar paramilon sintasas (*EgrPS*). Particularmente Yoshida y colaboradores [87] mencionan dos transcriptos que, de acuerdo a sus resultados y basados en la similitud hacia otras β -1,3-glucano sintasas, serían los ARNm que codifican para dos paramilon sintasas putativas. Posteriormente, se ha publicado un nuevo trabajo en el que, mediante ensayos de silenciamiento, se confirma que los transcriptos previamente identificados corresponderían fehacientemente a dos paramilon sintasas [157]. Las mismas se clasifican dentro de la familia de glicosiltransferasas GT48, de acuerdo a la clasificación mostrada en www.cazy.org, las cuales presentan como característica la inversión de la conformación anomérica del carbono-1, pasando de α (UDP-Glc) hacia β en el producto final (polímero β -1,3-glucano). Además, a partir de trabajos *in silico*, se pudo predecir que las enzimas de *E. gracilis* presentan tamaños similares a otras β -1,3-glucano sintasas, siendo *EgrPS1* y *EgrPS2* de 304 kDa y 258 kDa, respectivamente, conteniendo cada una de ellas alrededor de 16 dominios de transmembrana (Figura 36). En la Figura 36 se visualizan además, los dominios solubles de las *EgrPS* a cada lado de la membrana (citoplasmático y no citoplasmático) de acuerdo a la predicción realizada por Tanaka y colaboradores [157]. La orientación del dominio soluble principal difiere entre la *EgrPS1* (804 aa) y *EgrPS2* (602 aa), lo que sugiere una posible función diferencial para cada una de ellas. En esta publicación los autores confirmaron, mediante silenciamiento por ARNi, que la enzima encargada de la síntesis del paramilon sería la *EgrPS2* dado que disminuyó la acumulación de paramilon, así como también la actividad enzimática al producir el silenciamiento. Contrariamente, el silenciamiento de la *EgrPS1* no produjo cambios significativos en ninguno de los parámetros antes mencionados [157].

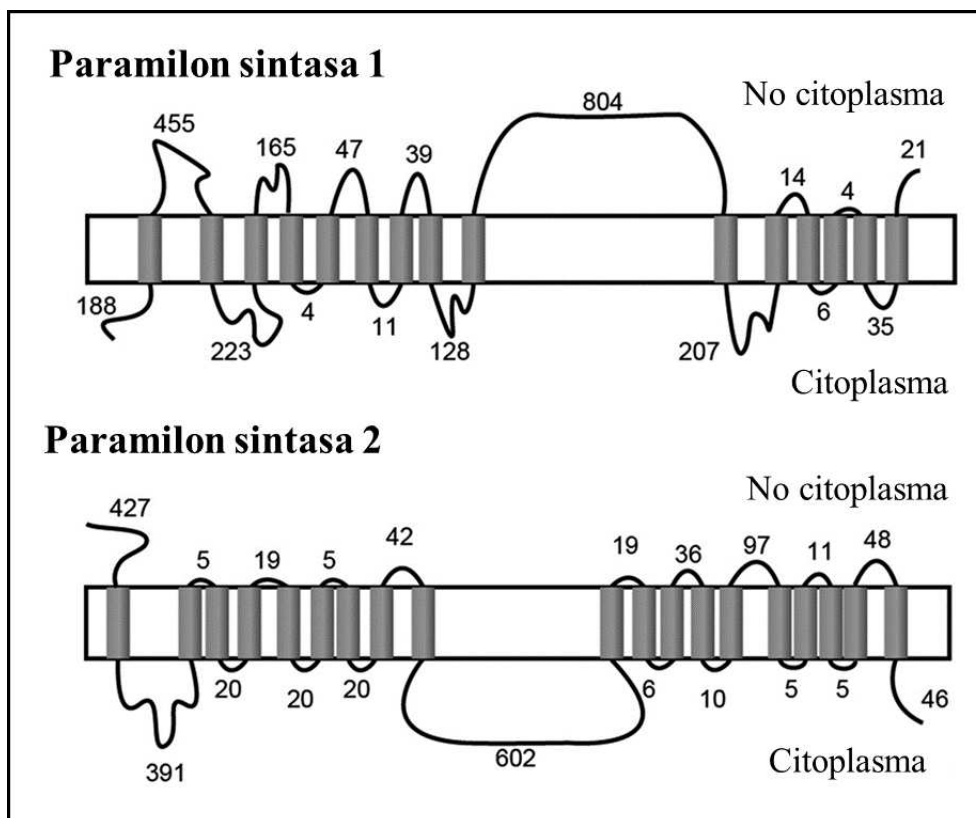


Figura 36: Esquema representativo de la disposición de los dominios de transmembrana de la *EgrPS1* y *EgrPS2*. Adaptado de Tanaka y colaboradores, 2017 [157].

Ante los antecedentes aquí presentados a partir de la bibliografía consultada, y frente a la identificación de la proteína que estaría involucrada en la síntesis de paramilon, en este trabajo de Tesis se optó por hacer el diseño y obtención de una herramienta para utilizarse en futuros ensayos de localización subcelular y/o microscopía confocal.

Considerando que *EgrPS2* sería la responsable de la síntesis del polímero y, teniendo en cuenta que la misma es una proteína de membrana, para el desarrollo de esta herramienta, se propuso utilizar el dominio soluble principal de la *EgrPS2* (fragmento de 600 aa) para producirlo de forma recombinante en *E. coli*. De esta manera, el fragmento proteico obtenido sería utilizado como antígeno en la producción de anticuerpos policlonales a ser empleados como marcador subcelular.

Mediante la información disponible en la bibliografía y junto a un análisis *in silico*, se identificaron los 600 aa correspondiente al dominio soluble de *EgrPS2*, al que denominamos *EgrPS2*₆₀₀. Seguidamente se procedió al diseño del fragmento génico para su síntesis *de novo* con codones optimizados para la expresión en *E. coli* y sitios de restricción (*NdeI/HindIII*), que fueron posteriormente utilizados para el subclonado del gen en el vector de expresión pET28c. Acorde a lo descrito anteriormente, este plásmido permite la obtención de altos niveles de expresión de la proteína deseada de forma recombinante, fusionada a una etiqueta de histidinas

en el extremo N-terminal, lo cual facilita su purificación mediante cromatografía de pseudoafinidad por metal inmovilizado (IMAC).

Con la construcción [pET28c/*EgrPS2*₆₀₀], se procedió a la transformación de células competentes de *E. coli* BL21 (DE3) que permiten la expresión recombinante de la enzima. Las células transformantes 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. Como se muestra en la Figura 37, en un primer ensayo la proteína se obtuvo en la fracción insoluble. A pesar de evaluar diversas condiciones en las que se variaron tiempo, temperatura y concentraciones del inductor IPTG, así como también diferentes cepas de *E. coli*, no fue posible obtener la proteína de forma soluble. Encontrándose la sobreexpresión de la proteína recombinante en todos los casos en la fracción insoluble, formando cuerpos de inclusión.

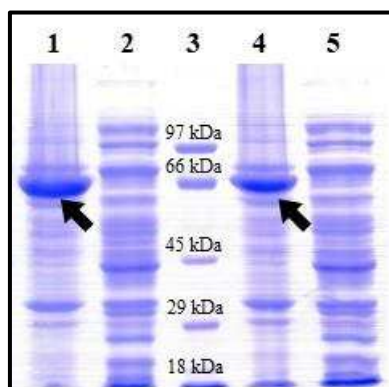


Figura 37: Perfil electroforético (SDS-PAGE 10%) del ensayo de expresión de 2 clones diferentes de la *EgrPS2* en *E. coli* BL21 (DE3). La inducción se realizó durante 16 h, a 25°C, con una concentración de inductor de 0,5 mM. Las flechas indican la sobreexpresión de la *EgrPS2* en la fracción insoluble. **Carril 1:** Fracción insoluble clon 1. **Carril 2:** Fracción soluble clon 1. **Carril 3:** Marcadores de masa molecular. **Carril 4:** Fracción insoluble clon 2. **Carril 5:** Fracción soluble clon 2

La obtención de esta proteína en forma insoluble era un resultado posible, considerando que se está expresando únicamente un fragmento (el dominio soluble principal de la *EgrPS2*), sumado al hecho de que no posea el anclaje a membrana, lo cual podría conducir a un plegamiento erróneo o la formación de una estructura inestable, llevando consecuentemente a la generación de cuerpos de inclusión.

Ante la imposibilidad de obtener esta proteína en forma soluble, y considerando que se pretende utilizarla como antígeno para generar anticuerpos, se procedió igualmente al escalado del cultivo utilizando una inducción con 0,5 mM de IPTG a 25°C durante toda la noche. Esta condición resultó exitosa para la obtención de buenos rendimientos de la *EgrPS2*₆₀₀ en la fracción insoluble, a partir de la cual se propuso la resuspensión y reconstitución de la proteína. Para esto se realizó un proceso de resuspensión de los cuerpos de inclusión mediante un

tratamiento con *buffer* conteniendo 50 mM fosfato a pH 12, 2 M urea y 100 mM NaCl. Se incubó en agitación suave durante 16 h a 4 °C. Posteriormente, se procedió al centrifugado a 20.000 ×g durante 30 min a 4°C y la fracción soluble se dializó contra un *buffer* fosfato 50 mM pH 8 y 2 M urea. A continuación se realizó la purificación por cromatografía IMAC-Ni²⁺ manteniendo la condición de 2 M urea para evitar una posible pérdida de estabilidad y precipitación de la proteína en el interior de la columna cromatográfica. Al analizar la pureza del paso de purificación de la IMAC-Ni²⁺ mediante SDS-PAGE, se pudo comprobar que la misma no había sido efectiva, obteniéndose diversas impurezas acompañando a la *EgrPS2₆₀₀* (Figura 38, carril 1). A modo de sortear esta dificultad y poder obtener la proteína con la pureza necesaria para su utilización como antígeno, se realizó la obtención de la *EgrPS2₆₀₀* purificada mediante electro-elución. Para esto, en un gel SDS-PAGE al 10%, se sembró el *pool* obtenido de la purificación antes descrita, se realizó la migración y finalmente se cortó la banda correspondiente a la proteína de interés. A partir del fragmento de gel conteniendo a la *EgrPS2₆₀₀*, se realizó la electro-elución, que finalmente permitió la obtención del antígeno con alto grado de pureza, como se muestra en la Figura 38, carril 2, con una concentración adecuada para ser utilizada en la inoculación de ratones para la obtención de anticuerpos policlonales siguiendo protocolos establecidos [169].

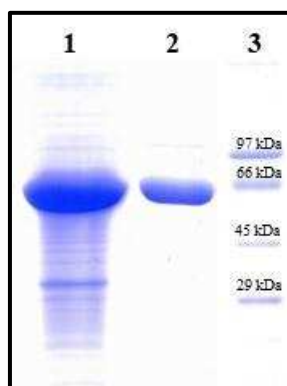


Figura 38: Perfil electroforético (SDS-PAGE 10%) purificación por cromatografía IMAC-Ni²⁺ de la *EgrPS2₆₀₀* y posterior electro-elución para obtención de antígeno puro. **Carril 1:** *Pool* purificación por cromatografía IMAC-Ni²⁺ de la *EgrPS2₆₀₀*. **Carril 2:** *EgrPS2₆₀₀* obtenida por electro-elución a partir de SDS-PAGE. **Carril 3:** Marcadores de masa molecular

Una vez obtenido el suero policlonal producido en ratones, se procedió a realizar una titulación del mismo y una prueba de especificidad contra extractos de *E. gracilis*. Lamentablemente, el suero resultó con un título extremadamente bajo, así como también una baja especificidad por el antígeno utilizado como inmunógeno, lo que dió lugar a reconocimientos inespecíficos. Estos resultados sugieren la necesidad de replantear la técnica de inmunización utilizada, siendo quizás necesario utilizar planes de inmunización diferentes a

los utilizados normalmente como protocolos estándar, considerando que posiblemente el fragmento de 600 aa utilizado como antígeno para las inmunizaciones tenga baja capacidad inmunogénica. Teniendo en cuenta que los resultados aquí descritos en cuanto a la *EgrPS2* fueron obtenidos hacia el final de este trabajo de Tesis, este nuevo plan de inmunización planteado, en conjunto a una nueva evaluación de los anticuerpos obtenidos, excede al presente trabajo y será objeto de futuros estudios en el laboratorio.

La obtención de un suero policlonal específico por la *EgrPS2* es considerado de alta importancia para su utilización como herramienta de marcación subcelular de los gránulos paramilon, dado que se ha determinado que esta enzima se encuentra en la membrana de los gránulos. Además, podría ser utilizado en la búsqueda y determinación de otras proteínas que puedan estar asociadas a la síntesis o degradación del principal polímero de reserva de carbono en *E. gracilis*.

Actualmente, ante el auge de la necesidad de obtener energía a través de fuentes alternativas al petróleo, las microalgas, particularmente las del género *Euglena*, han cobrado un rol central por su capacidad de asimilar carbono a partir del CO₂ atmosférico y obtener energía de la radiación solar con alta eficiencia. Al mismo tiempo, la posibilidad de biorremediación de aguas contaminadas creciendo en condiciones limitantes para otros organismos, hacen de *E. gracilis* un organismo adecuado para realizar cultivos de bajo costo. Esto, sumado a la capacidad de producir un gran número de compuestos de alto valor agregado, además de la generación de lípidos para la producción de biodiesel, o de hidratos de carbonos fermentables a ser utilizados para la fermentación en la obtención de bioetanol, destacan a *E. gracilis* como organismo central en la generación de energía sustentable. El conocimiento y entendimiento de la función y regulación de las enzimas involucradas en la partición del carbono en las células permitirían en un futuro, mediante técnicas de ingeniería genética, diseñar y modificar el metabolismo del carbono en *E. gracilis*, hacia el incremento en la acumulación de un determinado compuesto de interés, como el paramilon, las ceras, o el α -tocoferol, entre otros. Por este motivo creemos que la obtención de esta herramienta de marcación celular sería de gran importancia en la identificación de enzimas que están involucradas en la síntesis o degradación del paramilon, principal destino del carbono en *E. gracilis*.

4.4. Degradación de compuestos de reserva de carbono en *E. gracilis*

La degradación de los compuestos de reserva de carbono en *E. gracilis*, particularmente el paramilon que es un β -1,3-glucano, es llevada a cabo por un grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces glucosídicos a través de un patrón de acción del tipo endo- o exo-. Las endo- β -1,3-glucanasas, hidrolizan enlaces β -1,3 internos del polímero generando oligosacáridos, mientras que las exo- β -1,3-glucanasas hidrolizan desde los extremos de los polímeros u oligosacáridos[159]. Sin embargo, para lograr la hidrólisis completa de estos oligosacáridos para obtener las unidades de Glc, generalmente se requieren otro tipo de enzimas. En algunos casos actúan β -glucosidasas, siendo el sustrato principal de estas enzimas los disacáridos obtenidos en reacciones catalizadas por las glucanasas enunciadas previamente. Alternativamente, también se pueden encontrar β -glucano fosforilasas, enzimas que llevan a cabo su catálisis mediante la fosforólisis del polímero u oligosacáridos, dando lugar a la formación del correspondiente azúcar-1P, en el caso de *E. gracilis* unidades de Glc-1P, y el polímero con una unidad menos de Glc [160].

Las enzimas con actividad hidrolítica de β -1,3-glucanos del tipo endo-, se clasifican dentro del grupo EC 3.2.1.39, el cual es representativo de familias de glicosil-hidrolasas GH16, GH17, GH55, GH64 y GH81 de acuerdo a la base de datos CAZy (www.cazy.org), entre las cuales se han encontrado transcritos para β -1,3-glucanasas de las familias GH17, GH55, GH64 y GH81 en *E. gracilis*. Particularmente, esta sección del trabajo de tesis, se centra en la obtención y caracterización de una endo- β -1,3-glucanasa de la familia GH17 y su funcionalidad en la degradación del paramilon.

4.4.1. Caracterización *in vivo* e *in vitro* de la β -1,3-glucanasa de la familia GH17

4.4.1.1. Clonado y expresión recombinante de la GH17

A partir de la secuencia que se encuentra disponible en la base de datos del NCBI, Centro Nacional de Información Biotecnológica (del inglés *National Center for Biotechnology Information*), bajo el código BAR45479.1, se procedió al diseño del gen para síntesis *de novo* con codones optimizados para la expresión en *E. coli* y sitios de restricción para las enzimas *NdeI* y *HindIII*, Estos sitios fueron utilizados para el subclonado del gen en el vector de expresión pET28c el cual, como se describió anteriormente, permite la obtención de la proteína recombinante fusionada a una etiqueta de histidinas en el extremo N-terminal, que facilita la posterior purificación mediante IMAC.

Con la construcción [pET28c/*EgrGH17*], se transformaron células competentes de *E. coli* BL21 (DE3) que permiten la expresión recombinante de la enzima. Las células transformantes 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. En la Figura 39 se exhibe uno de los ensayos de expresión realizados en la optimización, en la que se observa que gran parte de la expresión recombinante se encuentra en la fracción insoluble, con una proporción menor en la fracción soluble. Sin embargo, a los fines de realizar la purificación y caracterización cinética de esta enzima recombinante, la fracción soluble resultó suficiente. Se procedió al escalado del cultivo en medio LB y se indujo con 0,5 mM de IPTG a 25°C durante 16 h. A partir de las células obtenidas se realizó su ruptura mediante ultrasonido, seguido de purificación de la *EgrGH17* mediante IMAC-Ni²⁺, a partir de la fracción soluble. Las fracciones eluidas que resultaron activas y puras se juntaron en un *pool* el cual se suplementó con glicerol 10% (v/v) y se almacenó a -80 °C para su posterior utilización.

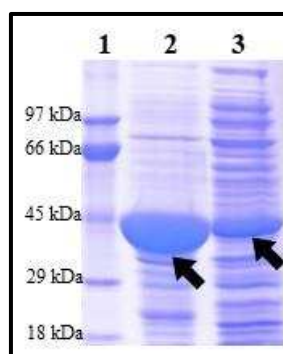


Figura 39: Perfil electroforético (SDS-PAGE 12%) del ensayo de expresión de la *EgrGH17* en *E. coli* BL21 (DE3). La inducción se realizó durante 16 h, a 25°C, con una concentración de inductor de 0,5 mM. Las flechas indican la sobreexpresión de la *EgrGH17* en la fracción insoluble y soluble. **Carril 1:** Marcadores de masa molecular. **Carril 2:** Fracción insoluble. **Carril 3:** Fracción soluble.

4.4.1.2. Caracterización cinética de la *GH17* recombinante

Para realizar la caracterización cinética de la *EgrGH17*, se utilizó tanto paramilon como laminarina, un polímero similar al paramilon (enlaces β -1,3-glucosídicos), con longitudes que van de 20 a 30 unidades de Glc, las cuales pueden presentar ramificaciones β -1,6. En promedio, se considera que la longitud de la laminarina es de 25 unidades de Glc, unidas por enlaces β -1,3-glucosídicos, presentando en promedio 1,3 ramificaciones (β -1,6) por molécula [223]. La laminarina es el sustrato de preferencia al caracterizar estas glucanasas ya que, a diferencia del paramilon, es soluble, de forma tal que la medida se independiza de ciertos artefactos que puedan darse por una medida realizada con un sustrato insoluble [159, 224–226]. La laminarina, se mantiene soluble en agua hasta concentraciones superiores a los 10 mg.ml⁻¹, a diferencia del

paramilon, el cual es insoluble en soluciones acuosas, lo que dificulta las medidas cinéticas en solución.

Previo a la determinación de los parámetros cinéticos, se llevaron a cabo diversos ensayos en los que se evaluaron diferentes condiciones para las medidas de actividad enzimática, en los que se varió tanto el pH como la temperatura de reacción. En primer lugar, se probaron diferentes pH de reacción en un amplio rango de valores desde ácidos hasta alcalinos. La mayor actividad se determinó a valores de pH ácidos, siendo este resultado similar a lo publicado para otras endo- β -1,3-glucanasas, las cuales presentaron mayores niveles de actividad enzimática cuando el medio de reacción presenta valores de pH por debajo de 7 [159, 224–226]. En lo que respecta a las temperaturas ensayadas, se evaluó un rango desde 30°C hasta 80°C. La actividad se fue incrementando a medida que la temperatura aumentaba hasta llegar a 60°C, valor a partir del cual comienza a decrecer la actividad enzimática. De este modo, se estableció como condiciones óptimas para la medida de actividad enzimática una temperatura de 60°C y un pH de 4,5, condiciones en las que se realizó la caracterización cinética y determinación de los parámetros correspondientes.

Se determinaron los parámetros cinéticos ($S_{0,5}$, V_{\max} y n_H) de la *EgrGH17* recombinante en estudio a partir de las curvas de saturación utilizando laminarina y paramilon como sustratos. Dada la insolubilidad del paramilon, la reacción se realizó en agitación constante, acorde a lo descrito en Materiales y Métodos. En la Figura 40 se muestran las curvas de saturación de sustrato obtenidas, a partir de las cuales se determinaron los parámetros cinéticos que se detallan en la Tabla 10. Se observó que para ambos sustratos, el tipo curva obtenida es del tipo sigmoidea, con valores de n_H similares. La afinidad por sustrato difiere levemente, resultando el $S_{0,5}$ con paramilon 1,5 veces superior en comparación con laminarina. Al analizar la V_{\max} , el valor encontrado para la laminarina es 3 veces mayor respecto del obtenido utilizando paramilon (Tabla 10). Como se mencionó anteriormente, esta diferencia podría ser justificada por la diferente solubilidad entre los sustratos analizados. El paramilon, al ser insoluble, resultaría más dificultoso de ser alcanzado por la enzima para llevar a cabo la catálisis, con la consecuente disminución en la actividad enzimática hallada. Contrariamente, la laminarina al presentarse en solución, tendría mayor contacto con la *EgrGH17*, generando una catálisis mayor.

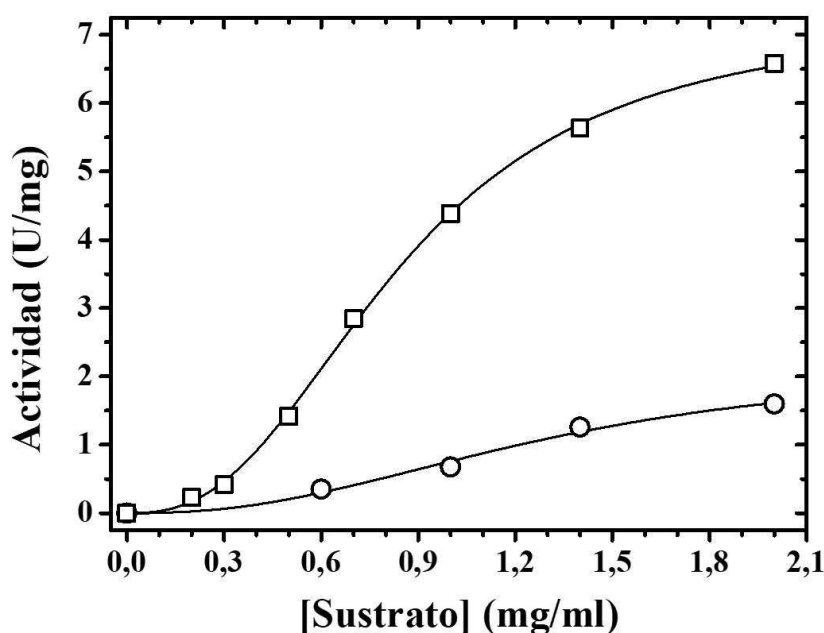


Figura 40: Curva de saturación de sustratos para la *EgrGH17*. □: Laminarina. ○: Paramilon.

A partir de los resultados mostrados en la Tabla 10 se observa que el valor de k_{cat} obtenida para el paramilon es 3 veces menor que el obtenido con la laminarina. Si comparamos en términos de eficiencia catalítica ($k_{cat}/S_{0,5}$), claramente la *EgrGH17* es más eficiente con el sustrato soluble que el insoluble, mostrando una eficiencia 6 veces mayor con laminarina. Como se mencionó previamente, posiblemente esto se deba a que la laminarina es un sustrato que permanece en solución, lo que quizás conlleva a una mejor interacción entre la enzima y el sustrato, facilitando la catálisis.

Tabla 10: Parámetros cinéticos de la *EgrGH17* recombinante.

| | $S_{0,5}$ ($\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) | n_H | V_{max} ($\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$) | k_{cat} (s^{-1}) | $k_{cat}/S_{0,5}$ ($\text{ml}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$) |
|-------------------|---|---------------|--|----------------------------------|---|
| Laminarina | $0,85 \pm 0,02$ | $2,6 \pm 0,1$ | $7,2 \pm 0,2$ | 5,1 | 6 |
| Paramilon | $1,3 \pm 0,3$ | $2,3 \pm 0,7$ | $2,2 \pm 0,6$ | 1,5 | 1,1 |

En búsqueda de comprender si el hecho de la insolubilidad del paramilon, es una limitante para la enzima en estudio, se procedió a la búsqueda de un CBM (dominio de unión a carbohidratos) que sea capaz de unir β -1,3-glucanos. Como se describió en la sección Introducción, estos dominios facilitan el acercamiento de la enzima al sustrato, siendo los CBM dominios no catalíticos, normalmente presentes en enzimas de diferentes familias de GH, con un plegado independiente dedicado al reconocimiento y unión de carbohidratos. Pueden clasificarse funcionalmente de acuerdo a las propiedades estructurales del ligando objetivo, aunque normalmente son agrupados en familias de acuerdo a la secuencia aminoacídica. Para

esto se procedió a la búsqueda *in silico* de posibles CBMs candidatos. Se encontró un CBM de 125 aa perteneciente a *Bacillus halodurans* el cual se encuentra en el extremo C-terminal de una endo- β -1,3-glucanasa de la familia GH81. Este CBM (125 aa) de *B. halodurans* se agrupa dentro de la familia de CBM6 de acuerdo a lo presentado en www.cazy.org, cuyos miembros presentan una estructura 3D del tipo “ β -sandwich” con tamaños cercanos a los 120 aa y poseen capacidad de unión a β -1,4-xilanos, β -1,3 y β -1,4-glucanos. En base a esto, decidimos utilizar este CBM para fusionarlo a la *EgrGH17* alternativamente tanto en su extremo N-terminal como C-terminal, introduciendo además un *linker* de 9 glicinas entre el CBM y la glucanasa que le permita a la proteína un cierto grado de movilidad para acomodarse correctamente sobre el sustrato.

A partir de esta estrategia, se procedió al diseño del CBM con sitios de restricción acordes y los *linker* de glicina a cada lado que permitan generar ambas construcciones, por síntesis *de novo*, con codones optimizados para la expresión en *E. coli*. Así, se obtuvieron dos nuevas construcciones [pET28c/*EgrGH17*-CBM-Nterm] y [pET28c/*EgrGH17*-CBM-Cterm]. Con estas construcciones se transformaron células competentes de *E. coli* BL21 (DE3) y posteriormente se realizaron ensayos de expresión con el objetivo de encontrar condiciones que permitan la obtención de la nueva proteína fusionada al CBM. En la Figura 41 se muestran perfiles electroforéticos obtenidos de los ensayos de expresión de ambas construcciones.

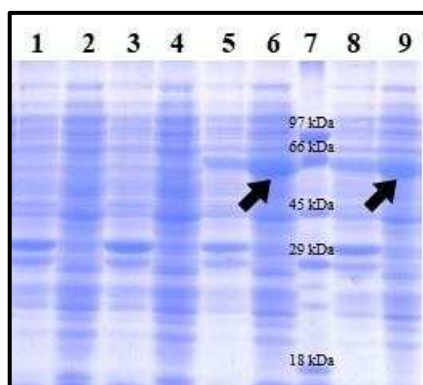


Figura 41: Perfil electroforético (SDS-PAGE 10%) del ensayo de expresión de 2 clones diferentes de la *EgrGH17*-CBM-Nterm y 2 clones *EgrGH17*-CBM-Cterm en *E. coli* BL21 (DE3). La inducción se realizó durante 16 h, a 25°C, con una concentración de inductor de 0,5 mM. Las flechas indican la sobreexpresión de la *EgrGH17*-CBM-Cterm en las fracciones solubles. **Carril 1:** Fracción insoluble clon 1 (CBM-Nterm). **Carril 2:** Fracción soluble clon 1 (CBM-Nterm). **Carril 3:** Fracción insoluble clon 2 (CBM-Nterm). **Carril 4:** Fracción soluble clon 2 (CBM-Nterm). **Carril 5:** Fracción insoluble clon 1 (CBM-Cterm). **Carril 6:** Fracción soluble clon 1 (CBM-Cterm). **Carril 7:** Marcadores de masa molecular. **Carril 8:** Fracción insoluble clon 2 (CBM-Cterm). **Carril 9:** Fracción soluble clon 2 (CBM-Cterm).

Con la construcción [pET28c/EgrGH17-CBM-Nterm] no fue posible obtener la proteína recombinante fusionada al CBM, a pesar de haber ensayado diversas condiciones de expresión e incluso diferentes clones. Aunque no fue posible obtener la enzima fusionada, el CBM con el *linker* de glicinas sí pudo ser expresado individualmente. Contrariamente, la construcción [pET28c/EgrGH17-CBM-Cterm] dio lugar a la producción de la proteína recombinante fusionada al CBM de *B. halodurans* en el extremo C-terminal de la glucanasa como se indica en la Figura 41 (carril 6 y 9), la cual se purificó por cromatografía IMAC-Ni²⁺.

Con esta EgrGH17-CBM-Cterm purificada, se ensayó actividad enzimática haciendo particular énfasis en la utilización de paramilon. Los parámetros obtenidos con esta enzima fusionada no mostraron diferencias significativas respecto a la EgrGH17 caracterizada, mostrando una V_{\max} de 1,9 U.mg⁻¹ y un $S_{0,5}$ por el paramilon de 1,2 mg.ml⁻¹. Los resultados indican que la presencia de este dominio de unión a carbohidratos, al menos en el extremo C-terminal de esta glucanasa de *E. gracilis*, no favoreció la afinidad de la enzima hacia el sustrato insoluble paramilon. Esto podría deberse a que el CBM seleccionado no posee la capacidad de interactuar eficientemente con el paramilon o, por el contrario, la fusión al extremo C-terminal no permitiría la correcta catálisis por parte de la EgrGH17. Sin embargo, para corroborar esto último, sería indispensable tener la versión de la enzima con el CBM fusionado al extremo N-terminal de la misma y así poder realizar un análisis comparativo.

4.4.1.3. Análisis de la actividad β -1,3-glucanasa a extractos de *E. gracilis*

Con el objetivo de evaluar cómo se encuentra este tipo de actividad enzimática en los extractos de células de *E. gracilis* crecidas en condiciones autotróficas, evaluamos la actividad β -1,3-glucanasa en extractos de esta microalga. Para esto se utilizaron cultivos crecidos en condiciones autotróficas, con ciclo de luz oscuridad 16/8 h a una temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$. Se cosecharon células cada 2 h por un periodo de 24 h, a modo de conseguir muestras a lo largo de todo un día, obteniéndose así 8 muestras correspondientes a momentos de luz y 4 de oscuridad. Estas muestras fueron guardadas a -80°C hasta el momento de su procesamiento en forma simultánea.

Las células se resuspendieron en un *buffer* adecuado (ver sección 3.4.6) con el agregado de inhibidor de proteasas. De este modo las muestras fueron sonicadas y luego centrifugadas a $20.000\times g$ durante 15 min a 4°C , para separar la fracción soluble de la insoluble. A partir de las fracciones solubles se realizaron medidas de actividad enzimática, utilizando laminarina como sustrato, y ensayo de western blot, acorde a lo detallado en Materiales y Métodos.

Evaluando los resultados obtenidos se observó que no habría mayores variaciones de la actividad a lo largo del día, similar a lo determinado previamente para la UDP-Glc PPasa, encontrándose una actividad β -1,3-glucanasa promedio de $0,08 \text{ U.mg}^{-1}$ tanto en el periodo de luz como en oscuridad. Estos resultados indicarían que no existe una regulación de la actividad enzimática por el ciclo de luz/oscuridad, manteniéndose constante a lo largo del día. Teniendo en cuenta el amplio repertorio de β -1,3-glucanasas presentes en *E. gracilis*, no podemos asegurar si existen variaciones entre las enzimas capaces de catalizar esta reacción. Sin embargo, en lo que respecta a la GH17 en estudio, se ha podido comprobar mediante ensayo de western-blot realizados sobre estas muestras, que no habría variaciones a lo largo del día en la cantidad de esta enzima presente (Figura 42). El ensayo de inmunodetección se realizó utilizando anticuerpos policlonales específicos contra la *EgrGH17* que fueron producidos en conejo (acorde a lo descrito en Materiales y Métodos) utilizando como antígeno la enzima producida de forma recombinante.

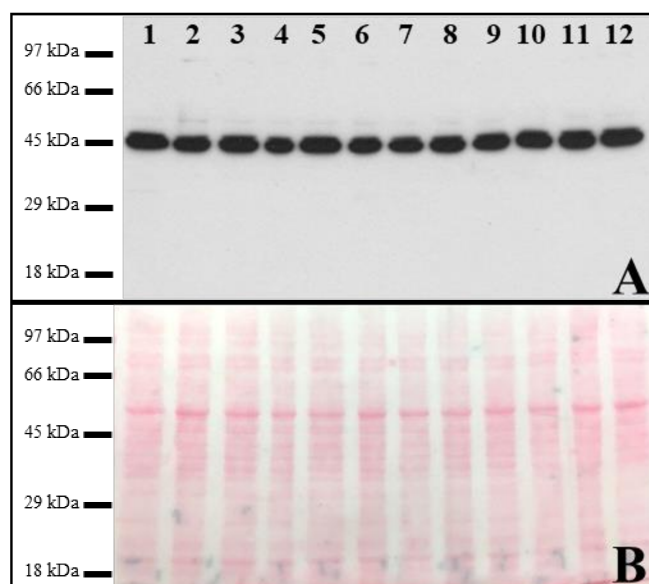


Figura 42: Análisis de *EgrGH17* en cultivos autotróficos de *E. gracilis*. **A** Western-blot con anticuerpos específicos anti *EgrGH17*. Se utilizaron extractos solubles de *E. gracilis* en condición autotrófica, tomadas cada 2 horas durante período de 24 horas. Muestras 1 a 8 corresponden al periodo de luz y de 9 a 12 al periodo de oscuridad. **B** Control de carga con *Rojo Ponceau*.

Por otra parte, cuando se realizaron medidas de actividad β -1,3-glucanasa a extractos solubles pertenecientes a cultivos que se encontraban en crecimiento en condición heterotrófica (medio de cultivo CyM suplementado con Glc 1% p/v y oscuridad), no fue posible detectar actividad enzimática. Asimismo, tampoco se detectó señal mediante ensayos de western-blot realizados sobre las mismas muestras. Este resultado nos indica que *E. gracilis* sería capaz de regular la expresión de las β -1,3-glucanasas de acuerdo a las condiciones particulares de cultivo

en la que se encuentra. En este sentido, en una condición donde tiene una fuente de carbono externa en exceso (como la Glc), disponible de forma continua, no tendría la necesidad de degradar el paramilon acumulado y por lo tanto la presencia de β -1,3-glucanasas resultaría en un gasto energético y de recursos innecesarios.

4.4.1.4. Silenciamiento por ARN de interferencia

En búsqueda de una mejor comprensión sobre la importancia de la GH17 en la degradación y movilización del carbono acumulado como paramilon en *E. gracilis*, se optó por hacer silenciamiento de la *EgrGH17* mediante ARNi. De esta forma, se podría evaluar si una disminución en la cantidad de esta enzima circundante, tiene efecto sobre la degradación del paramilon alterando el normal funcionamiento de la célula. Para realizar esta técnica de ARNi, la cual ha sido previamente utilizada con éxito para silenciar la UDP-Glc PPasa y la UDP-azúcar PPasa de *E. gracilis* como fuera mostrado en las secciones previas, se procedió de igual modo que para el caso de la UDP-Glc PPasa. Dado que el gen para la expresión recombinante de esta GH17 fue obtenida mediante síntesis *de novo*, a partir de la secuencia proteica, con codones optimizados para la expresión en *E. coli*, fue necesario obtener la secuencia codificante de la enzima a partir de fuente.

Partiendo de un cultivo en condición autotrófica, se realizó la extracción de ARN total, al cual se le evaluó su calidad. Con este ARN total se procedió a la obtención del ADNc, mediante retro-transcripción, acorde a lo descrito en Materiales y Métodos. Seguidamente, se realizó la PCR utilizando los oligonucleótidos *EgrGH17fow* y *EgrGH17rev*, detallados en la Tabla 3 de Materiales y Métodos, con el fin de amplificar el gen codificante para la *EgrGH17*. Con el producto de PCR amplificado, se procedió al clonado en el vector de clonado pGEM-T easy, y posterior secuenciación para corroborar la correcta secuencia nucleotídica del fragmento amplificado.

Con la secuencia nucleotídica corroborada, se diseñaron dos pares de oligonucleótidos para obtener dos fragmentos de alrededor de 400 pb. Estos oligonucleótidos, como se mencionó previamente, además de contar con la secuencia codificante para amplificar el fragmento deseado, poseen en sus extremos 5' la secuencia promotora para la T7 ARN polimerasa (Tabla 6 de Materiales y Métodos, *EgrGH17ARNi1fow/rev*, *EgrGH17ARNi2fow/rev*), necesaria para la generación *in vitro* del ARN doble cadena (ARNdc). Cada producto de PCR de 400 pb obtenido, fue utilizado como molde para la síntesis *in vitro* de su correspondiente ARNdc utilizando la T7 ARN polimerasa. Estos productos (ARNdc), se purificaron del resto de ADN utilizado como molde y se procedió a la electroporación de las células de *E. gracilis*, con la finalidad de producir el silenciamiento de la GH17, mediante la disminución de su ARNm.

Una cantidad aproximada de 1×10^6 células de un cultivo en crecimiento exponencial de *E. gracilis* fueron electroporadas con alrededor de 20 μg de ARNdc (10 μg de cada fragmento). Para realizar una evaluación de los efectos producidos por el silenciamiento de la GH17 en *E. gracilis*, hemos tomado muestras de las células post-electroporación, cada 7 días por un periodo de 28 días. Los resultados exhiben que el empleo de esta técnica ha resultado exitoso. Mediante ensayos de western-blot con anticuerpos específicos contra la *EgrGH17*, se observa una desaparición de la señal correspondiente a esta enzima por un periodo de 7 a 28 días posterior a la electroporación (Figura 43). Se evidencia una disminución en los niveles de *EgrGH17* durante los primeros 7 días, permaneciendo indetectable por períodos mayores a 28 días.

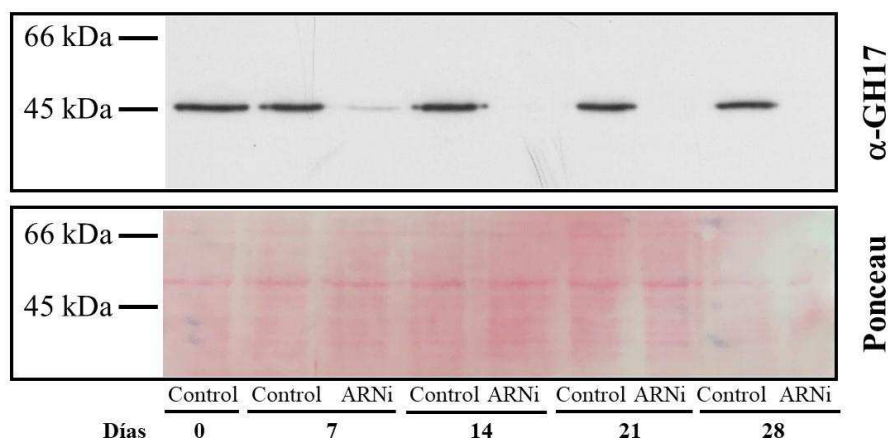


Figura 43: Ensayos de silenciamiento por ARNi de la *EgrGH17*. Se tomaron muestras de *E. gracilis* electroporadas sin ARNdc (control) y electroporadas con ARNdc, cada 7 días, durante un periodo de 0-28 días posteriores a la electroporación. Con los extractos solubles de cada muestra se realizó un western-blot con anticuerpos específicos anti-*EgrGH17*. Se muestra la tinción con Ponceau de la membrana como control de carga.

Aunque se evidenció una notable disminución de la *EgrGH17* en los extractos de las muestras tratadas, al realizar las medidas de actividad enzimática a las mismas muestras, si bien se encontró una diferencia, solo se logró disminuir alrededor de un 20% la actividad β -1,3-glucanasa en las células tratadas, respecto de los controles a lo largo de los 28 días analizados (Figura 44).

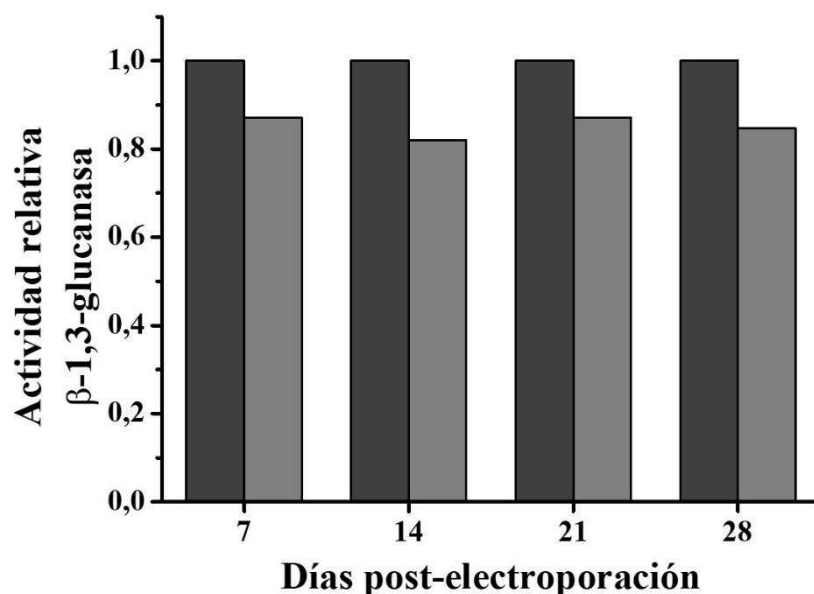


Figura 44: Actividad β -1,3-glucanasa en ensayos de silenciamiento por ARNi de la *EgrGH17*. Se tomaron muestras de *E. gracilis* electroporadas sin ARNdC (control) y electroporadas con ARNdC, cada 7 días, durante un periodo de 0-28 días posteriores a la electroporación. Con los extractos solubles de cada muestra se realizó la medida de actividad enzimática β -1,3-glucanasa.

En este punto se debe considerar, como fuera explicado previamente en la Introducción de este trabajo de Tesis, que *E. gracilis* presenta, de acuerdo a lo identificado a partir de un trabajo de transcriptoma, 17 transcritos que pertenecen a la familia GH81, 3 de la familia GH17 y 1 de la familia GH64 [85]. Considerando solamente endo- β -1,3-glucanasas tenemos al menos 21 posibles enzimas diferentes capaces de catalizar un mismo tipo de reacción. Por este motivo, es esperable que al momento de analizar la actividad β -1,3-glucanasa sobre un extracto, no sea tan evidente la faltante de una de ellas ya que la misma puede estar siendo enmascarada y/o complementada por el resto de enzimas de esta familia que aún se encuentran presentes. Además, no se debe dejar de lado la presencia de exo- β -1,3-glucanasas, siendo éstas capaces de hidrolizar el sustrato que se utilizó para la medida de actividad (laminarina), dando lugar a la formación de más extremos reductores por la hidrólisis del polímero.

Dado este contexto de redundancia de enzimas capaces de catalizar la misma o similares reacciones en *E. gracilis*, es esperable que no existan mayores cambios en el funcionamiento celular, ya que varias de estas enzimas podrían suplir la faltante de una de ellas. En este contexto sería esperable que la acumulación de paramilon no se viera afectado por el silenciamiento de la *EgrGH17*, ya que la diferencia menor al 20% de la actividad β -1,3-glucanasa no debería influir sobre su acumulación. Sin embargo, cuando analizamos los niveles de paramilon acumulado (Figura 45), curiosamente las células tratadas con el ARNdC contra la GH17,

presentaron un 20% menos de acumulación durante los primeros 14 días desde la electroporación, mientras que hacia los últimos 14 días del ensayo, los valores obtenidos se encontraron cercanos a los controles, siendo un 10% inferior a los 28 días e igual en las muestras a los 21 días posteriores a la electroporación.

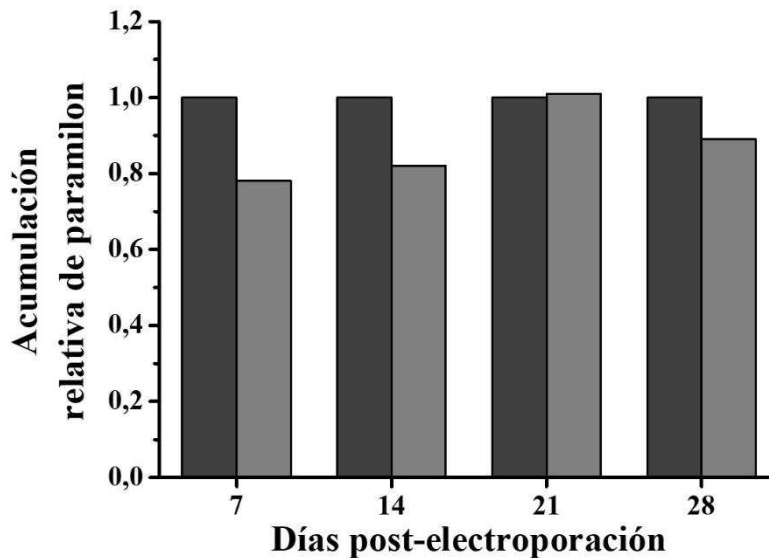


Figura 45: Acumulación relativa de paramilon en células de *E. gracilis* control (gris oscuro); tratadas con ARNi contra GH17 (gris). Los valores son relativos al control del correspondiente día de toma de muestra.

Sin lugar a dudas, el escenario encontrado en estas células de *E. gracilis* silenciadas para la GH17 era el menos esperado. Con los resultados observados en el ensayo de western-blot y actividad enzimática, podemos considerar que los niveles de paramilon en estas células serían similares a los controles. Inclusive, considerando que se encuentra silenciada una de las enzimas encargadas de la degradación de este polímero, esto resultaría en una mayor acumulación del mismo. En este contexto, podríamos sugerir que ante la disminución en la expresión de una de las glucanasas presentes en *E. gracilis*, el resto estaría cubriendo esta faltante. Sin embargo, sería necesario estudiar las diversas β -1,3 endo- o exo- glucanasas presentes en esta microalga, para asignarle roles metabólicos específicos a cada una de ellas.

A partir de los resultados descriptos en este trabajo, podemos decir que la *EgrGH17* es una β -1,3-glucanasa capaz de hidrolizar tanto la laminarina (sustrato soluble) como el paramilon, presentando mayor eficiencia sobre el primero. Nuestros ensayos muestran que esta enzima se expresa diferencialmente dependiendo las condiciones de cultivo, estando ausente en condición heterotrófica con Glc como fuente de carbono, mientras que en condición autotrófica (sin fuente de carbono externa) la *EgrGH17* se expresa, sin mostrar variaciones a lo largo de todo el período de luz/oscuridad. El silenciamiento de esta enzima mediante ARNi condujo a una disminución de casi un 20% de la actividad β -1,3-glucanasa total en extractos de *E. gracilis*,

lo que indicaría que la misma representa un porcentaje considerable de toda la actividad β -1,3-glucanasa en la célula, teniendo en cuenta el amplio repertorio de enzimas β -1,3-glucanasa (endo- y exo-) presentes en *E. gracilis*. En cuanto a la acumulación de paramilon, el resultado encontrado no se correlacionó con la hipótesis planteada respecto a una posible mayor acumulación (o menor movilización) del mismo ante una disminución de la actividad β -1,3-glucanasa. Sin embargo, el resultado abre nuevos interrogantes por responder con el objetivo de comprender cuál es fenómeno que ocurre en esta situación, que lleva a una menor acumulación en las células que poseen silenciada la GH17. Un estudio más profundo sería necesario para determinar si la menor acumulación está relacionado con una menor asimilación de carbono por parte de la célula o si el mismo está siendo direccionado hacia otro compuesto de reserva como por ejemplo ceras o trehalosa que es otro hidrato de carbono que acumula *E. gracilis* en ciertas condiciones.

5. DISCUSIÓN

E. gracilis es un eucariota fotosintético que, junto con otros protozoos y diatomeas, han adquirido sus cloroplastos a través de una endosimbiosis secundaria, siendo el resultado de que una célula eucariota heterotrófica haya sido invadida por un eucariota fotosintético [16–19]. Además, *E. gracilis* está relacionada filogenéticamente con otros protozoos como los tripanosomátidos de la clase Kinetoplastea, dentro de los cuales por ejemplo se encuentran *Trypanosoma brucei* y *T. cruzi* (ambos agentes patógenos del ser humano), que habrían experimentado un proceso similar pero que, a continuación, perdieron el cloroplasto manteniendo un número importante de enzimas relacionadas con el metabolismo fotosintético del carbono [20].

En comparación con plantas superiores, las microalgas como *E. gracilis*, poseen la ventaja de proliferar de manera más eficiente, permitiendo la obtención de grandes cantidades de biomasa cuando se les proporciona un ambiente adecuado [43]. Esto se suma además a la posibilidad de ser cultivadas en sitios que no se utilizan para la agricultura, asegurando que no haya competencia con los recursos agrícolas existentes. Particularmente, *E. gracilis* puede crecer en condiciones heterotróficas (con fuente de carbono y ausencia de luz), mixotrófica (fuente de carbono y en presencia de luz) o de forma autotrófica sólo utilizando luz y CO₂ [51]. Entre las ventajas del cultivo de *E. gracilis*, se encuentra su tolerancia a un amplio rango de pH, así como también su habilidad natural para crecer ante la presencia de metales pesados, haciéndola apta para biorremediación de aguas contaminadas [52]. Además, es capaz de utilizar una amplia gama de compuestos como fuente de carbono, entre los que se puede mencionar, la glucosa, lactato, acetato, etanol, glicerol, glicina, glutamato, entre otros [51, 52].

Hace algunos años comenzaron a realizarse estudios sobre la posibilidad de utilización de microalgas como fuente de alimento, o para la obtención de determinados metabolitos de interés, encontrándose que diferentes microalgas producen con mayor o menor eficiencia determinados metabolitos [44]. Se ha observado que *E. gracilis* es capaz de producir grandes cantidades de vitamina E, ácidos grasos poliinsaturados nutricionalmente importantes y además genera una gran proporción, respecto a la biomasa seca, del polisacárido de reserva, paramilon [45–47]. El paramilon, encontrado solamente en Euglenophyceae, es un polímero de glucosa unidas por enlaces β -1,3 glucosídicos, insoluble, que se acumula en gránulos en el interior celular. Este β -1,3-glucano posee diversas aplicaciones, entre las cuales se puede mencionar sus propiedades inmunomodulatorias, su uso para producir plastificantes o como fuente de carbono fermentable en la producción de bioetanol [48–50, 79]. Como parte de este trabajo de

tesis, se llevó a cabo la puesta a punto y caracterización de los cultivos de esta microalga realizados en diferentes condiciones, al mismo tiempo que se determinaron los niveles de acumulación de los compuestos de reserva. Los resultados exhiben diferencias tanto en los tiempos de crecimiento, como en las biomásas obtenidas, en cada una de las condiciones de cultivo evaluadas. Además, en lo que respecta a los niveles del β -1,3-glucano, se evidenciaron rendimientos de paramilon cercanos al 35%, respecto de la biomasa seca, cuando los cultivos se encuentran en condiciones autotróficas, en ausencia de fuente de carbono externa, obteniendo la energía y el carbono únicamente a partir de la luz y el CO₂. En cambio, cuando la cuantificación se realizó sobre células provenientes de cultivos en condiciones heterotróficas, utilizando Glc como fuente de carbono y en ausencia de luz, los rendimientos obtenidos ascendieron a 51% respecto de la biomasa seca. Esto indica que estaría existiendo una dependencia con la condición de cultivo para lograr una mayor acumulación de carbono intracelular. Los rendimientos en cultivos autotróficos, que poseen ciclos de luz/oscuridad, suelen ser menores en comparación con la condición heterotrófica con el agregado de una fuente de carbono externa. Esto podría explicarse teniendo en cuenta que durante el periodo de oscuridad, la célula necesita obtener energía y carbono para continuar con el resto del metabolismo celular, siendo la fuente de carbono a utilizar el paramilon acumulado. En conjunto, los resultados obtenidos de la caracterización de los cultivos de *E. gracilis*, así como también de los niveles determinados de paramilon, son comparables con los existentes en la bibliografía [69], indicando entonces que se logró la puesta a punto y conocimiento de los cultivos de *E. gracilis*, presentando esta tesis los primeros resultados respecto a estudios realizados con esta microalga, obtenidos en nuestro grupo de trabajo.

Por otra parte, como se describió previamente, *E. gracilis* también es capaz de acumular grandes cantidades de ceras cuando el cultivo es sometido a condiciones de anaerobiosis, produciéndose un cambio en el metabolismo, en el que se redirige el carbono acumulado en forma de paramilon hacia la producción de ceras, en una vía denominada “fermentación de ceras”. Esta vía le permite a la célula obtener energía, sin perder el carbono que fuera previamente asimilado, dirigiéndolo hacia la síntesis de ceras, alcanzando valores cercanos al 50% respecto de la biomasa seca [71–73], presentando la ventaja de acumular una relación ceras/lípidos totales de 0,8 g ceras/g lípidos totales [227]. Entre los destinos o utilidades de las ceras, su gran potencial se encuentra asociado a la utilización en la producción de biocombustible por el largo de sus cadenas, que lo hace idóneo para la producción de biodiesel [83]. En nuestra experiencia, hemos obtenido rendimientos de cera cercanos al 45% respecto de la biomasa seca, en células provenientes de un cultivo heterotrófico expuesto a anaerobiosis.

Los rendimientos fueron menores para células que, previo a la anaerobiosis, fueron crecidas en condición autotrófica. Esto corrobora la relación existente entre el contenido de paramilon y su direccionamiento a la generación de ceras, ya que los valores que hemos determinado de paramilon y ceras en cada condición están directamente correlacionados. Además, del análisis de tipificación de las ceras aisladas que llevamos a cabo mediante cromatografía gaseosa, se encontró como constituyentes principales de las mismas al ácido mirístico y el alcohol mirístico (ambos cadenas de 14 carbonos) los cuales se ha demostrado en la bibliografía que tienden a ser los componentes mayoritarios constituyentes de las ceras [71].

Para que se dé lugar a la síntesis de los compuestos de reserva de carbono, como paramilon o ceras en el caso de *E. gracilis*, u otros compuestos de interés, es necesario que ocurran una elevada cantidad de reacciones químicas en forma simultáneas, siguiendo determinadas pautas que las organizan en procesos coherentes y funcionan en forma secuencial para generar uno o varios productos específicos. Esto se da en forma rigurosamente regulada por una serie de reacciones catalizadas por enzimas que constituyen las vías metabólicas [94].

En la Figura 46 se representa un escenario respecto a la partición del carbono y la generación de compuestos de reserva en *E. gracilis*, donde se indican algunas de las enzimas involucradas y estudiadas en este trabajo de tesis. En este sentido, el carbono que ingresa a la célula a través de una fuente externa o que es asimilado a través de la fotosíntesis, debe seguir una serie de reacciones hasta llegar a Glc-1P (Figura 46), metabolito que es sustrato de diversas NDP-Glc PPasas o NDP-azúcar PPasas que permitirán la producción de las correspondientes unidades de “azúcar activada” (NDP-Glc), que serán direccionadas a diferentes destinos metabólicos. En *E. gracilis* el principal destino de la Glc-1P es la formación de UDP-Glc, como fuera determinado por O'Neill y colaboradores [86], donde se determinó a la UDP-Glc como principal NDP-azúcar en el interior de la célula, resultado compatible con el rol central de este metabolito como punto de partida hacia diversas vías metabólicas, siendo la principal enzima encargada de su síntesis la UDP-Glc PPasa (EC 2.7.7.9). Uno de los principales destinos de la UDP-Glc generada en *E. gracilis*, es la síntesis de paramilon, ya que es utilizada por la paramilon sintasa para la formación del β -1,3-glucano (Figura 46).

Conocer sobre las enzimas encargadas de utilizar la Glc-1P disponible en esta microalga es crucial para aportar al entendimiento respecto a la partición del carbono y su direccionamiento hacia la síntesis de diversos compuestos de interés. En este contexto, se llevó a cabo la caracterización bioquímica de una UDP-Glc PPasa de *E. gracilis* funcionalmente activa, producida de forma recombinante. La misma fue identificada a partir de un trabajo de

transcriptoma [85] en el que se encontró un transcripto de 459 aa el cual presentó una identidad de 51,2% con la UDP-Glc PPasa de *L. major*, 50,7% con su homóloga de *T. brucei* y 29,9% de identidad con la correspondiente de *G. lamblia*. A partir de la secuencia aminoacídica se obtuvo, mediante síntesis *de novo* el gen codificante, utilizando codones optimizados para su expresión en células de *E. coli*.

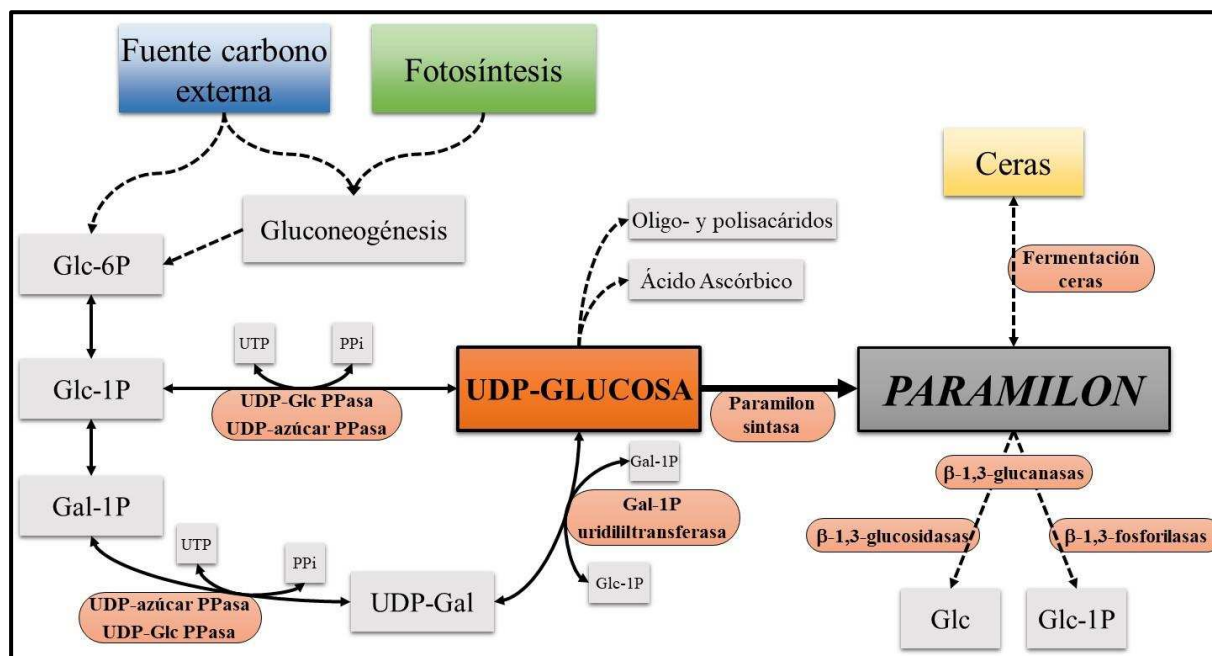


Figura 46: Esquema metabólico de la partición del carbono y las principales enzimas involucradas en la célula de *E. gracilis*. Se detallan la vía principal de producción de la UDP-Glc y posibles vías alternativas con las enzimas involucradas, además del destino de la UDP-Glc generada hacia la síntesis de paramilon. Asimismo, se indican las enzimas relacionadas con la degradación del β -1,3-glucano y su movilización hacia otros productos finales.

La enzima recombinante purificada a homogeneidad, presentó una estructura activa del tipo monomérica, comparable a las UDP-Glc PPasa de otros organismos protozoos como *L. major* [131] y *G. lamblia* [186], en las que se demostró que su estructura cuaternaria funcional, al igual que en el caso de plantas, es monomérica [129, 130]. A su vez, en la determinación de los parámetros cinéticos se encontraron valores de $S_{0,5}$ similares a las UDP-Glc PPasas de protozoos como *G. lamblia* y *E. histolytica*, con valores de 0,17 mM y 0,24 mM para UTP y Glc-1P respectivamente, presentando una cinética del tipo hiperbólica. Sin embargo, en cuanto a la V_{max} alcanzada, la enzima de *E. gracilis* ($3350 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$), se diferenció considerablemente de las UDP-Glc PPasas antes mencionadas, siendo uno y dos órdenes de magnitud superior a su homóloga de *G. lamblia* ($400 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$) y *E. histolytica* ($95 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$), respectivamente. Además, la enzima de *E. gracilis* presentó el doble de actividad respecto de la UDP-Glc PPasa de *L. major* ($1477 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$), con la cual presenta un mayor porcentaje de identidad, considerando además su cercanía filogenética.

Comparable a los resultados encontrados para la UDP-Glc PPasa de *G. lamblia* [186], la enzima de *E. gracilis*, además de utilizar los sustratos Glc-1P y UTP, presentó un cierto grado de promiscuidad, tanto en la utilización del nucleótido, como así también del azúcar-1P. La *Egr*UDP-Glc PPasa catalizó la reacción utilizando TTP en lugar de UTP, al igual que cuando se reemplazó la Glc-1P por Gal-1P y Man-1P, lo que llevaría a la generación de TDP-Glc, UDP-Gal y UDP-Man, respectivamente. Los parámetros cinéticos obtenidos con estos sustratos alternativos resultaron similares a los evidenciados para UTP y Glc-1P, a excepción de los obtenidos con Man-1P, donde no fue posible determinar un valor de $S_{0,5}$ dado que no se logró la saturación, inclusive a concentraciones de 10 mM de Man-1P. Si comparamos los valores de k_{cat} o V_{max} obtenidos con los sustratos alternativos, los mismos son inferiores al 10% respecto a los determinados para la *Egr*UDP-Glc PPasa con UTP y Glc-1P indicando que, aunque presenta afinidades similares por estos sustratos alternativos, la tasa de recambio que alcanza es mucho menor, lo que lleva a una menor eficiencia catalítica de la enzima. Si ampliamos el espectro de comparación hacia otros organismos eucariotas, se ha encontrado que la UDP-Glc PPasa de cebada también es capaz de catalizar el consumo de Gal-1P, pero con una eficiencia muy baja en comparación a la Glc-1P [228], mientras que en el caso de las UDP-Glc PPasas de mamíferos se ha demostrado, caracterizadas en el sentido inverso de reacción, que pueden usar la UDP-Gal como sustrato, con una capacidad significativamente menor respecto al uso de UDP-Glc [137]. En lo que respecta a la utilización de TTP como sustrato alternativo al UTP constituye un comportamiento singular, ya que las enzimas homólogas de plantas, hongos y protozoos son altamente específicas para el uso de UTP [128, 129, 131, 133], siendo entonces esta característica encontrada en la enzima de *E. gracilis*, compartida con la respectiva de *G. lamblia* [186].

Las UDP-Glc PPasas en diferentes organismos estudiados hasta el momento, se han destacado por no presentar regulación del tipo alostérico, a diferencia de lo que ocurre en las ADP-Glc PPasas de organismos tanto procariotas como eucariotas, en las que se ha estudiado minuciosamente el efecto de diferentes metabolitos relacionados a vías centrales de utilización del carbono y energía que resultaron efectores de esta enzima [98, 99, 190]. Por su parte, sí se han notificado diferentes modificaciones post-transcripcionales [123] y post-traduccionales [210] con fines regulatorios para las UDP-Glc PPasas de eucariotas. Es ampliamente conocido que una manera de modular la actividad de las enzimas implica su inactivación/activación a través de reacciones de oxidación-reducción [229, 230]. Ciertamente, dentro de las UDP-Glc PPasas, la enzima de *E. histolytica* fue la primera en ser caracterizada como regulada por mecanismos redox [133], seguida de la caracterización de la homóloga en *G. lamblia* [186].

En el presente trabajo de tesis hemos corroborado que la *Egr*UDP-Glc PPasa no es regulada en forma alostérica, mientras que se evidenció una regulación del tipo redox sobre la misma. Por este motivo, se ha abordado con mayor profundidad este punto en la UDP-Glc PPasa de *E. gracilis*. Los resultados mostraron que la modulación redox de la actividad de la *Egr*UDP-Glc PPasa está mediada por agentes oxidantes y reductores que normalmente se encuentran *in vivo*. La enzima es sensible a la inactivación oxidativa producida por compuestos fisiológicos (H_2O_2 , GSSG, CysNO), mientras que proteínas que participan en el metabolismo redox como la tiorredoxina (TRX), pueden reducir la enzima oxidada y lograr la completa recuperación de su actividad. Además de determinar cambios en el comportamiento cinético de la *Egr*UDP-Glc PPasa ante la presencia de diferentes condiciones de óxido-reducción, hemos evaluado sus características estructurales en estas mismas condiciones. La pérdida de actividad enzimática observada ante la exposición de la enzima a un agente oxidante (diamida o H_2O_2) es acompañada por un cambio estructural en la misma, visualizado por cromatografía de exclusión molecular y PAGE nativo, en los que se observa que la enzima oxidada adquiere conformaciones de mayor de radio de Stokes. Los resultados indican que al adicionar un agente reductor químico como el DTT, o fisiológico como la TRX, la *Egr*UDP-Glc PPasa, además de recuperar su actividad enzimática, presenta el mismo perfil de elusión en la cromatografía de exclusión molecular que el obtenido previo al tratamiento de oxidación, indicando que se recupera su estructura nativa. Lo aquí hallado para la enzima de *E. gracilis* es comparable con lo informado previamente para otras UDP-Glc PPasas [133, 186], donde se demostró un cambio en la actividad enzimática debido a la presencia de agentes redox. Sin embargo, el mecanismo molecular por el cual los residuos de Cys son oxidados en la *Egr*UDP-Glc PPasa, presenta diferencias con las enzimas de *E. histolytica* y *G. lamblia*. La inactivación por oxidación, tanto en la enzima de *E. histolytica* como de *G. lamblia* involucran la formación de un puente disulfuro intracatenario entre las Cys108 y Cys378 (numeración de acuerdo a la secuencia de la *Ehi*UDP-Glc PPasa), residuos que se encuentran cercanos entre sí en la estructura tridimensional, y participan en un sitio crítico de unión de nucleótidos junto con la Met106. Contrariamente, a partir del alineamiento realizado, se pudo observar que la *Egr*UDP-Glc PPasa presenta una Cys en la posición equivalente a la Cys378, pero carece de una en la posición equivalente a la Cys108 de la proteína de *E. histolytica*. Además, de acuerdo al análisis de la estructura tridimensional realizado sobre el modelo obtenido para la *Egr*UDP-Glc PPasa, ninguna de las 7 Cys presentes en la molécula se encuentran lo suficientemente cercanas para permitir la formación de un puente disulfuro. La inactivación de la *Egr*UDP-Glc PPasa es evidenciada tanto por la presencia de agentes alquilantes como por

agentes oxidantes, que producirían la formación de derivados del ácido sulfénico, los cuales involucrarían la modificación de al menos 5 de las 7 Cys presentes en la molécula. Los resultados exhibieron que las modificaciones generadas producen la formación de múltiples estructuras proteicas con diversos radios de Stokes y diferentes grados de modificación, los cuales conducen a la oligomerización de la enzima mediante interacciones no covalentes, con la consecuente inactivación de la misma. Fenómenos similares de oligomerización fueron observados en la UDP-Glc PPasa de cebada en la que se encontró que la misma puede ser regulada mediante este fenómeno con la formación de estructuras de dímeros o trímeros inactivos [130, 231]. Los resultados hallados con la *Egr*UDP-Glc PPasa expresada, purificada y caracterizada *in vitro*, también fueron evidenciados *in vivo* en ensayos realizados con cultivos axénicos de células de *E. gracilis*. Estos cultivos fueron sometidos a condiciones de estrés oxidativo por el agregado de H₂O₂ o alternativamente, fueron estresadas por el pasaje de los cultivos a condiciones anaeróbicas. Los resultados observados se corresponden con lo determinado *in vitro*, evidenciándose una disminución de la actividad enzimática en los extractos crudos de las células estresadas con ambos tipos de estrés, en comparación con los controles. La migración de estas mismas muestras en PAGE nativos, seguidos de inmunodetección, mostró un patrón con diferentes tipos de oligomerización de esta UDP-Glc PPasa, similar a lo hallado *in vitro*. De esta forma, los resultados obtenidos en relación a la regulación de esta enzima por modificaciones post-traduccionales del tipo redox, indican que el fenómeno observado *in vitro* sobre la enzima recombinante, se reproducen *in vivo* en los cultivos de *E. gracilis*. En conjunto, podríamos indicar que este mecanismo de regulación por oxido-reducción ocurriría naturalmente en las células de *E. gracilis* bajo condiciones de estrés, regulando así el direccionamiento del carbono disponible (principalmente en forma de Glc-1P), hacia la síntesis de UDP-Glc, dependiendo el estado en el que se encuentre la célula en determinados momentos.

Estudios de localización subcelular, realizados mediante fraccionamiento celular, seguidos de SDS-PAGE e inmunodetección sobre las fracciones obtenidas, indicaron la presencia de la *Egr*UDP-Glc PPasa únicamente en la fracción soluble citosólica. Esto se diferencia de otros organismos protozoo parasíticos como los tripanosomátidos, relacionados filogenéticamente con *E. gracilis*, en los cuales la enzima homóloga se encuentra restringida en organelas similares a peroxisomas de los eucariotas, denominados glicosomas, que cumplen un rol esencial en el metabolismo de los hidratos de carbono en estos organismos [132]. Además, el resultado obtenido en el fraccionamiento celular fue corroborado mediante microscopía confocal, donde se observó que la enzima se encuentra dispersa a lo largo de todo el citosol

celular, con la particularidad de que se halló una elevada señal correspondiente a esta UDP-Glc PPasa en el flagelo. Esto concuerda con lo expuesto por Chen y Bouck sobre la presencia de glicosiltransferasas en el flagelo de *E. gracilis*, en el que la síntesis de UDP-Glc sería necesario para dar lugar a la generación de glicoproteínas y oligosacáridos generados en el flagelo de la célula [189]. Por otra parte, se determinó actividad UDP-Glc PPasa en extractos celulares de *E. gracilis*, la cual no presentó mayores variaciones con el ciclo de luz/oscuridad (16/8 h) en cultivos autotróficos, al mismo tiempo que, mediante ensayos de western-blot sobre las mismas muestras, se pudo confirmar que la *Egr*UDP-Glc PPasa se mantiene constante en el periodo de 24 h analizado, siendo su expresión independiente del ciclo de luz/oscuridad.

Para complementar los estudios de caracterización *in vitro*, se determinó la funcionalidad de esta UDP-Glc PPasa, mediante su silenciamiento por ARNi en células de *E. gracilis*. Los resultados del ensayo de ARNi determinaron que la UDP-Glc PPasa es la enzima involucrada en la producción de la UDP-Glc necesaria para la producción del polisacárido de reserva paramilon. Se observó una disminución de la actividad UDP-Glc PPasa, alcanzando valores cercanos al 20% respecto de los controles, con una consecuente disminución en el paramilon acumulado de aproximadamente el 70% respecto a las células control. De este modo, se puso en evidencia la influencia de la UDP-Glc PPasa y su importante rol en la síntesis de UDP-Glc necesaria para la acumulación de carbono como β -1,3-glucano. Por su parte, los niveles de ARNm codificante de la *Egr*UDP-Glc PPasa, como así también la cantidad de proteína presente en las células silenciadas, se encontró por debajo de los límites de detección en los ensayos de PCR e inmunodetección, respectivamente. Esto nos lleva a preguntarnos si la cantidad de enzima remanente (indetectable por los métodos utilizados) es suficiente para catalizar el 20% de actividad UDP-Glc PPasa determinada, y proveer la UDP-Glc necesaria para mantener un 30% de paramilon acumulado, o si existirán otras enzimas capaces de catalizar esta reacción y/o proveer unidades de UDP-Glc. En este punto, deben considerarse todas las posibles vías alternativas a través de las cuales podría generarse UDP-Glc.

En la Figura 46 se muestran las posibles vías, principales y alternativas, involucradas en metabolismo de síntesis y degradación de paramilon, en las cuales se pueden observar las enzimas que permiten obtener unidades de UDP-Glc necesarias para la síntesis de paramilon y otras vías metabólicas de las cuales la UDP-Glc forma parte. En este contexto, a partir de estudios realizados en otros organismos, se sabe que las UDP-azúcar PPasas, a diferencia de las UDP-Glc PPasas en las que el producto principal es la UDP-Glc, pueden producir un amplio repertorio de UDP-azúcares. Estas UDP-azúcar PPasas poseen una baja especificidad por un

único tipo de azúcar-1P pero pueden catalizar la reacción utilizando diversos azúcares-1P, siendo uno de sus principales productos la UDP-Gal [143–145]. La presencia de una UDP-azúcar PPasa con promiscuidad hacia la utilización de Glc-1P podría justificar el 20% de actividad enzimática remanente en los extractos de *E. gracilis* silenciados para la *EgrUDP-Glc PPasa*. Por este motivo, se realizó la búsqueda *in silico* de posibles transcritos que codifiquen para homólogos de esta enzima en *E. gracilis*, hallándose dos posibles transcritos que codificarían para UDP-azúcar PPasas en esta microalga. Si bien se logró la amplificación y expresión recombinante de uno de los transcritos hallados, no fue posible concretar la caracterización cinética *in vitro* de la misma, ya que la actividad de esta enzima resultó indetectable. Sin embargo, fue posible realizar ensayos *in vivo* en los que se produjo el silenciamiento de esta UDP-azúcar PPasa mediante la técnica de ARNi tal como se había realizado con la UDP-Glc PPasa. Los resultados indicaron que en las muestras tratadas con el ARNi, al ensayar actividad enzimática utilizando UTP y Gal-1P como sustratos, la actividad fue de entre 40-50% menor respecto a la de los controles, corroborando que esta enzima cataliza la síntesis de UDP-Gal en *E. gracilis*. Cabe recordar que *E. gracilis* presenta dos posibles transcritos para UDP-azúcar PPasa, habiendo sido silenciado sólo uno de ellos, por lo que la fracción de actividad hallada en estas células silenciadas puede deberse a la otra enzima presente en esta microalga. Por otra parte, cuando se midió actividad enzimática utilizando UTP y Glc-1P como sustratos, las muestras silenciadas para esta UDP-azúcar PPasa no presentaron diferencia en la actividad comparada a los controles. Estos resultados son indicativos que en la célula, ante el silenciamiento de la UDP-azúcar PPasa, se generaría una disminución en la producción de UDP-Gal, mientras que la síntesis de UDP-Glc no se vería afectada. Sin embargo, cuando se analizó la acumulación de paramilon en las muestras silenciadas para *EgrUDP-azúcar PPasa*, se observó una ligera disminución en los niveles del β -1,3-glucano acumulados en comparación con el control. Esta baja en los niveles de paramilon resulta llamativo a partir de lo observado en las medidas de actividad enzimática, las que indican que la síntesis de UDP-Glc no se vería afectada por una faltante de esta UDP-azúcar PPasa.

Por lo antes expuesto, se puede considerar que la UDP-Glc PPasa se encargaría de suplir la producción de UDP-Gal y otros UDP-azúcares ante la faltante o deficiencia en la UDP-azúcar PPasa. De este modo, una fracción del carbono disponible en la célula se podría estar direccionando hacia otros destinos diferentes a la síntesis de paramilon, resultando en la disminución de este polímero acumulado en las células silenciadas para la *EgrUDP-azúcar PPasa*. De hecho, en la caracterización cinética de la *EgrUDP-Glc PPasa* presentada en este trabajo de tesis, se mostró que la misma exhibe actividad en presencia de

Gal-1P, siendo la k_{cat} 10 veces menor a la determinada con Glc-1P, aunque con afinidades por ambos sustratos en el mismo orden de magnitud. Por lo tanto, ante una disponibilidad de Gal-1P y una deficiencia en los niveles de UDP-azúcar PPasa, la UDP-Glc PPasa podría estar sintetizando UDP-Gal. Por otra parte, como se muestra en la Figura 46, existe otra vía catalizada por la Gal-1P uridililtransferasa (GalT, EC 2.7.7.12), conocida por pertenecer a la vía de Leloir en el metabolismo de la Gal [103], la cual permitiría la interconversión entre UDP-Gal y UDP-Glc. Este sería otro mecanismo mediante el cual, ante la carencia de una de las enzimas encargadas de la síntesis de un dado UDP-azúcar, el otro se puede interconvertir supliendo así una carencia momentánea.

Por último, para lograr una mayor comprensión respecto a la partición del carbono en *E. gracilis*, así como también conocer respecto a cómo se encuentran involucradas y/o relacionadas la UDP-Glc PPasa y la UDP-azúcar PPasa, se realizó un ensayo de doble silenciamiento por ARNi. Las medidas de actividad enzimática realizadas con Glc-1P como sustrato, sobre los extractos de las muestras tratadas para el doble silenciamiento, presentan un comportamiento similar a la silenciada en forma individual para la UDP-Glc PPasa. Por el contrario, al realizar la medida en presencia de Gal-1P, las células presentando el silenciamiento simultáneo de ambas enzimas, se comporta de manera semejante a las células que presentan el ARNi individual para la UDP-azúcar PPasa. Esto es indicativo que *in vivo*, la Glc-1P sería utilizada principalmente por la UDP-Glc PPasa, direccionándola hacia la síntesis de UDP-Glc, dador glucosídico necesario entre otros destinos para la síntesis del paramilon, compuesto de reserva de carbono en *E. gracilis*. Contrariamente, la Gal-1P presente en la célula sería preferencialmente utilizada por la UDP-azúcar PPasa y en menor medida por la UDP-Glc PPasa, siendo coincidente con los resultados de caracterización cinética *in vitro* obtenidos para la UDP-Glc PPasa. Si ponemos en consideración cómo se ve afectada la acumulación de paramilon en estas muestras, se observa un mayor detrimento en los niveles del β -1,3-glucano sobre la muestra de doble silenciamiento, seguida por el silenciamiento simple de la UDP-Glc PPasa y, se afecta en menor medida, al silenciar la UDP-azúcar PPasa, indicando que la UDP-Glc PPasa se encuentra relacionada de una forma más directa con la síntesis del paramilon. Sin embargo, teniendo en consideración las actividades enzimáticas detectadas en cada una de las versiones silenciadas, es evidente que ante la faltante de una de las enzimas involucradas en la partición de los azúcar-1P, estaría ocurriendo una desviación del destino “normal” del UDP-azúcar producido por cada una de estas enzimas, hacia una compensación en el faltante UDP-azúcar respectivo, repercutiendo así en la cantidad final de carbono acumulado. En el caso del doble silenciamiento, como se mencionó previamente, la

disminución del paramilon acumulado fue mayor al silenciamiento simple de la UDP-Glc PPasa, resultado esperable al considerar que ambas enzimas se verían afectadas y no podría existir la compensación que se observa ante los silenciamientos individuales. Estos resultados indican que estas PPasas de *E. gracilis* estudiadas en este trabajo de tesis, están involucradas y encargadas de alimentar vías metabólicas diferenciales. Además, lo hasta aquí exhibido, indica que ante el caso particular de la deficiencia de alguna de ellas, la otra estaría sintetizando el UDP-azúcar en defecto, direccionando una fracción del carbono a suplir el metabolito faltante, resultando provechoso para la célula ya que le permite mantener el metabolismo celular.

Una vez obtenida la UDP-Glc, este metabolito puede ser utilizado para diferentes vías, entre ellas, puede dirigirse hacia la síntesis de ácido ascórbico, la producción de oligo- y polisacáridos, interconversión entre azúcares y la síntesis de paramilon como se muestra en la Figura 46. La síntesis de paramilon sería el principal destino de este “azúcar activado”, el cual será utilizado por la *EgrPS* como sustrato para dar lugar a la síntesis del polímero de reserva. Esta enzima se ha caracterizado a partir de fuente por Marechal y Goldemberg, trabajo en el que demostraron que la UDP-Glc es sustrato preferencial de esta enzima [65, 67], siendo la misma una proteína con varios dominios de transmembrana que la mantienen anclada en la membrana que rodea al gránulo de paramilon [60, 157]. El diseño de una herramienta de marcación subcelular basada en la *EgrPS*, para la cual se conoce su ubicación en la célula, resulta de gran interés para la identificación de otras posibles proteínas que estén involucradas en la síntesis o la degradación del β -1,3-glucano de reserva en *E. gracilis*. En este contexto, se procedió a la obtención del principal dominio soluble de la *EgrPS2*, un fragmento de 600 aa que fue utilizado para la expresión recombinante y posterior purificación, con la finalidad de utilizarlo como antígeno en la producción de anticuerpos policlonales, que posteriormente serían utilizados como marcadores celulares en fraccionamientos subcelulares y en ensayos de microscopía confocal. De la utilización de estos anticuerpos se podrían realizar diferentes ensayos a partir de los cuales se les podría asignar ubicaciones específicas a posibles proteínas incógnitas en estudio, involucradas con el metabolismo del paramilon. Si se pone en consideración el amplio rango de utilidades encontradas al paramilon, desde la producción de biomateriales como plásticos con propiedades mecánicas y térmicas diferenciales a los obtenidos con otros polisacáridos, hasta las propiedades benéficas como inmunoestimulantes, entre otros, llevan a la necesidad de una mejor comprensión respecto a la síntesis y degradación del mismo. Por esto es necesaria la identificación de las proteínas involucradas y conocer su

regulación, lo que permitiría en un futuro, mediante ingeniería genética y metabólica, optimizar la síntesis y acumulación de este β -1,3-glucano o, ante la necesidad de direccionar el carbono hacia otro compuesto como la producción de ceras, estimular su despolimerización, potenciando así el desarrollo biotecnológico de *E. gracilis*.

En el sentido de profundizar en el entendimiento del metabolismo del paramilon en *E. gracilis*, se han podido identificar un gran repertorio de β -1,3-glucanasas a partir de los trabajos de transcriptomas [85, 87], que pertenecen a diversas familias de GH (1, 2, 3, 5, 17, 30, 55, 64, 81, 194). Entre las cuales, se encontraron una o más enzimas representantes de cada familia, totalizando al menos 68 enzimas, que incluyen a endo- y exo- β -1,3-glucanasas, β -glucosidasas y β -fosforilasas en esta microalga [85, 90]. Se sabe que para lograr una completa degradación de polímeros como el paramilon es necesario un consorcio de diferentes enzimas, en las que intervienen las endo- y exo- β -1,3-glucanasas generando fragmentos más pequeños de β -1,3-glucanos, que luego son sustrato para otras enzimas como las β -glucosidasas que dan lugar a la liberación de las unidades de Glc, o las β -fosforilasas que dan lugar a la producción de unidades de Glc-1P como producto de la reacción [227].

En este trabajo de tesis se generó particular interés en enzimas del tipo endo- β -1,3-glucanasas, particularmente de la familia GH17. A partir de su secuencia aminoacídica, mediante síntesis *de novo*, se obtuvo la secuencia codificante de una *EgrGH17* con los codones optimizados para la expresión en *E. coli*. Esta estrategia permitió la expresión de forma recombinante y purificación mediante cromatografía IMAC-Ni²⁺ a homogeneidad electroforética, con la cual se procedió a la caracterización y determinación de los parámetros cinéticos. Además de utilizar el paramilon como sustrato para la caracterización, se realizaron las determinaciones utilizando laminarina, un β -1,3-glucano soluble, a diferencia del paramilon que es insoluble en medio acuoso. Dada esta diferencia en la solubilidad respecto del paramilon, y por su similitud, la laminarina ha sido utilizada eficientemente para la caracterización de diferentes β -1,3-glucanasas y permite independizarse de posibles artefactos que puedan deberse a la utilización de un sustrato insoluble [159, 224–226]. En particular, la *EgrGH17* presentó actividad con ambos sustratos, exhibiendo mayor afinidad por la laminarina (1,5 veces mayor) que el paramilon, con un valor de k_{cat} 3 veces superior por el primero. Este resultado puede deberse principalmente a la disponibilidad del sustrato: la laminarina, al encontrarse en solución, es fácilmente accesible por la enzima, mientras que en el caso del paramilon al ser insoluble, la interacción de la enzima con el mismo resulta menos eficiente.

En los últimos años, la utilización de dominios de unión a carbohidratos (CBM) se ha vuelto recurrente en el campo de la biotecnología como herramienta para varias aplicaciones, dadas las ventajas que presentan por ser dominios independientes del plegamiento de las proteínas, facilitando su fusión a diversas proteínas en la producción de quimeras, sumada a la alta especificidad de unión presentada por algunos CBMs [232]. En este contexto, se realizó la adición de un CBM a la *EgrGH17* con especificidad por β -1,3-glucanos, con la hipótesis de que este dominio aumentaría la interacción con el paramilon, incrementando así la afinidad por este sustrato y la catálisis. Los resultados obtenidos de la caracterización de la *EgrGH17*-CBM no apoyaron la hipótesis planteada, ya que no se logró aumentar la afinidad por el paramilon, así como tampoco la máxima actividad obtenida. Resulta crítico ensayar otros CBMs específicos por β -1,3-glucanos con el fin de profundizar el estudio y avanzar en la optimización de la eficiencia de esta enzima en la degradación *in vitro* del paramilon.

Además de los ensayos *in vitro* realizados con la enzima recombinante, se determinó actividad β -1,3-glucanasa en extractos de células de *E. gracilis* crecidas en diferentes condiciones. Los resultados mostraron que no hay mayores variaciones a lo largo del día, en un periodo de 24 h, en cultivos que se encuentran en condición autotrófica de crecimiento con un ciclo de luz/oscuridad de 16/8 h, manteniéndose constante la actividad β -1,3-glucanasa tanto en momentos de luz como de oscuridad. Dada la cantidad de β -1,3-glucanasas presentes en la célula de *E. gracilis*, no es posible atribuir la actividad enzimática a una única enzima. Por tal motivo, con la finalidad de distinguir a la GH17 en estudio del resto de la mezcla de β -1,3-glucanasas, se realizó un ensayo de inmunodetección sobre las mismas muestras, en el que se pudo comprobar que la *EgrGH17* se mantiene constante a lo largo del ciclo, indicando que no es regulada a nivel transcripcional por el ciclo luz/oscuridad. Contrariamente al resultado obtenido en condiciones autotróficas, al analizar esta actividad en el cultivo heterotrófico en oscuridad y utilizando Glc como fuente de carbono, no fue posible detectar actividad β -1,3-glucanasa, como así tampoco se pudo detectar señal al realizar ensayos de inmunodetección sobre estos mismos extractos. Estos resultados indican que existiría una regulación en la expresión de las β -1,3-glucanasas en las células de *E. gracilis*, particularmente de la *EgrGH17* estudiada, que es dependiente de la condición de cultivo.

En búsqueda de una mejor comprensión sobre la funcionalidad de la presente GH17 evaluada en este trabajo de tesis, se realizaron ensayos de ARNi para esta enzima en cultivos autotróficos de *E. gracilis*. Sobre las muestras tratadas se detectó una disminución de un 20% de la actividad enzimática respecto del control, lo cual se considera una elevada proporción

dato el amplio repertorio de β -1,3-glucanasas presentes en *E. gracilis*, indicando que esta *EgrGH17* tendría un rol importante en la célula. Al analizar la acumulación de paramilon, sería esperable encontrar un ligero incremento en la acumulación de este β -1,3-glucano respecto a los controles, considerando la disminución producida en la actividad β -1,3-glucanasa, lo que influenciaría en la capacidad de la célula de movilizar el carbono asimilado en forma de paramilon. Sin embargo, contrariamente a lo hipotetizado, se observó una disminución en los niveles de paramilon de aproximadamente un 20% en los primeros 15 días del *knockdown* transiente, y a medida que transcurre el tiempo tiende a normalizarse respecto del control. Estos resultados dan lugar a nuevos interrogantes por responder con el objetivo de comprender cuál es el fenómeno que conduce a una menor acumulación de paramilon ante la disminución de una β -1,3-glucanasa. Es necesario profundizar en los estudios respecto de otras β -1,3-glucanasas en *E. gracilis* para comprender si esta disminución en la acumulación de paramilon está relacionada a una menor asimilación de carbono por parte de la célula, o si existe una desviación del carbono asimilado hacia la síntesis de otros compuestos que puedan actuar de reserva transitoria, ante la disminución en la capacidad de la célula de movilizar rápidamente el carbono acumulado como β -1,3-glucano frente a las necesidades fisiológicas propias de la célula.

Actualmente existe un creciente interés en la explotación comercial de *E. gracilis*, basado en la versatilidad, flexibilidad y capacidad de este organismo para sintetizar una amplia y única gama de bioproductos. Se ha determinado que la generación de estos productos es cultivo dependiente y son valiosos para su aplicación en diversas áreas tanto a nivel nutricional y biomedicina, como también en la generación de biocombustibles y diversos biomateriales. La biomasa de microalgas, como *E. gracilis*, es considerada la materia prima de los combustibles de tercera generación, no solo por su contenido de lípidos potencialmente elevado, sino también por las grandes cantidades de carbohidratos complejos que pueden producir. Sin embargo, hasta el momento los biocombustibles derivados de microalgas no son económicamente rentables en comparación con los combustibles fósiles, debido a su alto costo de producción.

Aunque la producción de biocombustibles a partir de la biomasa de *E. gracilis* aún no es rentable, los rendimientos de carbohidratos y lípidos en esta microalga podrían ser incrementados mediante nuevas tecnologías de cultivo y enfoques de ingeniería metabólica. En este contexto, el análisis realizado tanto a nivel *in vitro* como *in vivo* en este trabajo de tesis, permite hacer inferencias respecto a la partición del carbono, la síntesis de diferentes compuestos de reserva y su correlación con el contexto metabólico en esta microalga de interés biotecnológico. Así, el conocimiento generado en *E. gracilis* permite el diseño de futuras

herramientas biotecnológicas, mediante la utilización de ingeniería genética y metabólica, que permitan un mayor aprovechamiento de este microorganismo a nivel industrial. De esta forma podría proveerse de una alternativa rentable a los combustibles fósiles en el futuro cercano, así como también generar un incremento en la obtención de estos bioproductos con alto valor agregado sintetizados por *E. gracilis*.

6. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta tesis han permitido arribar a las siguientes conclusiones, que se detallan a continuación:

✓ Se generó el conocimiento respecto a la manipulación, caracterización y utilización de los cultivos de *E. gracilis* en nuestro laboratorio, así como también el desarrollo de diferentes herramientas para el uso de esta microalga como modelo de estudio. En particular:

- Se evaluó el comportamiento de *E. gracilis* crecida en condiciones autotróficas, heterotróficas y mixotróficas. En cada una de ellas se determinaron las condiciones óptimas de medios de cultivo, tiempos de duplicación, periodos de luz/oscuridad e intensidad lumínica.

- Se evaluaron los compuestos de reserva almacenados en esta microalga crecidas en las diferentes condiciones. Se cuantificaron los niveles de paramilon, principal reserva de carbono, y su movilización hacia la producción de ceras en ausencia de oxígeno y fuente de carbono externa. Además, se determinaron las características de las ceras acumuladas mediante análisis de cromatografía gaseosa. Todo esto, implicó la puesta a punto y adaptación de las diversas técnicas utilizadas para la medición y cuantificación de los compuestos de reserva de carbono.

- Se puso a punto la extracción de ARN total a partir de células de *E. gracilis* crecidas en diversas condiciones, seguida de retro-transcripción y PCR, para la amplificación de genes específicos, codificantes para proteínas de interés estudiadas en esta tesis.

- Se optimizó el ensayo de localización subcelular mediante microscopía confocal para *E. gracilis*, para la detección de las enzimas en estudio, mediante la utilización de anticuerpos específicos.

- Se realizó la puesta a punto de la técnica de silenciamiento mediante ARN de interferencia en *E. gracilis*, siendo la primera vez que se utiliza esta técnica para esta microalga en nuestro grupo de trabajo.

✓ A modo general, se profundizó en el estudio de las propiedades cinéticas, regulatorias y estructurales de enzimas involucradas en la partición del carbono en *E. gracilis*. El presente trabajo de tesis contribuye a incrementar el conocimiento sobre las propiedades funcionales y estructurales de la UDP-Glc PPasa y la UDP-azúcar PPasa de *E. gracilis*. Las conclusiones puntuales respecto a los estudios realizados con estas diferentes enzimas son las siguientes:

- Se caracterizó cinéticamente la UDP-Glc PPasa presente en *E. gracilis* obtenida en forma recombinante. La misma catalizó la reacción de síntesis de UDP-Glc, utilizando Glc-1P

y UTP como sustratos, con una eficiencia notablemente superior al resto de las UDP-Glc PPasas eucariotas caracterizadas. Presenta una estructura funcional del tipo monomérica, coincidente con la enzima proveniente de protozoos y plantas previamente estudiadas. Un análisis regulatorio, indicó que la *Egr*UDP-Glc PPasa no es regulada de forma alostérica, aunque sí se regula de manera redox, tanto *in vitro* como *in vivo*, disminuyendo su actividad en un entorno oxidante y formando diferentes tipos de agregados proteicos, lo cual se revierte ante la adición de un agente reductor.

Además, se realizó un análisis de esta UDP-Glc PPasa *in vivo*, sobre extractos de *E. gracilis* crecidos en condiciones autotróficas. Los resultados indican que no existen mayores variaciones en los niveles de expresión de esta enzima (analizado por western-blot), así como tampoco en los valores de actividad encontrados, durante el ciclo de luz/oscuridad. Se determinó, mediante ensayos de localización sub-celular con microscopía confocal, que la *Egr*UDP-Glc PPasa se encuentra en el citosol, y presenta una elevada señal en el flagelo celular.

Por su parte, se llevó a cabo el silenciamiento de esta UDP-Glc PPasa mediante ARNi, disminuyendo así los niveles de enzima presente en las células de *E. gracilis*. Los resultados indican que el silenciamiento fue exitoso, generando una disminución en un orden de magnitud en la actividad UDP-Glc PPasa, respecto al control, y una pérdida total en la detección de la enzima evaluada mediante western-blot. Esto vino acompañado por una disminución de un 70% en los niveles de paramilon cuantificados en estas células silenciadas, respecto al control. El remanente tanto en actividad, como en cantidades del β -1,3-glucano acumulado en estas células silenciadas para la *Egr*UDP-Glc PPasa, nos estaría indicando la posibilidad de que *E. gracilis* presente otras enzimas capaces de catalizar alternativamente esta reacción y/o proveer las unidades de UDP-Glc necesarias para la síntesis de este polímero de reserva, cuando las células están en ausencia de la *Egr*UDP-Glc PPasa.

- Se logró amplificar, a partir del ADNc proveniente del ARNm extraído de *E. gracilis*, y expresar en forma recombinante, una de las dos secuencias codificantes para UDP-azúcar PPasa en esta microalga. Sin embargo, no se pudo detectar actividad enzimática en esta enzima así expresada, lo que impidió poder realizar su caracterización cinética *in vitro*. En este sentido, se realizó la evaluación de la funcionalidad de la *Egr*UDP-azúcar PPasa *in vivo*, mediante su silenciamiento a través de ARNi. Los resultados exhiben que esta enzima cataliza la formación de UDP-Gal, ya que las células silenciadas mostraron una disminución de un 40% en la actividad medida con Gal-1P como sustrato, mientras que cuando la medida se realizó con Glc-1P, la actividad permaneció prácticamente constante, respecto al control. La acumulación de paramilon en estas células silenciadas para la *Egr*UDP-azúcar PPasa, exhibió una

disminución de alrededor de un 25%, respecto al control. Estos resultados estarían indicando una leve influencia de esta UDP-azúcar PPasa en la generación del polímero de reserva en *E. gracilis*.

- Se llevó a cabo un doble silenciamiento mediante ARNi para la *Egr*UDP-Glc PPasa y la *Egr*UDP-azúcar PPasa en forma simultánea. La actividad medida en presencia de Gal-1P y UTP en la doble silenciada fue levemente menor a las células silenciadas de manera individual. Por su parte, cuando la actividad se determinó con Glc-1P y UTP, los valores de actividad de la doble silenciada prácticamente no presentan diferencias respecto a la silenciada para *Egr*UDP-Glc PPasa. La acumulación de paramilon en *E. gracilis* con ambas enzimas silenciadas en forma simultánea, fueron levemente menores a los niveles medidos para las células silenciadas en forma individual. Estos resultados corroboran *in vivo*, la importancia de la UDP-Glc PPasa para la vía de síntesis de paramilon. Además indican una posible conexión entre ambas PPasas estudiadas, donde ante la falta o disminución de una de ellas, la otra podría estar compensando su actividad. Esto teniendo en cuenta además, la capacidad de la *Egr*UDP-Glc PPasa de utilizar Gal-1P como sustrato, determinada mediante su caracterización *in vitro*.

✓ Además de evaluar enzimas involucradas en la partición del carbono en *E. gracilis*, se profundizó en el estudio respecto a la enzima encargada de la síntesis del paramilon, así como también una de las encargadas de su degradación y movilización:

- La paramilon sintasa es la enzima encargada de la síntesis del polímero β -1,3-glucano, y en *E. gracilis* existirían dos secuencias codificantes para esta enzima. La misma presenta 16 dominios transmembrana, por lo que hasta el momento no se ha logrado la obtención recombinante de esta enzima en forma completa para su caracterización. Se planteó el objetivo de producir anticuerpos policlonales contra esta enzima y así utilizarlos como herramienta de localización sub-celular. Para esto se expresó en forma recombinante en células de *E. coli*, el dominio soluble principal de una de estas dos paramilon sintasas (*Egr*PS2). Se realizaron anticuerpos en ratón, con los que se evaluó el título y especificidad al reconocimiento de la paramilon sintasa en extractos de *E. gracilis*.

- Se obtuvo en forma recombinante, en células de *E. coli*, la β -1,3-glucanasa GH17. Su caracterización cinética mostró que esta enzima posee la capacidad de hidrolizar el polímero β -1,3-glucano produciendo un aumento en el número de extremos reductores a partir del sustrato soluble laminarina (polímero soluble de Glc unido β -1,3), así como también con paramilon. Con éste último, presentó una actividad 3 veces menor y una afinidad menor por el

mismo, lo cual podría justificarse por la insolubilidad presentada por este sustrato en solución acuosa. En este sentido se expresó, también en forma recombinante, la *EgrGH17* fusionada a un dominio de unión a carbohidratos (CBM), planteando la hipótesis de que su presencia aumentaría la unión al paramilon insoluble, incrementando así la catálisis de GH17 con este sustrato. Sin embargo, los resultados indican que la presencia de este CBM no produjo cambios en la actividad o afinidad de GH17 con paramilon. Un análisis *in vivo*, sobre extractos de *E. gracilis*, exhibió que la expresión de esta enzima varía dependiendo la condición de cultivo, siendo indetectable su actividad en células crecidas en condición heterotrófica con el agregado de Glc como fuente de carbono.

- Se evaluaron células de *E. gracilis* silenciadas para GH17, mediante ARNi. Los resultados indican que la actividad β -1,3-glucanasa medida en estas células fue un 15-20% menor en comparación con el control. Al mismo tiempo, las variaciones en el contenido de paramilon fue menor respecto al control, contrariamente a lo esperado. Por otra parte, la disminución en un 20% de esta actividad glucanasa medida en estas células silenciadas para GH17, indicarían que esta β -1,3-glucanasa en estudio representaría una parte importante del conjunto de β -1,3-glucanasas presentes a nivel celular.

En conjunto, los resultados de este trabajo de tesis, proporcionan un importante aporte al entendimiento del metabolismo del carbono en *E. gracilis*. Al mismo tiempo, exhibe la generación de un gran número de herramientas para la utilización y manipulación de esta microalga de interés biotecnológico, con implicancias en la generación de herramientas para su utilización bioindustrial.

7. BIBLIOGRAFIA

- [1] RE Leakey (2008) Introducción, En: *El origen de las especies. Carlos Darwin*, Editorial Porrúa.
- [2] B Alberts, A Johnson, J Lewis, M Raff, K Roberts, W Peter (2004) *Biología molecular de la célula*. Ediciones Omega.
- [3] G Wächtershäuser (2006) From volcanic origins of chemoautotrophic life to Bacteria, Archaea and Eukarya. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 361 (1474) p. 1787–1808.
- [4] G Wächtershäuser (2007) On the Chemistry and Evolution of the Pioneer Organism. *Chem. Biodivers.* 4 (4) p. 584–602.
- [5] RJP Williams (2007) A system's view of the evolution of life. *J. R. Soc. Interface* 4 (17) p. 1049–1070.
- [6] SD Dyall, MT Brown, PJ Johnson (2004) Ancient Invasions: From Endosymbionts to Organelles. *Science* 304 (5668) p. 253–257.
- [7] B Halliwell (2006) Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* 141 (2) p. 312–322.
- [8] I Ślesak, M Libik, B Karpinska, S Karpinski, Z Miszalski (2007) The role of hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism and cellular signalling in response to environmental stresses. *Acta Biochim. Pol.* 54 (1) p. 39–50.
- [9] S Mora-Garcia, FG Stolorowicz, RA Wolosiuk (2006) Redox signal transduction in plant metabolism, En: *Control of primary metabolism in plants*, (Ed.: WC Plaxton, MT McManus) Blackwell Publishing Ltd, p. 150–186.
- [10] JF Kasting, JL Siefert (2002) Life and the evolution of Earth's atmosphere. *Science* 296 (5570) p. 1066–1068.
- [11] JF Kasting (2001) The Rise of Atmospheric Oxygen. *Science* 293 (5531) p. 819–820.
- [12] RA Anderson (1996) Algae, En: *Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry*, (Ed.: JC Hunter-Cevera, A Belt) Academic Press, p. 29–64.
- [13] PO Wainright, G Hinkle, ML Sogin, SK Stickel (1993) Monophyletic origins of the metazoa: An evolutionary link with fungi. *Science* 260 (5106) p. 340–342.
- [14] J Hecht (1993) Animals and fungi are closer than anyone expected. *New Sci.* (1877) p. 1–16.
- [15] M Rogers, PJ Keeling (2004) Lateral Transfer and Recompartmentalization of Calvin Cycle Enzymes of Plants and Algae. *J. Mol. Evol.* 58 (4) p. 367–375.
- [16] EV Armbrust, JA Berges, C Bowler, BR Green, D Martinez, NH Putnam, S Zhou, AE

- Allen, KE Apt, M Bechner, MA Brzezinski, BK Chaal, A Chiovitti, AK Davis, MS Demarest, JC Detter, T Glavina, D Goodstein, MZ Hadi, U Hellsten, M Hildebrand, BD Jenkins, J Jurka, V V. Kapitonov, N Kröger, WWY Lau, TW Lane, FW Larimer, JC Lippmeier, S Lucas, M Medina, A Montsant, M Obornik, MS Parker, B Palenik, GJ Pazour, PM Richardson, TA Ryneerson, MA Saito, DC Schwartz, K Thamatrakoln, K Valentin, A Vardi, FP Wilkerson, DS Rokhsar (2004) The genome of the diatom *Thalassiosira Pseudonana*: Ecology, evolution, and metabolism. *Science* 306 (5693) p. 79–86.
- [17] V Hannaert, F Bringaud, FR Opperdoes, PA Michels (2003) Evolution of energy metabolism and its compartmentation in Kinetoplastida. *Kinetoplastid Biol. Dis.* 2 (1) p. 1–30.
- [18] V Hannaert, E Saavedra, F Duffieux, J-P Szikora, DJ Rigden, PAM Michels, FR Opperdoes (2003) Plant-like traits associated with metabolism of Trypanosoma parasites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (3) p. 1067–71.
- [19] SP Gibbs (1978) The chloroplasts of *Euglena* may have evolved from symbiotic green algae. *Can. J. Bot.* 56 (22) p. 2883–2889.
- [20] BS Leander (2004) Did trypanosomatid parasites have photosynthetic ancestors? *Trends Microbiol.* 12 (6) p. 251–258.
- [21] E Uggetti, B Sialve, E Trably, J-P Steyer (2014) Integrating microalgae production with anaerobic digestion: a biorefinery approach. *Biofuels, Bioprod. Biorefining* 8 (4) p. 516–529.
- [22] T Cavalier-Smith (1981) Eukaryote kingdoms: Seven or nine? *Biosystems* 14 (3–4) p. 461–481.
- [23] DE Buetow (2011) *Euglena*, En: *Encyclopedia of Life Sciences*, John Wiley & Sons, Ltd.
- [24] M Turmel, M-C Gagnon, CJ O’Kelly, C Otis, C Lemieux (2009) The Chloroplast Genomes of the Green Algae *Pyramimonas*, *Monomastix*, and *Pycnococcus* Shed New light on the Evolutionary History of Prasinophytes and the Origin of the Secondary Chloroplasts of Euglenids. *Mol. Biol. Evol.* 26 (3) p. 631–648.
- [25] KE Wiegert, MS Bennett, RE Triemer (2012) Evolution of the Chloroplast Genome in Photosynthetic Euglenoids: A Comparison of *Eutreptia viridis* and *Euglena gracilis* (Euglenophyta). *Protist* 163 (6) p. 832–843.
- [26] LA Lewis, RM McCourt (2004) Green algae and the origin of land plants. *Am. J. Bot.* 91 (10) p. 1535–1556.
- [27] HS Yoon, JD Hackett, C Ciniglia, G Pinto, D Bhattacharya (2004) A Molecular Timeline

- for the Origin of Photosynthetic Eukaryotes. *Mol. Biol. Evol.* 21 (5) p. 809–818.
- [28] RE Triemer, B Zakryś (2015) Photosynthetic Euglenoids, En: *Freshwater Algae of North America*, 2nd ed., (Ed.: JD Wehr, RG Sheath, JP Kociolek) Academic Press, p. 459–483.
- [29] JZ Kiss, AC Vasconcelos, RE Triemer (1987) Structure of the Euglenoid Storage Carbohydrate, Paramylon. *Am. J. Bot.* 74 (6) p. 877–882.
- [30] B Zakryś, R Milanowski, A Karnkowska (2017) Evolutionary Origin of Euglena, En: *Euglena: Biochemistry, Cell and Molecular Biology. Advances in Experimental Medicine and Biology*, (Ed.: SD Schwartzbach, S Shigeoka) Springer, Cham, p. 3–17.
- [31] AGB Simpson (1997) The identity and composition of the Euglenozoa. *Arch. für Protistenkd.* 148 (3) p. 318–328.
- [32] RE Triemer, MA Farmer (1991) An ultrastructural comparison of the mitotic apparatus, feeding apparatus, flagellar apparatus and cytoskeleton in euglenoids and kinetoplastids. *Protoplasma* 164 (1–3) p. 91–104.
- [33] D Dooijes, I Chaves, R Kieft, A Dirks-Mulder, W Martin, P Borst (2000) Base J originally found in Kinetoplastida is also a minor constituent of nuclear DNA of *Euglena gracilis*. *Nucleic Acids Res.* 28 (16) p. 3017–3021.
- [34] L Bonen (1993) Trans-splicing of pre-mRNA in plants, animals, and protists. *FASEB J.* 7 (1) p. 40–46.
- [35] X Liang, A Haritan, S Uliel, S Michaeli (2003) trans and cis splicing in trypanosomatids: mechanism, factors, and regulation. *Eukaryot. Cell* 2 (5) p. 830–40.
- [36] T Cavalier-Smith (2002) The phagotrophic origin of eukaryotes and phylogenetic classification of Protozoa. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52 (2) p. 297–354.
- [37] T Cavalier-Smith (2010) Kingdoms Protozoa and Chromista and the eozoan root of the eukaryotic tree. *Biol. Lett.* 6 (3) p. 342–345.
- [38] EC O'Neill, M Trick, B Henrissat, RA Field (2015) *Euglena* in time: Evolution, control of central metabolic processes and multi-domain proteins in carbohydrate and natural product biochemistry. *Perspect. Sci.* 6 p. 84–93.
- [39] EW Linton, A Karnkowska-Ishikawa, JI Kim, W Shin, MS Bennett, J Kwiatowski, B Zakryś, RE Triemer (2010) Reconstructing Euglenoid Evolutionary Relationships using Three Genes: Nuclear SSU and LSU, and Chloroplast SSU rDNA Sequences and the Description of *Euglenaria* gen. nov. (Euglenophyta). *Protist* 161 (4) p. 603–619.
- [40] LW Parfrey, DJG Lahr, AH Knoll, LA Katz (2011) Estimating the timing of early eukaryotic diversification with multigene molecular clocks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 (33) p. 13624–13629.

- [41] S Maruyama, T Suzaki, AP Weber, JM Archibald, H Nozaki (2011) Eukaryote-to-eukaryote gene transfer gives rise to genome mosaicism in euglenids. *BMC Evol. Biol.* 11 (105) p. 1–11.
- [42] W Martin, CC Somerville, S Loiseaux-de Goër (1992) Molecular phylogenies of plastid origins and algal evolution. *J. Mol. Evol.* 35 (5) p. 385–404.
- [43] Y Chisti (2007) Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* 25 (3) p. 294–306.
- [44] P Spolaore, C Joannis-Cassan, E Duran, A Isambert (2006) Commercial applications of microalgae. *J. Biosci. Bioeng.* 101 (2) p. 87–96.
- [45] AI Stern, JA Schiff, HP Klein (1960) Isolation of Ergosterol from *Euglena gracilis*; Distribution Among Mutant Strains*. *J. Protozool.* 7 (1) p. 52–55.
- [46] ER Baker, JJA McLaughlin, SH Hutner, B DeAngelis, S Feingold, O Frank, H Baker (1981) Water-soluble vitamins in cells and spent culture supernatants of *Poterochromonas stipitata*, *Euglena gracilis*, and *Tetrahymena thermophila*. *Arch. Microbiol.* 129 (4) p. 310–313.
- [47] JC Ogonna, S Tomiyama, H Tanaka (1998) Heterotrophic cultivation of *Euglena gracilis* Z for efficient production of α -tocopherol. *J. Appl. Phycol.* 10 (1) p. 67–74.
- [48] A Sugiyama, K Suzuki, S Mitra, R Arashida, E Yoshida, R Nakano, Y Yabuta, T Takeuchi (2009) Hepatoprotective Effects of Paramylon, a β -1, 3-D-Glucan Isolated from *Euglena gracilis* Z, on Acute Liver Injury Induced by Carbon Tetrachloride in Rats. *J. Vet. Med. Sci.* 71 (7) p. 885–890.
- [49] A Sugiyama, S Hata, K Suzuki, E Yoshida, R Nakano, S Mitra, R Arashida, Y Asayama, Y Yabuta, T Takeuchi (2010) Oral Administration of Paramylon, a β -1,3-D-Glucan Isolated from *Euglena gracilis* Z Inhibits Development of Atopic Dermatitis-Like Skin Lesions in NC/Nga Mice. *J. Vet. Med. Sci.* 72 (6) p. 755–763.
- [50] T Watanabe, R Shimada, A Matsuyama, M Yuasa, H Sawamura, E Yoshida, K Suzuki (2013) Antitumor activity of the β -glucan paramylon from *Euglena* against preneoplastic colonic aberrant crypt foci in mice. *Food Funct.* 4 (11) p. 1–21.
- [51] ES Kempner (1982) Stimulation and inhibition of the metabolism and growth of *Euglena gracilis*, En: *The Biology of EUGLENA*, Physiology., (Ed.: DE Buetow) Academic Press, p. 197–252.
- [52] J Krajčovič, Matej Vesteg, SD Schwartzbach (2015) Euglenoid flagellates: A multifaceted biotechnology platform. *J. Biotechnol.* 202 p. 135–145.
- [53] Y Kitaya, S Kibe, M Oguchi, H Tanaka, K Miyatake, Y Nakano (1998) Effects of CO₂ and O₂ Concentrations and Light Intensity on Growth of Microalgae (*Euglena gracilis*)

- in cells. *Life Support Biosph. Sci.* 5 (2) p. 243–247.
- [54] K Suzuki (2017) Large-Scale Cultivation of *Euglena*, En: *Euglena: Biochemistry, Cell and Molecular Biology. Advances in Experimental Medicine and Biology*, (Ed.: SD Schwartzbach, S Shigeoka) Springer, Cham, p. 285–293.
- [55] D-P Häder, M Iseki (2017) Photomovement in *Euglena*, En: *Euglena: Biochemistry, Cell and Molecular Biology. Advances in Experimental Medicine and Biology*, (Ed.: SD Schwartzbach, S Shigeoka) Springer, Cham, p. 207–235.
- [56] GF Leedale (1982) Ultrastructure, En: *The Biology of EUGLENA, Physiology.*, (Ed.: DE Buetow) Academic Press, p. 1–27.
- [57] RE Lee (2008) Euglenophyta, En: *Phycology*, 4th ed., (Ed.: RE Lee) Cambridge University Press, p. 245–261.
- [58] DR Barras, BA Stone (1968) Carbohydrate composition and metabolism in *Euglena*, En: *The Biology of EUGLENA, Physiology.*, (Ed.: DE Buetow) Academic Press, p. 149–191.
- [59] J Gottlieb (1850) Ueber eine neue, mit Stärkmehl isomere Substanz; *Ann. der Chemie und Pharm.* 75 (1) p. 51–61.
- [60] D Bäumer, A Preisfeld, HG Ruppel (2001) Isolation and Characterization of Paramylon Synthase from *Euglena gracilis* (Euglenophyceae). *J. Phycol.* 37 p. 38–46.
- [61] BA Stone (2009) Chemistry of Beta-Glucans, En: *Chemistry, Biochemistry and Biology of 1,3-Beta-Glucans and Related Polysaccharides*, (Ed.: A Bacic, GB Fincher, BA Stone) Academic Press, p. 5–46.
- [62] RH Marchessault, Y Deslandes (1979) Fine structure of (1→3)-β-d-glucans: curdlan and paramylon. *Carbohydr. Res.* 75 p. 231–242.
- [63] JZ Kiss, AC Vasconcelos, RE Triemer (1988) The Intramembranous Particle Profile of the Paramylon Membrane During Paramylon Synthesis in *Euglena* (Euglenophyceae). *J. Phycol.* 24 (2) p. 152–157.
- [64] JZ Kiss, AC Vasoconcelos, RE Triemer (1986) Paramylon Synthesis and Chloroplast Structure Associateed with Nutrient Levels in *Euglena* (Euglenophyceae). *J. Phycol.* 22 (3) p. 327–333.
- [65] LR Marechal, SH Goldemberg (1964) Uridine Diphosphate Glucose-Beta-1,3-Glucan Beta-3-Glucosyltransferase from *Euglena gracilis*. *J. Biol. Chem.* 239 (10) p. 3163–3167.
- [66] L Barsanti, R Vismara, V Passarelli, P Gualtieri (2001) Paramylon (β-1,3-glucan) content in wild type and WZSL mutant of *Euglena gracilis*. Effects of growth conditions. *J. Appl. Phycol.* 13 (1) p. 59–65.
- [67] SH Goldemberg, LR Marechal (1963) Biosynthesis of paramylon in *Euglena gracilis*.

- Biochim. Biophys. Acta* 71 p. 743–744.
- [68] JZ Kiss, EM Roberts, RM Brown, RE Triemer (1988) X-ray and dissolution studies of paramylon storage granules from *Euglena*. *Protoplasma* (2–3) p. 150–156.
- [69] F Matsuda, M Hayashi, A Kondo (2011) Comparative Profiling Analysis of Central Metabolites in *Euglena gracilis* under Various Cultivation Conditions. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 75 (11) p. 2253–2256.
- [70] K Miyatake, T Enomoto, S Kitaoka (1984) Detection and Subcellular Distribution of Pyrophosphate: D -Fructose 6-Phosphate Phosphotransferase (PFP) in *Euglena gracilis*. *Agric. Biol. Chem.* 48 (11) p. 2857–2859.
- [71] S Tucci, R Vacula, J Krajcovic, P Proksch, W Martin (2010) Variability of Wax Ester Fermentation in Natural and Bleached *Euglena gracilis* Strains in Response to Oxygen and the Elongase Inhibitor Flufenacet. *J. Eukaryot. Microbiol.* 57 (1) p. 63–69.
- [72] P Teerawanichpan, X Qiu (2010) Fatty Acyl-CoA Reductase and Wax Synthase from *Euglena gracilis* in the Biosynthesis of Medium-Chain Wax Esters. *Lipids* 45 (3) p. 263–273.
- [73] H Inui, K Miyatake, Y Nakano, S Kitaoka (1982) Wax ester fermentation in *Euglena gracilis*. *FEBS Lett.* 150 (1) p. 89–93.
- [74] T Osafune, S Sumida, T Ehara, N Ueno, E Hase, JA Schiff (1990) Lipid (wax) and Paramylum as Sources of Carbon and Energy for the Early Development of Proplastids in Dark-Grown *Euglena gracilis* Cells Transferred to an Inorganic Medium. *J. Electron Microsc.* 39 (5) p. 372–381.
- [75] H Inui, K Miyatake, Y Nakano, S Kitaoka (1992) Synthesis of reserved polysaccharide from wax esters accumulated as the result of anaerobic energy generation in *Euglena gracilis* returned from anaerobic to aerobic conditions. *Int. J. Biochem.* 24 (5) p. 799–803.
- [76] K Kataoka, T Muta, S Yamazaki, K Takeshige (2002) Activation of macrophages by linear (1,3)-beta-D-glucans. Implications for the recognition of fungi by innate immunity. *J. Biol. Chem.* 277 (39) p. 36825–36831.
- [77] J Skov, PW Kania, L Holten-Andersen, B Fouz, K Buchmann (2012) Immunomodulatory effects of dietary β -1,3-glucan from *Euglena gracilis* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immersion vaccinated against *Yersinia ruckeri*. *Fish Shellfish Immunol.* 33 (1) p. 111–120.
- [78] M Shibakami, M Sohma, M Hayashi (2012) Fabrication of doughnut-shaped particles from spheroidal paramylon granules of *Euglena gracilis* using acetylation reaction.

- Carbohydr. Polym.* 87 (1) p. 452–456.
- [79] M Shibakami, G Tsubouchi, M Hayashi (2014) Thermoplasticization of euglenoid β -1,3-glucans by mixed esterification. *Carbohydr. Polym.* 105 p. 90–96.
- [80] M Shibakami, G Tsubouchi, M Sohma, M Hayashi (2015) Preparation of transparent self-standing thin films made from acetylated euglenoid β -1,3-glucans. *Carbohydr. Polym.* 133 p. 421–428.
- [81] M Shibakami, M Sohma (2017) Synthesis and thermal properties of paramylon mixed esters and optical, mechanical, and crystal properties of their hot-pressed films. *Carbohydr. Polym.* 155 p. 416–424.
- [82] M Shibakami, M Sohma (2018) Thermal, crystalline, and pressure-sensitive adhesive properties of paramylon monoesters derived from an euglenoid polysaccharide. *Carbohydr. Polym.* 200 p. 239–247.
- [83] H Inui, T Ishikawa, M Tamoi (2017) Wax Ester Fermentation and Its Application for Biofuel Production, En: *Euglena: Biochemistry, Cell and Molecular Biology. Advances in Experimental Medicine and Biology*, (Ed.: SD Schwartzbach, S Shigeoka) Springer, Cham, p. 269–283.
- [84] TE Ebenezer, M Zoltner, A Burrell, A Nenarokova, AMG Novák Vanclová, B Prasad, P Soukal, C Santana-Molina, EC O’Neill, NN Nankissoor, N Vadakedath, V Daiker, S Obado, S Silva-Pereira, AP Jackson, DP Devos, J Lukeš, M Lebert, S Vaughan, V Hampl, M Carrington, ML Ginger, JB Dacks, S Kelly, MC Field (2019) Transcriptome, proteome and draft genome of *Euglena gracilis*. *BMC Biol.* 17 (1) p. 1–23.
- [85] EC O’Neill, M Trick, L Hill, M Rejzek, RG Dusi, CJ Hamilton, P V. Zimba, B Henrissat, RA Field (2015) The transcriptome of *Euglena gracilis* reveals unexpected metabolic capabilities for carbohydrate and natural product biochemistry. *Mol. Biosyst.* 11 (10) p. 2808–2820.
- [86] EC O’Neill, S Kuhaudomlarp, M Rejzek, JU Fangel, K Alagesan, D Kolarich, WGT Willats, RA Field (2017) Exploring the glycans of *Euglena gracilis*. *Biology* 6 (4) p. 1–13.
- [87] Y Yoshida, T Tomiyama, T Maruta, M Tomita, T Ishikawa, K Arakawa (2016) De novo assembly and comparative transcriptome analysis of *Euglena gracilis* in response to anaerobic conditions. *BMC Genomics* 17 (182) p. 1–10.
- [88] S Kitaoka, Y Nakano, K Miyatake, A Yokota (1989) Enzymes and their functional location, En: *The Biology of EUGLENA*, Subcellula., (Ed.: DE Buetow) Academic Press, p. 1–135.

- [89] JS Rodríguez-Zavala, MA Ortiz-Cruz, G Mendoza-Hernández, R Moreno-Sánchez (2010) Increased synthesis of α -tocopherol, paramylon and tyrosine by *Euglena gracilis* under conditions of high biomass production. *J. Appl. Microbiol.* 109 (6) p. 2160–2172.
- [90] S Kuhaudomlarp, NJ Patron, B Henrissat, M Rejzek, G Saalbach, RA Field (2018) Identification of *Euglena gracilis* β -1,3-glucan phosphorylase and establishment of a new glycoside hydrolase (GH) family GH149. *J. Biol. Chem.* 293 (8) p. 2865–2876.
- [91] HH Freeze, GW Hart, RL Schnaar (2017) Glycosylation Precursors, En: *Essentials of Glycobiology*, 3rd ed., (Ed.: A Varki, RD Cummings, JD Esko, P Stanley, GW Hart, M Aebi, AG Darvill, T Kinoshita, NH Packer, JH Prestegard, RL Schnaar, PH Seeberger) p. 1–19.
- [92] Q Qu, S-J Lee, W Boos (2004) TreT, a novel trehalose glycosyltransfering synthase of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis*. *J. Biol. Chem.* 279 (46) p. 47890–47897.
- [93] DR Barras, BA Stone (1965) Chemical Composition of Pellicle of *Euglena gracilis* var *Bacillaris*. *Biochem. J.* 97 p. 14–15.
- [94] DL Nelson, MM Cox (2004) *Lehninger. Principios de Bioquímica*, 4th ed. W. H. Freeman.
- [95] H Gao, JA Leary (2004) Kinetic measurements of phosphoglucomutase by direct analysis of glucose-1-phosphate and glucose-6-phosphate using ion/molecule reactions and Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 329 (2) p. 269–275.
- [96] G Zhang, J Dai, L Wang, D Dunaway-Mariano, LW Tremblay, KN Allen (2005) Catalytic Cycling in β -Phosphoglucomutase: A Kinetic and Structural Analysis. *Biochemistry* 44 (27) p. 9404–9416.
- [97] C Méndez, JA Salas (2001) Altering the glycosylation pattern of bioactive compounds. *Trends Biotechnol.* 19 (11) p. 449–456.
- [98] MA Ballicora, AA Iglesias, J Preiss (2003) ADP-glucose pyrophosphorylase, a regulatory enzyme for bacterial glycogen synthesis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67 (2) p. 213–225.
- [99] MA Ballicora, AA Iglesias, J Preiss (2004) ADP-Glucose Pyrophosphorylase: A Regulatory Enzyme for Plant Starch Synthesis. *Photosynth. Res.* 79 (1) p. 1–24.
- [100] HM Koo, S-W Yim, C-S Lee, YR Pyun, YS Kim (2000) Cloning, Sequencing and Expression of UDP-Glucose Pyrophosphorylase Gene from *Acetobacter xylinum* BRC5. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64 (3) p. 523–529.

- [101] R Köplin, W Arnold, B Hötte, R Simon, G Wang, A Pühler (1992) Genetics of xanthan production in *Xanthomonas campestris*: the *xanA* and *xanB* genes are involved in UDP-glucose and GDP-mannose biosynthesis. *J. Bacteriol.* 174 (1) p. 191–199.
- [102] AC Weissborn, Q Liu, MK Rumley, EP Kennedy (1994) UTP: alpha-D-glucose-1-phosphate uridylyltransferase of *Escherichia coli*: isolation and DNA sequence of the *galU* gene and purification of the enzyme. *J. Bacteriol.* 176 (9) p. 2611–2618.
- [103] PA Frey (1996) The Leloir pathway: a mechanistic imperative for three enzymes to change the stereochemical configuration of a single carbon in galactose. *FASEB J.* 10 (4) p. 461–470.
- [104] HM Holden, I Rayment, JB Thoden (2003) Structure and function of enzymes of the Leloir pathway for galactose metabolism. *J. Biol. Chem.* 278 (45) p. 43885–8.
- [105] AJ Parodi (2000) Protein Glucosylation and Its Role in Protein Folding. *Annu. Rev. Biochem.* 69 (1) p. 69–93.
- [106] S Singh, GN Phillips Jr., JS Thorson (2012) The structural biology of enzymes involved in natural product glycosylation. *Nat. Prod. Rep.* 29 (10) p. 1201–1237.
- [107] W Blankenfeldt, M Asuncion, JS Lam, JH Naismith (2000) The structural basis of the catalytic mechanism and regulation of glucose-1-phosphate thymidylyltransferase (RmlA). *EMBO J.* 19 (24) p. 6652–6663.
- [108] WA Barton, J Lesniak, JB Biggins, PD Jeffrey, J Jiang, KR Rajashankar, JS Thorson, DB Nikolov (2001) Structure, mechanism and engineering of a nucleotidylyltransferase as a first step toward glycorandomization. *Nat. Struct. Biol.* 8 (6) p. 545–551.
- [109] S Zuccotti, D Zanardi, C Rosano, L Sturla, M Tonetti, M Bolognesi (2001) Kinetic and crystallographic analyses support a sequential-ordered bi bi catalytic mechanism for *Escherichia coli* glucose-1-phosphate thymidylyltransferase. *J. Mol. Biol.* 313 (4) p. 831–843.
- [110] JB Thoden, FJ Ruzicka, PA Frey, I Rayment, HM Holden (1997) 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* 36 (6) p. 1212–1222.
- [111] JB Thoden, HM Holden (2007) The molecular architecture of glucose-1-phosphate uridylyltransferase. *Protein Sci.* 16 (3) p. 432–440.
- [112] JB Thoden, HM Holden (2007) Active site geometry of glucose-1-phosphate uridylyltransferase. *Protein Sci.* 16 (7) p. 1379–1388.
- [113] H Kim, J Choi, T Kim, NK Lokanath, SC Ha, SW Suh, H-Y Hwang, KK Kim (2010)

- Structural basis for the reaction mechanism of UDP-glucose pyrophosphorylase. *Mol. Cells* 29 (4) p. 397–405.
- [114] X Jin, MA Ballicora, J Preiss, JH Geiger (2005) Crystal structure of potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase. *EMBO J.* 24 (4) p. 694–704.
- [115] JR Cupp-Vickery, RY Igarashi, M Perez, M Poland, CR Meyer (2008) Structural Analysis of ADP-Glucose Pyrophosphorylase from the Bacterium *Agrobacterium tumefaciens*. *Biochemistry* 47 (15) p. 4439–4451.
- [116] K Brown, F Pompeo, S Dixon, D Mengin-Lecreulx, C Cambillau, Y Bourne (1999) Crystal structure of the bifunctional N-acetylglucosamine 1-phosphate uridylyltransferase from *Escherichia coli*: a paradigm for the related pyrophosphorylase superfamily. *EMBO J.* 18 (15) p. 4096–4107.
- [117] J Sivaraman, V Sauvé, A Matte, M Cygler (2002) Crystal Structure of *Escherichia coli* Glucose-1-Phosphate Thymidylyltransferase (RffH) Complexed with dTTP and Mg²⁺. *J. Biol. Chem.* 277 (46) p. 44214–44219.
- [118] NM Koropatkin, WW Cleland, HM Holden (2005) Kinetic and Structural Analysis of α -D-Glucose-1-phosphate Cytidylyltransferase from *Salmonella typhi*. *J. Biol. Chem.* 280 (11) p. 10774–10780.
- [119] T Steiner, A-C Lamerz, P Hess, C Breithaupt, S Krapp, G Bourenkov, R Huber, R Gerardy-Schahn, U Jacob (2007) Open and closed structures of the UDP-glucose pyrophosphorylase from *Leishmania major*. *J. Biol. Chem.* 282 (17) p. 13003–13010.
- [120] M-C Pelissier, SA Lesley, P Kuhn, Y Bourne (2010) Structural insights into the catalytic mechanism of bacterial guanosine-diphospho-D-mannose pyrophosphorylase and its regulation by divalent ions. *J. Biol. Chem.* 285 (35) p. 27468–27476.
- [121] M-F Giraud, JH Naismith (2000) The rhamnose pathway. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10 (6) p. 687–696.
- [122] NM Koropatkin, HM Holden (2004) Molecular Structure of α -D-Glucose-1-Phosphate Cytidylyltransferase from *Salmonella typhi*. *J. Biol. Chem.* 279 (42) p. 44023–44029.
- [123] LA Kleczkowski, M Geisler, I Ciereszko, H Johansson (2004) UDP-glucose pyrophosphorylase. An old protein with new tricks. *Plant Physiol.* 143 (3) p. 912–918.
- [124] M Flores-Díaz, A Alape-Girón, B Persson, P Pollesello, M Moos, C von Eichel-Streiber, M Thelestam, I Florin (1997) Cellular UDP-glucose deficiency caused by a single point mutation in the UDP-glucose pyrophosphorylase gene. *J. Biol. Chem.* 272 (38) p. 23784–23791.
- [125] M Mollerach, R López, E García (1998) Characterization of the galU gene of

- Streptococcus pneumoniae* encoding a uridine diphosphoglucose pyrophosphorylase: a gene essential for capsular polysaccharide biosynthesis. *J. Exp. Med.* 188 (11) p. 2047–2056.
- [126] M Mollerach, E García (2000) The galU gene of *Streptococcus pneumoniae* that codes for a UDP–glucose pyrophosphorylase is highly polymorphic and suitable for molecular typing and phylogenetic studies. *Gene* 260 (1–2) p. 77–86.
- [127] HY Chang, HC Huang, JH Lee, HL Peng (1999) Characterization of a putative *Pseudomonas* UDPglucose pyrophosphorylase. *Proc. Natl. Sci. Counc. Repub. China. B* 23 (2) p. 74–84.
- [128] A Roeben, JM Plitzko, R Körner, UMK Böttcher, K Siegers, M Hayer-Hartl, A Bracher (2006) Structural Basis for Subunit Assembly in UDP-glucose Pyrophosphorylase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Biol.* 364 (4) p. 551–560.
- [129] F Martz, M Wilczynska, LA Kleczkowski (2002) Oligomerization status, with the monomer as active species, defines catalytic efficiency of UDP-glucose pyrophosphorylase. *Biochem. J.* 367 (Pt 1) p. 295–300.
- [130] LA Kleczkowski, F Martz, M Wilczynska (2005) Factors affecting oligomerization status of UDP-glucose pyrophosphorylase. *Phytochemistry* 66 (24) p. 2815–2821.
- [131] A-C Lamerz, T Haselhorst, AK Bergfeld, M von Itzstein, R Gerardy-Schahn (2006) Molecular cloning of the *Leishmania major* UDP-glucose pyrophosphorylase, functional characterization, and ligand binding analyses using NMR spectroscopy. *J. Biol. Chem.* 281 (24) p. 16314–16322.
- [132] K Marino, MLS Guther, AK Wernimont, M Amani, R Hui, MA Ferguson (2010) Identification, subcellular localization, biochemical properties, and high-resolution crystal structure of *Trypanosoma brucei* UDP-glucose pyrophosphorylase. *Glycobiology* 20 (12) p. 1619–1630.
- [133] LI Martínez, CV. Piattoni, SA Garay, DE Rodríguez, SA Guerrero, AA Iglesias (2011) Redox regulation of UDP-glucose pyrophosphorylase from *Entamoeba histolytica*. *Biochimie* 93 (2) p. 260–268.
- [134] T Yang, M Bar-Peled (2010) Identification of a novel UDP-sugar pyrophosphorylase with a broad substrate specificity in *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. J.* 429 (3) p. 533–43.
- [135] VL Rudick, RA Weisman (1974) Uridine Diphosphate Glucose Pyrophosphorylase of *Acanthamoeba castellani*. Purification, Kinetic and Developmental Studies. *J. Biol. Chem.* 244 (24) p. 7832–7840.
- [136] KK Tsuboi, K Fukunaga, JC Petricciani (1969) Purification and Specific Kinetic

- Properties of Erythrocyte Uridine Diphosphate Glucose Pyrophosphorylase. *J. Biol. Chem.* 244 (4) p. 1008–1015.
- [137] RL Turnquist, TA Gillett, RG Hansen (1974) Uridine Diphosphate Glucose Pyrophosphorylase. Crystallization and Properties of the Enzyme from Rabbit Liver and Species Comparisons. *J. Biol. Chem.* 249 (23) p. 7695–7700.
- [138] JM Daran, W Bell, J François (1997) Physiological and morphological effects of genetic alterations leading to a reduced synthesis of UDP-glucose in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 153 (1) p. 89–96.
- [139] JM Daran, N Dallies, D Thines-Sempoux, V Paquet, J Francois (1995) Genetic and Biochemical Characterization of the UGP1 Gene Encoding the UDP-Glucose Pyrophosphorylase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 233 (2) p. 520–530.
- [140] J Rutter, BL Probst, SL McKnight (2002) Coordinate Regulation of Sugar Flux and Translation by PAS Kinase. *Cell* 111 (1) p. 17–28.
- [141] TL Smith, J Rutter (2007) Regulation of Glucose Partitioning by PAS Kinase and Ugp1 Phosphorylation. *Mol. Cell* 26 (4) p. 491–499.
- [142] J Fühling, JT Cramer, FH Routier, A-C Lamerz, P Baruch, R Gerardy-Schahn, R Fedorov (2013) Catalytic Mechanism and Allosteric Regulation of UDP-Glucose Pyrophosphorylase from *Leishmania major*. *ACS Catal.* 3 (12) p. 2976–2985.
- [143] M Geisler, M Wilczynska, S Karpinski, LA Kleczkowski (2004) Toward a blueprint for UDP-glucose pyrophosphorylase structure/function properties: homology-modeling analyses. *Plant Mol. Biol.* 56 (5) p. 783–794.
- [144] T Kotake, D Yamaguchi, H Ohzono, S Hojo, S Kaneko, H-K Ishida, Y Tsumuraya (2004) UDP-sugar pyrophosphorylase with broad substrate specificity toward various monosaccharide 1-phosphates from pea sprouts. *J. Biol. Chem.* 279 (44) p. 45728–36.
- [145] LA Litterer, JA Schnurr, KL Plaisance, KK Storey, JW Gronwald, DA Somers (2006) Characterization and expression of Arabidopsis UDP-sugar pyrophosphorylase. *Plant Physiol. Biochem.* 44 (4) p. 171–180.
- [146] T Kotake, S Hojo, D Yamaguchi, T Aohara, T Konishi, Y Tsumuraya (2007) Properties and Physiological Functions of UDP-Sugar Pyrophosphorylase in *Arabidopsis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71 (3) p. 761–771.
- [147] LA Kleczkowski, D Decker, M Wilczynska (2011) UDP-sugar pyrophosphorylase: a new old mechanism for sugar activation. *Plant Physiol.* 156 (1) p. 3–10.
- [148] W Gross, C Schnarrenberger (1995) Purification and Characterization of a Galactose-1-

- Phosphate: UDP-Glucose Uridyltransferase from the Red Alga *Galdieria Sulphuraria*. *Eur. J. Biochem.* 234 (1) p. 258–263.
- [149] LA Kleczkowski, D Decker (2015) Sugar Activation for Production of Nucleotide Sugars as Substrates for Glycosyltransferases in Plants. *J. Appl. Glycosci.* 62 (2) p. 25–36.
- [150] LA Litterer, KL Plaisance, JA Schnurr, KK Storey, H-JG Jung, JW Gronwald, DA Somers (2006) Biosynthesis of UDP-glucuronic acid in developing soybean embryos: possible role of UDP-sugar pyrophosphorylase. *Physiol. Plant.* 128 (2) p. 200–211.
- [151] A Dickmanns, S Damerow, P Neumann, E-C Schulz, A-C Lamerz, FH Routier, R Ficner (2011) Structural Basis for the Broad Substrate Range of the UDP-Sugar Pyrophosphorylase from *Leishmania major*. *J. Mol. Biol.* 405 (2) p. 461–478.
- [152] S-Y Jiang, Y-H Chi, J-Z Wang, J-X Zhou, Y-S Cheng, B-L Zhang, A Ma, J Vanitha, S Ramachandran (2015) Sucrose metabolism gene families and their biological functions. *Sci. Rep.* 5 (1) p. 1–24.
- [153] JA Schnurr, KK Storey, H-JG Jung, DA Somers, JW Gronwald (2006) UDP-sugar pyrophosphorylase is essential for pollen development in *Arabidopsis*. *Planta* 224 (3) p. 520–532.
- [154] A-C Lamerz, S Damerow, B Kleczka, M Wiese, G van Zandbergen, J Lamerz, A Wenzel, F-F Hsu, J Turk, SM Beverley, FH Routier (2010) Deletion of UDP-glucose pyrophosphorylase reveals a UDP-glucose independent UDP-galactose salvage pathway in *Leishmania major*. *Glycobiology* 20 (7) p. 872–882.
- [155] AE Clarke, BA Stone (1960) Structure of the paramylon from *Euglena gracilis*. *Biochim. Biophys. Acta* 44 p. 161–163.
- [156] FP Booy, H Chanzy, A Boudet (1981) An electron diffraction study of paramylon storage granules from *Euglena gracilis*. *J. Microsc.* 121 (2) p. 133–140.
- [157] Y Tanaka, T Ogawa, T Maruta, Y Yoshida, K Arakawa, T Ishikawa (2017) Glucan synthase-like 2 is indispensable for paramylon synthesis in *Euglena gracilis*. *FEBS Lett.* 591 (10) p. 1360–1370.
- [158] M Hrmova, GB Fincher (2009) Plant and Microbial Enzymes Involved in the Depolymerization of (1,3)-Beta-D-Glucans and Related Polysaccharides, En: *Chemistry, Biochemistry and Biology of 1,3-Beta-Glucans and Related Polysaccharides*, (Ed.: A Bacic, GB Fincher, BA Stone) Academic Press, p. 119–170.
- [159] T Takeda, Y Nakano, M Takahashi, N Konno, Y Sakamoto, R Arashida, Y Marukawa, E Yoshida, T Ishikawa, K Suzuki (2015) Identification and enzymatic characterization

- of an endo-1,3- β -glucanase from *Euglena gracilis*. *Phytochemistry* 116 p. 21–27.
- [160] G Pergolizzi, S Kuhaudomlarp, E Kalita, RA Field (2017) Glycan Phosphorylases in Multi-Enzyme Synthetic Processes. *Protein Pept. Lett.* 24 (8) p. 696–709.
- [161] V Lombard, H Golaconda Ramulu, E Drula, PM Coutinho, B Henrissat (2014) The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res.* 42 (1) p. 490–495.
- [162] DW Abbot, AB Boraston (2009) Interactions between Proteins and (1,3)-Beta-Glucans and Related Polysaccharides, En: *Chemistry, Biochemistry and Biology of 1,3-Beta-Glucans and Related Polysaccharides*, (Ed.: A Bacic, GB Fincher, BA Stone) Academic Press, p. 171–199.
- [163] F Kerff, A Amoroso, R Herman, E Sauvage, S Petrella, P Filée, P Charlier, B Joris, A Tabuchi, N Nikolaidis, DJ Cosgrove (2008) Crystal structure and activity of *Bacillus subtilis* YoaJ (EXLX1), a bacterial expansin that promotes root colonization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (44) p. 16876–16881.
- [164] T Schallus, C Jaeckh, K Fehér, AS Palma, Y Liu, JC Simpson, M Mackeen, G Stier, TJ Gibson, T Feizi, T Pieler, C Muhle-Goll (2008) Malectin: A Novel Carbohydrate-binding Protein of the Endoplasmic Reticulum and a Candidate Player in the Early Steps of Protein *N*-Glycosylation. *Mol. Biol. Cell* 19 (8) p. 3404–3414.
- [165] M Cramer, J Myers (1952) Growth and photosynthetic characteristics of *euglena gracilis*. *Arch. Mikrobiol.* 17 (1–4) p. 384–402.
- [166] J Sambrook, EF Fritsch, T Maniatis (1989) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- [167] UK Laemmli (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259) p. 680–685.
- [168] C Arndt, S Koristka, H Bartsch, M Bachmann (2012) Native Polyacrylamide Gels, En: *Protein Electrophoresis. Methods and Protocols*, (Ed.: BT Kurien, RH Scofield) Humana Press, Totowa, NJ, p. 49–53.
- [169] JL Vaitukaitis (1981) Production of antisera with small doses of immunogen: multiple intradermal injections, En: *Methods in Enzymology*, 73, Academic Press, p. 46–52.
- [170] MM Bradford (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72 (1) p. 248–254.
- [171] DG Arias, VE Marquez, ML Chiribao, FR Gadelha, C Robello, AA Iglesias, SA Guerrero (2013) Redox metabolism in *Trypanosoma cruzi*: Functional characterization

- of tryparedoxins revisited. *Free Radic. Biol. Med.* 63 p. 65–77.
- [172] DG Arias, A Reinoso, N Sasoni, MD Hartman, AA Iglesias, SA Guerrero (2014) Kinetic and structural characterization of a typical two-cysteine peroxiredoxin from *Leptospira interrogans* exhibiting redox sensitivity. *Free Radic. Biol. Med.* 77 p. 30–40.
- [173] C Fusari, AM Demonte, CM Figueroa, M Aleanzi, AA Iglesias (2006) A colorimetric method for the assay of ADP-glucose pyrophosphorylase. *Anal. Biochem.* 352 (1) p. 145–147.
- [174] GH González Blair, ÓF Castellanos Domínguez (2003) Alternativas de modificación del método de Somogyi-Nelson para la determinación de azúcares reductores a partir de sus posibilidades químicas. *Rev. Ing. e Investig.* 52 p. 5–17.
- [175] M Biasini, S Bienert, A Waterhouse, K Arnold, G Studer, T Schmidt, F Kiefer, TG Cassarino, M Bertoni, L Bordoli, T Schwede (2014) SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Res.* 42 (W1) p. W252–W258.
- [176] M Remmert, A Biegert, A Hauser, J Söding (2012) HHblits: lightning-fast iterative protein sequence searching by HMM-HMM alignment. *Nat. Methods* 9 (2) p. 173–175.
- [177] B Webb, A Sali (2014) Protein Structure Modeling with MODELLER, En: *Protein Structure Prediction*, 3rd ed., (Ed.: K Daisuke) Humana Press, New York, p. 1–15.
- [178] B Webb, A Sali (2014) Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER. *Curr. Protoc. Bioinforma.* 47 (1) p. 1–32.
- [179] D Eisenberg, R Lüthy, JU Bowie (1997) VERIFY3D: Assessment of protein models with three-dimensional profiles, En: *Methods in Enzymology*, 277, (Ed.: CWJ Carter, RM Sweet) Academic Press, p. 396–404.
- [180] M Shen, A Sali (2006) Statistical potential for assessment and prediction of protein structures. *Protein Sci.* 15 (11) p. 2507–2524.
- [181] P Benkert, M Künzli, T Schwede (2009) QMEAN server for protein model quality estimation. *Nucleic Acids Res.* 37 (suppl_2) p. W510–W514.
- [182] M DuBois, KA Gilles, JK Hamilton, PA Rebers, F Smith (1956) Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal. Chem.* 28 (3) p. 350–356.
- [183] EG Bligh, WJ Dyer (1959) A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37 (8) p. 911–917.
- [184] E Ryckebosch, K Muylaert, I Foubert (2012) Optimization of an Analytical Procedure for Extraction of Lipids from Microalgae. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 89 (2) p. 189–198.
- [185] S Shigeoka, Y Nakano, S Kitaoka (1979) The biosynthetic pathway of L-ascorbic acid

- in *Euglena gracilis* Z. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 25 (4) p. 299–307.
- [186] AC Ebrecht, MD Asención Diez, CV. Piattoni, SA Guerrero, AA Iglesias (2015) The UDP-glucose pyrophosphorylase from *Giardia lamblia* is redox regulated and exhibits promiscuity to use galactose-1-phosphate. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1850 (1) p. 88–96.
- [187] ST Mugford, O Fernandez, J Brinton, A Flis, N Krohn, B Encke, R Feil, R Sulpice, JE Lunn, M Stitt, AM Smith (2014) Regulatory properties of ADP glucose pyrophosphorylase are required for adjustment of leaf starch synthesis in different photoperiods. *Plant Physiol.* 166 (4) p. 1733–1747.
- [188] JB Schenkman, DL Cinti (1978) Preparation of microsomes with calcium, En: *Methods in Enzymology*, Elsevier. 52, (Ed.: S Fleischer, L Packer) Academic Press, p. 83–89.
- [189] SJ Chen, GB Bouck (1984) Endogenous glycosyltransferases glucosylate lipids in flagella of *Euglena*. *J. Cell Biol.* 98 (5) p. 1825–35.
- [190] MD Asención Diez, AC Ebrecht, LI Martínez, M Aleanzi, SA Guerrero, MA Ballícora, AA Iglesias (2013) A Chimeric UDP-Glucose Pyrophosphorylase Produced by Protein Engineering Exhibits Sensitivity to Allosteric Regulators. *Int. J. Mol. Sci.* 14 (5) p. 9703–9721.
- [191] P Eyer, F Worek, D Kiderlen, G Sinko, A Stuglin, V Simeon-Rudolf, E Reiner (2003) Molar absorption coefficients for the reduced Ellman reagent: reassessment. *Anal. Biochem.* 312 (2) p. 224–227.
- [192] GN Ramachandran, C Ramakrishnan, V Sasisekharan (1963) Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *J. Mol. Biol.* 7 (1) p. 95–99.
- [193] LB Poole (2003) Formation and Functions of Protein Sulfenic Acids. *Curr. Protoc. Toxicol.* 18 (1) p. 1–15.
- [194] M Nakazawa, H Andoh, K Koyama, Y Watanabe, T Nakai, M Ueda, T Sakamoto, H Inui, Y Nakano, K Miyatake (2015) Alteration of Wax Ester Content and Composition in *Euglena gracilis* with Gene Silencing of 3-ketoacyl-CoA Thiolase Isozymes. *Lipids* 50 (5) p. 483–492.
- [195] M Iseki, S Matsunaga, A Murakami, K Ohno, K Shiga, K Yoshida, M Sugai, T Takahashi, T Hori, M Watanabe (2002) A blue-light-activated adenyl cyclase mediates photoavoidance in *Euglena gracilis*. *Nature* 415 (6875) p. 1047–1051.
- [196] T Ogawa, A Kimura, H Sakuyama, M Tamoi, T Ishikawa, S Shigeoka (2015) Identification and characterization of cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase in *Euglena gracilis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 79 (12) p. 1957–1964.

- [197] M Ntefidou, M Iseki, M Watanabe, M Lebert, D-P Häder (2003) Photoactivated adenylyl cyclase controls phototaxis in the flagellate *Euglena gracilis*. *Plant Physiol.* 133 (4) p. 1517–21.
- [198] A Nasir, A Le Bail, V Daiker, J Klima, P Richter, M Lebert (2018) Identification of a flagellar protein implicated in the gravitaxis in the flagellate *Euglena gracilis*. *Sci. Rep.* 8 (1) p. 1–10.
- [199] S Kato, M Soshino, S Takaichi, T Ishikawa, N Nagata, M Asahina, T Shinomura (2017) Suppression of the phytoene synthase gene (*EgcrB*) alters carotenoid content and intracellular structure of *Euglena gracilis*. *BMC Plant Biol.* 17 (1) p. 125.
- [200] T Ishikawa, N Tajima, H Nishikawa, Y Gao, M Rapolu, H Shibata, Y Sawa, S Shigeoka (2010) *Euglena gracilis* ascorbate peroxidase forms an intramolecular dimeric structure: its unique molecular characterization. *Biochem. J.* 426 (2) p. 125–134.
- [201] V Daiker, D-P Häder, PR Richter, M Lebert (2011) The involvement of a protein kinase in phototaxis and gravitaxis of *Euglena gracilis*. *Planta* 233 (5) p. 1055–1062.
- [202] B-H Zhu, H-P Shi, G-P Yang, N-N Lv, M Yang, K-H Pan (2016) Silencing UDP-glucose pyrophosphorylase gene in *Phaeodactylum tricornutum* affects carbon allocation. *N. Biotechnol.* 33 (1) p. 237–244.
- [203] DS Feingold, G Avigad (1980) Sugar Nucleotide Transformations in Plants, En: *Carbohydrates: Structure and Function. A comprehensive Treatise*, (Ed.: J Preiss) Academic Press, p. 101–170.
- [204] LA Kleczkowski, S Kunz, M Wilczynska (2010) Mechanisms of UDP-Glucose Synthesis in Plants. *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.* 29 (4) p. 191–203.
- [205] T Kotake, C Hirosawa, Y Ando, Y Tsumuraya (2010) Generation of nucleotide sugars for biomass formation in plants. *Plant Biotechnol.* 27 (3) p. 231–236.
- [206] M Bar-Peled, MA O'Neill (2011) Plant Nucleotide Sugar Formation, Interconversion, and Salvage by Sugar Recycling. *Annu. Rev. Plant Biol.* 62 (1) p. 127–155.
- [207] LA Kleczkowski (1994) Glucose activation and metabolism through UDP-glucose pyrophosphorylase in plants. *Phytochemistry* 37 (6) p. 1507–1515.
- [208] Q Yu, X Zheng (2012) The crystal structure of human UDP-glucose pyrophosphorylase reveals a latch effect that influences enzymatic activity. *Biochem. J.* 442 (2) p. 283–291.
- [209] MB Bosco, M Machtey, AA Iglesias, M Aleanzi (2009) UDPglucose pyrophosphorylase from *Xanthomonas* spp. Characterization of the enzyme kinetics, structure and inactivation related to oligomeric dissociation. *Biochimie* 91 (2) p. 204–213.
- [210] D Decker, LA Kleczkowski (2019) UDP-sugar producing pyrophosphorylases: Distinct

- and essential enzymes with overlapping substrate specificities, providing de novo precursors for glycosylation reactions. *Front. Plant Sci.* 9 p. 1–20.
- [211] S Damerow, A-C Lamerz, T Haselhorst, J Führung, P Zarnovican, M von Itzstein, FH Routier (2010) Leishmania UDP-sugar pyrophosphorylase: the missing link in galactose salvage? *J. Biol. Chem.* 285 (2) p. 878–887.
- [212] GJ Gopal, A Kumar (2013) Strategies for the Production of Recombinant Protein in *Escherichia coli*. *Protein J.* 32 (6) p. 419–425.
- [213] CV. Piattoni, SP Rius, DF Gomez-Casati, SA Guerrero, AA Iglesias (2010) Heterologous expression of non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Triticum aestivum* and *Arabidopsis thaliana*. *Biochimie* 92 (7) p. 909–913.
- [214] RJ Muchut, CV. Piattoni, E Margarit, KEJ Tripodi, FE Podestá, AA Iglesias (2019) Heterologous expression and kinetic characterization of the α β and $\alpha\beta$ blend of the PPI-dependent phosphofructokinase from *Citrus sinensis*. *Plant Sci.* 280 (September 2018) p. 348–354.
- [215] GL Rosano, ES Morales, EA Ceccarelli (2019) New tools for recombinant protein production in *Escherichia coli*: A 5-year update. *Protein Sci.* 28 (8) p. 1412–1422.
- [216] A Schrödel, A de Marco (2005) Characterization of the aggregates formed during recombinant protein expression in bacteria. *BMC Biochem.* 6 (1) p. 1–10.
- [217] A de Marco, E Deuerling, A Mogk, T Tomoyasu, B Bukau (2007) Chaperone-based procedure to increase yields of soluble recombinant proteins produced in *E. coli*. *BMC Biotechnol.* 7 (32) p. 1–9.
- [218] AE Cereijo, MD Asención Diez, JS Dávila Costa, HM Alvarez, AA Iglesias (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) p. 1–12.
- [219] N Sasoni, DML Ferrero, SA Guerrero, AA Iglesias, DG Arias (2019) First evidence of glutathione metabolism in *Leptospira interrogans*. *Free Radic. Biol. Med.* 143 p. 366–374.
- [220] PJP Brown, B Zakryś, MA Farmer (2003) Plastid morphology, ultrastructure, and development in *Colacium* and the loricate euglenophytes (Euglenophyceae). *J. Phycol.* 39 (1) p. 115–121.
- [221] AM Orcival-Lafont, R Calvayrac (1974) Le plastidome chez *Euglena gracilis* Z. *J. Phycol.* 10 (3) p. 300–307.

- [222] J Briand, R Calvayrac (1980) Paramylon Synthesis in Heterotrophic and Photoheterotrophic *Euglena* (Euglenophyceae), *Journal of Phycology*, 16 (2). p. 234–239, 1980.
- [223] SM Read, G Currie, A Bacic (1996) Analysis of the structural heterogeneity of laminarin by electrospray-ionisation-mass spectrometry. *Carbohydr. Res.* 281 (2) p. 187–201.
- [224] NT Keen, M Yoshikawa (1983) β -1,3-Endoglucanase from Soybean Releases Elicitor-Active Carbohydrates from Fungus Cell Walls. *Plant Physiol.* 71 (3) p. 460–465.
- [225] EF Noronha, CJ Ulhoa (1996) Purification and characterization of an endo- β -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum*. *Can. J. Microbiol.* 42 (10) p. 1039–1044.
- [226] F Mauch, LA Hadwiger, T Boller (1988) Antifungal hydrolases in pea tissue: I. Purification and characterization of two chitinases and two β -1,3-glucanases differentially regulated during development and in response to fungal infection. *Plant Physiol.* 87 (2) p. 325–333.
- [227] A Gissibl, A Sun, A Care, H Nevalainen, A Sunna (2019) Bioproducts From *Euglena gracilis*: Synthesis and Applications. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 7 p. 1–16.
- [228] D Decker, M Meng, A Gornicka, A Hofer, M Wilczynska, LA Kleczkowski (2012) Substrate kinetics and substrate effects on the quaternary structure of barley UDP-glucose pyrophosphorylase. *Phytochemistry* 79 p. 39–45.
- [229] CV. Piattoni, VS Blancato, H Miglietta, AA Iglesias, SA Guerrero (2006) On the occurrence of thioredoxin in *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.* 97 (2) p. 151–160.
- [230] CV. Piattoni, SA Guerrero, AA Iglesias (2013) A Differential Redox Regulation of the Pathways Metabolizing Glyceraldehyde-3-Phosphate Tunes the Production of Reducing Power in the Cytosol of Plant Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 14 (4) p. 8073–8092.
- [231] M Meng, E Fitzek, A Gajowniczek, M Wilczynska, LA Kleczkowski (2009) Domain-specific determinants of catalysis/substrate binding and the oligomerization status of barley UDP-glucose pyrophosphorylase. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 1794 (12) p. 1734–1742.
- [232] O Shoseyov, Z Shani, I Levy (2006) Carbohydrate Binding Modules: Biochemical Properties and Novel Applications. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70 (2) p. 283–295.