

# UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



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

*“Metabolismo de hidratos de carbono en procariontas y eucariontas. Estudio comparativo de nucleótido-azúcar pirofosforilasas y glicosiltransferasas en bacterias y protozoos”*

**Lic. Ana Cristina Ebrecht**

**Director de Tesis: Alberto A. Iglesias**

**Co-director de Tesis: Sergio A. Guerrero**

**Laboratorio de Enzimología Molecular**

**-2015-**

## **AGRADECIMIENTOS**

Tratando de encontrar las palabras justas para agradecerles a todos aquellos que me acompañaron durante el desarrollo de mi doctorado, se me viene a la cabeza la frase de Cortázar “Las palabras nunca alcanzan cuando lo que hay que decir desborda el alma”. Y es que resulta difícil expresar y resumir en unos cuantos párrafos el enorme aporte de tantas personas durante estos años, ya que este trabajo de tesis no sería tal sin la ayuda y el apoyo de quienes contribuyeron a mi crecimiento profesional y personal.

Quiero agradecer a CONICET por las becas otorgadas que me permitieron realizar mi trabajo de tesis. Y a la Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas de la UNL por brindarme el espacio para llevar a cabo esta etapa de formación.

Quiero agradecer al Dr. Alberto Iglesias por la oportunidad de formar parte de su excelente grupo y dirigir este trabajo. Muchas gracias por todas las posibilidades brindadas, por los consejos y las exigencias que impulsaron mi desarrollo profesional y personal.

Agradezco también al Dr. Sergio Guerrero por su colaboración y predisposición durante todos estos años.

Al Dr. Miguel Ballicora por recibirme en su laboratorio. Por la calidez y la paciencia, por su confianza y estímulo que me permitieron crecer tanto. También a la gente del Departamento de Química de la LUC por poner a mi disposición sus recursos y por su colaboración en mi trabajo. Y especialmente a “las chicas del frente” por los buenos momentos compartidos. Quiero agradecer a Miguel, Gaby y Sofía por “hacer más argentina” mi estadía en Chicago.

A mis compañeros de lab, mi otra familia, aquellos con quienes se comparte el día a día, ¡con todo lo que eso implica! En primer lugar a Carlos y Matías Asenshon,

aunque creo que no hay manera de retribuir toda la ayuda que me brindaron, quiero agradecerles por guiarme desde el primer día, por todo lo enseñado con infinita paciencia y por los lindos momentos vividos. Especialmente a mi compañero de mesada, porque creo que en estos años no hay persona que haya contribuido tanto en este trabajo, ¡mil gracias por todo! A Vane, mi amiga, mi referencia para las medidas de óxido-reducción, mi compañera de aventuras, a veces madre controladora, a veces hija rebelde y así unos cuantos roles más! Por todo esto es difícil expresar todo el cariño y admiración que te tengo, simplemente gracias por estar siempre. A Mati, el Jarmo, gracias por ser ese “hermano de la misma edad” con quien las charlas pueden ser de igual a igual y los códigos son otros, gracias por crecer y aprender juntos y por tu amistad incondicional. A Mabel y Ana D., las madres postizas, quienes siempre se preocupan y te aconsejan, y por supuesto te cocinan algo rico :) ¡Gracias por todo! A las profes de Macro, Virginia, Silvia y Ceci E., gracias por las charlas compartidas fuera y dentro del TP! Quiero agradecer también a quienes me ayudaron durante los primeros años, Machunchus y Belén, por su colaboración y buena onda. Y a aquellos con los que compartí estos últimos años, los chiquitos. Especialmente a Roberto y Antonieta Roberts, mil gracias por todos los momentos compartidos, por la compañía durante los fines de semana y cuando se nos hacía tarde en el lab, por su sencillez y amistad. No tengo palabras Anto para agradecer tu increíble ayuda, por abrirme las puertas de tu casa y compartir conmigo este momento. No hay manera de devolver tanta generosidad diaria, infinitas gracias! A Bruno Rosé y María Melisa, porque sus personalidades tan peculiares le dan un toque distinto al lab, gracias por tantos buenos momentos! A Pao y Dani, por la buena onda y las risas compartidas.

A los chicos “del otro lab”. Gracias Dieguito, por siempre tener una respuesta, por obligarme a razonar las cosas, por desafiar mis experimentos y resultados, pero

sobre todo mil gracias por tu ayuda y predisposición! Gracias Naty por tu amistad y generosidad incondicionales. A Mati Cabetza y Eri por tantas charlas, discusiones y cervezas (y algunos salamitos!) compartidas, por hacer más llevaderos los días largos de trabajo. A Vani y Ale B. por la buena predisposición y el apoyo brindado. Gracias Vani por las largas charlas que empiezan en los medios de cultivos y terminan en el ciclo circadiano de los cactus, gracias por tus consejos siempre muy lógicos y útiles!

Quiero agradecer al Dr. Gonzales y la Dra. Chan y sus respectivos grupos de trabajo por su gran predisposición. Especialmente agradecer a Jesi, por su amistad y alegría contagiosa.

Así también quiero agradecer a mis amigos de la facu (Iván, Flor, Rodri, Joha, Pau, Mili, Ale, Mechi, Emi y Benchi) por su amistad incondicional después de tantos años.

A Ceci, Chino y Lisi por su increíble amistad, por seguir durante tantos años y a pesar de todo compartiendo momentos inolvidables. Gracias por estar siempre y por su cariño constante! Especialmente gracias Ceci por acompañarme tanto estos últimos años, por haber sido esa persona con quien compartir risas y llantos. Mil gracias por estar siempre ahí, escuchándome y acompañándome en el día a día.

A “las chicas” (Flori, Jor, Lu, Ivi y Vicky) por ser un cable a tierra, por compartir tantos buenos momentos.

A mis amigas de siempre (Fefa, Clau, Mari, Guadi, Pame, Api y Bel G.) porque a pesar de nunca haber entendido lo que hago siempre me apoyaron y compartieron mis alegrías.

Y obviamente agradezco a mi familia, por su amor y comprensión, por estar siempre conmigo. A mi sobri, ese chancho hermoso que me llena de tanta alegría, al que amo profundamente y hace que todo sea perfecto, pase lo que pase. A mi mamá, por su

orgullo y apoyo constante. A mi viejo por haber sido siempre el ejemplo a seguir, esa persona a quien admirar.

Cada uno de Uds. fue muy importante en estos años y en este trabajo de tesis y siempre va a ser una parte de quien soy. ¡MUCHAS GRACIAS A TODOS!

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. Alberto A. Iglesias.

Parte de los resultados de esta Tesis fueron publicados en:

Ebrecht A.C.; Asención Diez M.D.; Piattoni C.V.; Guerrero S.A.; Iglesias A.A.(2015) *The UDP-glucosepyrophosphorylase from Giardia lamblia is redox-regulated and exhibits promiscuity to use galactose-1-phosphate*. BBA General Subjects. 1850: 88-96.

Los resultados de esta tesis fueron expuestos en las siguientes reuniones científicas:

- Ebrecht, A.C.; Solamen, L.; Olsen, K.W.; Ballicora, M.A.; Iglesias, A.A. *ADP-glucose pyrophosphorylase allosteric regulation involves changes in substrates specificity*. I Reunión Anual - SAIB, Rosario, Argentina, Noviembre 11-14, 2014. Biocell38 (2014) 117, EN-P10
- Ebrecht, A.C.; Solamen, L.; Olsen, K.W.; Ballicora, M.A.; Iglesias, A.A. *An Allosteric effect that enhances substrate specificity in the ADP-Glc PPase from Escherichia coli*. 34rd Midwest Enzyme Chemistry Conference, Chicago, USA, Septiembre 27, 2013.
- Ebrecht, A.C.; Sasoni, N.; Orlof, A.; Figueroa, C.M.; Khun, M; Ballicora, M.A.; Iglesias, A.A. *Kinetic and structural characterization of enzymes involved in UDP-glucose metabolism in Escherichia coli*. 33rd Midwest Enzyme Chemistry Conference, Chicago, USA, Octubre12, 2013.
- Ebrecht, A.C.; Sasoni, N.; Orlof, A.; Figueroa, C.M.; Khun, M; Ballicora, M.A.; Iglesias, A.A. *Kinetic and structural study of GalU and GalF proteins from*

- Escherichia coli. XLVIII Reunión Anual - SAIB, Mendoza, Argentina, Octubre 29-Noviembre 1, 2012. Biocell 36 (2012) 133, EN-P09
- Ebrecht, A.C.; Sasoni, N.; Orlof, A.; Figueroa, C.M.; Khun, M; Ballicora, M.A.; Iglesias, A.A. *Characterization of enzymes involved in UDP-glucose metabolism in Escherichia coli*. XLVII Reunión Anual - SAIB, Potrero de los Funes, Argentina, Octubre 30-Noviembre 2, 2011. Biocell 35 (2011) 131, EN-P06
  - Ebrecht, A.C.; Guerrero, S.A.; Iglesias, A.A. *Study of enzymes involved in glycogen metabolism in Giardia lamblia*. XLVI Reunión Anual -SAIB, Puerto Madryn, Argentina, Noviembre 30 – Diciembre 3, 2010. Biocell 34 (2010) 86, EN-P09

## ÍNDICE

I. RESUMEN.....	1
II. ABSTRACT.....	8
III. INTRODUCCIÓN.....	13
III.1. Promiscuidad, evolución y adaptabilidad.....	13
III.2. Hidratos de carbono, fuente de carbono y energía.....	17
III.2.1. <i>Conceptos generales</i> .....	17
III.2.2. <i>Utilización de la Glc</i> .....	20
III.2.3. <i>Activación de la Glc</i> .....	22
III.2.4. <i>Glucógeno: estructura y función</i> .....	26
III.3. Enzimas involucradas en la partición de la Glc.....	32
III.3.1. <i>La familia de las NDP-azúcar PPasas, características generales</i> .....	33
III.3.2. <i>Las glucógeno sintasas</i> .....	46
III.4. El estudio comparativo de las enzimas involucradas en el metabolismo de carbohidratos en organismos eucariotas y procariotas.....	49
III.4.1. <i>Escherichia coli, la célula procariota mejor estudiada</i> .....	50
III.4.2. <i>Giardia lamblia, ¿el eslabón perdido entre eucariotas y procariotas?</i> .....	53
III.4.3. <i>El estudio de las enzimas involucradas en la partición de la Glc-IP</i> .....	55
IV. OBJETIVOS.....	58
IV.1. Objetivos generales.....	58
IV.2. Objetivos específicos.....	58
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	60
V.1. Reactivos químicos y materiales.....	60
V.2. Cepas bacterianas, plásmidos, medios de cultivo y antibióticos.....	60
V.2.1. <i>Cepas bacterianas</i> .....	60
V.2.2. <i>Plásmidos</i> .....	61

V.2.3. <i>Medios de cultivo</i> .....	61
V.2.4. <i>Antibióticos</i> .....	62
V.3. Métodos generales de biología molecular.....	62
V.3.1. <i>Oligonucleótidos</i> .....	62
V.3.2. <i>Amplificación de fragmentos de ADN. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</i> .....	63
V.3.3. <i>Purificación de ADN a partir del gel de agarosa</i> .....	64
V.3.4. <i>Clonado de los genes amplificados por PCR</i> .....	65
V.3.5. <i>Transformación de bacterias competentes</i> .....	65
V.3.6. <i>Minipreparación de ADN plasmídico</i> .....	66
V.3.7. <i>Secuenciación de ADN</i> .....	66
V.3.8. <i>Digestión con enzimas de restricción</i> .....	66
V.3.9. <i>Precipitación de ADN</i> .....	67
V.3.10. <i>Ligación de fragmentos de ADN</i> .....	67
V.4. Expresión y purificación de las proteínas recombinantes.....	68
V.4.1. <i>Creación de un banco de células</i> .....	68
V.4.2. <i>Expresión de las proteínas recombinantes</i> .....	68
V.4.3. <i>Purificación de las proteínas recombinantes</i> .....	69
V.5. Métodos bioquímicos generales.....	71
V.5.1. <i>Electroforesis en gel de poliacrilamida</i> .....	71
V.5.2. <i>Cuantificación del contenido proteico</i> .....	71
V.5.3. <i>Desalado y concentración de proteínas</i> .....	71
V.5.4. <i>Cromatografía de filtración por gel. Determinación de la masa molecular</i> .....	72
V.5.5. <i>Ensayos de complementación en la cepa mutante Escherichia coli deficiente en el gen galU</i> .....	72
V.6. Metodología de análisis enzimático.....	73
V.6.1. <i>Ensayos de actividad enzimática para las NDP-Glc PPasas</i> .....	73
V.6.2. <i>Ensayos de actividad enzimática para la GSasa</i> .....	74

V.6.3 Caracterización cinética de las enzimas .....	75
V.7. Metodología utilizada en ensayos de óxido-reducción .....	75
V.7.1. Ensayos con reactivos oxidantes .....	76
V.7.2. Ensayos con reactivos reductores .....	76
V.7.3. Curva de potenciales redox .....	77
V.8. Tratamiento informático .....	78
V.8.1. Alineamiento de secuencias .....	78
V.8.2. Construcción de árbol filogenético .....	78
V.8.3. Modelado por homología .....	79
VI. ENZIMAS INVOLUCRADAS EN LA PARTICIÓN DE LA GLC-1P EN BACTERIAS .....	80
VI.1. Capítulo: “Control alostérico de la especificidad por sustrato de la ADP-Glc PPasa de <i>Escherichia coli</i> ” .....	83
VI.1.1. Resultados .....	83
VI.1.1.1. Análisis de la especificidad por el nucleótido .....	83
VI.1.1.2. Análisis de la especificidad por el azúcar-1P y el cofactor esencial .....	88
VI.1.1.3. Análisis del efecto sinérgico de los efectores Fru-1,6-bisP y Pyr .....	90
VI.1.2. Discusión .....	92
VI.2. Capítulo: “Caracterización cinética y estructural de las enzimas implicadas en el metabolismo de UDP-Glc en <i>Escherichia coli</i> ” .....	98
VI.2.1. Resultados .....	98
VI.2.1.1. Clonado y expresión recombinante de los genes que codifican para las proteínas GalU y GalF .....	98
VI.2.1.2. Caracterización cinética de las proteínas recombinantes .....	102
VI.2.1.3. Estudio de la estructura cuaternaria de GalU y GalF .....	105
VI.2.1.4. Análisis de los residuos críticos en la actividad PPasa .....	106
VI.2.1.5. Ensayos de complementación de la cepa deficiente en GalU .....	113
VI.2.2. Discusión .....	116

VII. ENZIMAS DEL METABOLISMO DE HIDRATOS DE CARBONO DE PROTOZOOS.....	122
VII.1. Capítulo: “Estudio de la UDP-Glc PPasa de <i>Giardia lamblia</i> . Análisis comparativo de la enzima con otras PPasas en su regulación y uso de sustratos alternativos” .....	125
VII.1.1. Resultados .....	125
VII.1.1.1. <i>Clonado y expresión heteróloga de los genes que codifican la UDP Glc PPasa y la UDP-GlcNAc PPasa de Giardia lamblia</i> .....	125
VII.1.1.2. <i>Caracterización cinética de la UDP-Glc PPasa y la UDP-GlcNAc PPasa de G. lamblia</i> .....	127
VII.1.1.3. <i>Modificación redox de GlaUDP-Glc PPasa y GlaUDP-GlcNAc PPasa</i> ...	131
VII.1.2. Discusión .....	142
VII.2. Capítulo: “La GSasa de <i>Giardia lamblia</i> . Análisis cinético y evolutivo de la enzima responsable del metabolito de reserva” .....	157
VII.2.1. Resultados .....	157
VII.2.1.1. <i>Análisis filogenético de las GSasas</i> .....	157
VII.2.1.2. <i>Obtención de la GlaGSasa en forma recombinante</i> .....	162
VII.2.1.3. <i>Caracterización cinética de la GlaGSasa</i> .....	163
VII.2.2. Discusión .....	170
VIII. CONCLUSIONES.....	175
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	180

**LISTA DE ABREVIATURAS**

μg	microgramo
μl	microlitro
μM	micromolar
μmol	micromol
-P	derivado éster fosfato
3-PGA	ácido 3-fosfoglicérico
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADP	adenosina-5'-difosfato
ADP-Glc	adenosina-5'-difosfo-glucosa
ADP-Glc PPasa	adenosina-5'-difosfo-glucosa pirofosforilasa
AMP	adenosina-5'-monofosfato
ATP	adenosina-5'-trifosfato
ARN	ácido ribonucleico
Amp	ampicilina
BSA	albúmina sérica bovina
CTP	citocina-5'-trifosfato
dNTP	mezcla equimolecular de desoxinucleótidos
DO	densidad óptica
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EMP	vía de Embden-Meyerhof-Parnas (glucólisis clásica)

$E_{m,pH}$	El potencial redox medio a un pH dado
$E_h$	Potencial de reducción
EPS	exopolisacáridos
Fru-1P	fructosa-1-fosfato
Fru-1,6-bisP	fructosa-1,6-bisfosfato
Fru-6P	fructosa-6-fosfato
Gal	galactosa
Gal-1P	galactosa-1-fosfato
GalN-1P	galactosamina-1-fosfato
Glc	glucosa
Glc-1P	glucosa-1-fosfato
Glc-6P	glucosa-6-fosfato
GlcN-1P	glucosamina-1-fosfato
GlcNAc-1P	N-acetil-glucosamina-1-fosfato
GTP	guanosina-5'-trifosfato
h	hora
$H_2O_2$	Peróxido de hidrogeno
IDA- $Ni^{2+}$	$Ni^{2+}$ - ácido iminodiacético
IMAC	cromatografía de afinidad con metales inmovilizados
IPTG	isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido
Kan	kanamicina
LB	medio Luria Bertani

L-Cys	L-cisteína
L-CySS	L-cistina
LPS	lipopolisacáridos
Man	manosa
Man-1P	manosa-1-fosfato
mM	milimolar
MM	masa molecular
MOPS	ácido 3-[N-morfolino] propano sulfónico
NAD <sup>+</sup>	nicotinamida adenina dinucleótido
NADH	nicotinamida adenina dinucleótido, reducida
•NO	óxido nítrico
NPS	nitroprusiato de sodio
p/p	peso en peso
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PDB	código de Protein Data Bank
P <sub>i</sub>	ortofosfato inorgánico
PP <sub>i</sub>	ortopirofosfato inorgánico
Pyr	piruvato
rpm	revoluciones por minuto
s	segundo

SDS	dodecil sulfato de sodio
TAE	solución Tris-acético-EDTA
Tris	N-Tris-(hidroximetil) aminoetano
TTP	timidina-5'-trifosfato
U	Unidades internacionales de actividad enzimática
UDP	uridina-5'-difosfato
UDP-Glc	uridina-5'-difosfo glucosa
UDP-Glc PPasa	uridina-5'-difosfo glucosa pirofosforilasa
UDP-GlcNAc PPasa	uridina-5'-difosfo N-acetil-glucosamina pirofosforilasa

## I. RESUMEN

En bacterias, el destino metabólico de la glucosa-1-fosfato (Glc-1P) depende principalmente de la actividad de dos nucleótido-Glc pirofosforilasas (NDP-Glc PPasas): la ADP-Glc PPasa (la cual es regulada alostéricamente) y la UDP-Glc PPasa (que no es regulada). De esta forma, el metabolito es incorporado a la producción de glucógeno (vía ADP-Glc) o a la interconversión de la hexosa o a la producción de oligo- y poli-sacáridos estructurales (vía UDP-Glc).

La ADP-Glc PPasa es una enzima clave en el metabolismo, responsable de la producción de ADP-Glc, que es el dador de restos glucosilos para la síntesis de glucógeno y almidón en bacterias y plantas, respectivamente. La actividad de la ADP-Glc PPasa es modulada alostéricamente por diversos metabolitos que indican los niveles de energía dentro de la célula. Por lo tanto, la reacción catalizada por la enzima es el punto de regulación en la biosíntesis del poliglucano de reserva. En particular, la ADP-Glc PPasa de *Escherichia coli* (*EcoADP-Glc PPasa*) es activada principalmente por fructosa-1,6-bisfosfato (Fru-1,6-bisP) y por piruvato (Pyr), aunque este último tiene un menor efecto cuando actúa solo, y ambos tienen un efecto sinérgico de activación de la *EcoADP-Glc PPasa*. Hemos observado que esta enzima exhibe cierto grado de promiscuidad hacia los sustratos y el cofactor esencial. Es así que en este trabajo de tesis se planteó llevar a cabo el análisis de la especificidad de la *EcoADP-Glc PPasa* y el rol de los efectores en la selectividad de los sustratos. Los resultados muestran que la promiscuidad hacia los nucleótidos (NTP) fue superada en presencia de los efectores: la Fru-1,6-bisP (así como el Pyr y su acción conjunta) tiene un efecto “selectivo” hacia el uso de ATP, ya que la eficiencia catalítica para este (y los azúcares-1P en conjunto con ATP) es aumentada considerablemente cuando la enzima produce ADP-Glc, mientras que esto no ocurre en la reacción con los otros NTP. Además se ensayó el efecto de la

Fru-1,6-bisP respecto al uso alternativo de azúcares-1P. El activador alostérico aumentó la eficiencia catalítica de la enzima para el uso de todos las hexosas-1P: Glc-1P >> GlcN-1P > Gal-1P, pero bajo todas las condiciones (en presencia o ausencia del efector) la mayor eficiencia catalítica se logró con Glc-1P como sustrato. Así también se evaluó el comportamiento de  $\text{Co}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$  como cofactores en las reacciones catalizadas tanto con ATP como con UTP en presencia y ausencia de la Fru-1,6-bisP. La enzima utilizó ambos metales para la síntesis de ADP-Glc y UDP-Glc, aunque sólo en las reacciones llevadas a cabo con el ATP el activador aumentó la eficiencia catalítica. Estos resultados plantean que el activador alostérico jugaría un papel crítico en la determinación del uso específico de ATP como sustrato. Este punto de vista de los efectores como una herramienta para aumentar la especificidad de la enzima abre nuevas perspectivas para la comprensión de los mecanismos de regulación alostérica y posibles procesos evolutivos de ADP-Glc PPasas, así como también para otras enzimas.

En las bacterias, un destino alternativo para la Glc-1P es la conversión en UDP-Glc por la UDP-Glc PPasa. La UDP-Glc es un compuesto clave en el metabolismo celular; tiene un número de funciones importantes, siendo un intermediario central en la producción de mono-, oligo- y poli-sacáridos. Se ha determinado que en bacterias la enzima es codificada por el gen *galU* ya que la delección del mismo tiene como consecuencia la interrupción de la vía de Leloir, por lo que las células son incapaces de fermentar la galactosa (Gal) y fallan en la incorporación de Glc y Gal en las membranas celulares. En enterobacterias, se encontró un segundo gen, *galF*, que codifica una proteína que presenta elevada identidad de secuencia con GalU, pero cuya funcionalidad no es clara. En el presente trabajo de tesis se clonaron los genes que codifican para GalU y GalF de *E. coli* para la producción recombinante de las mismas. Se determinó que GalF es una enzima funcional con actividad UDP-Glc PPasa. Sin embargo, la  $V_{\max}$

determinada y la afinidad relativa por Glc-1P fueron considerablemente inferiores a las exhibidas por GalU. Estas discrepancias cinéticas podrían deberse a: (i) la ausencia de residuos clave en GalF y/o (ii) la presencia de residuos que afectan a su interacción con los sustratos y/o (iii) la diferencia en la conformación activa que cada una presenta, ya que GalF es una enzima monomérica, mientras que GalU adquiere una conformación heterotetramérica. El análisis *in silico* nos permitió identificar residuos críticos conservados implicados en la actividad PPasa. En base a esto, construimos las doble mutantes GalUT20M/R21H y GalFM15T/H16R y las mutantes simples GalU K202A y GalFK198A. Los resultados sustentan la relevancia del motivo GLGTR en GalU (conservado en todas las PPasas): la doble mutante de GalF exhibió un aumento en la  $V_{\max}$ , mientras que en GalU las mutaciones disminuyeron la  $V_{\max}$  y aumentaron el  $S_{0,5}$  de la enzima para la Glc-1P. En cuanto a las mutantes simples, GalUK202A exhibió un notable aumento del  $S_{0,5}$  para la Glc-1P, mientras que la mutante GalFK198A no mostró diferencias con la enzima salvaje. Esto sugiere que el sitio de unión a sustrato se encuentra alterado en GalF, lo que sería un punto crítico para explicar su reducida afinidad aparente por la Glc-1P en comparación con GalU. Sumado a esto, la obtención de una fracción monomérica de GalU (GalU<sub>m</sub>) permitió determinar que el estado de oligomerización influye sobre la actividad de la enzima: GalU<sub>m</sub> exhibió una  $V_{\max}$  inferior a la de la forma tetramérica. Además, se realizaron ensayos de complementación en una cepa de *E. coli* que no expresa GalU. El efecto fisiológico producido por esta mutación fue revertido con la sobre-expresión de GalU, GalF y GalF M15T/H16R. En su conjunto, los resultados evidenciaron que GalU y GalF son proteínas homólogas funcionalmente activas. Sin embargo, la baja actividad de GalF nos lleva a postular que estas enzimas divergieron de un ancestro común y que por adaptaciones evolutivas las proteínas experimentaron cambios estructurales que las

llevaron a cumplir diferentes roles. Este mecanismo natural podría ser una estrategia para la adquisición de propiedades reguladoras en GalF.

Por otro lado, la partición de Glc-1P en células eucariotas se produce de manera diferente a la de bacterias. Este monosacárido es utilizado principalmente por la UDP-Glc PPasa para la producción de UDP-Glc. Este metabolito es luego sustrato de diferentes glicosiltransferasas que la derivan a diversas vías metabólicas en la célula; por ejemplo, síntesis de oligo- y poli-sacáridos con funciones estructurales (glicosilación de proteínas y producción de glicoconjugados estructurales) o a la biosíntesis de glucógeno. La UDP-Glc PPasa no es regulada alostéricamente, por lo tanto en eucariotas heterotróficos la producción de glucógeno estaría regulada por la modulación de la actividad de la glucógeno sintasa (GSasa). *Giardia lamblia* es el agente etiológico de la giardiasis, una infección intestinal muy frecuente en los niños. La investigación sobre este protozoo es impulsada tanto por su impacto en la salud pública como su relevancia evolutiva, ya que se ubica en la rama divergente más tempranamente del linaje eucariota. Se sabe que la Glc es una fuente de energía clave en el metabolismo del organismo y este monosacárido es acumulado en forma de glucógeno en los trofozoítos del parásito. La síntesis de glucógeno y de oligo- y poli-sacáridos estructurales es crítica para la supervivencia y la patogenicidad del parásito. Sin embargo la caracterización de las enzimas implicadas en estas vías está lejos de ser completa. Por ejemplo, no hay trabajos realizados sobre la actividad de las enzimas responsables de la producción del glucógeno, a pesar de su importancia en el metabolismo de *Giardia*. En este trabajo de tesis, presentamos el clonado molecular de los genes que codifican para la GSasa y la UDP-Glc PPasa de *G. lamblia* (*GlaGSasa* y *GlaUDP-Glc PPasa*, respectivamente), seguido de sus expresiones heterólogas en *E. coli*, purificación y caracterización bioquímica.

La *Gla*UDP-Glc PPasa recombinante presentó una estructura monomérica y exhibió características distintivas, principalmente por su capacidad de utilizar TTP y Gal-1P como sustratos alternativos al uso de UTP y Glc-1P, respectivamente. La oxidación por compuestos fisiológicos (peróxido de hidrógeno y el óxido nítrico) inactivó la enzima y el proceso pudo ser revertido por reducción con L-cisteína y tiorredoxina, entre otros compuestos. Teniendo en cuenta la escasa información disponible sobre el tema, los resultados obtenidos son de gran relevancia en el marco de la función que desempeñan los NDP-azúcares (UDP-Glc y UDP-Gal) en la fisiología de *Giardia*. En su conjunto, los resultados sugieren que en este parásito la UDP-Glc PPasa es regulada mediante un mecanismo post-traduccional de tipo redox; además, presenta propiedades distintivas a las UDP-Glc PPasas de otros protozoos previamente estudiados, ya que la enzima exhibe la capacidad de sintetizar UDP-Glc y UDP-Gal y de utilizar TTP como sustrato alternativo al UTP. De esta forma, jugaría un papel clave proporcionando sustratos a las glicosiltransferasas para la producción de oligo- y poli-sacáridos. Por un lado, este organismo acumula glucógeno como fuente de carbono y energía que permiten la supervivencia y diferenciación de las células. Pero además, la Glc es utilizada en la síntesis de estructuras glicosídicas que forman parte de la membrana de trofozoítos y quistes. Con lo cual la UDP-Glc es un metabolito de gran relevancia en la utilización de este azúcar. Por otro lado, estas estructuras presentes en la membrana presentan un contenido relativamente alto de Gal, por lo que la activación de este azúcar resulta de gran importancia en la fisiología del parásito. Siendo que la vía de Leloir se ve interrumpida por la ausencia de una de las enzimas que forman parte de la misma (GalT), la capacidad de utilizar Gal-1P de la *Gla*UDP-Glc PPasa sería clave en el metabolismo del parásito. Las propiedades de la *Gla*UDP-Glc PPasa caracterizados en el presente trabajo apoyan firmemente que el metabolismo de los

hidratos de carbono que utilizan UDP-Glc y UDP-Gal podría ser controlado estrictamente en dependencia de los niveles redox en el medio intracelular. Los resultados contribuyen como un nuevo ejemplo de la posible ocurrencia de un mecanismo redox para modular el metabolismo de carbohidratos en protozoos.

Por otra parte, se llevó a cabo la caracterización bioquímica de una GSasa funcionalmente activa de *G. lamblia*. Un análisis filogenético ubicó a esta enzima dentro de la familia de glicosiltransferasas del tipo GT3 en la cual se agrupan las enzimas de mamíferos, hongos y algunas bacterias (Bacteroidetes). Se determinó una estructura cuaternaria activa trimérica y la enzima exhibió actividad utilizando tanto UDP-Glc como ADP-Glc como donador glucosilo para la elongación de una molécula preformada de glucógeno; aunque presentó mayor eficiencia catalítica con UDP-Glc. Además, a diferencia de las enzimas de mamíferos y hongos, la *GlaGSasa* no exhibió regulación alostérica por Glc-6P, ni otros metabolitos ensayados. Aunque fue inhibida por Pi, disminuyendo su actividad en un 50% en presencia de 1,5 mM del mismo. Además, mediante estudios *in silico* se observó que en la secuencia de la enzima de *G. lamblia* están conservados residuos que podrían ser blancos de la acción de quinasas, por lo que en principio la actividad de esta enzima podría ser modulada de mediante fosforilación reversible. Sin embargo, son necesarios más estudios para tener un claro panorama de la regulación de esta enzima. Hasta el momento no se ha informado la caracterización de ninguna GSasa de protozoos, siendo la enzima de *G. lamblia* la primera en ser expresada en forma recombinante y caracterizada cinéticamente. La enzima del parásito se ubica dentro de la familia de las GSasas eucariotas, pero exhibe propiedades intermedias entre las proteínas de bacterias y de organismos eucariotas, lo cual la hace única entre todas las GSasas caracterizadas hasta el momento.

Con todo, los resultados de este trabajo de tesis proporcionan un aporte novedoso al entendimiento del metabolismo de la síntesis de carbohidratos con funciones relevantes en bacterias y protozoos, así como a la relación estructura-función, -regulación y evolución de las enzimas implicadas en el mismo.

## II. ABSTRACT

In bacteria, sugar anabolism involves partition of glucose-1-phosphate (Glc-1P) into either ADP-Glc or UDP-Glc. Their respective synthesis is catalyzed by allosterically regulated ADP-Glc pyrophosphorylase (ADP-Glc PPase) or unregulated UDP-Glc PPase. Later, diverse glycosyltransferases with specificity toward a particular nucleotide-Glc (NDP-Glc) lead the monosaccharide to a variety of carbohydrate metabolic routes. In general, in bacteria, there are two major biochemical roles for nucleotide-linked sugars: as intermediates in the formation of monosaccharides used in the production of complex carbohydrates, via UDP-Glc or as glycosyl donors for glycogen synthesis, using ADP-Glc.

The ADP-Glc PPase is a key enzyme responsible for the production of ADP-Glc, the sugar nucleotide used in the synthesis of glycogen and starch in bacteria and plants, respectively. The enzyme activity is allosterically modulated by various metabolites that indicate the energy levels of the cell. Thus, the ADP-Glc PPase is the regulatory enzyme of the pathway. In particular the *Escherichia coli* ADP-Glc PPase (*EcoADP-Glc PPase*) is mainly activated by fructose-1,6-bisP (Fru-1,6-bisP). Moreover, pyruvate behaves itself as a modest activator but it acts in synergy with Fru-1,6-bisP to finely modulate enzyme activity. We observed that this enzyme exhibits a degree of promiscuity toward the substrates and the essential cofactor. Interestingly such a promiscuous behavior was found affected by the allosteric activators in a way that they markedly increased the affinity of the enzyme toward the use of ATP (and the sugar-1P used together with ATP), but not of other nucleotides (NTP). The “selective” effect of Fru-1,6-bisP was also studied respect to the sugar-1P substrate as well on the essential metal ion required for catalysis. The allosteric activator increased catalytic efficiency of the enzyme for Glc-1P >> glucosamine-1P > galactose-1P. Under all of the conditions

(plus or minus allosteric activator) the greatest catalytic efficiency was achieved with Glc-1P as substrate. In the other hand,  $\text{Co}^{2+}$  and  $\text{Mn}^{2+}$  behaved as cofactors in reactions with both ATP and UTP. Although only in the reactions performed with ATP the Fru-1,6-bisP increased the catalytic efficiency. These results support a view in which the allosteric regulator would play a critical role in the specific selection of ATP as a substrate, enhancing the production of the sugar nucleotide that leading to synthesis of glycogen *in vivo*. This view of the effectors as a mechanism to increase the specificity of the enzyme opens new perspectives for the understanding of the allosteric regulation mechanisms of ADP-Glc PPases (and possibly other enzymes) in the context of the metabolic scenario.

In bacteria, an alternative fate for the Glc is the conversion into UDP-Glc by the UDP-Glc PPase. The UDP-Glc is a key compound in the cell metabolism; it has a number of important functions, being a central intermediate in the mono-, oligo-, and poly-saccharides production. The enzyme is encoded by the *galU* gene, which deletion generates cells unable to ferment galactose (Gal). In some bacteria, it is found a second gene, *galF*, encoding for a protein with high sequence identity to GalU, but which functionality is not understood. We cloned the genes encoding for GalU and GalF in *E. coli*. After recombinant expression and purification we determined that GalF is an active enzyme. However, its activity and affinity for Glc-1P were considerably lower than those of GalU. We hypothesized that differences are mainly due to the absence of key catalytic residues, as well as the presence of residues that affect the interaction with the substrates, and to the quaternary structure of the proteins (since GalU is a homotetrameric enzyme and GalF is monomeric). An *in silico* analysis allowed us to identify key residues involved in PPase activity. Based on these, we constructed the double mutants GalU T20M/R21H and GalF M15T/H16R and simple mutants

GalU K202A and GalF K198A. GalF double mutant exhibited an increment of the  $V_{\max}$ , whereas of GalU T20M/R21H exhibited a reduction in the  $V_{\max}$  and an increment in the  $S_{0.5}$  for Glc-1P. Regarding the simple mutants, GalU K202A exhibited an increment in the  $S_{0.5}$  for the sugar substrate, whereas GalF K198A had similar apparent affinity for Glc-1P compared to GalF wild type. Results suggest that in GalF the monosaccharide binding site is altered, which is critical for the difference in Glc-1P affinity between GalU and GalF. Furthermore, production of monomeric GalU resulted in a decreased of the enzyme  $V_{\max}$ , showing that differences between enzyme activities would, in part, be due to oligomerization status of the respective protein. In addition an *E. coli* strain deficient in *galU* expression was complemented GalU, GalF and mutant GalF M15T/H16R. The physiological effect observed in this strain, due to absence of GalU, was overcome with the over-expression of the two enzymes. On the whole, results showed that GalU and GalF are functional homologous. However, the low activity of GalF suggests that the *galF* gene would be a duplication of *galU*, after which it evolved to code for a less active, but hypothetically regulatory subunit.

In the other hand, partition of Glc-1P in eukaryotic cells occurs differently to bacteria. This monosaccharide is mainly utilized by the UDP-Glc PPase for the production of UDP-Glc. This metabolite is then substrate of different glycosyltransferases that derive it to the different metabolic pathways in the cell, for example to the synthesis of oligo- and poly-saccharides with structural functions (protein glycosylation and structural glycoconjugates) and of reserve compounds of energy and carbon (biosynthesis of glycogen). The eukaryotic UDP-Glc PPase is not allosterically regulated. Thus, different to plants and bacteria, the production of glycogen would be regulated by the modulation of the glycogen synthase (GSase) activity in non-photosynthetic eukaryotes. *Giardia lamblia* is the etiological agent of

giardiasis, an intestinal infection most prevalent in children. Research on this protozoon is driven both by its impact on public health and its relevance for understanding evolution of eukaryotes, since it is a member of one of the earliest diverging eukaryotic lineages. It is known that Glc is a key source of metabolic energy for the organism, being the monosaccharide accumulated as glycogen in the trophozoite stage. The synthesis of glycogen and of structural oligo- and poly-saccharides critically determines the parasite's capacity for survival and pathogenicity. Despite its relevance the complete characterization of the enzymes involved in carbohydrates metabolism in *Giardia* is far from be complete. For example, no report is available concerning the enzymes involved in the generation of glycogen in this protozoan, which is critical for its metabolism. In this work, we present the molecular cloning of the genes coding for glycogen synthase (GSase) and UDP-Glc PPase from genomic DNA of *G. lamblia*, followed by its heterologous expression in *E. coli*, purification and biochemical characterization.

The purified recombinant UDP-Glc PPase from *G. lamblia* (*Gla*UDP-Glc PPase) was characterized to have a monomeric structure. Glc-1P and UTP were preferred substrates, but the enzyme also used Gal-1P and TTP. The catalytic efficiency to synthesize UDP-Gal was significant. Oxidation by physiological compounds (hydrogen peroxide and nitric oxide) inactivated the enzyme and the process was reverted after reduction by L-cystein and thioredoxine. Our results suggest that in *G. lamblia* the UDP-Glc PPase is regulated by oxido-reduction mechanism. The enzyme exhibits the ability to synthesize UDP-Glc and UDP-Gal and it plays a key role providing substrates to glycosyltransferases that produce oligo- and poly-saccharides. The characterization of the *Gla*UDP-Glc PPase reinforces the view that in protozoa this enzyme is regulated by a redox mechanism. As well, we propose a new pathway for UDP-Gal production mediated by the promiscuous UDP-Glc PPase of this organism.

In the other hand, phylogenetic analysis showed that the GSase from *G. lamblia* (*GlaGSase*) belongs to glycosyltransferases of the GT3 family. In this group are also found the enzymes of mammals, fungi and a group of bacteria, the Bacteroidetes. In the phylogenetic tree the *Giardia* enzyme is located between the Bacteroidetes and eukaryotic enzymes. In good agreement with this, the recombinant protein exhibited certain degree of promiscuity for the use of NDP-Glc in the catalytic reaction. The *GlaGSase* was able to use both UDP-Glc and ADP-Glc as glycosyl donor for the elongation of the  $\alpha$ -1,4-polyglucan, although the enzyme exhibited a higher catalytic efficiency for the former compound. Furthermore, the enzyme was not affected by Glc-6P, the allosteric regulator of eukaryotic GSases, but 1,5 mM Pi inhibited the enzyme to the 50% of its activity. So far this is the first GSase from protozoan source to be characterized. Results contribute to a better understanding of parasite metabolism, and also provide a contribution to the evolutionary analysis of these enzymes.

On the whole, the results of this thesis provide a novel contribution to the understanding of the carbohydrate metabolism in bacteria and protozoa with relevant functions as well as the structure-function, -regulation and evolution of enzymes involved in it.

### III. INTRODUCCIÓN

#### III.1. Promiscuidad, evolución y adaptabilidad

*Darwin was obsessed with variation. His books, considered as an ensemble, devote much more attention to variation than to natural selection, because he knew that no satisfactory theory of evolutionary change could be constructed until the causes of variation and the empirical rule of its form and amount had been elucidated.*

Gould, S. J.

En: *Hen's Teeth and Horse's Toes*

1983, Norton, New York

La especificidad de una enzima es fundamental en la fisiología de los organismos; el metabolismo sería imposible si las enzimas no pudiesen distinguir entre sustratos estructuralmente similares, y todas las reacciones procedieran sin ningún control hacia el equilibrio termodinámico (Cornish-Bowden y Cardenas, 2010). Emil Fischer fue uno de los primeros en señalar la gran selectividad de las enzimas, y su modelo de “llave-cerradura” (Fischer, 1984) fue muy importante para el desarrollo y comprensión de la catálisis enzimática. Posteriormente esta idea fue modificándose hacia visiones menos más dinámicas respecto a la estructura del sitio activo. En la década de 1930 J.B.S. Haldane señaló la idea de que la catálisis enzimática se limita a una pequeña región, el sitio activo, y postuló un modo de acción donde “la llave no encaja en la cerradura a la perfección, pero ejerce una cierta presión sobre ella” (Haldane, 1930). En 1948 Linus Pauling postuló la teoría del estado de transición, donde sugiere que la aceleración de una reacción por acción de la enzima está dada por la estabilización del estado de transición de la reacción química que interacción con su sitio activo (Pauling, 1948). A partir de esta teoría surgieron nuevas hipótesis sobre la

interacción enzima-sustrato. A finales de la década de 1950, Daniel Koshland introdujo el modelo de “ajuste inducido” (Koshland, 1958). Esta teoría, que hoy en día es ampliamente aceptada, sugiere que el sitio activo de las enzimas es una estructura relativamente flexible que cambia su conformación por interacción con los sustratos.

El modelo del ajuste inducido propone los siguientes términos: a) se requiere la orientación precisa de los grupos catalíticos para la acción de la enzima, b) el sustrato provoca un cambio apreciable en la relación tridimensional de los aminoácidos en el sitio activo y c) los cambios en la estructura de la proteína causada por el sustrato conlleva el adecuado alineamiento de los grupos catalíticos, mientras que un compuesto que no es sustrato no generará estas modificaciones (Koshland, 1958). Más adelante, sus nociones de “ajuste inducido” condujeron a un modelo de unión cooperativa de ligandos a proteínas de múltiples subunidades propuesto junto con George Nemethy y David Filmer, el modelo secuencial (Koshland y col., 1966), que junto con el modelo de cambio conformacional concertado propuesto por Monod, Wyman y Changeux (Monod y col., 1965) explican los fenómenos alostéricos y de cooperatividad observados en algunas enzimas. La propuesta de Koshland también estableció una visión más adecuada respecto a que el sitio activo no es estructuralmente rígido y que la dinámica y los cambios de conformación son fundamentales para el funcionamiento enzimático.

En el contexto general, los libros de texto y la aproximación experimental han dedicado pocos esfuerzos a estudiar el lado “oscuro” de las enzimas: su reactividad cruzada, o promiscuidad. Sin embargo, en los últimos años, la promiscuidad de las proteínas, incluyendo las enzimas, ha tomado mayor peso. La investigación sobre la posibilidad de las enzimas de catalizar reacciones diferentes conduce a ideas de importancia tanto desde el punto de vista evolutivo como así también en un aspecto industrial. A pesar de su eficiencia, especificidad y robustez las enzimas exhiben una

notable capacidad de adaptación evolutiva. A lo largo de la historia natural del planeta la aparición de nuevas enzimas ha sido un proceso crítico. De hecho, ahora sabemos que las nuevas funciones enzimáticas pueden ser modificadas en cuestión de décadas, o incluso de meses, como ocurre con aquellas proteínas que degradan las sustancias químicas sintéticas que aparecieron por primera vez en nuestro planeta durante el siglo XX (Raushel y Holden, 2000; Wackett, 2004; Janssen y col., 2005) y el incremento alarmante en la resistencia de las bacterias a los medicamentos. La hipótesis de que la amplia especificidad de las proteínas proporciona puntos de partida para la generación de nuevas funciones se formalizó por primera vez en una revisión realizada por Jensen a mediados de 1970 (Jensen, 1976). En este trabajo se propone que, en contraste con las enzimas modernas, las proteínas primitivas poseían especificidades muy amplias. Esta versatilidad catalítica las habilitaba para llevar a cabo funciones múltiples, que eran necesarias para mantener los organismos ancestrales. La duplicación de genes y su divergencia llevó a la obtención de moléculas especializadas y al aumento de la eficiencia metabólica.

A medida que nuestra comprensión de la biología aumenta, también lo hace la evidencia de que muchas de nuestras suposiciones acerca de lo que sucede a nivel molecular son demasiado reduccionistas para capturar la complejidad de la vida. A raíz de la constatación de que el “dogma central” ‘DNA → ARN → proteína’ no es tal, otras suposiciones simplistas, como la idea de que una proteína que tiene una única función, ahora están también siendo desafiadas. Desde el mencionado postulado de Jensen, se han determinado las estructuras de más de 30000 proteínas y las secuencias de cientos de miles de ellas. Siguiendo entonces con esta línea de pensamiento, se establece que estos procesos evolutivos han llevado a la creación de familias y superfamilias de enzimas (Khersonsky y col., 2006). De hecho se observan ciertos vestigios de esta

divergencia; por ejemplo, un plegamiento similar e incluso residuos catalíticos conservados dentro de la familia (Gerlt y Babbitt, 2001). Además, numerosas veces existe cierto grado de promiscuidad compartida entre más de uno de los miembros (Khersonsky y col., 2006); al mismo tiempo que estas funciones promiscuas aparecen a menudo en uno, pero no los otros integrantes de la familia. Incluso, la magnitud de esas actividades impropias varía en varios órdenes de magnitud, tanto en términos absolutos como en relación a la actividad nativa (Khersonsky y col., 2006).

Pero, ¿por qué resulta importante la comprensión de la promiscuidad? Desde una perspectiva teórica, permite un mejor entendimiento de la bioquímica de los sistemas vivos, ya que la noción de la capacidad de utilizar sustratos alternativos se correlaciona con la del reconocimiento molecular. Por otro lado, al ser la evolución una función que se asocia con la presencia inicial de promiscuidad, un mayor conocimiento de este fenómeno permite un mejor entendimiento de los procesos evolutivos (Nobeli y col., 2009). En el presente trabajo de tesis se intenta obtener una visión más amplia de la actividad de las enzimas estudiadas. Dejando de lado las suposiciones tradicionales, se intenta explorar y comparar la relación las propiedades de las enzimas según su origen y con aquellas proteínas equivalentes encontradas en otros organismos. Estos estudios de relaciones de estructura proteica a función y regulación buscan alcanzar una mejor comprensión a nivel enzimático así como también a nivel metabólico sobre la forma en que la glucosa (Glc), específicamente la Glc-1-fosfato (Glc-1P), puede ser derivada a diferentes destinos metabólicos y este proceso regulado en distintas células.

## III.2. Hidratos de carbono, fuente de carbono y energía

### III.2.1. *Conceptos generales*

Los hidratos de carbono, glúcidos o sacáridos (del griego σάκχαρον, sákcharon, que significa “azúcar”) se definen como moléculas orgánicas compuestas por átomos de carbono, hidrógeno y oxígeno, siendo las biomoléculas más abundantes sobre la Tierra (Stick y Williams, 2009). Químicamente, los hidratos de carbono son polihidroxialdehídos o polihidroxicetonas que se presentan como distintos estereoisómeros, susceptibles de combinarse entre sí y con otros tipos de grupos funcionales originando gran variedad de compuestos. Esta riqueza combinatoria radica tanto en la diversidad de los monosacáridos como en los múltiples enlaces posibles que los mismos pueden formar entre sí (Stick y Williams, 2009).

Los carbohidratos ocupan un lugar protagónico en el metabolismo de todos los seres vivos, cumpliendo roles cruciales en los procesos biológicos, tanto estructural, funcional y energéticamente. Son moléculas parcialmente reducidas que sirven para el almacenamiento de energía a corto y largo plazo. De acuerdo a las diferentes vías metabólicas que siguen, pueden ser oxidadas generando intermediarios necesarios para conducir los procesos celulares y, de hecho, la oxidación de monosacáridos es la vía de obtención de energía en la mayoría de organismos (Stephanopoulos, 1998; Nelson y Cox, 2004). Además, son precursores para la síntesis de polímeros que constituyen los sillares para el almacenamiento intracelular de la energía (Nelson y Cox, 2004; Stick y Williams, 2009). También proveen material para la construcción de estructuras celulares. En la naturaleza, se encuentran en los seres vivos formando parte de biomoléculas aisladas o asociadas a otras como, por ejemplo, proteínas y lípidos generando glicoproteínas y glicolípidos, proteoglucanos (cuando el componente glucosídico es mayoritario) y péptidoglucanos (Nelson y Cox, 2004).

En el curso de la evolución las formas vivientes han utilizado el potencial de variabilidad que ofrece la glicosilación. Es así que la importancia de los carbohidratos en la célula no sólo es debida a sus funciones estructurales y de almacenamiento energético, sino también a que actúan, en combinación con lípidos y proteínas, como marcadores celulares en el reconocimiento y la adherencia celular. Algunas células están cubiertas por una densa capa de glicoconjugados que median su comunicación con el medio exterior, lo que es no sólo importante para los procesos biológicos propios, sino también para la interacción con otras células. De esta manera, en muchos protozoos parásitos los glicoconjugados externos están sujetos a un gran número de ciclos evolutivos relacionados con la respuesta del huésped para evadir la infección (Varki, 2006).

En células procariotas, los glicoconjugados se presentan ya sea como polisacáridos capsulares o como lipopolisacáridos (LPS), los cuales están involucrados en los factores de virulencia y son el principal blanco de acción de la respuesta inmune. Acorde a la gran diversidad estructural de estos polisacáridos constituyen la base para la clasificación por serogrupo y serotipo entre las distintas familias bacterianas. Por otra parte, también pueden localizarse en el medio extracelular, como el caso del dextrano producido por bacterias, que participa del fenómeno de adhesión (Biswas y Biswas, 2006). En el caso de los heteropolisacáridos, la combinación de ácidos urónicos y hexosaminas origina los glicosaminoglicanos, también llamados mucopolisacáridos, de importancia por sus propiedades mecánicas y capacidad lubricante. Además, ciertos heteropolisacáridos pueden unirse a cadenas peptídicas cortas formando péptidoglicanos. Un ejemplo de interés es el polímero de N-acetil-glucosamina (GlcNAc) y ácido N-acetil murámico, que integra la estructura denominada mureína, característica de la pared celular bacteriana (Nelson y Cox, 2004).

Según su complejidad, los hidratos de carbono pueden clasificarse como simples (los monosacáridos), o como aquellos que resultan de la combinación de estos (los carbohidratos complejos), que pueden ser homo o heteroderivados, según contengan uno o más tipos de monosacáridos en su estructura. Estos últimos incluyen a los disacáridos (dos monosacáridos unidos por un enlace *o*-glicosídico), los oligosacáridos (compuestos por entre 3 y 9 monosacáridos unidos por enlaces glicosídicos) y los polisacáridos (cadenas, ramificadas o lineales, de más de diez monosacáridos unidos mediante enlaces glicosídicos) (Nelson y Cox, 2004).

Los monosacáridos, los azúcares más simples, están formados por una sola molécula que consiste en una única unidad de polihidroxi-aldehído o -cetona y, según el número de átomos de carbono, pueden clasificarse en triosas, tetrosas, pentosas, hexosas o heptosas (Nelson y Cox, 2004; Stick y Williams, 2009). En el metabolismo de glúcidos, los intermediarios son derivados fosforilados de los mismos. La condensación del ácido fosfórico con un -OH de un azúcar da lugar al éster fosfato correspondiente (Sanwal y col., 1972). La fosforilación de los monosacáridos, además de activarlos, evita que difundan a través de las membranas, haciendo más eficientes los procesos en los que intervienen los azúcares-P (Sanwal y col., 1972; Nelson y Cox, 2004). Tanto en eucariotas como en procariotas se han descrito los mecanismos de ingreso a la célula, las rutas de utilización y las conexiones a otras vías metabólicas de las hexosas. En general, el monosacárido ingresa mediante diversos sistemas de transporte y es fosforilado (Nelson y Cox, 2004); así permanece en el medio intracelular para ser utilizado en distintas rutas metabólicas, dependiendo del organismo. Además de la Glc, otros monosacáridos, como por ejemplo la fructosa (Fru) y la galactosa (Gal), poseen vías metabólicas particulares; pero, además, por medio de isomerasas y mutasas fluyen mutuamente desde y hacia las rutas metabólicas centrales de la Glc (Stick y Williams,

2009). Cuando los monosacáridos no son necesarios en forma inmediata en las células son convertidos en otros compuestos, frecuentemente en polisacáridos (Stick y Williams, 2009).

### III.2.2. Utilización de la Glc

La Glc, libre o combinada, es el compuesto orgánico más abundante de la naturaleza y es la fuente primaria de energía de las células mediante su oxidación catabólica en las vías glucolíticas (Nelson y Cox, 2004), tanto en condiciones anaeróbicas (fermentación) como aeróbicas (respiración). Las rutas glucolíticas [donde podemos encontrar como las principales la vía de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP, o glucólisis clásica) o la vía de Entner-Doudoroff (ED)] forman parte de las rutas metabólicas consideradas centrales, junto con el camino oxidativo de las pentosas-P y el ciclo de los ácidos tricarbóxicos. Las vías metabólicas centrales son responsables de generar la energía biológica (ATP) y los precursores metabólicos que sirven como esqueletos carbonados para la biosíntesis de los componentes esenciales de todas las células vivas (Stick y Williams, 2009). Esta serie de reacciones, con sus variantes, ocurren en todas las ramas del árbol filogenético que agrupa a los organismos vivos (Stick y Williams, 2009). Resulta interesante destacar que la glucólisis es una vía estructuralmente simple, que funciona en forma independiente a la disponibilidad de oxígeno, por lo cual se ajusta perfectamente al ambiente de los primeros organismos sobre la Tierra (Kasting y Siefert, 2002; Halliwell, 2006). Además, las dos reacciones de fosforilación a nivel de sustrato de la glucólisis son suficientes para proveer la energía que las células primitivas demandaban (Kasting y Siefert, 2002). Teniendo al piruvato (Pyr) como aceptor terminal de electrones, el balance redox de la vía puede ser mantenido (principalmente en lo concerniente a la oxidación posterior del NADH para regenerar el NAD<sup>+</sup>) (Bilgen, 2004; Halliwell, 2006). Todas estas características parecen

indicar que posiblemente la glucólisis se haya generado antes de la divergencia de los distintos dominios (Romano y Conway, 1996; Bilgen, 2004). Es decir, el camino glucolítico evolucionó como una vía catabólica anaeróbica para desempeñar dos roles fundamentales: generar ATP mediante la oxidación de las hexosas, poder reductor y Pyr y, además, generar los precursores necesarios para las reacciones anabólicas.

Por otra parte, muchas de las enzimas de la vía glucolítica EMP catalizan reacciones reversibles, lo cual permite que esta ruta pueda funcionar en forma reversa y generar hexosas-P a partir de compuestos de bajo peso molecular y energía (ATP) mediante la gluconeogénesis (Spector, 2009). Sin embargo la reversión no es completamente alcanzada por las mismas enzimas del camino EMP, ya que hay pasos claves irreversibles que necesitan de otras enzimas específicas de la gluconeogénesis (Spector, 2009). Inclusive, estudios recientes proponen que el rol inicial de la vía glucolítica en bacterias ancestrales era gluconeogénico, debido a que en las mismas la principal forma de degradación de azúcares ocurre por la vía de ED (Romano y Conway, 1996).

Los organismos autótrofos, como las plantas, sintetizan la Glc durante la fotosíntesis a partir de compuestos inorgánicos como agua y dióxido de carbono. Los heterótrofos, por otra parte, son incapaces de realizar este proceso y toman la Glc de otros seres vivos o la sintetizan a partir de diversos compuestos orgánicos. La Glc puede sintetizarse a partir de otros azúcares, como Fru o Gal. Otra posibilidad es la síntesis a partir la gluconeogénesis (Nelson y Cox, 2004; Spector, 2009); existen diversas moléculas como lactato, oxaloacetato y glicerol que pueden actuar como precursoras en la síntesis. Aunque las reacciones de la gluconeogénesis son las mismas en todos los organismos, el contexto metabólico y la regulación de la vía difiere no sólo entre los

diferentes organismos, sino entre los distintos tejidos (Nelson y Cox, 2004; Spector, 2009).

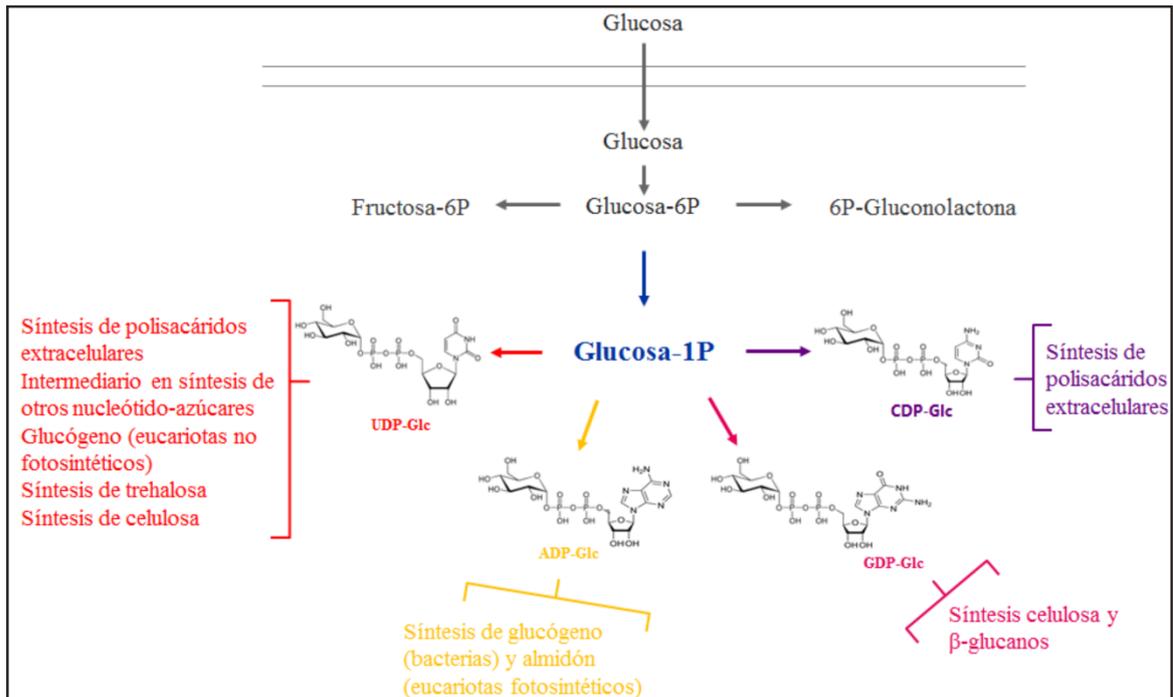
Además del rol fundamental en la obtención de energía mediante su oxidación en la glucólisis, la Glc está implicada en otros procesos celulares críticos: es el componente principal de polímeros de importancia estructural, como la celulosa, y de polímeros de almacenamiento energético, como el almidón y el glucógeno (Nelson y Cox, 2004); además es clave en la síntesis de componentes de la pared celular que intervienen en la interacción entre células y en el metabolismo de glicoproteínas (Spector, 2009). Es así que la utilización de la Glc es una etapa metabólica central en los distintos organismos, y la partición del azúcar hacia las diversas rutas metabólicas determina la producción de compuestos con diferentes funciones celulares. En este proceso la Glc-1P tiene un papel esencial, siendo un metabolito que se encuentra en bajas concentraciones intracelulares y es sustrato de distintas nucleótido-Glc pirofosforilasas (NDP-Glc PPasas) que derivan al azúcar hacia los diferentes caminos metabólicos.

### III.2.3. *Activación de la Glc*

Si bien los intermediarios en la glucólisis y gluconeogénesis son azúcares-P, muchas de las reacciones en las cuales las hexosas son transformadas o polimerizadas involucran un tipo diferente de grupo activador: un nucleósido-difosfato al que queda unido el azúcar. Los NDP-azúcares son los sustratos requeridos en la síntesis de polisacáridos como glucógeno, almidón, celulosa y polisacáridos extracelulares más complejos (Nelson y Cox, 2004) (Figura III.1). El rol de los NDP-azúcares (específicamente UDP-Glc) en la biosíntesis de glucógeno fue descubierto por Luis F. Leloir (Leloir, 1971). Leloir y su grupo establecieron que la biosíntesis y degradación de glucógeno ocurre por diferentes vías. La primera involucra el uso de una forma

activada de glucosa, específicamente UDP-Glc en células de mamíferos, hongos y microorganismos eucariotas heterotróficos, pero ADP-Glc en bacterias y eucariotas fotosintéticos (Preiss y Sivak, 1998; Ballicora y col., 2003, 2004).

El mecanismo de activación de monosacáridos descrito por Leloir indica que la unión al fosfato  $\alpha$  de un NTP y la posterior hidrólisis del PPi genera una variación de energía libre favorable para conducir la reacción de síntesis. Esta es una estrategia común a muchas reacciones de polimerización, no solo en el caso de la activación del dador glucosídico para el glucógeno, sino que es una forma universal de la química de NDP-azúcares, conservada en células de todos los niveles de la vida (Nelson y Cox, 2004). Mediante la activación de monosacáridos con grupos nucleotídilo, la célula distingue un *pool* de hexosas para un dado propósito (como por ejemplo síntesis de glucógeno, ver Figura III.1) de otro como las hexosas-P destinadas a vías tales como la glucólisis. Un aspecto destacable también es que la base nitrogenada, aunque no participa de la transformación química, presenta gran número de grupos para establecer interacciones no covalentes con las enzimas, contribuyendo significativamente a la actividad y especificidad catalítica.



**Figura III.1. Esquema de los destinos metabólicos de la Glc.** Una vez ingresada en la célula la glucosa es fosforilada y utilizada para la producción de diferentes compuestos. La activación como NDP-Glc particiona al azúcar hacia las distintas vías metabólicas.

### III.2.3.1. La molécula de UDP-Glc

La UDP-Glc es la forma activada de la glucosa comúnmente empleada en todos los organismos como precursor para la interconversión entre distintos azúcares, así como también para las reacciones de transferencia de grupos glucosilos en la formación de oligo- y poli-sacáridos y glicoconjugados (Roeben y col., 2006). Es por esto que el compuesto tiene un rol fundamental en el metabolismo de hidratos de carbono y en la fisiología celular (Steiner y col., 2007).

En eucariotas, la UDP-Glc, es sustrato de diferentes glicosil transferasas y actúa como dador glucosilo en la síntesis de polisacáridos de reserva como el glucógeno (por ejemplo, en animales y levaduras) y de polisacáridos estructurales como la celulosa en

plantas y algunas bacterias, de motivos glicano en glicolípidos y glicoproteínas y de los disacáridos trehalosa y sacarosa (Alonso y col., 1995; Kleczkowski y col., 2004). También cumple un papel importante en la interconversión de Gal a Glc por la vía de Leloir (Leloir, 1951; Frey, 1996; Mollerach y col., 1998), en la regulación de la fuerza osmótica en el citoplasma y la formación de flagelos (Komeda y col., 1977; Kleczkowski y col., 2004; Thoden y Holden, 2007b). Además, otros nucleótidos azúcares importantes como UDP-xilosa, UDP-ácido glucurónico y UDP-Gal son derivados de la UDP-Glc (Turnock y Ferguson, 2007). En procariontes, algunos de estos azúcares activados son utilizados para construir la cápsula bacteriana compuesta por polisacáridos que frecuentemente determinan su virulencia (Bonofiglio y col., 2005b). En una amplia variedad de organismos, la UDP-Glc está involucrada en el monitoreo y asistencia del plegamiento de proteínas sintetizadas en el retículo endoplasmático debido a que es sustrato de la enzima UGGT: *unfolded glycoprotein glucosyltransferase* (Parker y col., 1995; Flores-Díaz y col., 1997; Trombetta y Parodi, 2003; Helenius y Aebi, 2004). De esta manera la UDP-Glc aparece como un compuesto clave en la biología de la mayoría de los organismos.

#### III.2.3.2. La molécula de ADP-Glc

En un principio se informó que la incorporación de Glc al  $\alpha$ -poliglucano para la síntesis de almidón a partir de extractos de plantas utilizaba UDP-Glc como sustrato (Leloir, 1971, 1983); pero luego, estudios sobre la especificidad para NDP-azúcares mostraron que la ADP-Glc era mejor sustrato en la ruta biosintética ocuriente en plantas superiores (Recondo y Leloir, 1961). Posteriormente, se identificó por primera vez una enzima involucrada en la síntesis de ADP-Glc, la ADP-Glc PPasa (Espada, 1962), lo que resultó coherente con el posterior aislamiento del metabolito de extractos de maíz (Recondo y col., 1963). Hoy se sabe que para la síntesis de almidón en organismos

fotosintéticos (algas verdes y plantas superiores) y de glucógeno en bacterias (incluyendo cianobacterias), la ADP-Glc es utilizada como donador de grupo glucosilo (Preiss y Sivak, 1998; Ballicora y col., 2003).

#### III.2.4. *Glucógeno: estructura y función*

El descubrimiento de glucógeno hepático en 1857 se atribuye a Claude Bernard (Young, 1957) y un siglo y medio más tarde varios de sus postulados originales todavía se aceptan. El estudio del metabolismo de este compuesto en la segunda mitad del siglo XX introdujo una serie de nuevos conceptos bioquímicos sobre la regulación biológica, que quedaron arraigados en el pensamiento actual y que dieron lugar a la adjudicación de cuatro premios Nobel (Carl y Gerty Cori en 1947; Luis F. Leloir en 1970, Earl Sutherland en 1971; Edwin Krebs y Edmond Fischer en 1992; ver [http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/](http://nobelprize.org/nobel_prizes/)). El glucógeno es un polímero ramificado de Glc que sirve como un medio osmóticamente compatible para almacenar reservas del monosacárido en las células en tiempos de abundancia nutricional para la utilización en tiempos de necesidad (Roach y col., 2012). Está presente en un amplio espectro de organismos, desde bacterias y arqueas a los distintos organismos eucariotas heterótrofos, incluyendo al hombre (Wilson y col., 2010; Roach y col., 2012); mientras que las plantas sintetizan polímeros de reserva de glucosa en forma de almidón, como ya se mencionó antes. De esta forma, la polimerización de la glucosa puede pensarse como un mecanismo universal para el almacenamiento de carbono y energía en la naturaleza.

La molécula de glucógeno muestra la optimización de una estructura compleja, dado que no se requieren “instrucciones” de un nivel superior ni templado para proceder con su síntesis. Esto es un argumento de peso para proponer que el polímero se transformó en la molécula de almacenamiento de elección en un etapa muy temprana de

la evolución de los organismos vivos (Bilgen, 2004). Otro argumento que sustenta esta idea tiene que ver con la conservación de la estructura del glucógeno, de bacterias a mamíferos pasando por las levaduras. La estructura del polisacárido tiene que haber sido “optimizada” muy tempranamente en la historia de los organismos y de la evolución de las vías metabólicas; donde puede establecerse que mientras el poliglucano es prácticamente igual en todos los organismos, las enzimas involucradas en el metabolismo del mismo (tanto en la síntesis como en la degradación) han experimentado modificaciones evolutivas, encontrándose marcadas diferencias en los aspectos cinéticos, regulatorios y estructurales de las mismas. Esto implica que la estructura funcional óptima del polímero se conservó independientemente del contexto metabólico diferente de cada célula.

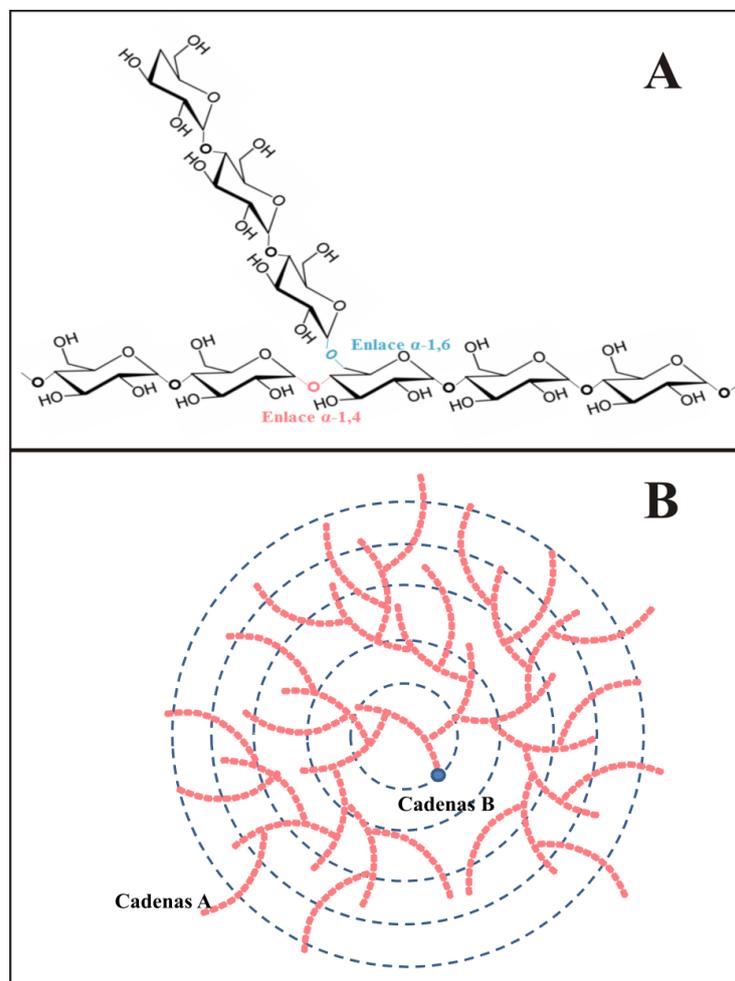
La biosíntesis de poliglucanos es una estrategia importante para lograr la reserva metabólica de carbono y energía (Melendez y col., 1999), siendo que cumple con los 3 preceptos propuestos por Wilkinson para definir a un compuesto de reserva: (i) acumularse intracelularmente frente a un exceso de nutrientes/energía, (ii) utilizarse cuando el exceso de nutrientes desaparece del medio y (iii) emplearse para la obtención de energía que permita sustentar el crecimiento/mantenimiento en ausencia de una fuente de energía externa (Wilkinson, 1963). Claramente, el glucógeno satisface estos requerimientos. La principal ventaja de utilizar este tipo de polisacárido para almacenar Glc radica en que las propiedades físicas y la elevada masa molecular del mismo minimizan el efecto de la acumulación sobre la presión osmótica intracelular (se pueden acumular hasta cinco decenas de miles de unidades de Glc en una sola partícula de glucógeno) (Melendez y col., 1999; Cornish-Bowden y Cardenas, 2010).

El glucógeno es un polímero ramificado de elevada masa molecular, formado por residuos de  $\alpha$ -D-Glc unidos por enlaces glucosídicos  $\alpha$ -1,4 en la cadena principal y

con ramificaciones  $\alpha$ -1,6 cada ocho a doce unidades de Glc (Figura III.2 A), dependiendo del origen. Aislado de fuentes biológicas se ha visto que existe como una población de moléculas de diferentes tamaños. En organismos eucariotas, el polímero tiene una longitud de cadena lateral de 12 a 14 residuos (Wang y Wise, 2011; Roach y col., 2012); mientras que, dependiendo la fuente, la longitud de cadena puede ser de 7 a 21 unidades glucosídicas en procariontes (Wang y Wise, 2011). Inclusive, recientemente se ha propuesto que el glucógeno con cadenas cortas favorece el tiempo de supervivencia en condiciones de hambruna (Wang y Wise, 2011).

Alrededor de la década de 1970, Whelan y colaboradores propusieron un modelo estructural de la molécula del glucógeno (Figura III.2 B) en el cual se definen las cadenas glucosídicas lineales “B”, que se encuentran en el interior de la molécula con 2 ramificaciones cada una, y las cadenas “A”, que se encuentran expuestas en la capa más externa de ramificación y son susceptibles de ser degradadas (Figura III.2 B) (Whelan, 1961, 2003). Posteriormente, mediante modelado matemático Meléndez-Hevia y col. realizaron la optimización de la estructura de la molécula del poliglucano, tomando como variables el número de ramificaciones por cada cadena lineal “B”, la longitud de las cadenas y que el volumen ocupado sea mínimo (Melendez-Hevia y col., 1993; Melendez y col., 1999). Los resultados obtenidos presentan grandes similitudes a la estructura propuesta por Whelan (Melendez-Hevia y col., 1993; Melendez y col., 1997; Melendez y col., 1999; Whelan, 2003). En este modelo, el glucógeno consistiría en una serie de niveles, siendo el nivel más exterior de cualquier molécula completamente formada el que contendrá 50% de los residuos totales de Glc de la molécula como cadenas A no ramificadas. Sin embargo, sólo una fracción de estos residuos de cadena exterior es accesible a la enzima glucógeno fosforilasa degradativa, que utiliza sólo cuatro residuos de una rama sin la intervención de la enzima desramificante

(amiló- $\alpha$ -1,6-glucosidasa,4- $\alpha$ -glucano). Es así que el grado de ramificación permite también que haya espacio suficiente para que actúen las enzimas asociadas al poliglucano. La estructura del glucógeno optimiza el rápido almacenamiento de unidades glucosídicas, incrementa la solubilidad de la molécula, y por lo tanto su capacidad de acumulación en un espacio limitado. A su vez, un mayor número de residuos de Glc terminales permiten la rápida movilización de los monómeros, tanto para la síntesis como para la degradación (Melendez-Hevia y col., 1993; Melendez y col., 1997; Melendez y col., 1999; Whelan, 2003).



**Figura III.2. Estructura del glucógeno.** (A) Porción de una molécula de glucógeno donde se muestran los enlaces característicos. (B) Esquema de la organización de la molécula.

#### III.2.4.1. *Glucógeno en distintos organismos*

Todos los seres vivos tienen la capacidad de utilizar una variedad de nutrientes y adaptarse al cambio de las condiciones ambientales en forma continua. Numerosos organismos, como mamíferos (incluyendo al hombre), levaduras, bacterias y algunos protozoos, acumulan las reservas de carbono y energía para hacer frente a las condiciones de escasez temporalmente presentes en el medio ambiente. La biosíntesis de glucógeno es una estrategia principal de dicho almacenamiento metabólico y una variedad de detectores y mecanismos de señalización han evolucionado en especies distantes para asegurar la producción de este homopolisacárido. En el nivel más fundamental, los procesos de la síntesis y la degradación de glucógeno en todos los organismos comparten ciertas similitudes generales. Sin embargo, la regulación de estos procesos es marcadamente distinta, lo que indica que han evolucionado por separado para responder de forma óptima a las condiciones del hábitat de cada especie (Wilson y col., 2010).

Tanto para mamíferos como para levaduras hay una amplia variedad de información sobre el glucógeno y su metabolismo. A partir de esto se han determinado una serie de características en relación a la síntesis de este polímero en organismos eucariotas que es distintiva de lo que ocurre en organismos procariotas. Como se ha mencionado antes, en los primeros el donador de grupo glucosilo para la elongación del poliglucano es la UDP-Glc, mientras que en procariotas la Glc activada utilizada en esta vía es presentada como ADP-Glc. Además, en eucariotas el punto de regulación de la ruta metabólica está dado a nivel de la glucógeno sintasa (GSasa) (Roach, 2002), cuando en bacterias ha sido demostrado que la regulación de la vía está dada en el paso de producción de la ADP-Glc (Preiss, 2009).

En mamíferos, los principales depósitos de glucosa están en el músculo esquelético y el hígado, aunque muchos otros tejidos son capaces de la síntesis de glucógeno, incluyendo riñón, corazón, la grasa y el cerebro. En estos organismos, el glucógeno del hígado es requerido para el mantener los niveles necesarios de glucosa en sangre durante el ayuno, mientras que las reservas musculares son utilizadas localmente como un combustible para la contracción muscular (Roach y col., 2012). La desregulación del metabolismo del glucógeno se ha implicado en el desarrollo de muchas enfermedades, incluyendo diabetes mellitus de tipo 2 (Cline y col., 1994; Roach y col., 2012). La ausencia o modificaciones de enzimas que participan tanto en la síntesis como en la degradación del polímero están asociadas a distintas enfermedades, algunas de las cuales resultan letales (Voet y Voet, 2006; Roach y col., 2012).

En levaduras, se ha demostrado que las reservas de glucógeno tienen un rol esencial en la supervivencia durante la privación de nutrientes a largo plazo (Sillje y col., 1999). Además, las células que pueden acumular glucógeno tienen una ventaja de crecimiento sobre aquellas que no pueden hacerlo, lo que sugiere que el polímero contribuye a un mejor funcionamiento celular en general (Anderson y Tatchell, 2001). Para el caso de eucariotas inferiores, como los protozoos, es limitada la cantidad de trabajos que se encuentran en relación al metabolismo del glucógeno. Si bien la acumulación de este compuesto no ocurre en todos los protistas, en algunos de ellos como *Giardia* (Ladeira y col., 2005; Pradhan y col., 2012) y *Entamoeba* (Takeuchi y col., 1977) se ha observado la presencia de partículas de glucógeno. En estos microorganismos parece cumplir la función de almacenamiento y fuente de carbono y energía durante el crecimiento y la diferenciación del parásito (Pradhan y col., 2012). Pero la información sobre las enzimas que participan en las rutas de síntesis y degradación del compuesto es escasa.

Se ha informado de la presencia glucógeno o  $\alpha$ -1,4-poliglucanos similares en bacterias (tanto Gram-negativas como Gram-positivas) y arqueas (Preiss, 2009). El papel exacto de este poliglucano en bacterias no es tan claro como en las células animales y hongos, pero varios estudios han relacionado el metabolismo del compuesto en la supervivencia de la bacteria en el medio ambiente, así como también su rendimiento simbiótico, colonización y virulencia (Jensen, 1976; Bonafonte y col., 2000; Ballicora y col., 2003; Bourassa y Camilli, 2009; Preiss, 2009). Se ha establecido la importancia del glucógeno en situaciones fisiológicas específicas de diversos microorganismos. Por ejemplo, en *Salmonella enteritidis* demostró que hay relación entre la síntesis de glucógeno, la capacidad para formar biofilmes y la virulencia (Bonafonte y col., 2000); mientras que en bacilos formadores de esporos como *Bacillus subtilis*, guarda una estrecha relación con la esporulación y las condiciones de cultivo (Kiel y col., 1994). En *Streptococcus mutans* la acumulación del polisacárido (conocido como IPS, de las siglas en inglés de “*internal polysaccharide*”) es el factor de virulencia (Spatafora y col., 1995), pues la capacidad de producir caries depende directamente de la acumulación del mismo (Islam y col., 2007). Por otra parte, en *Corynebacterium glutamicum*, microorganismo utilizado para la producción industrial de aminoácidos (particularmente glutamato y lisina), se ha demostrado que el glucógeno, aunque no es esencial para el crecimiento ni la supervivencia, le confiere ventajas para una adaptación rápida al estrés osmótico (Seibold y Eikmanns, 2007).

### **III.3. Enzimas involucradas en la partición de la Glc**

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 (Nelson y Cox, 2004).

La Glc-1P es un metabolito que se encuentra en bajas concentraciones intracelulares, ya que por acción de la fosfoglucomutasa es convertida a Glc-6P, en una reacción reversible pero desplazada hacia la formación de esta última (Gao y Leary, 2004; Zhang y col., 2005). La Glc-1P es además sustrato de 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 (Mendez y Salas, 2001). 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 (Ballicora y col., 2003, 2004)], la síntesis de compuestos de pared (Koo y col., 2000), la producción de polisacáridos estructurales y de secreción (Koplin y col., 1992; Weissborn y col., 1994) y la interconversión de hidratos de carbono (Frey, 1996; Holden y col., 2003). En eucariotas, los distintos NDP-Glc derivados también están involucrados en el proceso de glicosilación de proteínas (Parodi, 2000). 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.

### III.3.1. *La familia de las NDP-azúcar PPasas, características generales*

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 nucleotidililtransferasa (también denominada como NDP-azúcar PPasa, EC 2.7.7.-) y procede con la pérdida concomitante de pirofosfato (Singh y col., 2012). Las estructuras tridimensionales de muchas enzimas de esta clase han sido resueltas, incluyendo timidililtransferasas [EC 2.7.7.24; (Blankenfeldt y col., 2000a; Barton y col., 2001; Zuccotti y col., 2001)]; uridililtransferasas [UDP-Glc PPasas, EC 2.7.7.9; (Thoden y col., 1997; Thoden y Holden, 2007a, b; Kim y col., 2010)]; UDP-GlcNAc PPasas [EC 2.7.7.23; (Brown y col., 1999; Kostrewa y col., 2001; Mochalkin y col., 2007; Verma y col., 2009)]; citidililtransferasas [CDP-Glc PPasas, EC 2.7.7.33; (Koropatkin y Holden, 2004; Koropatkin y col., 2005)]; guanililtransferasa [EC 2.7.7.22; (Pelissier y col., 2010)] y adenililtransferasa [ADP-Glc PPasa, EC 2.7.7.27; (Jin y col., 2005; Cupp-Vickery y col., 2008)].

A pesar de la gran diversidad existente a nivel de estructura primaria (los miembros de la familia presentan relativamente baja identidad de secuencia) y cuaternario (se han descrito formas mono-, di-, tetra-, hexa-, y octaméricas), las nucleotidililtransferasas comparten una organización de dominio similar y características estructurales comunes:

- Tienen un dominio catalítico N-terminal conservado, presentan un plegamiento de tipo GT-A (Singh y col., 2012) 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  $\beta$  central y dos hélices  $\alpha$  (Singh y col., 2012). 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 PPasas descritas hasta el momento y se ha identificado como parte del sitio de unión al NTP (Brown y col., 1999; Sivaraman y col., 2002; Jin y col., 2005; Koropatkin y col., 2005; Steiner y col., 2007; Pelissier y col., 2010).

- Típicamente, las nucleotidiltransferasas utilizan un mecanismo secuencial bien ordenado, donde se une primero el NTP. La reacción catalizada sigue un mecanismo  $S_N2$ , con el ataque nucleofílico del azúcar-1P al fosfato  $\alpha$  del NTP (Giraud y Naismith, 2000; Barton y col., 2001; Zuccotti y col., 2001; Koropatkin y Holden, 2004, 2005).
- Utilizan como cofactor esencial un metal divalente, generalmente  $Mg^{2+}$ , 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 (Zuccotti y col., 2001; Sivaraman y col., 2002).

### III.3.1.1. *La ADP-Glc PPasa, punto de regulación de la síntesis del polímero de reserva en plantas y bacterias*

La síntesis de glucógeno en bacterias y de almidón en plantas ocurre con el uso de ADP-Glc y el paso limitante de la ruta tiene lugar en el paso que produce el dador glucosídico, el que es catalizado por la ADP-Glc PPasa (Preiss y col., 1991; Preiss, 1996; Ballicora y col., 2003, 2004; Preiss, 2009). Distintas experiencias con organismos mutantes, ya sea con sobreproducción o con baja acumulación del polisacárido, sustentan a la enzima como la regulatoria en el camino de biosíntesis del polisacárido de reserva en los organismos indicados (Ballicora y col., 2003, 2004; Preiss, 2009). Esta enzima cataliza la reacción:  $ATP + \alpha\text{-D-Glc-1P} \leftrightarrow \text{ADP-Glc} + \text{PPi}$ , en presencia de

$Mg^{2+}$ . La reacción es reversible *in vitro*, con una constante de equilibrio próxima a 1. Sin embargo, *in vivo* resulta prácticamente irreversible, debido tanto a la utilización de la ADP-azúcar en la biosíntesis del poliglucano como por la hidrólisis del PPi por una pirofosfatasa inorgánica (Ballicora y col., 2003, 2004; Preiss, 2009).

La ADP-Glc PPasa es una enzima regulada alostéricamente. Aunque los principales reguladores varían según el origen biológico de la enzima, los mismos comparten una característica en común: son intermediarios claves del camino principal de asimilación y distribución del carbono en el respectivo organismo (Preiss, 1996; Preiss y Sivak, 1998; Ballicora y col., 2003, 2004; Preiss, 2009). Así, por ejemplo, en varias bacterias heterotróficas la enzima es activada por metabolitos del camino glucolítico (tanto de la glucólisis clásica de EMP o del metabolismo de ED) tales como la Fru-1,6-bisP, la Fru-6P o el Pyr; mientras que el AMP, el ADP y/o el ortofosfato inorgánico (Pi) son los principales inhibidores. Por otra parte, la enzima de organismos que realizan fotosíntesis oxigénica es primariamente regulada por 3-fosfoglicerato (3-PGA, activador) y por Pi (inhibidor). Globalmente, el análisis racional de las propiedades regulatorias de la ADP-Glc PPasa, sumado al hecho que el ATP es uno de sus sustratos, indica que la síntesis de polisacáridos de reserva en bacterias y plantas es máxima cuando hay un exceso de carbono y energía en la célula y viceversa (Ballicora y col., 2003, 2004). Teniendo en cuenta la especificidad para los activadores e inhibidores, se han propuesto nueve clases diferentes para agrupar a las ADP-Glc PPasas (Ballicora y col., 2003, 2004).

Existe una relación entre las ADP-Glc PPasas y la estructura cuaternaria en los distintos tipos de organismos. La mayoría de las enzimas bacterianas son homotetraméricas ( $\alpha_4$ ), a excepción de unas pocas (Kiel y col., 1994; Takata y col., 1997; Asencion Diez y col., 2013) que presentan una estructura heterotetramérica

( $\alpha_2\delta_2$ ). Esto último es característico de las ADP-Glc PPasas de bacterias Gram-positivas del grupo de Firmicutes (bajo contenido de G+C). En estas bacterias los genes necesarios para la síntesis del glucógeno se encuentran agrupados en un operón y un análisis comparativo de este grupo de genes permitió identificar que *glgC* y *glgD* codifican para proteínas homólogas a la ADP-Glc PPasa de procariotas (Ballicora y col., 2003). La ADP-Glc PPasa de organismos eucariotas (desde algas verdes hasta plantas superiores) están compuestas por dos subunidades,  $\alpha$  y  $\beta$ , que en conjunto forman una estructura heterotetramérica  $\alpha_2\beta_2$ . Se ha descrito que la subunidad denominada pequeña ( $\alpha$ , 50-54 kDa) posee actividad catalítica mientras que la llamada grande ( $\beta$ , 51-60 kDa) modula la actividad de la subunidad  $\alpha$  (Preiss y Greenberg, 1981; Ballicora y col., 2004). La subunidad  $\beta$  encontrada en eucariotas fotosintéticos modifica la sensibilidad de la subunidad  $\alpha$  hacia los efectores alostéricos, posiblemente mediante interacciones proteína-proteína. Es necesario aclarar que la subunidad  $\beta$  es estructuralmente diferente a la subunidad  $\delta$  encontrada en Firmicutes (Ballicora y col., 2003, 2004; Cho y col., 2008).

A la fecha, se han informado sendas estructuras cristalinas de la enzima de tubérculo de papa en su forma homotetramérica ( $\alpha_4$ ) [la primer resolución atómica de la estructura de una ADP-Glc PPasa (Jin y col., 2005)] y la de *Agrobacterium tumefaciens* (Cupp-Vickery y col., 2008). En ambos casos las enzimas están en un estado inhibido debido a la presencia de altas concentraciones de sulfato de amonio en las condiciones empleadas para la cristalización, aspecto que limita la realización de un análisis completo de los dominios funcionales. Sin embargo, a lo largo de los casi 50 años de estudio de las ADP-Glc PPasas procedentes de distintas fuentes se han identificado residuos aminoacídicos relevantes para la catálisis y la regulación de la enzima. Tales aproximaciones experimentales se realizaron con herramientas de modificación química

y de mutagénesis sitio dirigida y al azar (Parsons y Preiss, 1978b, a; Kumar y col., 1988; Kumar y col., 1989; Hill y col., 1991; Hill y Preiss, 1998; Frueauf y col., 2001; Gomez-Casati y col., 2001; Frueauf y col., 2002; Bejar y col., 2006a; Figueroa y col., 2011). Así por ejemplo, diferentes experimentos permitieron identificar en la enzima de *E. coli* residuos como la Tyr<sup>114</sup> (Lee y Preiss, 1986; Lee y col., 1987; Kumar y col., 1988), la cual estaría implicada en la interacción con el anillo de adenina presente en los sustratos ATP y ADP-Glc.

El piridoxal-5-P (PLP) es un agente que interacciona con residuos lisina para formar una base de Schiff en una reacción de piridoxilación. Dado que el PLP puede ser considerado un análogo estructural de la Fru-1,6-bisP y del 3-PGA (de hecho se comporta como activador de las enzimas de *E. coli*, *Anabaena* sp. y de hojas de espinaca) (Preiss, 1996), lo hace muy útil para identificar residuos ubicados en los sitios de unión de aquellos activadores. Así, se determinó que el PLP puede unirse a los residuos Lys<sup>39</sup> y Lys<sup>195</sup> en la ADP-Glc PPasa de *E. coli*. Mediante experimentos de protección de la piridoxilación (Parsons y Preiss, 1978a, b) y mutagénesis sitio dirigida (Hill y col., 1991), se pudo concluir que la Lys<sup>195</sup> está específicamente involucrada en la unión a Glc-1P; mientras que la Lys<sup>39</sup> es importante para la interacción con el activador Fru-1,6-bisP (Gardiol y Preiss, 1990). En estudios más recientes, se confirmaron los resultados anteriores al construir la arquitectura molecular del sitio de unión de Glc-1P en la enzima de *E. coli* mediante modelado por homología y mutagénesis sitio dirigida (Bejar y col., 2006a). Por otra parte, con el objeto de identificar los residuos catalíticos, se pudo observar que entre los aminoácidos altamente conservados en la familia de PPasas se encuentra un residuo de ácido aspártico próximo a los sitios de unión de los sustratos. La caracterización de las mutantes sitio dirigidas del Asp<sup>142</sup> en la

ADP-Glc PPasa de *E. coli* confirmó el rol de este residuo como involucrado en el proceso catalítico (Frueauf y col., 2001).

Diferentes estudios han logrado identificar algunos residuos responsables de la unión a efectores en la regiones N- (Parsons y Preiss, 1978b, a; Gomez-Casati y col., 2001) y C-terminal (Sheng y col., 1996; Sheng y Preiss, 1997; Meyer y col., 1998a; Meyer y col., 1998b; Frueauf y col., 2002; Iglesias y col., 2006) de diferentes organismos. Hoy en día hay claras evidencias que la regulación de la enzima está determinada por la interacción entre los extremos N- y C-terminal (Ballicora y col., 2002; Diez y col., 2013). Se ha demostrado que los residuos Trp<sup>113</sup> y Gln<sup>74</sup> son claves en la respuesta alostérica a la Fru-1,6-bisP de la enzima de *E. coli* (Figuroa y col., 2011). Estos residuos forman parte de dos *loops* funcionales universalmente conservado en las ADP-Glc PPasas, independientemente de sus propiedades regulatorias. El dominio formado por dichos *loops* se ha evidenciado como un “gatillo alostérico” común a esta familia de enzimas, uniendo así los sitios catalítico y de unión a efectores (Figuroa y col., 2011). De hecho, en un trabajo posterior en la enzima de papa (Figuroa y col., 2013), se ha caracterizado que los residuos homólogos tienen los mismos efectos sobre el activador de esa enzima, el 3-PGA.

Del análisis de los datos experimentales obtenidos hasta el momento, sumado a modelos estructurales de la enzima, surge la idea de que las ADP-Glc PPasas y otras NDP-azúcar PPasas derivan de un ancestro común, siendo que todas exhiben el mismo plegamiento en su dominio catalítico (Smith-White y Preiss, 1992; Brown y col., 1999; Blankenfeldt y col., 2000b). La diferencia principal es que las ADP-Glc PPasas son enzimas alostéricas y el monómero es de mayor tamaño, ya que el extremo C-terminal se ha extendido entre 120 y 150 aminoácidos y el N-terminal unos 10 a 40 residuos. Probablemente, la adquisición del fragmento C-terminal le confiere el carácter de

enzima alostérica o mejora cierta regulación rudimentaria ya presente (Ballicora y col., 2003, 2004). De hecho, en nuestro grupo de trabajo se ha demostrado que una enzima no regulada alostéricamente, como lo es la UDP-Glc PPasa bacteriana, puede adquirir esta propiedad con la simple fusión del extremo C-terminal de una ADP-Glc PPasa de procariontas (Diez y col., 2013). Esto lleva a pensar que una vez adquirido ese dominio, la enzima pudo haber experimentado distintos procesos evolutivos que favorecieron una adaptación a los diferentes entornos metabólicos, lo cual produjo la diferenciación en las diversas clases de enzimas (Ballicora y col., 2003, 2004). Con respecto al extremo N-terminal, no está claro en qué punto de la evolución se ha expandido o si ha sido un proceso más dinámico (Ballicora y col., 2003, 2004).

El origen de las ADP-Glc PPasas en eucariotas probablemente esté relacionado con el proceso endosimbiótico entre procariontas que dio lugar a la formación de plástidos y la posterior transferencia del gen al núcleo (Martin y Herrmann, 1998; Martin y col., 1998). En concordancia con esta hipótesis, las enzimas de cianobacterias exhiben mayor similitud con las subunidades pequeñas de plantas que con las de otras bacterias heterotróficas. En eucariotas, la subunidad  $\beta$  apareció más tarde en la evolución, probablemente por duplicación génica, luego de lo cual esos genes dieron origen de manera divergente a numerosas variedades especializadas (Ballicora y col., 2004; Kuhn y col., 2009). Esto permitió obtener distintos polipéptidos: una subunidad catalítica y una regulatoria. Aunque ambas parecen provenir del mismo ancestro (dada la similitud de las regiones conservadas) la mayor similitud entre las subunidades  $\alpha$  indica que las mismas han tenido restricciones evolutivas más fuertes que las  $\beta$ . Además, las subunidades  $\alpha$  muestran mayor similitud con la enzima de cianobacterias que con las subunidades  $\beta$ , las cuales entre sí presentan considerable diferencia de secuencia. Esto último probablemente refleja los requerimientos diferenciales en la

modulación de la respuesta de la subunidad  $\alpha$ , es decir, a la activación e inhibición alostérica representada por las diferentes demandas de tejidos y especies (Smith-White y Preiss, 1992; Crevillen y col., 2003; Ballicora y col., 2004; Kuhn y col., 2009). Una etapa posterior en la evolución de las subunidades  $\alpha$  de ADP-Glc PPasas de plantas involucraría la adquisición de un tipo de regulación a nivel post-traducciona mediado por tiorredoxinas en ciertos tejidos (Ballicora y col., 2000; Ballicora y col., 2004).

### III.3.1.2. *La UDP-Glc PPasa, una enzima ampliamente distribuida en la naturaleza*

La enzima UDP-Glc PPasa (UTP: $\alpha$ -D-Glc1P 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 (Kleczkowski y col., 2004) y no se encuentran relacionadas a nivel de estructura tridimensional (Flores-Diaz y col., 1997; Mollerach y col., 1998; Mollerach y Garcia, 2000). 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 (Chang y col., 1999).

### La UDP-Glc PPasa bacteriana

Pese a la importancia que cumple en el metabolismo de los hidratos de carbono, la UDP-Glc PPasa de origen bacteriano, en contraste a la ADP-Glc PPasa, en general ha sido escasamente estudiada. La UDP-Glc PPasa es una proteína fundamental para la adhesión y virulencia de numerosas bacterias, estando involucrada en la síntesis de polisacáridos capsulares y LPS (Genevaux y col., 1999; Degeest y de Vuyst, 2000; Bonofiglio y col., 2012). En bacterias entéricas tales como *E. coli* y *Salmonella typhimurium* la enzima participa en el metabolismo de la Gal mediante la vía de Leloir (Hossain y col., 1994). De hecho, mutantes de *E. coli* deficientes en esta enzima son incapaces de utilizar Gal como fuente de carbono y no incorporan Glc y Gal a las paredes y membranas bacterianas, resultando en una síntesis incompleta de la cadena lateral de los LPS y del receptor para bacteriófago de la superficie celular (Fukasawa y col., 1962; Sundararajan y col., 1962). La UDP-Glc PPasa está asociada con la producción de exopolisacáridos (EPS) en algunas cepas de *Streptococcus thermophilus* cultivadas en medios con Glc o lactosa como única fuente de carbono (Escalante y col., 1998). En el caso de *Streptococcus pneumoniae*, la enzima es clave para la producción del polisacárido de la cápsula que contiene Glc, Gal, ácido UDP-glucorónico (UDP-GlcA) o ácido UDP-galacturónico, operando como factor de virulencia (Mollerach y col., 1998; Bonofiglio y col., 2005b). Otro ejemplo es *Pseudomonas aeruginosa*, donde el producto del gen *galU* (Chang y col., 1999) es un factor de virulencia requerido como facilitador de la infección de la córnea (Priebe y col., 2004).

La bacteria *Sphingomonas elodea* es un microorganismo usado industrialmente para la síntesis de una goma de EPS aprovechado como agente gelificante y estabilizante de alimentos. La vía de producción de este compuesto es un proceso de

múltiples etapas, comenzando con la formación intracelular de precursores de nucleótidos azúcares UDP-Glc, UDP-GlcA y TDP-L-ramnosa, donde la UDP-Glc PPasa juega un rol fundamental en la producción del polímero (Sa-Correia y col., 2002). En el mismo plano, bacterias del género *Xanthomonas* (*X. campestris*, *X. axonopodis*) producen polisacáridos (goma xantano) estrictamente relacionados a un camino metabólico que utiliza UDP-Glc y los genes *galU* que codifican para las PPasas han sido clonados y caracterizados recientemente (Becker y col., 1998; Bosco y col., 2009). Además, la UDP-Glc PPasa juega un papel clave en la síntesis de trehalosa, un metabolito clave en la regulación y estabilización de la célula contra el estrés osmótico (Bonafonte y col., 2000; Padilla y col., 2004a; Padilla y col., 2004b); así como también en la biosíntesis de celulosa, particularmente en bacterias de los géneros *Acetobacter*, *Rhizobium*, *Agrobacterium* y *Sarcina* (Ross y col., 1991).

La mayoría de las UDP-Glc PPasas de organismos procariotas caracterizadas hasta el momento, como ser la de *E. coli*, *S. elodea* y *C. glutamicum*, presentan una estructura tetramérica (dímeros de dímeros) (Thoden y Holden, 2007a, b), mientras que la enzima de *Xanthomonases* dimérica (Bosco y col., 2009). En las estructuras cristalinas de la enzima de *E. coli* y *C. glutamicum*, el dominio C-terminal de cada monómero está formado por una  $\alpha$ -hélice que interactúa con la  $\alpha$ -hélice del dominio C-terminal de la otra subunidad, formando así un “dímero fuerte”. Esto indica que esta interacción es esencial en el ensamblado del dímero, junto con la región en donde una subunidad se cierra sobre el sitio activo de la otra subunidad (Thoden y Holden, 2007a, b). Recientemente ha sido establecido un mecanismo enzimático bi-bi ordenado para las UDP-Glc PPasas bacterianas (Kim y col., 2010).

### La UDP-Glc PPasa eucariota

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. Como fue descrito en el apartado anterior, las UDP-Glc PPasas procariotas forman principalmente homotetrámeros, mientras que en animales y levaduras las proteínas funcionales se encuentran formando complejos octaméricos (Roeben y col., 2006) y en plantas y protozoos la forma enzimáticamente activa es monomérica (Martz y col., 2002; Kleczkowski y col., 2005; Lamerz y col., 2006; Steiner y col., 2007; Marino y col., 2010; Martinez y col., 2011).

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 (Steiner y col., 2007; Marino y col., 2010; Yang y Bar-Peled, 2010; Martinez y col., 2011) o en la producción de polímeros estructurales (celulosa) durante el enquistamiento que permiten la supervivencia del parásito (Rudick y Weisman, 1974). 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 (Kleczkowski y col., 2004). 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. (Tsuboi y col., 1969; Turnquist y col., 1974; Daran y col., 1997; Roeben y col., 2006). A diferencia de lo que ocurren 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 (Martz y col., 2002; Kleczkowski y col., 2004; Kleczkowski y col., 2005). Se ha descrito que la UDP-GlcPPasa de levaduras es fosforilada por una quinasa implicada también en la regulación de la actividad de la glucógeno sintasa (Daran y col., 1995; Rutter y col., 2002). Si bien esta fosforilación no alteró la actividad de la enzima la falta de fosforilación *in vivo* llevó a síntesis inadecuada de los  $\beta$ -glucanos de la pared celular, a lo cual se sumó un incremento en la acumulación de glucógeno (Smith y Rutter, 2007). Coherente con esto, la enzima fosforilada fue localizada en la membrana plasmática (donde ocurre la síntesis de  $\beta$ -glucanos), mientras que la enzima desfosforilada permanecía en el citoplasma (donde es sintetizado el glucógeno) (Smith y Rutter, 2007). 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 hemos 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 (Martinez y col., 2011). 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 (Turnquist y col., 1974; Roeben y col., 2006; Steiner y col., 2007; Marino y col., 2010; Führung y col., 2013) 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 estas 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 (Geisler y col., 2004; Roeben y col., 2006).

### III.3.2. Las glucógeno sintasas

Las GSasas comprenden un grupo de enzimas que se agrupan en dos familias de glicosiltransferasas (GT3 y GT5) según la base de datos *on-line* CAZy (*Carbohydrate-Active enZYmesdatabase*, <http://www.cazy.org/>), las cuales comparten menos del 15% de identidad (Roach, 2002; Roach y col., 2012). En la familia GT3 se encuentran principalmente las GSasas de hongos y mamíferos que utilizan preferentemente UDP-Glc como dador glucosilo (EC 2.4.1.11) y poseen una masa molecular de ~80 kDa (Roach, 2002; Roach y col., 2012). En tanto que dentro de las glicosiltransferasas de tipo GT5 se encuentran las secuencias correspondientes a las glucógeno/almidón

sintasas de fuentes bacterianas y vegetales (EC 2.4.1.21), que utilizan específicamente como dador glucosilo a la ADP-Glc y son más pequeñas (donde la subunidad posee un tamaño de ~50 kDa) (Busi y col., 2008; Valdez y col., 2008; Preiss, 2009).

Las GSasas, a diferencia de las nucleotidiltransferasas, no requieren la presencia de un metal para su actividad (Roach y col., 2012) y poseen un plegamiento de tipo GT-B (Lairson y col., 2008; Baskaran y col., 2010; Roach y col., 2012), constituido por dos dominios de tipo Rossmann con una hendidura interdominio que alberga el sitio activo. Una observación evolutiva interesante es que la glucógeno fosforilasa, encargada de degradar el glucógeno liberando moléculas de Glc-1P, es también un miembro de la familia con plegamiento GT-B, lo que sugiere una relación estructural divergente para estas enzimas que catalizan reacciones opuestas (Roach y col., 2012). Este plegamiento GT-B se conserva entre GSasas de bacterias, arqueas y eucariotas (Buschiazzo y col., 2004; Horcajada y col., 2006; Sheng y col., 2009; Baskaran y col., 2010). Pero las enzimas eucariotas difieren de aquellas de organismos procariontes no sólo a nivel de secuencia primaria, sino también en la especificidad hacia el donante NDP-azúcar que utilizan y en su regulación (Wilson y col., 2010; Roach y col., 2012). Las GSasas de animales y hongos utilizan UDP-Glc como sustrato para la elongación del poliglucano y son reguladas alostéricamente y mediante modificaciones post-traduccionales (Roach, 2002; Roach y col., 2012). Estas enzimas son activadas por Glc-6P e inhibidas por fosforilación reversible en distintos residuos de Ser y Thr. En cambio, las GSasas de bacterias utilizan ADP-Glc en la reacción de síntesis de glucógeno y no presentan ningún tipo de regulación (Preiss, 2009).

Cada una de las distintas propiedades de las GSasas eucariotas está asociada estructuralmente con inserciones o deleciones de secuencia respecto a las enzimas procariontes. Una gran inserción de aproximadamente 100 aminoácidos está presente en

el plegamiento de Rossmann C-terminal y forma la superficie de interacción de la subunidad para los tetrámeros de GSasas eucariotas (Baskaran y col., 2010). Además de esta gran secuencia de inserción, otra más pequeña (que en la isoforma 2 de levadura abarca los residuos 481-492) forma una estructura de *loop* que proporciona la selectividad para UDP-Glc, en lugar de ADP-Glc, en las formas eucariotas (Roach y col., 2012). La regulación por fosforilación está mediada a través de residuos en las secuencias N- y/o C-terminal (Roach y col., 2012). Sorprendentemente, la adquisición de la regulación por Glc-6P no está relacionada con la adición de elementos estructurales, ya que el sitio de unión se compone de la estructura secundaria conservada (Baskaran y col., 2010).

La GSasa de mamíferos fue uno de los primeros ejemplos de una enzima fosforilada en forma múltiple (Smith y col., 1971). Varias quinasas fueron vinculadas a la fosforilación *in vitro* de los nueve sitios determinados para la GSasa muscular. Estos están ubicados en los extremos N- y C-terminal de la proteína (Roach y col., 2012) y cuatro de ellos (2, 2a, 3a y 3b) se identificaron como los más importantes en la regulación de la actividad de la enzima de músculo de conejo (Skurat y col., 1994; Skurat y Roach, 1995). Un análisis similar de la GSasa hepática, sin embargo, sugiere un papel dominante para la fosforilación en uno sólo de esos sitios (el sitio 2) (Ros y col., 2009). Las enzimas de levadura carecen de los residuos susceptibles a ser fosforilados en el dominio N-terminal y poseen tres sitios C-terminales: Ser<sup>650</sup> y Ser<sup>654</sup>, que se asemejan a los sitios de mamíferos 3a y 3b, y Thr<sup>667</sup> que es único para la levadura (Hardy y Roach, 1993). La fosforilación de este último por la quinasa dependiente de ciclina (denominada Pho85) parece dominar la inactivación de esta GSasa (Roach y col., 2012). En todos los casos, la inhibición puede ser suprimida por el activador alostérico Glc-6P o revertida por la acción de las fosfatasas de Ser/Thr

(Roach, 2002). Además, se ha identificado un grupo de seis argininas, conservadas en la región C-terminal de las enzimas de eucariotas superiores, implicadas en la sensibilidad al efector y a la fosforilación (Pederson y col., 2000). Mediante la mutación puntual de estos residuos en la GSasa de levadura (Pederson y col., 2000) y la obtención de cristales de la misma formando complejo con el activador (Baskaran y col., 2010) se ha establecido que la respuesta a la Glc-6P es controlada por dos de estas argininas (Arg<sup>583</sup> y Arg<sup>587</sup>), mientras que los cuatro residuos de Arg adicionales, presentes en la misma hélice regulatoria, intervienen en la inhibición mediante fosforilación.

En el modelo propuesto para la regulación de las GSasas eucariotas la enzima existe en un estado desfosforilado de actividad intermedia, o basal, que puede ser convertido a un estado de baja actividad por fosforilación (Baskaran y col., 2010; Roach y col., 2012). La unión de la Glc-6P convierte a la enzima al estado de alta actividad. Dado que las mutaciones de las Arg conservadas interfieren tanto con la activación como la inhibición de la enzima (Pederson y col., 2000), se ha propuesto que las mismas estarían íntimamente involucradas en la transición entre los diferentes estados de actividad. Los estudios demuestran que estos residuos reguladores, a través de sus interacciones con el fosfato de la Glc-6P o de la Thr<sup>668</sup> fosforilada, actúan como sensores que controlan directamente las transiciones entre estados conformacionales en la GSasa de levadura (Pederson y col., 2000).

#### **III.4. El estudio comparativo de las enzimas involucradas en el metabolismo de carbohidratos en organismos eucariotas y procariotas.**

La utilización de la Glc es una etapa metabólica central en todos los seres vivos. Como ya se ha comentado en este capítulo introductorio, en todos los organismos la utilización de la Glc-1P por distintas NDP-azúcar PPasas determina la producción de

compuestos con funciones celulares diferentes (Figura III.1) (Nelson y Cox, 2004; Spector, 2009). Sin embargo, esto ocurre en forma diferencial en procariontas y eucariotas, por lo que el estudio comparativo de las enzimas que participan en estas vías permite una comprensión más amplia de cómo es utilizada la Glc dentro de la célula [derivándose hacia el metabolismo bioenergético (glucólisis, síntesis de polisacáridos de reserva) o la producción de oligómeros y polímeros estructurales] y cómo este proceso es regulado en los distintos organismos. Es así que para el desarrollo de esta tesis se seleccionaron *E. coli* y *G. lamblia* como modelo de células procariota y eucariota, respectivamente, para la caracterización bioquímica de las enzimas involucradas en la partición de la Glc-1P.

#### III.4.1. *Escherichia coli*, la célula procariota mejor estudiada

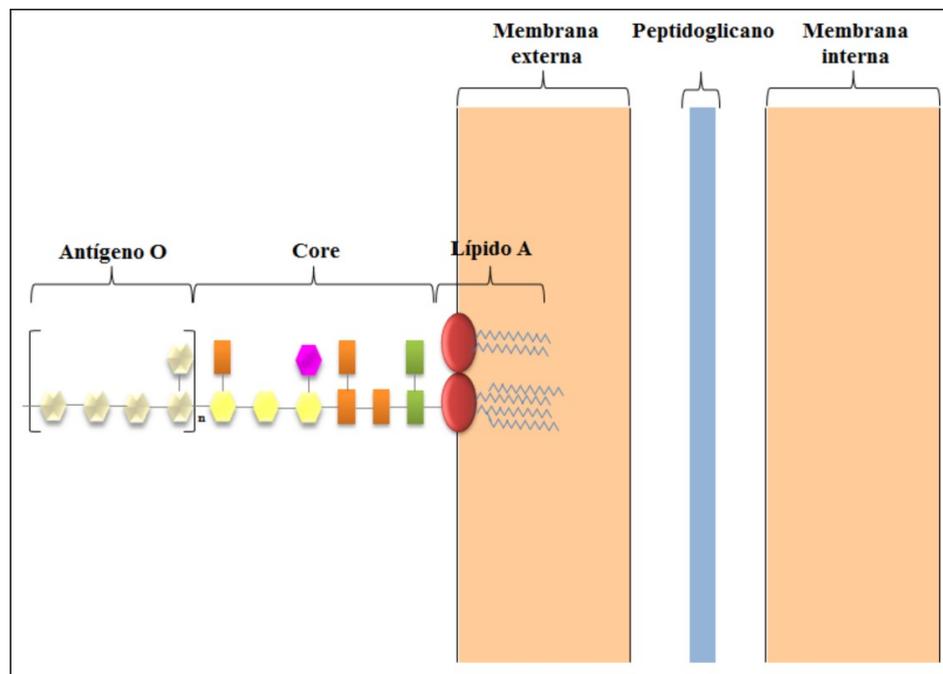
Los microorganismos fueron (y son) un pilar en la ciencia y la tecnología, proporcionando sistemas experimentales para el estudio de los procesos básicos de todas las formas de vida (Gest, 2003). El científico francés ganador del Premio Nobel, Jacques Monod, acuñó la expresión: “Lo que es cierto para *E. coli*, es válido para un elefante”. A pesar de su declaración puede parecer desconcertante, es tal vez la mejor manera de resumir la contribución de este microorganismo a nuestra comprensión de la biología. Particularmente, la cepa *E. coli* K-12 ha sido utilizada durante décadas como un organismo modelo para la biología básica, la genética molecular y la fisiología de las bacterias y fue el “caballo de batalla” de la fundación de la industria de la biotecnología (Riley y col., 2006). Gracias a ella se ha logrado en gran medida el conocimiento de algunos de los fundamentos de la biología moderna que han merecido el reconocimiento de 11 premios Nobel ([http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/](http://nobelprize.org/nobel_prizes/)), entre otros por las contribuciones en el conocimiento de la replicación del ADN, regulación génica y el desarrollo de la tecnología recombinante.

Su nombre, *Escherichia*, es debido al pediatra alemán Theodor Escherich, quien en 1885 fue el primero en describirla. Mientras que *coli*, hace referencia al hábitat natural del organismo, el colon. La mayoría de cepas de *E. coli* viven y crecen sin causar daño en el tracto gastrointestinal, o el intestino, de muchos animales, incluyendo seres humanos; donde su función primaria es proveer al hospedador de vitamina K y prevenir la colonización por bacterias patógenas. Sin embargo, existen cepas patógenas que producen toxinas y están asociadas a envenenamiento con comidas o bebidas contaminadas que causan infecciones gastro-intestinales. *E. coli* que pertenece al orden Enterobacteriales; es una bacteria Gram-negativa, anaerobia facultativa, móvil por flagelos peritricos, no formadora de esporas, capaz de fermentar Glc y lactosa. Como todas las bacterias Gram-negativas, presentan dos membranas lipídicas entre las que se localiza una fina pared celular de peptidoglicano (Sussman, 1997).

Se han identificado un gran número de serotipos de *E. coli*, que se clasifican de acuerdo a la presencia de 3 tipos de antígenos: los llamados O (los cuales son cadenas de poli-sacáridos que forman parte del LPS), los denominados H (de naturaleza protéica) y los antígenos capsulares K (constituidos por polisacáridos de alto peso molecular que se encuentran rodeando a la envoltura celular) (Orskov y col., 1977; Wang y col., 2002; Prager y col., 2003; Wang y col., 2003; Whitfield, 2006). Los antígenos O contribuyen a la mayor variabilidad antigénica en la superficie celular; en base a esas variaciones se han identificado ~160 tipos del mismo (Wang y col., 2002). El serotipo, entonces, está dado por la presencia de uno o más antígenos en la superficie celular. Las cepas que presentan una combinación de los antígenos O y H son las más estudiadas.

Los LPS (Figura III.3) son los componentes principales de la membrana externa de *E. coli* y contribuyen en gran medida a la integridad estructural y a la protección ante

ciertos tipos de ataque químico (Bassford y col., 1977; Schnaitman y Klena, 1993). El LPS es una endotoxina e induce una respuesta fuerte del sistema inmune de los animales. Aunque también ha sido implicado en aspectos no patógenos de la ecología bacteriana, incluyendo la adhesión superficial, la sensibilidad a bacteriófagos, y las interacciones con depredadores tales como las amebas (Raetz y Whitfield, 2002; Rhee, 2014). La biosíntesis de LPS es compleja y requiere de la actividad de numerosos genes, la mayoría de los cuales se agrupan en diferentes regiones del mapa cromosómico (Marolda y col., 1999).



**Figura III.3. Estructura de los LPS.** Los LPS se encuentran expuestos en la superficie de las bacterias, anclados a la membrana externa a través del lípido A, al que se encuentra unido un dominio denominado *core*, constituido por azúcares y, en algunos casos, grupos fosfato, aminoácidos o etanolamida. El *core* varía entre las especies bacterianas e incluso dentro de cepas de la misma especie. La región más variable es el antígeno O, constituido por una cadena larga de poliglucanos.

### III.4.2. *Giardia lamblia*, ¿el eslabón perdido entre eucariotas y procariotas?

Los eucariotas han sido divididos en cuatro grandes grupos: animales, plantas, hongos y protistas. La mayor parte de la investigación biológica en eucariotas se ha llevado a cabo sobre representantes de los tres primeros grupos, mientras que mucho menos se sabe acerca de la biología protista. *Giardia lamblia* (también llamado *G. intestinalis* o *G. duodenalis*) es considerado como un miembro de los protozoos del tipo eucariota unicelular “animal”. Se ubica dentro del orden Diplomonadida en la familia Hexamitidae (Adam, 2001). Este organismo microaerófilo habita en el intestino delgado superior de los seres humanos y varios otros vertebrados, infecta a miles de personas de todo el mundo y es el agente etiológico de la giardiasis, una infección que se caracteriza por la presentación asintomática o manifestaciones agudas y crónicas como la diarrea y la mala absorción (Adam, 2001). Las infecciones son iniciadas por la ingestión de quistes presentes en el agua o alimentos contaminados, o por contacto fecal-oral directo (Carranza y Lujan, 2010).

Los parásitos de *Giardia* patógenos para seres humanos se clasifican en dos grandes grupos: los conjuntos A y B (Monis y col., 2009), que están representados por los aislamientos de humanos denominados WB y GS, respectivamente (Nash, 1992). Ambos conjuntos infectan, además de los seres humanos, a animales de vida silvestre, domésticos y de granja pero no a roedores (Adam, 2001). Sin embargo, se ha reportado el aislamiento GS/H7 de *G. lamblia* (conjunto B) que puede infectar a seres humanos y a ratones. Los ratones son naturalmente infectados por *Giardia muris*, que también se somete a la variación antigénica (Ropolo y col., 2005), pero no infecta a los seres humanos y no puede ser cultivado *in vitro* (Adam, 2001).

*Giardia* es simple con respecto a su estructura en comparación con otros eucariotas. Son organismos unicelulares con núcleo definido (aunque a diferencia de la

mayoría de células eucariotas presentan la característica de ser binucleados) y envolturas vinculadas al retículo endoplásmico, poseen un citoesqueleto complejo y vacuolas periféricas similares a lisosomas que se encuentran debajo de la membrana plasmática (Adam, 2001). Además, muestra ciertas propiedades “procariota”, ya que carece de orgánulos típicos de eucariotas superiores, como una mitocondria clásica, peroxisomas y un aparato de Golgi morfológicamente evidente además de tener algunas de las rutas metabólicas típicas de bacterias (Adam, 2001). Pero estas características diferenciales podrían deberse a pérdidas secundarias ocurridas debido a su estilo de vida parasitaria y a la adquisición de ciertas vías metabólicas por transferencia lateral de genes (Morrison y col., 2001; Samuelson y col., 2005). Es así que *Giardia* es considerado un eucariota primitivo y estudios filogenéticos de varios genes mostraron que este microorganismo pertenece a la rama divergente más temprana del linaje (Morrison y col., 2007). Sin dudas todas estas características hacen de *Giardia* un microorganismo que ofrece oportunidades únicas para obtener conocimientos básicos en las vías principales que caracterizan a las células eucariotas y la identificación de nuevos mecanismos moleculares.

Los mecanismos de adaptación para sobrevivir dentro y fuera del intestino del huésped son la variación antigénica y el enquistamiento, respectivamente (Carranza y Lujan, 2010). La variación antigénica consiste en la mutación continua de antígenos de superficie específicos que se consideran importantes para la evasión del sistema inmune del huésped (Nash, 2002). El enquistamiento, por otra parte, comprende la formación de una pared resistente que permite al parásito sobrevivir en condiciones ambientales hostiles externas y garantiza la transmisión de la infección a huéspedes susceptibles (Carranza y Lujan, 2010). Es así que *Giardia* posee dos etapas de desarrollo estructural y bioquímicamente diferentes: los trofozoítos flagelados móviles (forma vegetativa),

que colonizan el intestino delgado y son responsables de la manifestación clínica de la enfermedad, y las formas de quistes (forma resistente y que es la etapa infectiva del microorganismo) (Adam, 2001). La disponibilidad de Glc durante el ciclo de vida de *Giardia* juega un papel crítico. En primer lugar, tanto en los trofozoítos como en los quistes hay un alto porcentaje de Glc y Gal en las estructuras glicosídicas de las membranas celulares (Ortega-Barria y col., 1990). Además, durante el proceso de enquistamiento, la Glc es utilizada para la síntesis de oligosacáridos estructurales de la pared que recubre el quiste (Sener y col., 2004). En relación a esto, se ha informado que en los trofozoítos de este microorganismo se acumula glucógeno durante las primeras fases de su crecimiento (fase lag y primera etapa de la fase exponencial) y luego este compuesto es utilizado durante las restantes etapas del crecimiento del cultivo (Pradhan y col., 2012). Es así que este poliglucano sirve como una reserva de energía y carbono en los trofozoítos (Ladeira y col., 2005) y juega un papel crítico en su diferenciación a la forma de quiste (Pradhan y col., 2012).

#### III.4.3. *El estudio de las enzimas involucradas en la partición de la Glc-1P*

Con todo lo expuesto es evidente que las enzimas encargadas de derivar la Glc-1P hacia los diferentes destinos metabólicos tienen una función fundamental dentro de la célula. En bacterias hay dos enzimas principales que, en este sentido, utilizan esta hexosa-1P: la ADP-Glc PPasa y la UDP-Glc PPasa. De esta forma, el metabolito es incorporado a la producción de glucógeno (vía ADP-Glc) o a la interconversión de hexosas o a la producción de oligo- y polisacáridos estructurales (vía UDP-Glc). La forma en que este nodo metabólico es regulado en estos microorganismos dependerá de las propiedades cinéticas y regulatorias de las enzimas que participan en los diferentes caminos. Como ya ha sido establecido durante este capítulo introductorio, la ADP-Glc PPasa es una enzima regulada alostéricamente y es el punto de control de la

vía de síntesis de glucógeno en bacterias, mientras que la UDP-Glc PPasa no presenta esta característica regulatoria. Es así que el estudio y comparación de ambas PPasas resultan necesarios para entender y establecer los mecanismos enzimáticos por los cuales el azúcar es conducido hacia la producción de oligo- y poli-sacáridos esenciales para la supervivencia e infectividad de las bacterias.

Lo que ocurre en organismos eucariotas heterótrofos es diferente a lo planteado para aquellos procariotas. En primer lugar, no hay un gen que codifica para una ADP-Glc PPasa y la Glc-1P es utilizada principalmente por la UDP-Glc PPasa. La UDP-Glc sintetizada, luego, es utilizada por diferentes glicosiltransferasas que participan en las distintas vías de síntesis de los oligo- y poli-sacáridos. De esta forma, y basado principalmente en estudios realizados en eucariotas superiores (no fotosintéticos), se ha establecido que la regulación de la partición de este metabolito está dado a nivel de las glicosiltransferasas, por ejemplo en la síntesis de glucógeno es la actividad de la GSasa el paso limitante en la producción del poliglucano. Sin embargo el conocimiento sobre esta vía en protozoos es escaso a pesar de su importancia en organismos como *Giardia* u otros parásitos que acumulan glucógeno. Recientemente, nuestro grupo de trabajo ha demostrado que la UDP-Glc PPasa de *E. histolytica* es inhibida en forma reversible por agentes oxidantes de importancia fisiológica. Esto nos ha llevado a plantear que la actividad de esta enzima es modulada mediante mecanismos de tipo redox (Martinez y col., 2011) y plantea la incógnita si la regulación de esta enzima es única para este parásito o es compartida en las UDP-Glc PPasas de otros protozoos.

Basados en esto, en este trabajo de tesis se plantea el estudio de las NDP-Glc PPasas procariotas y eucariota y de la GSasa eucariota que permitirán profundizar el conocimiento sobre estas enzimas y su importancia en el metabolismo de

los respectivos microorganismos, pero que también brindará un mayor aporte a la comprensión de las diferencias en el metabolismo de carbohidratos de las células eucariotas y procariotas.

## IV. OBJETIVOS

### IV.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 (en forma de Glc-1P) para la síntesis de polisacáridos estructurales y de reserva, en eucariotas y procariotas. Nos proponemos realizar la caracterización de las enzimas NDP-azúcar PPasas y glicosiltransferasas (específicamente GSasa) de bacterias y de protozoos, así como en la realización de un análisis comparativo de las propiedades de las enzimas según su origen y con aquellas proteínas equivalentes encontradas en otros organismos. Se busca alcanzar una comprensión más amplia de las relaciones estructurales, funcionales y regulatorias de esta enzima.

### IV.2. Objetivos específicos

- 1- Caracterización de las enzimas involucradas en la partición de la Glc-1P en bacterias. Particularmente las enzimas ADP-Glc PPasa (EC 2.7.7.27) y UDP-Glc PPasa (EC 2.7.7.9) de *E. coli*. Para lo cual se plantean los siguientes pasos:
  - Clonado molecular y expresión los genes que codifican para las UDP-Glc PPasas del microorganismo, *galU* (UDP-Glc PPasa), *galF* (UDP-Glc PPasa putativa), a partir de ADN genómico.
  - Estudio de las propiedades cinéticas de la reacción catalizada por la enzima putativa y determinación de parámetros cinéticos. Estudio comparativo con la UDP-Glc PPasa (GalU) que permitan comprender la relación estructura/función de las enzimas.

- Estudio de la enzima ADP-Glc PPasa. Se plantea profundizar los aspectos cinéticos y regulatorios de la ADP-Glc PPasa de *Escherichia coli*, caracterizando su uso de sustratos alternativos y la acción de los efectores sobre esta actividad cruzada.
- 2- Caracterización de las enzimas del metabolismo de hidratos de carbono de protozoos. Particularmente las enzimas UDP-Glc PPasa y GSasa (EC 2.4.1.11) de *Giardia lamblia*, y el estudio comparativo de la primera con la UDP-GlcNAc PPasa (EC 2.7.7.23) y otras UDP-Glc PPasas eucariota.
- Clonado molecular, a partir de ADN genómico de *G. lamblia*, y expresión de los genes que codifican para las enzimas UDP-Glc PPasa, UDP-GlcNAc PPasa y GSasa del parásito.
  - Estudio de las propiedades cinéticas de la reacción catalizada por las enzimas putativas (UDP-Glc PPasa y GSasa) y determinación de sus parámetros cinéticos.
  - Estudio de las propiedades regulatorias de ambas enzimas.
  - Análisis comparativo de las propiedades cinéticas y regulatorias de las PPasas de *G. lamblia*
  - Análisis comparativo de las propiedades cinéticas y regulatorias de las enzimas pertenecientes a la vía de síntesis del glucógeno en *G. lamblia*, específicamente la UDP-Glc PPasa y la GSasa, con enzimas de otros organismos eucariotas.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### V.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 bacteriológicos*: Britania.
- *Reactivos de biología molecular*: Promega, Invitrogen, Fermentas, Novagen, Stratagene, Pierce, New England BioLabs.
- *Materiales utilizados en la purificación de proteínas y otros reactivos relacionados a proteínas*: GE Healthcare.
- *Reactivos químicos*: Sigma-Aldrich, Merck.
- *Oligonucleótidos sintéticos*: Sigma-Genosys, GBT.

### V.2. Cepas bacterianas, plásmidos, medios de cultivo y antibióticos

#### V.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 de los plásmidos que se disponen en nuestro grupo de trabajo, según lo detallado a continuación.

#### Cepas de *E. coli*

- *E. coli* Top 10 F': [*lacI*<sup>q</sup> Tn10 (*Tet*<sup>R</sup>)] *mcrA*Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ80*lacZ*ΔM15 Δ*lacX74 recA1 deoR araD139* Δ(*ara-leu*) 7697 *galU galK*rpsL (*Str*<sup>R</sup>) *endA1 nupG*.

Cepa empleada para generar las construcciones de expresión por técnicas de biología molecular.

- *E. coli* BL21 (DE3):  $\bar{F}ompThsdS$  ( $\bar{r}^- m^-$ )*galdcm* (DE3). Cepa empleada para la expresión recombinante de la mayoría de las enzimas caracterizadas en este trabajo.
- *E. coli* FF4001: MC4100*galU95* (Harding y col., 1993). Esta cepa contiene una delección en el gen *galU* y fue empleada para los ensayos de complementación realizados.

### V.2.2. Plásmidos

Vector de clonado de los productos de PCR generados con *Taq* ADN polimerasa:

- pGEM<sup>®</sup>-T Easy (Promega). Marcador de selección: gen de resistencia a ampicilina (Amp).

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

- pET28c (Novagen). Marcador de selección: gen de resistencia a kanamicina (Kan).
- pRSET-A (Novagen). Marcador de selección: gen de resistencia a Amp.
- pRSET-B (Novagen). Marcador de selección: gen de resistencia a Amp.
- pMAB5. Este vector deriva del vector no comercial pMON17335 (Iglesias y col., 1993). Promotor *tac*, inducible por IPTG. Marcador de selección: gen de resistencia a Kan.

### V.2.3. Medios de cultivo

Para la expresión de proteínas recombinantes se utilizaron los siguientes medios:

- Luria-Bertani (LB). Composición: triptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 5 g/l.
- YT 2X. Composición: triptona 10 g/l, extracto de levadura 16 g/l, NaCl 5 g/l.

Para la selección de colonias:

- LB-agar. Composición: medio LB suplementado con agar-agar 1,8% (p/v).

Para los ensayos de complementación:

- Medio basal de Hugh-Leifson [determinación metabolismo oxidativo-fermentativo, (Hugh y Leifson, 1953)]: triptona 2 g/l, NaCl 5 g/l, fosfato dipotásico 0,3 g/l, azul de bromotimol 0,03 g/l.

#### *V.2.4. Antibióticos*

- Amp. Concentración final 100 µg/ml.
- Kan. Concentración final 50 µg/ml.
- Cloranfenicol. Concentración final 34 µg/ml.

### **V.3. Métodos generales de biología molecular**

Las técnicas estándares de microbiología y biología molecular fueron realizadas, fundamentalmente, según los protocolos ya establecidos, de acuerdo a (Maniatis, 1982).

#### *V.3.1. Oligonucleótidos*

Los oligonucleótidos cebadores se diseñaron convenientemente teniendo en cuenta secuencias disponibles en las bases de datos de los proyectos genoma de cada uno de los microorganismos empleados. 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. Por otro lado, se diseñaron oligonucleótidos que permitieron la incorporación de mutaciones puntuales de algunos de los genes estudiados. Los cebadores utilizados se detallan en diferentes tablas en los correspondientes capítulos de resultados.

### V.3.2. Amplificación de fragmentos de ADN. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

#### A. Clonado de los genes de interés

Para la amplificación de los genes de interés mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se utilizó el ADN (genómico o plasmídico según el caso de cada muestra) y los oligonucleótidos específicos para cada gen. En cada caso, la mezcla de reacción (50  $\mu$ l) contenía: 100 ng ADN molde, 0,2 mM de cada dNTP, 2 pmol de cada oligonucleótido, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1X PCR *buffer* y 1,25 U de *Taq* ADN polimerasa (Fermentas). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo con un protocolo estándar: 1 ciclo de 5 min, 95 °C; seguido de 30 ciclos de 50 s a 95 °C, 50 s a T<sub>A</sub> (°C), t<sub>E</sub> a 72 °C; y finalmente un ciclo de 10 min a 72 °C. T<sub>A</sub> y t<sub>E</sub> indican la temperatura de apareamiento y tiempo de elongación, respectivamente, especificados en cada capítulo de resultados. Las reacciones se realizaron en un termociclador *Mastercyclergradient* (Eppendorf) y los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa. Se emplearon los programas apropiados en cada caso, donde la temperatura de la etapa de apareamiento se estableció de acuerdo a la secuencia de oligonucleótidos correspondientes.

#### B. Generación de mutantes

Para el análisis de residuos clave en la actividad de las enzimas estudiadas durante esta tesis, se realizaron mutaciones puntuales mediante *QuikChange* (Stratagene). Esta técnica consiste en la utilización de un par de oligonucleótidos portadores de la mutación y complementarios a una misma secuencia de ADN, en el centro de la cual se encuentra la región a mutar. Mediante la técnica de PCR se extienden ambas cadenas del ADN molde (plásmido) utilizando como cebadores los

oligonucleótidos complementarios mutados. Luego, el templado se remueve por digestión con la enzima de restricción *DpnI*, que reconoce secuencias específicas que se encuentran metiladas en el ADN molde, dejando intacto el ADN plasmídico mutado que sintetizado en la reacción de PCR. Con el ADN plasmídico mutado se transforman células de *E. coli* TOP10 para luego analizar distintos clones por minipreparación y posterior secuenciación, con el objetivo de encontrar aquellos que contengan la mutación deseada.

### V.3.3. Purificación de ADN a partir del gel de agarosa

#### A. Electroforesis en gel de agarosa

Con fines analíticos o preparativos, los fragmentos de ADN fueron resueltos empleando gel de agarosa al 1% (p/v) en *buffer* TAE 1X (40 mM Tris pH 8,0; 40 mM ácido acético; 1 mM EDTA), con la adición de Gel Green (Promega) en una concentración final de 0,3 µg/ml. Las muestras se acondicionaron con glicerol 3% (v/v) y Azul de Bromofenol 0,05% (p/v) antes de realizar la siembra. Se utilizó el sistema Mini-Sub<sup>®</sup> Cell GT (Bio-Rad) para la corrida propiamente dicha y la visualización de los fragmentos de ADN se realizó sobre luz ultravioleta (310 nm) del transiluminador (Fotodyne).

#### B. Extracción de ADN a partir de gel de agarosa

Las muestras corridas en gel de agarosa se purificaron utilizando el equipo comercial *Wizard<sup>®</sup> Plus PCR Preps DNA Purification System* (Promega) de acuerdo con las indicaciones suministradas por el fabricante.

#### V.3.4. Clonado de los genes amplificados por PCR

Los genes amplificados por PCR se clonaron en vectores adecuados para ser mantenidos, secuenciados y luego subclonados en los vectores de expresión correspondientes. Para el clonado de genes amplificados con *Taq* ADN polimerasa, se usó el vector pGEM<sup>®</sup>-T Easy (Promega). Las reacciones se realizaron siguiendo las indicaciones especificadas en cada sistema de reactivos.

#### V.3.5. Transformación de bacterias competentes

Para permitir la incorporación de ADN plasmídico exógeno, las células de *E. coli* se hicieron competentes utilizando el método de CaCl<sub>2</sub>. 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 DO<sub>600</sub> ~0,4. Se tomaron alícuotas de 1 ml en tubos de centrifuga de 1,5 ml, se centrifugaron a 5000 x g por 5 min. Las células se resuspendieron en 500 µl de solución ST1 [MOPS-NaOH pH 7,0 10 mM; KCl 10 mM]. Se volvió a centrifugar a 5000 x g por 5 min y las células fueron resuspendidas en 500 µl de solución ST2 [MOPS-NaOH pH 6,5 100 mM; KCl 10 mM; CaCl<sub>2</sub> 100 mM] e incubadas durante 15 min en hielo. Las células se centrifugaron nuevamente a 5000 x 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 4600 x g durante 5 min, se eliminó el ml de medio adicionado, se resuspendieron en los 100 µl remanentes y se sembraron en placas de LB-agar suplementado con el antibiótico correspondiente 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.

#### V.3.6. *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 3 ml de medio LB líquido suplementado con el antibiótico correspondiente y se cultivaron toda la noche a 37 °C. Las células se recolectaron por centrifugación a 3000 x g durante 10 min y se extrajo el ADN plasmídico utilizando el kit comercial *Wizard<sup>®</sup> Plus SV Minipreps DNA PurificationSystem* (Promega), siguiendo el protocolo establecido en el mismo. La obtención del plásmido se corroboró por electroforesis en geles de agarosa, como se indica en el punto V.3.3.A.

#### V.3.7. *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 (Korea) para ser secuenciada de forma automatizada utilizando oligonucleótidos específicos que hibridan en alguna región del plásmido cercana al sitio de inserción del gen o sobre el propio gen.

#### V.3.8. *Digestión 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 correspondientes. Esto permitió su incorporación 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  $\mu\text{g}$  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 (V.3.3.A) y en el caso de utilizarse para subclonado el inserto liberado se purificó a partir del gel como se indica en el punto V.3.3.B.

#### V.3.9. *Precipitación de ADN*

La precipitación de ADN se utiliza para eliminar todos los componentes no deseados de la mezcla de reacción. En este caso se utilizó como paso intermedio durante 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 -20 °C durante 30 min. Posteriormente, se centrifugó a 15000 x g durante 15 min a 4 °C, se eliminó el sobrenadante, se dejaron evaporar los restos de etanol a temperatura ambiente y, por último, se resuspendió el pellet de ADN en H<sub>2</sub>O Milli-Q esterilizada por calor y presión.

#### V.3.10. *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 65 °C y luego se enfrió rápidamente en hielo. Posteriormente, se agregó a ese mismo tubo una cantidad adecuada de *buffer* de reacción 10X 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, 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.

#### **V.4. Expresión y purificación de las proteínas recombinantes**

##### *V.4.1. Creación de un banco de células*

Con el objeto de normalizar las condiciones de cultivo y expresión de los distintos clones, se construyó un banco central de células para cada cepa de expresión. Las reservas de células se prepararon a partir del cultivo de una única colonia de cada clon de expresión y se almacenaron a -80 °C en suplementado con glicerol 20% (v/v).

##### *V.4.2. Expresión de las proteínas recombinantes*

Para la producción de las enzimas recombinantes se utilizaron las células transformadas con la construcción plasmídica que porta el gen de interés, siguiendo un protocolo estándar utilizado en el laboratorio. Las células transformadas se repicaron en medio LB líquido (o YT 2X), suplementado con el antibiótico adecuado, 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 realizando una dilución 1/50. El medio de cultivo inoculado se incubó a 37 °C en agitador orbital a 200 rpm hasta alcanzar una  $DO_{600} \sim 0,6$ , momento en el cual se agregó el inductor IPTG. Luego de la inducción, las células continuaron cultivándose a 25-28 °C en agitador orbital a 200 rpm durante 5 h más. Las condiciones de cultivo (la temperatura, el tiempo y la concentración del agente inductor) fueron ajustadas a cada caso en particular, de modo de optimizar la expresión de las proteínas

recombinantes. Para cosechar las células se centrifugó el cultivo a 5000 x g durante 10 min y se conservaron a -20 °C hasta su uso.

#### V.4.3. Purificación de las proteínas recombinantes

En función de la estrategia de clonado utilizada, las proteínas se expresaron fusionadas o no a una etiqueta de histidinas en el extremo N-terminal. Las enzimas recombinantes producidas como proteínas de fusión a la cola de polihistidinas fueron purificadas mediante cromatografía de afinidad por metal inmovilizado (IMAC). Aquellas que fueron expresadas sin ninguna etiqueta fueron purificadas mediante cromatografía de intercambio iónico, en columnas de DEAE-*Sepharose* seguida de purificación en columna de Q-*Sepharose*. Todos los pasos de purificación fueron realizados entre 0 y 4 °C, en un equipo *Äkta purification* (GE Healthcare).

En cada caso, las células se resuspendieron en una cantidad adecuada de *buffer* de equilibrado y se rompieron por sonicado con un procesador ultrasónico de alta intensidad VibraCell™ VCX 130 (Sonics). La suspensión resultante se centrifugó a 10000 x g durante 15 min a 4 °C para separar la fracción soluble (extracto crudo) de los detritos celulares y el resto de los componentes insolubles.

##### A. Cromatografía de intercambio iónico

El extracto crudo obtenido se sembró en una matriz DEAE-*Sepharose* (Pharmacia, AmershamBiosciences) previamente equilibrada con *buffer* A [MOPS-NaOH 50 mM pH 8,0; EDTA 0,1 mM; MgCl<sub>2</sub> 5 mM; sacarosa 10% (p/v)]. Se emplearon 10 ml de resina en una columna cerrada C 10/10 (GE Healthcare). Una vez completada la siembra de la muestra, la columna se lavó con 100 ml de *buffer* A, a los efectos de desplazar las proteínas no retenidas (exclusión). A continuación, se procedió con la elusión de las proteínas adsorbidas en la matriz mediante el uso de 20 volúmenes

de columna de un gradiente lineal de NaCl (en *buffer A*), en un rango entre 10 y 500 mM. Las fracciones que presentaron actividad se reunieron en un pool, se desalaron y dializaron con *buffer A*, para ser utilizadas en el siguiente paso de purificación.

Como siguiente paso de purificación, la muestra desalada se sembró en una columna Mono Q HR 5/5 column (FPLC, GE Healthcare) previamente equilibrada con *buffer A*. Una vez completada la siembra se procedió con las mismas condiciones descritas para el paso anterior. Se recolectaron alícuotas de todas las fracciones, las cuales fueron evaluadas por actividad enzimática y posterior SDS-PAGE. Las fracciones más puras/activas se reunieron, se concentraron por ultrafiltración y, luego de ser desaladas, se suplementaron con glicerol 10% (p/v) para ser almacenadas a -80 °C hasta su posterior análisis.

#### B. Cromatografía de pseudoafinidad por metal inmovilizado (IMAC)

Este tipo de cromatografía fue utilizada para la purificación de las proteínas recombinantes que contienen una etiqueta de polihistidinas en el extremo N-terminal. Para esto el extracto crudo se sembró en una columna de 1 ml His-TRAP (GE Healthcare) previamente equilibrada con *buffer B* [25 mM Tris-HCl pH 8,0; 300 mM NaCl; 10 mM imidazol; 5% (v/v) glicerol] y cargada con Ni<sup>2+</sup>. Finalizada la carga de muestra, la columna se lavó con *buffer B* y luego la elución de las proteínas retenidas se realizó utilizando un gradiente lineal de imidazol (en *buffer B*), en un rango entre 10 y 300 mM. Se recolectaron alícuotas de todas las fracciones, las cuales fueron evaluadas por actividad enzimática y posterior SDS-PAGE. Las fracciones más puras/activas se reunieron, se concentraron por ultrafiltración y, previamente desaladas, se suplementaron con glicerol 10% (p/v) para ser almacenadas a -80 °C hasta su posterior análisis. En el caso de las proteínas eucariotas la muestra fue suplementada además con 2 mM DTT y 0,1 mM EDTA.

## V.5. Métodos bioquímicos generales

### V.5.1. *Electroforesis en gel de poliacrilamida*

La electroforesis de proteínas en gel discontinuo de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) se realizó siguiendo la técnica descrita por (Laemmli, 1970). La concentración de acrilamida del gel de apilamiento fue de 4%, mientras que la concentración del gel de separación fue variada entre 10% y 15% según la masa molecular de las proteínas a analizar. Las muestras fueron desnaturizadas antes de su siembra mediante el agregado de *buffer* de siembra SDS-PAGE 4X [1% (p/v) SDS, 100 mM  $\beta$ -mercaptoetanol, en 50 mM TRIS-HCl pH 6,8] y su posterior calentamiento a 100 °C durante 5 min. En caso de realizar SDS-PAGE no reductor, se omite la presencia de  $\beta$ -mercaptoetanol.

Finalizada la corrida electroforética, las proteínas en el gel se visualizaron por tinción con *Coomassie*<sup>®</sup> *Brilliant Blue* R-250 en una solución de metanol 30% (v/v) y ácido acético 10% (v/v); y la posterior decoloración se realizó con una solución de metanol 5% (v/v) y ácido acético 7,5% (v/v).

### V.5.2. *Cuantificación del contenido proteico*

Para determinar la concentración de las proteínas totales presentes en las muestras se utilizó la técnica de Bradford (Bradford, 1976), utilizando como patrón una solución de BSA (Sigma). Las lecturas de absorbancia se realizaron a 595 nm en un espectrofotómetro UV-Vis METROLAB 325 BD.

### V.5.3. *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.

#### V.5.4. *Cromatografía de filtración por gel. Determinación de la masa molecular*

La cromatografía de filtración por gel se utilizó como herramienta con fines analíticos para la determinación de la masa molecular (MM) de las distintas proteínas. En el equipo *Äkta purification* (GE Healthcare) se conectó una columna Tricorn 5/200 (GE Healthcare) cargada con resina Superdex 200 (GE Healthcare). Las corridas se realizaron a 0,2 ml/min en *buffer* C [50 mM HEPES pH 8,0; 100 mM NaCl; 0,1 mM EDTA]. Se empleó el *Gel Filtration Calibration Kit – High Molecular Weight* (GE Healthcare) para realizar el calibrado de la columna. Los estándares de calibrado incluyeron tiroglobulina (669 kDa), ferritina (440 kDa), aldolasa (158 kDa), conalbúmina (75 kDa) y ovoalbúmina (44 kDa). El volumen muerto de la columna se determinó empleando una solución de Azul de Dextrano (Promega). Con los estándares se realizó una curva de calibrado graficando el log de la MM de los marcadores comerciales vs  $K_{av}$ . El  $K_{av}$  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. A partir de esta curva fueron determinadas las masas moleculares de las enzimas en estudio.

#### V.5.5. *Ensayos de complementación en la cepa mutante de Escherichia coli deficiente en el gen galU*

Para el estudio de la actividad de UDP-Glc PPasa *in vivo* de las proteínas GalU y GalF de *E. coli*, así como la de la doble mutante GalF M15T/H16R, la cepa deficiente en la expresión del gen *galU* se transformó con las construcciones que permitieron la expresión de dichas enzimas (pGALU, pGALF y pM15TH16R, respectivamente).

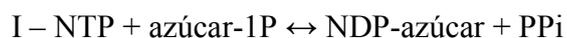
Además, como control se transformaron células con el plásmido sin inserto (pMAB5). Las bacterias transformadas se sembraron en medio base Hugh-Leifson con 1% (w/v) de D-Glc o D-Gal, para determinar la capacidad de las mismas para fermentar los hidratos de carbono, como se ha descrito previamente (Hugh y Leifson, 1953). El medio fue suplementado con Kan (50 µg/ml) e IPTG (0,4 mM).

## V.6. Metodología de análisis enzimático

Todas las actividades enzimáticas de las enzimas estudiadas se expresaron en U/mg. Una unidad de actividad enzimática (U) es definida como la cantidad de enzima capaz de convertir 1 µmol de sustrato (o de generar 1 µmol de producto) en 1 min, en las condiciones experimentales especificadas en cada caso.

### V.6.1. Ensayos de actividad enzimática para las NDP-Glc PPasas

La determinación de actividad enzimática se realizó en sentido de síntesis del NDP-Glc. Para esto se empleó el método colorimétrico desarrollado en nuestro laboratorio (Fusari y col., 2006). Esta metodología fue empleada para la medida de actividad tanto de las ADP-Glc PPasas como de las UDP-Glc PPasas estudiadas en esta tesis y la UDP-GlcNAc PPasa. Se basa en la cuantificación de Pi mediante una reacción de color con el complejo Verde de Malaquita-molibdato de amonio. Este Pi es generado a expensas de la reacción acoplada de la hidrólisis enzimática del PPi, producto de la reacción de síntesis de NDP-azúcar (Fusari y col., 2006). 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: 100 mM MOPS-NaOH pH 8,0; 10 mM MgCl<sub>2</sub>;

0,2 mg/ml BSA; 0,5 U/ml pirofosfatasa inorgánica de levadura (pirofosfato:fosfohidrolasa, E.C. 3.6.1.1, producida en forma recombinante en nuestro laboratorio), NTP y muestra en una dilución adecuada. El ensayo se inició con el agregado del correspondiente monosacárido-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 placas multipocillos y se determinó la absorbancia a 630 nm en un lector de ELISA EMax (Molecular Devices). Paralelamente a la determinación se estableció una curva de calibrado con testigos de PPi y se obtuvo el factor de conversión de absorbancia 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 homogenizar durante 30 min y filtrar, a 5 ml de la solución obtenida se le adicionaron 100 µl de Tween 20 al 2% (v/v).

#### V.6.2. Ensayos de actividad enzimática para la GSasa

Para las medidas de actividad de la GSasa se utilizó un método continuo en el que la formación de NDP está acoplada enzimáticamente a la desaparición de NADH. Para el acople se utilizaron las enzimas piruvato quinasa de músculo de conejo (PK, Sigma) y lactato deshidrogenasa de *Lactobacillus* (LDH, Sigma). A menos que se indique lo contrario la mezcla de reacción típicamente contenía: 50 mM MOPS-NaOH pH 8,0; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,3 mM fosfoenolpiruvato y 0,3 mM NADH; NDP-Glc; 0,02 U/µl PK y 0,02 U/µl LDH. La reacción se inició por el agregado de 2 mg/ml glucógeno de hígado de conejo. Todas las medidas se realizaron en un volumen de reacción de 50

µl en placas con multipocillos (Nunc™), a 37 °C, midiendo absorbancia a 340 nm en un espectro MultiskanAscent (Thermo).

### V.6.3 Caracterización cinética de las enzimas

Para determinar los parámetros cinéticos de las enzimas en estudio se realizaron curvas de saturación de actividad enzimática en presencia de una concentración fija de uno de los sustratos y concentraciones variables del sustrato (o efector) analizado. Los datos cinéticos obtenidos se graficaron como velocidad inicial (U/mg) *versus* la concentración del sustrato (o efector) variable (mM) y las constantes cinéticas se determinaron ajustando los datos a la ecuación de Hill modificada:  $v_o = V_{\max} [S]^n / (S_{0.5}^n + [S]^n)$ , utilizando el algoritmo no lineal de mínimos cuadrados Levenberg-Marquardt suministrada por el programa Origin™ 8.0. Los gráficos de Hill se utilizaron para calcular el coeficiente de Hill ( $n$ ), la velocidad máxima ( $V_{\max}$ ), y las constantes cinéticas que se corresponden a las concentraciones de activador, sustrato, o inhibidor que produce el 50% de la máxima activación ( $A_{0.5}$ ), velocidad ( $S_{0.5}$ ), o inhibición ( $I_{0.5}$ ). Todas las constantes cinéticas son las medias de al menos tres conjuntos de datos, que fueron reproducibles dentro de  $\pm 10\%$ .

### V.7. Metodología utilizada en ensayos de óxido-reducción

Los ensayos de oxidación-reducción tienen como finalidad evaluar el efecto de compuestos oxidantes y reductores sobre la actividad de las PPasas de protozoos estudiadas en este trabajo para inferir, de esta forma, su posible regulación post-traducciona *in vivo* por mecanismos redox.

### V.7.1. Ensayos con reactivos oxidantes

Para evaluar el efecto de la oxidación sobre la actividad biológica de las PPasas eucariotas (UDP-Glc PPasa y UDP-GlcNAc PPasa), las enzimas fueron incubadas en presencia de distintos agentes oxidantes. Para esto alícuotas de las proteínas recombinantes purificadas se desalaron (sección V.5.3) y acondicionaron en *buffer* D (100 mM MOPS-NaOH pH 8,0, EDTA 0,1 mM) para eliminar la presencia de DTT (condiciones de almacenamiento, sección V.4.3). Cada enzima (0,5  $\mu$ M) se incubó en *buffer* D a 25°C con los siguientes compuestos oxidantes: diamida, peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), nitroprusiato de sodio (NPS, compuesto que por exposición a la luz blanca genera óxido nítrico, •NO). Después de diferentes tiempos de incubación, se retiraron partes alícuotas, convenientemente diluido y se ensayaron para la actividad como se describió anteriormente.

### V.7.2. Ensayos con reactivos reductores

Evaluada la oxidación de las enzimas, se ensayó si era posible revertir la misma y recuperar la actividad enzimática, mimetizando el proceso regulatorio que ocurriría *in vivo*. Para analizar la reducción de las proteínas oxidadas se utilizaron los siguientes compuestos reductores: ditiotreitól (DTT), L-cisteína (L-Cys), tiorredoxina (TRX) y triparredoxina (TXN) reducidas de *T. cruzi*. Los compuestos reductores se obtuvieron comercialmente, excepto en el caso de las enzimas TRX y TXN de *T. cruzi* que se expresó en forma recombinante en el Laboratorio de Bioquímica Microbiana. De los compuestos ensayados como reductores, tienen implicancia a nivel fisiológico la L-Cys, TRX y TXN.

Para evaluar la respuesta de las enzimas a la reducción, las enzimas oxidadas y previamente desaladas o diluidas convenientemente, se preincubaron en presencia del

reductor un tiempo adecuado a 25 °C. El medio de reacción tenía una concentración de 0,024 µg/µl de enzima, una concentración adecuada de reductor y *buffer* MOPS-NaOH 100 mM pH 8,0; EDTA 0,1 mM, a menos que se indique lo contrario. A distintos tiempos de reacción, se tomó una alícuota de la reacción de reducción, se diluyó al medio en el mismo *buffer* de reacción sin reductor y se midió la actividad de la enzima correspondiente según se indica en el punto V.6.1.

### V.7.3. Curva de potenciales redox

El potencial de reducción medio ( $E_m$ ) de una proteína se define como el potencial de reducción en el que las concentraciones de sus formas oxidadas y reducidas son iguales. El  $E_m$  de las enzimas de *Giardia*, *Gla*UDP-Glc PPasa y *Gla*UDP-GlcNAc PPasa, se determinaron por titulación redox con el par L-Cys/L-cistina (L-Cys/L-CySS), las especies reducidas y oxidadas de L-Cys, respectivamente. Se obtuvieron los valores de potencial de reducción ( $E_h$ ) variando las concentraciones relativas de ambas especies. El mantenimiento de la concentración total fija fue de 1 mM, con la adición de 100 mM MOPS-HCl pH 7,4. Los valores de  $E_h$  se calcularon utilizando la ecuación de Nernst:

$$E_h = E_o - RT / n F \ln [L-Cys]^2 / [L-CySS]$$

Donde  $E_o$  es el  $E_h$  de L-Cys/L-CySS a pH 7,4 (-0.250 V) (Zhu y col., 2012), R es la constante universal de los gases (8,314 J K<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>), T es la temperatura absoluta (298 K), n es el número de moles de electrones transferidos en la reacción (n = 2), F es la constante de Faraday (96.485 J mol<sup>-1</sup> V<sup>-1</sup>), y [L-Cys]<sup>2</sup>/[L-CySS] es la relación entre las concentraciones de ambas especies redox (Rouhier y col., 2004).

La *Gla*UDP-Glc PPasa y la *Gla*UDP-GlcNAc PPasa se incubaron en una concentración final de 0,5 mM durante 2 h a temperatura ambiente en diferentes soluciones *buffer* redox (hasta alcanzar el equilibrio redox). Alícuotas de las muestras tratadas fueron tomadas y se ensayó la actividad para ambas enzimas bajo condiciones

estándar (ver sección V.6.1.). Los datos se representan como porcentaje de actividad *versus* E<sub>h</sub>, donde la actividad más alta para cada enzima se estableció como 100% de actividad.

## V.8. Tratamiento informático

### V.8.1. Alineamiento de secuencias

Los análisis de secuencias requirieron el uso de bases de datos *on line* como:

- NCBI (Blast, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).
- CAZy [<http://www.cazy.org/>, (Cantarel y col., 2009)].
- Brenda-Enzyme (<http://www.brenda-enzymes.org/>).
- KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>).
- Eukaryotic Pathogen Database Resources (<http://eupathdb.org/eupathdb/>).

El diseño de los oligonucleótidos para amplificar por PCR los genes y los alineamientos de secuencias de proteínas y ADN, para corroborar el resultado de las secuenciaciones y las diferencias entre secuencias, identidad y similitud se realizaron con el programa *vector NTI 10.0*.

### V.8.2. Construcción de árbol filogenético

El análisis filogenético se realizó siguiendo los pasos:

1. Se obtuvieron las secuencias de interés (formato FASTA), a partir de las bases de datos NCBI y CAZy.
2. Se alinearon las secuencias de interés se alinearon con el algoritmo MUSCLE (Edgar, 2004), utilizando el servidor online <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>.
3. El alineamiento fue refinado manualmente.

4. Para construir un árbol, previamente se determinó qué modelo de evolución corresponde a las secuencias alineadas. Para eso el alineamiento se introdujo en el servidor *online* Prottest [(Abascal y col., 2005), <http://darwin.uvigo.es/software/prottest.html>].
5. Con estos resultados se procedió a la construcción del árbol filogenético, utilizando la aplicación PhyML del programa SeaView 4.3 [(Gouy y col., 2010) (<http://pbil.univ-lyon1.fr/software/seaview.html>)]. Basados en los resultados del punto anterior se utilizó el modelo LG+I+G, para la construcción del árbol.
6. La figura se armó utilizando el programa FigTree 1.3 program (<http://tree.bio.ed.ac.uk/>).

#### V.8.3. Modelado por homología

El modelado de homología se realizó con el programa Modeller 9v1 (Sali y Blundell, 1993). Se construyeron modelos para GalU y GalF. La estructura de GalU está informada (código de Protein Data Bank, PDB: 2PA4) sin ningún sustrato o producto. De esta forma, construimos el modelo para incluir el producto UDP-Glc y el ión  $Mg^{2+}$  en la estructura. Para esto se utilizó como templado la estructura conocida de la enzima GalU de *Corynebacterium glutamicum* (PDB: 2PA4) que tiene incluidos el producto y el catión. Las estructuras cristalinas de GalU de *E. coli* (PDB: 2E3D) y de *C. glutamicum* se utilizaron como un molde para el modelado de GalF. Se estableció como mejor modelo aquel que presentó mayor global score en verify3D (Luthy y col., 1992) y mayor valor potencial DOPE1. Se corrió el programa PROCHECK para validar la estructura final obtenida y corroborar la calidad estereoquímica del modelo. Las cifras fueron preparadas con Swiss-PdbViewer (Schwede y col., 2003).

## VI. ENZIMAS INVOLUCRADAS EN LA PARTICIÓN DE LA GLC-1P EN BACTERIAS

Como ha sido detallado en el capítulo introductorio, el destino metabólico de la Glc (en su forma Glc-1P) en bacterias depende principalmente de la actividad de dos NDP-Glc PPasas: la ADP-Glc PPasa (la cual es regulada alostéricamente) y la UDP-Glc PPasa (que no es regulada). Las propiedades cinéticas y regulatorias de estas enzimas determinan, entonces, si el azúcar es conducido hacia la producción  $\alpha$ -1,4-glucanos de reserva o a la producción de oligo- y poli-sacáridos estructurales, respectivamente.

Se sabe que la delección o mutación del gen que codifica para la UDP-Glc PPasa, *galU*, genera células que son incapaces de fermentar el monosacárido Gal (ya que la vía de Leloir se ve interrumpida) y que fallan en la incorporación de Gal y Glc en las membranas celulares bacterianas, lo que resulta en una síntesis incompleta del antígeno O de los LPS (Sundararajan y col., 1962) y del receptor celular para bacteriófagos (Fukasawa y col., 1962). Sin embargo, en enterobacterias, se ha identificado un segundo gen, *galF*, que codifica para una proteína homóloga a GalU (Marolda y Valvano, 1996) y cuya secuencia se encuentra muy conservada en estos microorganismos (Jiang y col., 1991; Klena y Schnaitman, 1993; Macpherson y col., 1994; Xiang y col., 1994; Yao y Valvano, 1994; Marolda y Valvano, 1995). La elevada identidad que presentan las proteínas GalF y GalU sugiere que la primera podría ser un miembro de la familia de las UDP-Glc PPasas bacterianas. La enzima GalU de *E. coli* ha sido producida en forma recombinante y purificada para su caracterización (Hossain y col., 1994), e incluso ha sido y cristalizada y determinada su estructura molecular (Thoden y Holden, 2007b). En estos estudios se asume que esta UDP-Glc PPasa de esta bacteria adquiere una conformación homotetramérica. Sin embargo, la presencia del gen *galF*, que codifica

para una proteína de elevada identidad y similar MM plantea la incógnita que si *in vivo* GalU y GalF interaccionan, pudiendo formar otras estructuras hetero-oligoméricas, y de ser así cual sería la función de la segunda proteína. Sin embargo, los estudios a nivel molecular son escasos para establecer claramente un papel funcional (si lo hay) para GalF.

Por otro lado, como ya se ha mencionado, el paso limitante en la síntesis de glucógeno en bacterias está dado a nivel de la ADP-Glc PPasa ya que su actividad es modulada por diferentes metabolitos implicados en la principal vía de utilización de carbono del organismo (Ballicora y col., 2003, 2004). Particularmente, la enzima de *E. coli* es activada por Fru-1,6-bisP (principalmente) e inhibida por AMP. Además, recientemente nuestro grupo de trabajo ha informado que el Pyr resultó un activador de la enzima (Asencion Diez y col., 2014) que, aunque actuando individualmente muestra un  $A_{0.5}$  relativamente elevado, opera en sinergia con la Fru-1,6-bisP y la acción conjunta de ambos metabolitos provoca incrementos significativamente mejores en la  $V_{max}$  y la afinidad por los sustratos. Siempre se ha considerado a la ADP-Glc PPasa como una enzima altamente específica hacia el uso del nucleótido y el azúcar-1P. Sin embargo, nuestro grupo de trabajo ha obtenido resultados que muestran una cierta promiscuidad exhibida por la enzima de ciertos procariotas como la de *Nitrosomonas europaea* (Machtey y col., 2012) e incluso la propia enzima de *E. coli*. Para esta última ha sido informado que es capaz de utilizar diferentes azúcares-1P como sustrato (Hill y col., 1991), pero no hay un estudio detallado sobre la cinética con estos compuestos y su implicancia en el metabolismo del microorganismo. A partir de estas observaciones surge el interrogante de cómo sortea la enzima esa promiscuidad *in vivo* y hace más eficiente la producción de ADP-Glc. Hasta el momento no han sido realizados estudios

exhaustivos sobre las afinidades relativas de las ADP-Glc PPasas por estos sustratos alternativos en ausencia y en presencia de los efectores alostéricos.

Con estos antecedentes planteados es claro que el estudio de las enzimas ADP-Glc PPasa y UDP-Glc PPasa de *E. coli* está lejos de ser completo y resulta necesario un análisis más profundo de las mismas. Ambas PPasas juegan un papel relevante en el metabolismo de carbohidratos de la bacteria. Su estudio permitirá una mejor comprensión de la relación de estructura a función/regulación para estas enzimas y de su importancia y control en el metabolismo de la célula, pudiendo tener un mejor panorama de la partición de la Glc-1P que es clave para el correcto funcionamiento del microorganismo.

## VI.1. Capítulo: “Control alostérico de la especificidad por sustrato de la ADP-Glc PPasa de *Escherichia coli*”

### VI.1.1. Resultados

Para abordar el estudio de la ADP-Glc PPasa de *E. coli* (*EcoADP-Glc PPasa*) se realizó en primer lugar la expresión del vector pETEC en células *E. coli* BL21 (DE3) de acuerdo a trabajos previos donde se obtuvo la enzima recombinante y distintas mutantes sitio dirigidas (Ballicora y col., 2002; Ballicora y col., 2007; Figueroa y col., 2011). La proteína fue purificada mediante dos pasos de cromatografía de intercambio iónico, como se detalla en Materiales y Métodos. Estos pasos de purificación permitieron obtener un grado de pureza mayor al 90%.

#### VI.1.1.1. Análisis de la especificidad por el nucleótido

Como ya se ha mencionado, a pesar de que las ADP-Glc PPasas tradicionalmente han sido consideradas enzimas altamente específicas, en nuestro grupo de trabajo hemos encontrado evidencias de que algunas de ellas son capaces de llevar a cabo su acción catalítica con sustratos alternativos al ATP y la Glc-1P. Por ejemplo, la enzima de *N. europea* puede utilizar los distintos NTP y Man-1P en su reacción (Machtey y col., 2012). Sin embargo, hasta el momento no hay realizado ningún estudio cinético en presencia y ausencia de los efectores que permita evaluar en detalle la promiscuidad observada en estas enzimas. Es así que nos propusimos el estudio de la especificidad por sustratos de la *EcoADP-Glc PPasa* y el análisis del efecto de la Fru-1,6-bisP sobre esto.

En primer lugar se evaluó el uso de NTP alternativos. La enzima fue capaz de utilizar otros NTP además de su sustrato principal (el ATP) (Tabla VI.1.1). Es de hacer notar que en ausencia de regulador alostérico el cociente  $V_{\max}/S_{0,5}$  (análogo al cociente

$V_{\max}/K_m$ , definido como eficiencia catalítica para cinéticas hiperbólicas) de los NTP alternativos fue similar al del sustrato principal (ATP), mientras que en presencia del activador Fru-1,6-bisP la eficiencia para el uso de ATP aumentó notablemente (~200 veces), pero no para los otros NTP (Figura VI.1.1 A, nótese la escala logarítmica del eje de las ordenadas, y Tabla VI.1.1). En trabajos previos (Ballicora y col., 2003; Ballicora y col., 2007; Figueroa y col., 2011), se ha descrito que la Fru-1,6-bisP modifica los parámetros cinéticos determinados para la *EcoADP-Glc PPasa*, incrementando la  $V_{\max}$  y disminuyendo los  $S_{0,5}$  de los sustratos (especialmente el del ATP). Pero cuando la enzima utilizó un NTP alternativo (UTP, CTP o GTP) durante la reacción el activador alostérico no tuvo ningún efecto en la  $V_{\max}$  (Tabla VI.1.1 y Figura VI.1.2 A) ni en el  $S_{0,5}$  de cualquiera de los sustratos (Tabla VI.1.1). De esta forma, en ausencia de Fru-1,6-bisP la  $V_{\max}$  de la enzima cuando utilizaba UTP, GTP o CTP fue ~10-20 veces menor que la determinada con ATP (a la misma concentración: 2 mM); mientras que en presencia del efector, este parámetro fue por lo menos 400 veces mayor con ATP que con otros NTP (Tabla VI.1.1 y Figura VI.1.2 A).

Nuestro grupo de trabajo ha demostrado que el Trp<sup>113</sup> y la Gln<sup>74</sup> son dos residuos claves en la respuesta alostérica de la *EcoADP-Glc PPasa* a la Fru-1,6-bisP (Figueroa y col., 2011). Estos aminoácidos forman parte de dos *loops* funcionales universalmente conservado en las ADP-Glc PPasas de todos los organismos (Figueroa y col., 2011; Figueroa y col., 2013). La mutación puntual de los mismos implicó la pérdida de sensibilidad a la respuesta al activador. Es así que, por ejemplo, la mutante *EcoADP-Glc PPasa* W113A exhibió los mismos parámetros cinéticos que la enzima salvaje en ausencia de la Fru-1,6-bisP, pero en presencia del activador dichos parámetros no eran modificados a diferencia de lo que ocurre con las ADP-Glc PPasas (Figueroa y col., 2011). Con estas características esta mutante en el Trp<sup>113</sup> resulta de

gran utilidad para un mejor análisis de la relevancia funcional de la Fru-1,6-bisP en la selección del nucleótido.

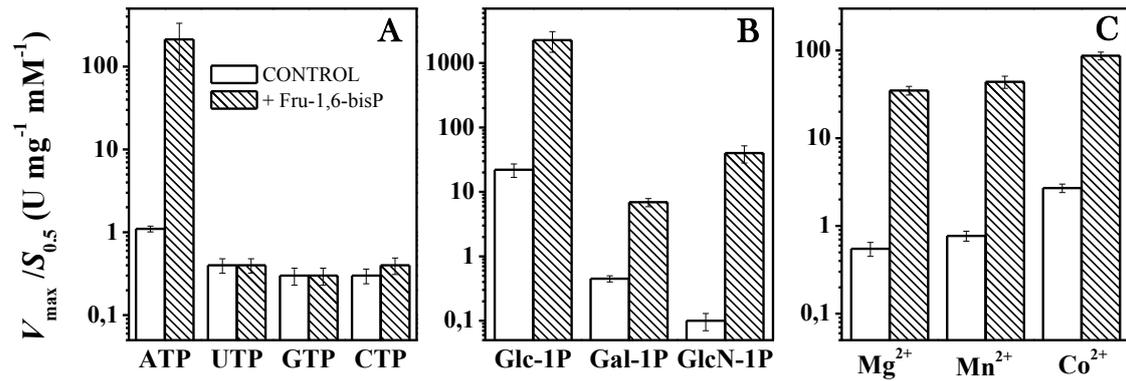
Así, realizamos un ensayo comparativo del comportamiento cinético de la *EcoADP-Glc PPasa W113A* con respecto a la enzima salvaje. Efectivamente, la Figura VI.1.2 B muestra que la mutante purificada fue prácticamente insensible al efector. De esta manera, incluso para altas concentraciones de Fru-1,6-bisP no hubo cambios en la actividad de la enzima utilizando cualquiera de los NTP (Figura VI.1.2 B). Esto implica que en esta mutante se pierde la acción del activador de incrementar la eficiencia catalítica hacia el uso de ATP y la misma sería muy similar entre los distintos NTP. En su conjunto, los resultados indican que uno de los efectos de la Fru-1,6-bisP sería el aumentar la especificidad de la enzima hacia el ATP.

Además, es importante notar que la Fru-1,6-bisP incrementó la eficiencia catalítica de la *EcoADP-Glc PPasa* tanto para el uso de la Glc-1P (~100 veces) como del  $Mg^{2+}$  (~10 veces) sólo cuando utilizaba ATP como sustrato, pero no cuando la reacción transcurrió con los otros NTP (Tabla VI.1.1, Figura VI.1.2 B y C). Cuando la enzima utilizó los NTP alternativos, los valores de los parámetros cinéticos no cambiaron en presencia de Fru-1,6-bisP. Estos resultados refuerzan la idea de que el activador estaría seleccionando el ATP y de esa forma favorecer la reacción de síntesis de ADP-Glc.

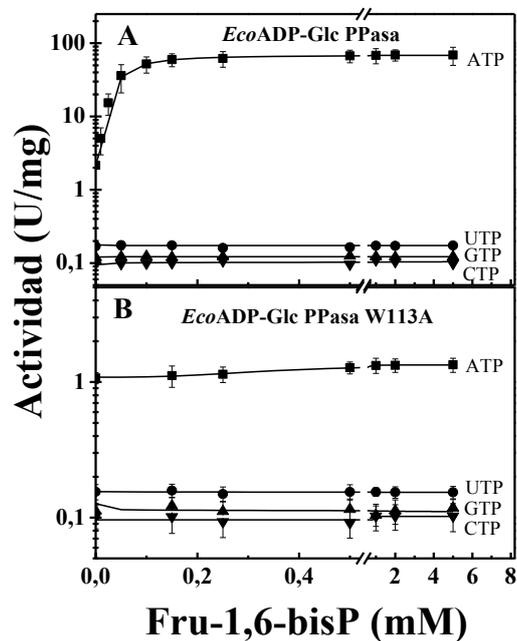
Síntesis de	Sustrato	CONTROL				+ Fru-1,6-bisP			
		$S_{0,5}$ (mM)	$n$	$V_{max}$ (U/mg)	$V_{max}/S_{0,5}$ (U/mg mM)	$S_{0,5}$ (mM)	$n$	$V_{max}$ (U/mg)	$V_{max}/S_{0,5}$ (U/mg mM)
	ATP	11 ± 4	1,3		1,1	0,32 ± 0,02	2,3		212
ADP-Glc	Glc-1P	0,54 ± 0,04	1,2	12,2 ± 0,3 <sup>a</sup>	22	0,03 ± 0,01	1,2	68 ± 1	2260
	Mg <sup>2+</sup>	4,0 ± 0,1	1,7		3	1,9 ± 0,2	2,8		35
	UTP	0,40 ± 0,06	1,4		0,4	0,40 ± 0,04	1,4		0,4
UDP-Glc	Glc-1P	0,38 ± 0,03	1,3	0,17 ± 0,01	0,4	0,36 ± 0,02	1,1	0,17 ± 0,02	0,5
	Mg <sup>2+</sup>	3,2 ± 0,3	2,3		0,05	3,8 ± 0,4	2,2		0,04
	GTP	0,51 ± 0,03	1,5		0,3	0,35 ± 0,02	1,6		0,3
GDP-Glc	Glc-1P	0,22 ± 0,03	1,4	0,12 ± 0,01	0,5	0,16 ± 0,01	1,1	0,11 ± 0,01	0,7
	Mg <sup>2+</sup>	2,8 ± 0,2	1,9		0,04	2,5 ± 0,1	2,3		0,04
	CTP	0,29 ± 0,02	1,4		0,3	0,25 ± 0,01	1,3		0,4
CTP-Glc	Glc-1P	0,37 ± 0,03	1,2	0,10 ± 0,01	0,3	0,34 ± 0,03	1,1	0,10 ± 0,01	0,3
	Mg <sup>2+</sup>	2,9 ± 0,3	2,0		0,03	2,7 ± 0,1	2,1		0,04

<sup>a</sup> $V_{max}$  determinada a partir de la curva de saturación de ATP

**Tabla VI.1.1. Parámetros cinéticos de la *EcoADP-Glc* PPasa para el uso de NTP alternativos en ausencia (control) o presencia (+Fru-1,6-bisP) de 1 mM Fru-1,6-bisP.**



**Figura VI.1.1. Eficiencia catalítica para los distintos sustratos.** La actividad de la *EcoADP-Glc PPasa* fue medida en ausencia (barras blancas) o presencia (barras de líneas oblicuas) de 1 mM Fru-1,6-bisP con diferentes (A) NTP, (B) azúcares-1P y (C) cationes divalentes. Nótese la escala logarítmica del eje de las ordenadas en los gráficos.



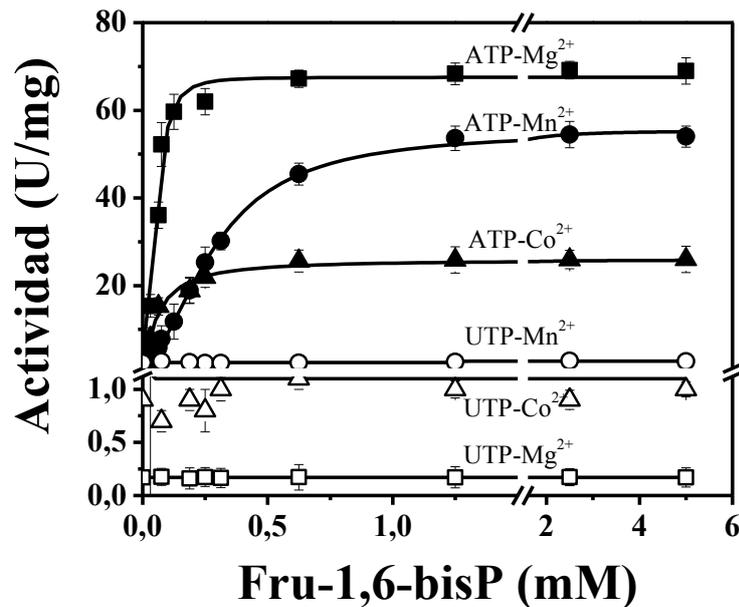
**Figura VI.1.2. Efecto del Fru-1,6-bisP en la activación de la *EcoADP-Glc PPasa* dependiente del nucleótido utilizado.** Actividad de (A) la ADP-Glc PPasa salvaje y (B) su mutante W113A. Se analizó la actividad a diferentes concentraciones del efector con los distintos nucleótidos (2 mM): ATP (■), UTP (●), GTP (▲) y CTP (▼).

### VI.1.1.2. Análisis de la especificidad por el azúcar-1P y el cofactor esencial

Estudios anteriores han mostrado que la *EcoADP-Glc PPasa* es capaz de utilizar diferentes azúcares-1P como sustrato (Hill y col., 1991). Sin embargo, en este trabajo no se analiza en profundidad el grado de promiscuidad de la enzima ni el efecto de la Fru-1,6-bisP en la misma. En base a esto, y a los resultados obtenidos para el uso de NTP alternativos, se realizó el estudio de la actividad de la *EcoADP-Glc PPasa* con otros monosacáridos (Gal-1P y GlcN-1P) y el efecto del activador alostérico sobre las reacciones catalizadas con los mismos en comparación a su actividad con Glc-1P, utilizando ATP como sustrato nucleotídico. Acorde a lo observado en el trabajo anterior (Hill y col., 1991), la enzima exhibió actividad con Gal-1P y GlcN-1P. A partir de los parámetros cinéticos obtenidos se calculó la eficiencia catalítica para estos azúcares en presencia y ausencia del efector y se compararon con respecto a la del sustrato principal, la Glc-1P. Como se observa en la Figura VI.1.1 B, la Fru-1,6-bisP tiene un efecto activador sobre la enzima independientemente del monosacárido utilizado. Es así que aumenta su eficiencia para el uso de Glc-1P >> GlcN-1P > Gal-1P. Aunque es importante remarcar bajo todas las condiciones (en presencia o ausencia de Fru-1,6-bisP) la mayor eficiencia catalítica se logró con Glc-1P como sustrato.

Como todas las nucleotidiltransferasas, las ADP-Glc PPasas requieren un metal divalente para llevar a cabo la reacción. Por su abundancia y amplia disponibilidad para la mayoría de las células, el  $Mg^{2+}$  es considerado el cofactor principal. Sin embargo, en nuestro grupo de trabajo hemos observado que estas enzimas son capaces de catalizar la reacción en presencia de otros cationes, como  $Mn^{2+}$  y  $Co^{2+}$ . Es por esto que nos planteamos analizar si el efector aumenta la especificidad por un determinado cofactor. Para el estudio con diferentes cationes, entonces, se utilizaron  $Co^{2+}$  y  $Mn^{2+}$  como sustitutos del  $Mg^{2+}$  y se ensayó la actividad de la enzima con ATP o UTP como

sustratos. Los tres metales se comportaron como cofactores eficaces en las reacciones con ambos NTP. En el estudio realizado con ATP la eficiencia catalítica para los metales mejoró en un orden de magnitud en presencia de Fru-1,6-bisP (Figura VI.1.1 C). El efecto del activador fue evidente en el incremento de la  $V_{\max}$  (Figura VI.1.), aumentando más de 10 veces este parámetro en todos los casos. Por otro lado, la enzima también fue activa utilizando UTP en complejo con los diferentes cationes. Como se muestra en la Figura VI.1., en los ensayos con UTP la  $V_{\max}$  determinada fue mayor en presencia de  $Mn^{2+}$  y  $Co^{2+}$  que cuando el cofactor usado era  $Mg^{2+}$ . Es decir, el  $Co^{2+}$  y en mayor medida el  $Mn^{2+}$  incrementarían la promiscuidad de la enzima sobre el uso de los NTP, pero en presencia del activador este efecto se ve disminuido ya que se incrementa la eficiencia catalítica cuando la enzima utiliza ATP pero no UTP (Figura VI.1.).

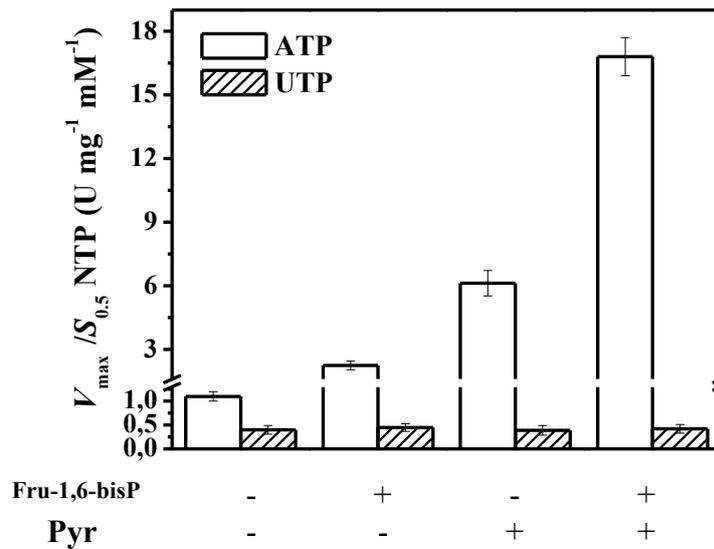


**Figura VI.1.3. Efecto de los metales divalentes en las curvas de saturación de la ADP-Glc PPasa para la Fru-1,6-bisP.** La actividad se midió a diferentes concentraciones de efector (Fru-1,6-bisP) y en presencia de diferentes cationes utilizados como cofactores en la reacción [Mg<sup>2+</sup> (cuadrados), Mn<sup>2+</sup> (círculo) o Co<sup>2+</sup> (triángulo)] y distintos NTP [ATP (símbolo negro) o UTP (símbolo blanco)]. Las concentraciones de NTP fueron de 2 mM, mientras que las de los Me<sup>2+</sup> fueron de 10 mM para Mg<sup>2+</sup>, 2 mM para Mn<sup>2+</sup> y 0,5 mM para Co<sup>2+</sup> para las reacciones con ATP, y de 10 mM para Mg<sup>2+</sup>, 10 mM para Mn<sup>2+</sup> y 1 mM para Co<sup>2+</sup> para las reacciones con UTP.

#### VI.1.1.3. Análisis del efecto sinérgico de los efectores Fru-1,6-bisP y Pyr

Se ha informado que el Pyr es un activador clave en la regulación de la ADP-Glc PPasa de *E. coli* (Asencion Diez y col., 2014) y que se uniría a un sitio distinto a la Fru-1,6-bisP, modulando su actividad. Aunque el Pyr presenta un efecto menos marcado que la Fru-1,6-bisP, ambos pueden actuar en sinergia y potenciar la activación de la enzima. El Pyr aumenta la afinidad de la enzima por la Fru-1,6-bisP, y

viceversa. La acción combinada de estos efectores modifica significativamente los parámetros cinéticos de la enzima, aumentando la  $V_{\max}$  y disminuyendo los valores de  $S_{0,5}$  para los sustratos (Asencion Diez y col., 2014). Para investigar el efecto del Pyr y su acción sinérgica con la Fru-1,6-bisP la actividad de ADP-Glc PPasa con NTP alternativos, se realizaron ensayos de medida de actividad con ATP o UTP en presencia de diferentes concentraciones de los metabolitos. La Figura VI.1. ilustra los resultados: como se ha descrito anteriormente en este capítulo, en ausencia de efectores la eficiencia catalítica de la enzima es prácticamente la misma para ATP y UTP. A bajas concentraciones de Fru-1,6-bisP (10  $\mu\text{M}$ ) la eficiencia para el uso del ATP se incrementó  $\sim 4,5$  veces mientras que no tuvo efecto en la actividad con UTP. En presencia de 20 mM de Pyr la actividad sólo incrementó cuando la enzima utiliza ATP como sustrato: la eficacia catalítica fue  $\sim 7$  veces mayor. Y al igual que lo observado en trabajos anteriores, se evidenció un efecto sinérgico, ya que en presencia de Pyr (20 mM) y bajas concentraciones de Fru-1,6-bisP (10  $\mu\text{M}$ ) la eficiencia catalítica para el uso de ATP aumentó  $\sim 20$  veces. Cuando los ensayos fueron realizados utilizando UTP como sustrato, no se observó activación con ninguno de los efectores (Figura VI.1.).



**Figura VI.1.4. Eficiencia catalítica para el uso de ATP y UTP en presencia de diferentes efectores alostéricos.** La actividad de la ADP-Glc PPasa de *E. coli* se midió utilizando como sustrato alternativamente ATP (barras blancas) o UTP (barras líneas oblicua) en presencia de 10  $\mu$ M Fru-1,6-bisP y / o Pyr 20 mM.

### VI.1.2. Discusión

Al presente, se han resuelto dos estructuras cristalográficas de ADP-Glc PPasas: la forma homotetramérica ( $\alpha_4$ ) de la subunidad catalítica (pequeña) de tubérculo de papa (Jin y col., 2005) y la enzima de *Agrobacterium tumefaciens* (Cupp-Vickery y col., 2008). Ambas estructuras mostraron que las proteínas presentan dos dominios definidos: el dominio catalítico N-terminal, que presenta un plegamiento de tipo Rossmann y el dominio C-terminal, que participa en la oligomerización y en la regulación alostérica de la enzima (Ballicora y col., 2003; Jin y col., 2005; Georgelis y col., 2009). Estudios llevados a cabo mediante el uso de diferentes enfoques experimentales han demostrado la existencia de una interacción entre ambos dominios y distintos trabajos (Gomez-Casati y col., 2001; Ballicora y col., 2002; Asencion Diez y

col., 2013) sugieren que la comunicación entre los dos dominios es importante para la regulación de la enzima. Ciertamente, el hecho de que todas las PPasas comparten la misma estructura tridimensional del dominio catalítico, residuos involucrados en la actividad de las enzimas y motivos altamente conservados [como el *loop* rico en glicina GXG(T/S)R] conducen a la posibilidad de que la ADP-Glc PPasa pueda unir (y probablemente utilizar) otros compuestos además de sus sustratos principales (ATP y Glc-1P).

En la literatura, se describe poco sobre el uso alternativo de los sustratos NTP (Lapp y Elbein, 1972; Machtey y col., 2012), azúcar-1P (Hill y col., 1991; Machtey y col., 2012) y cationes divalentes (Machtey y col., 2012) por las distintas ADP-Glc PPasas hasta ahora estudiadas. Y ningún trabajo ha realizado un análisis en detalle sobre el efecto de los activadores alostéricos en el uso de otros sustratos por estas enzimas. La ADP-Glc PPasa de *E. coli* exhibió un cierto grado de promiscuidad hacia los sustratos y el cofactor esencial. En función de esto se analizó cómo la Fru-1,6-bisP (principal efector de la enzima) y el Pyr juegan un rol clave en la selección específica del NTP correcto, y de esta forma mejora la eficiencia catalítica para el uso de todos los sustratos.

Nuestro grupo de trabajo ha informado de que la ADP-Glc PPasa de *N. europaea* es capaz de mediar la síntesis de distintos NDP-Glc, con la disminución de las eficiencias catalíticas según utiliza ATP>UTP~CTP>dTTP>GTP en la reacción (Machtey y col., 2012). De manera similar a los resultados obtenidos en el presente trabajo, el Pyr (principal activador para la enzima *N. europaea*) aumenta la eficiencia del uso del ATP, haciendo a la enzima más específica hacia la síntesis de ADP-Glc. Además, se ha informado que para la ADP-Glc PPasa de *Mycobacterium smegmatis* (Lapp y Elbein, 1972) el GTP fue eficaz en la sustitución del ATP y también se observó

actividad (aunque moderada) con UTP. Para esta enzima la Fru-6-P y el fosfoenolpiruvato estimularon la síntesis de ADP-Glc (Lapp y Elbein, 1972), pero el efecto de estos metabolitos sobre la actividad con GTP no ha sido descripto.

En cuanto al uso de los azúcares-1P alternativos, la Fru-1,6-bisP no mostró el mismo efecto que con los NTP. La eficiencia catalítica para el uso de todos los monosacáridos analizados se incrementó en presencia del activador. La ADP-Glc PPasa de *N. europaea* mostró actividad con Man-1P más allá del sustrato natural Glc-1P. Sin embargo, el activador alostérico no tuvo ningún efecto en los parámetros cinéticos de los azúcar-1P utilizados por la enzima (Machtey y col., 2012).

Entre los iones metálicos divalentes, el  $Mg^{2+}$  es sin duda el más abundante, se encuentra ampliamente disponible en la mayoría de las células, y está implicado en varios procesos fisiológicos; sin embargo, otros metales pueden actuar como cofactores de las PPasas (Machtey y col., 2012; Asencion Diez y col., 2013). La ADP-Glc PPasa de *N. europaea* tiene un cierto grado de promiscuidad hacia el ión metálico divalente (Machtey y col., 2012), donde tanto el  $Mg^{2+}$ , el  $Mn^{2+}$  como el  $Co^{2+}$  pueden actuar como cofactor para la reacción. Esta enzima en particular exhibió una afinidad notablemente baja hacia el  $Mg^{2+}$  y el uso de otros cationes (principalmente  $Co^{2+}$ ) aumentó su promiscuidad para el uso de otros nucleótidos (principalmente UTP y CTP) y para la Man-1P como sustratos. El metabolito que actuó como activador alostérico, el Pyr, altera marcadamente la baja afinidad por  $Mg^{2+}$  y, por lo tanto, el grado de promiscuidad por los sustratos. Principalmente se reduce el  $S_{0,5}$  para el  $Mg^{2+}$  y aumenta de esta forma la utilización del ATP. La ADP-Glc PPasa de *E. coli* exhibió una mayor  $V_{max}$  con UTP en presencia de  $Co^{2+}$  y  $Mn^{2+}$ ; pero la Fru-1,6-bisP sólo tuvo efecto sobre los parámetros cinéticos de la enzima cuando la reacción se llevaba a cabo con ATP. En este sentido, el efector no sólo actuaría como un activador aumentando la actividad de la enzima, e

incluso disminuyendo el  $S_{0,5}$  de los sustratos, sino que podría plantearse un rol en la selección del nucleótido correcto, mejorando la especificidad de la enzima.

Nuestro grupo desarrolló un modelo molecular de la *EcoADP-Glc PPasa* (Figuroa y col., 2011) que sugiere un mecanismo de propagación de la activación alostérica, en la que las interacciones entre los *loops* que contienen los residuos Gln<sup>74</sup> y Trp<sup>113</sup> juegan un papel crítico. El modelo proporciona una hipótesis en la que el principal efecto de activación de la Fru-1,6-bisP se ejerce mediante la inducción de un cambio conformacional a partir de una forma abierta para favorecer y/o estabilizar una forma cerrada de la enzima. En este mecanismo se produce un re-arreglo de los *loops*, que se cierran aproximando los sustratos hacia los residuos catalíticos y, de esta forma, confiere un medio ambiente adecuado para una catálisis más eficiente. Coherente con esta hipótesis, los ensayos realizados con la mutante W113A de la *EcoADP-Glc PPasa* mostraron que no había activación de la enzima en presencia del efector. De esta forma, la eficiencia catalítica para el uso de los cuatro nucleótidos permanece igual; mientras que para la enzima salvaje el activador alostérico aumentó la especificidad en el uso del ATP. Estos resultados apoyan la idea de que uno de los efectos del activador alostérico sería la de seleccionar el NTP correcta, para favorecer la síntesis de ADP-Glc necesaria para el metabolismo organismo.

Este mecanismo podría ser comparable con el observado en las ribonucleótido-reductasas (RNR) (Ahluwalia y col., 2012). La RNR es la enzima crítica, responsable de la producción de los 5'-desoxinucleósido-trifosfatos (dNTP). Los niveles de dNTP están estrechamente controlados a nivel de la RNR por procesos de retroalimentación y cambios alostéricos intrínsecos. En el sitio regulador de la subunidad pueden ser unidos dATP, ATP, dGTP, y dTTP. Dependiendo de cuál de ellos interacciona, se producen cambios conformacionales en el sitio catalítico que le

proporcionan la capacidad de reducir un determinado NDP (ADP, CDP, GDP o UDP). De esta forma, este sitio regula la especificidad de la enzima de manera tal que los cuatro dNTP se mantienen en sus proporciones adecuadas para el correcto mantenimiento celular. Numerosas RNR han sido cristalizadas (Uppsten y col., 2003; Larsson y col., 2004; Uppsten y col., 2006; Ando y col., 2011; Fairman y col., 2011) y se ha establecido un mecanismo de regulación para la especificidad por el sustrato: el sitio regulador está en contacto con el sitio catalítico a través de un *loop* flexible. Cuando el efector alostérico se une al sitio de regulación, se altera la conformación del *loop* de tal manera que hace que el sitio catalítico más susceptible a la unión de un sustrato sobre los otros (Hofer y col., 2012).

En los últimos años, la promiscuidad de las enzimas ha tomado mayor relevancia. La investigación sobre la promiscuidad abre una visión hacia nuevas ideas para el estudio de la evolución divergente de las enzimas. Como ya se ha mencionado, las ADP-Glc PPasas tienen un dominio común con otras NDP-azúcar PPasas, pero las primeras son más grandes debido a que tienen un extremo C-terminal extendido (120 a 150 aminoácidos) y uno N-terminal ligeramente más largo (10 a 40 aminoácidos) que el resto de las PPasas (Ballicora y col., 2003, 2004). Es posible que un fragmento de ~150 aminoácidos en el extremo C-terminal haya sido adquirido evolutivamente para lograr una enzima regulada y/o mejorar la regulación rudimentaria que ya estaba presente. Coherente con esta hipótesis, la vista del activador alostérico como una herramienta para mejorar la especificidad de las enzimas apoya la idea de que un ancestro común de estas enzimas evolucionó hacia otras formas con propiedades reguladoras. De esta manera, favoreciendo la regulación y el uso de los sustratos más adecuados para optimizar el metabolismo del organismo. Esto último está altamente en concordancia con el hecho que los efectores alostéricos de las distintas ADP-Glc PPasas siempre son

metabolitos clave de la ruta metabólica principal de asimilación del carbono en el organismo respectivo (Ballicora y col., 2003, 2004; Preiss, 2009).

## VI.2. Capítulo: “Caracterización cinética y estructural de las enzimas implicadas en la síntesis de UDP-Glc en *Escherichia coli*”

### VI.2.1. Resultados

#### VI.2.1.1. Clonado y expresión recombinante de los genes que codifican para las proteínas GalU y GalF

Se ha informado que *galU* es el gen que codifica para la UDP-Glc PPasa procariota (Weissborn y col., 1994). Sin embargo, como se mencionó anteriormente, en algunas bacterias se ha encontrado un segundo gen que codifica para una UDP-Glc PPasa putativa: *galF* (Jiang y col., 1991; Klena y Schnaitman, 1993; Macpherson y col., 1994; Xiang y col., 1994; Yao y Valvano, 1994; Marolda y Valvano, 1995). La proteína que se predice a partir de este gen (GalF) está altamente conservada en enterobacterias (más de 90% de identidad en secuencia de aminoácidos) (Marolda y Valvano, 1996). A pesar de la presencia de *galF*, la UDP-Glc PPasa de *E. coli* ha sido caracterizada como una enzima homotetramérica constituida por GalU ya que se ha producido y purificado en forma recombinante para su caracterización (Hossain y col., 1994) y cristalización (Thoden y Holden, 2007b). Sin embargo, es tentador pensar que *in vivo* estas proteínas podrían interactuar para formar estructuras heteroméricas. Es así que para una mejor comprensión de la ocurrencia de estos genes, y las proteínas codificadas por ellos, decidimos encarar el estudio de la UDP-Glc PPasa (GalU) y la enzima homóloga (GalF) de *E. coli*. Los genes *galU* (Gene ID: 945730) y *galF* (Gene ID: 946560) predicen dos proteínas: GalU de 302 aminoácidos y GalF de 297 aminoácidos, respectivamente, que comparten el 56,6% de identidad en sus secuencias de aminoácidos (Figura VI.2.1). Además, ambas enzimas comparten entre 30-45% de identidad con UDP-Glc PPasas de

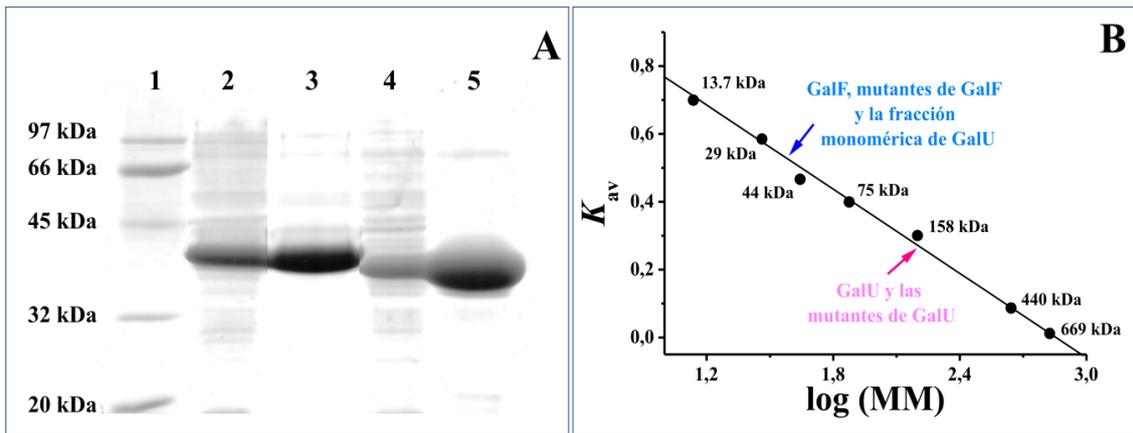
otras bacterias, como *C. glutamicum* (Thoden y Holden, 2007a), *Helicobacter pylori* (Kim y col., 2010), *Streptococcus mutans* (Asencion Diez y col., 2013).

Para comenzar los estudios, se diseñaron cebadores específicos (Tabla VI.2.1) para amplificar los genes *galU* (909 pb) y *galF* (894 pb) a partir de ADN genómico de *E. coli* K-12 mediante PCR. Después de confirmar su identidad mediante secuenciación, los productos amplificados fueron clonados en el vector comercial pET28c. Con las construcciones se transformaron células de *E. coli* BL21 (DE3) para producir en forma recombinante GalU y GalF, respectivamente. Esta última se expresó fusionada a una etiqueta de histidinas, a fin de evitar la co-purificación de la GalU endógena de la célula huésped. De esta forma GalF fue purificada mediante IMAC ( $\text{Ni}^{2+}$ ), mientras que GalU fue purificada mediante dos pasos cromatográficos de intercambio iónico. Ambas proteínas recombinantes se sobre-expresaron en las fracciones solubles (Figura VI.2.2 A, carriles 2 y 4), y fueron purificadas a homogeneidad a juzgar por análisis en SDS-PAGE (Figura VI.2.2 A, carriles 3 y 5). GalU y GalF predicen una MM de ~33 kDa (Figura VI.2.2 A).



Primer	Secuencias de oligonucleótidos	T <sub>A</sub> (°C)	T <sub>E</sub> (min)
<i>galUWT-fo</i>	5'- <u>CCATGG</u> ATGGCTGCCATTAATACGAAAAGTCAAAAAAGCCGTTATCCCCGTTGCGGG-3'	61	1
<i>galUWT-re</i>	5'-GAGCTC <u>TT</u> ATTTCGCTTAACAGCTTCTCAATACCTTTAAATTCGGTGC-3'	59	
<i>galUT20MR21H-fo</i>	5'-GCGGGATTAGGAAT <b>GC</b> CATATGTTGCCGGCG-3'	55	1
<i>galUT20MR21H-re</i>	5'-CGCCGGCAACATAT <b>GC</b> ATTTCCTAATCCCCGC-3'	54	
<i>galUK202A-fo</i>	5'-GTGGTAGAA <b>AGCG</b> CCGAAAGCG-3'	52	1
<i>galUK202A-re</i>	5'-CGCTTTCGGGCGCTTCTACCAC-3'	53	
<i>galFWT-fo</i>	5'- <u>CATATG</u> ACGAATTTAAAAGCAGTTATCCTGTAGCGGGTCTCGGGATGCATAT-3'	63	1
<i>galFWT-re</i>	5'-GAGCTC <u>TT</u> ATTTCGCTTAACAGCTTCTCAATACCTTTACGGAAGCTTCGCCCTTCT-3'	62	
<i>galFM15TH16R-fo</i>	5'-GGTCTCGGG <b>ACCCG</b> TATGTTGCCT-3'	55	1
<i>galFM15TH16R-re</i>	5'-AGGCAACATA <b>ACGGG</b> TCCCCGAGACC-3'	53	
<i>galFK198A-fo</i>	5'-GAATTTATCGAA <b>AGCG</b> CCGGATCAGCCG-3'	53	1
<i>galFK198A-re</i>	5'-CGGCTGATCC <b>GGCG</b> CTTCGATAAAATTC-3'	52	

**Tabla VI.2.2. Secuencias de oligonucleótidos específicos para la amplificación de los genes *galU* y *galF* (los sitios de restricción se encuentran subrayados) y para la mutagénesis sitio-dirigida (las bases cambiadas se marcan en negrita).** Los sitios de restricción utilizados para subclonar *galU* fueron *NcoI* (oligonucleótido Fo) y *SacI* (oligonucleótido Re); y los sitios de restricción para el gen *galF* fueron *NdeI* (oligonucleótido Fo) y *SacI* (oligonucleótido Re). T<sub>A</sub>, temperatura de apareamiento y t<sub>E</sub>, tiempo de elongación.



**Figura VI.2.2. Determinación la estructura de GalU y de GalF.** (A) SDS-PAGE de las proteínas de *E. coli* producidas en forma recombinante. Carril 1: marcadores de MM; carril 2: sobre-expresión de GalU en extracto crudo; carril 3: GalU purificada; carril 4: sobre-expresión de GalF fusionada a la etiqueta de histidinas; carril 5: GalF purificada. (B) Determinación de la MM de las proteínas realizada mediante cromatografía de filtración por geles.

#### VI.2.1.2. Caracterización cinética de las proteínas recombinantes

Como ya se ha mencionado, la UDP-Glc PPasa es una enzima clave en el anabolismo de la Glc en todos los organismos. En particular en bacterias, la actividad de esta PPasa está involucrada en diversas rutas metabólicas. Por lo que el estudio de sus propiedades cinéticas es relevante para entender el metabolismo de los hidratos de carbono en estos microorganismos. En trabajos previos se ha establecido que en *E. coli* GalU es la UDP-Glc PPasa funcionalmente activa, mientras que GalF no exhibe actividad catalítica a pesar de su alto porcentaje de identidad con GalU (> 50%) (Marolda y Valvano, 1996). Pero los estudios moleculares realizados son escasos como para establecer concretamente la el rol de GalF (si es que lo tiene) dentro de la célula. Es así que decidimos llevar a cabo la caracterización de las proteínas codificadas por los

genes *galU* y *galF* de *E. coli* y de esta forma determinar la funcionalidad de estas proteínas, particularmente de GalF.

En nuestras manos ambas proteínas purificadas mostraron actividad UDP-Glc PPasa, con una marcada diferencia en la  $V_{\max}$  determinadas para GalU (340 U/mg) y GalF (0.015 U/mg). La Figura VI.2.3 muestra las curvas de saturación de estas enzimas para los diferentes sustratos a partir de las cuales se determinaron los parámetros cinéticos. Como se esperaba, ambas PPasas mostraron una estricta dependencia por  $Mg^{2+}$  para catalizar la síntesis de UDP-Glc y PPi a partir de UTP y Glc-1P. GalF exhibió un  $S_{0,5}$  ligeramente superior para este cofactor esencial (3,1 mM para GalF y 2,2 mM para GalU) y para ambas enzimas las curvas de saturación mostraron un comportamiento sigmoidal (Figura VI.2.3 A y B). Además, GalF presentó un mayor  $S_{0,5}$  para el UTP (0,36 mM) en comparación con los parámetros calculados para GalU (0,17 mM) y, como puede observarse en las Figura VI.2.3 C y D, un comportamiento cinético distinto: GalU exhibió una curva de saturación hiperbólica para el NTP, mientras que en GalF se observó un comportamiento más sigmoideo. Sin embargo, la mayor diferencia se encontró en los parámetros determinados para la Glc-1P: en GalU el  $S_{0,5}$  fue un orden de magnitud inferior (0,035 mM) que el determinado en GalF (0,52 mM). Además, GalU mostró un comportamiento ligeramente desviado de una hipérbola para el uso de Glc-1P presentando cooperatividad positiva, mientras que GalF exhibió una cooperatividad negativa para el azúcar-P (Figura VI.2.3 E y F).

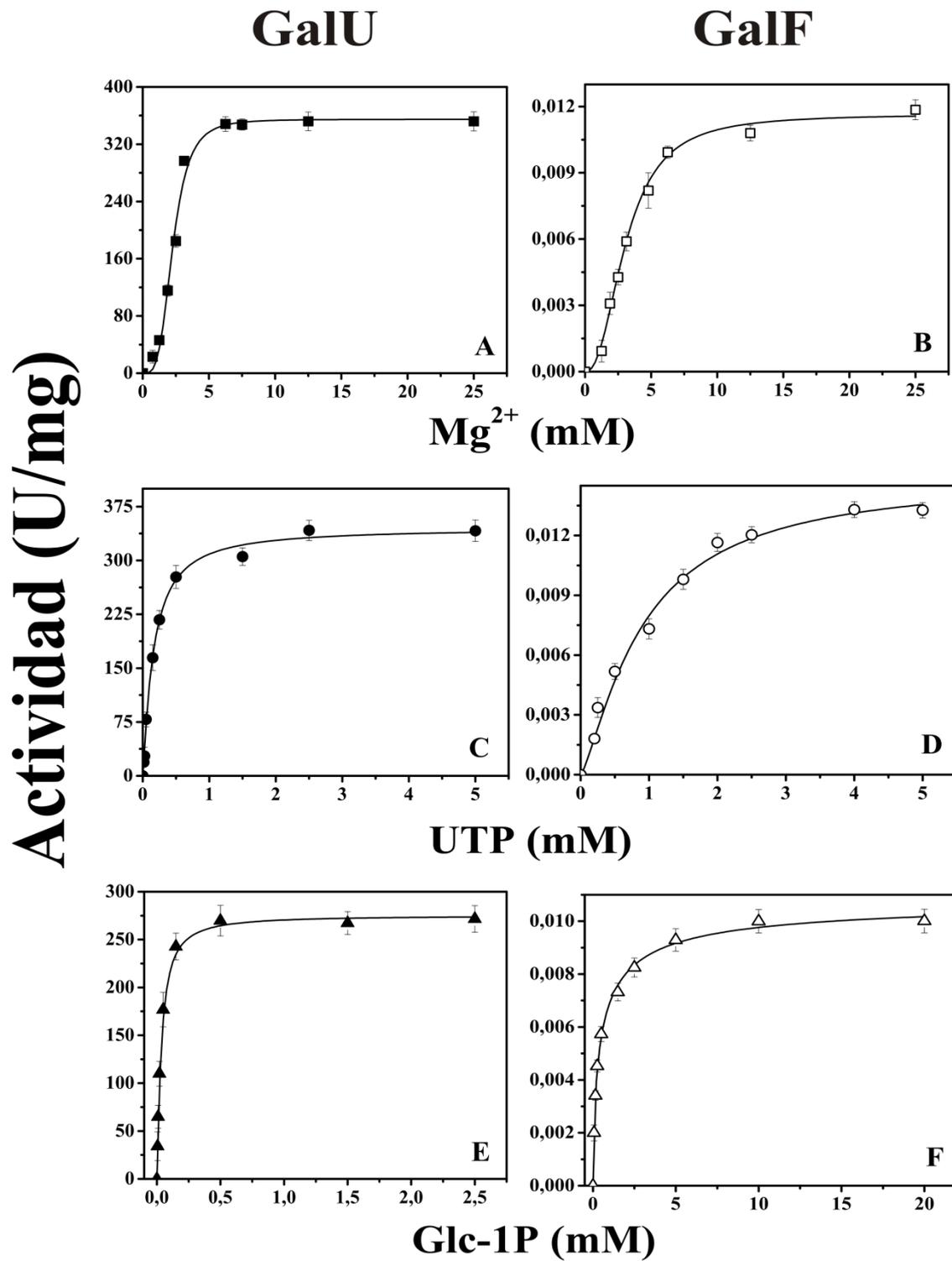


Figura VI.2.3. Curvas de saturación de GalU (símbolos negros) y GalF (símbolos blancos) para: (A) y (B) Mg<sup>2+</sup>, (C) y (D) UTP y (E) y (F) Glc-1P.

## VI.2.1.3. Estudio de la estructura cuaternaria de GalU y GalF

Cuando se determinó la estructura cuaternaria para GalU y GalF, mediante cromatografía de exclusión molecular, se observaron diferencias importantes (Figura VI.2.2 B). La primera exhibió el perfil de elución de una proteína homotetramérica (~160 kDa, Figura VI.2.2 B) [este resultado es acorde a lo descrito por (Thoden y Holden, 2007b)]; mientras que GalF se comportó como un monómero (~40 kDa, Figura VI.2.2 B). Basados en estos resultados, decidimos investigar si el estado de oligomerización de GalU influía en la actividad de la enzima; y si esto pudiera explicar, al menos en parte, las diferencias en los parámetros cinéticos respecto a GalF.

Se ha informado que la UDP-Glc PPasa de cebada presenta cambios en el estado oligomérico cuando se la incuba en diferentes *buffers* (Kleczkowski y col., 2005). De esta manera se realizó un ensayo similar a lo descrito: GalU fue incubada en HEPES-NaOH (pH 8,0) y Tris-HCl (pH 8,0) y posteriormente se analizaron las muestras mediante cromatografía de exclusión molecular. Cuando la enzima fue preincubada en *buffer* Tris eluyó en un único pico correspondiente a una forma tetramérica. Mientras que la preincubación en *buffer* HEPES promovió cambios parciales en la estructura cuaternaria de la enzima, dando lugar a una mezcla de formas tetramérica y monomérica. Las muestras se recogieron y analizaron cinéticamente. La fracción monomérica de GalU (GalU<sub>m</sub>) exhibió una  $V_{\max}$  20 veces menor (18 U/mg) que la forma tetramérica (350 U/mg) (Tabla VI.2.3). Sin embargo, este parámetro continuó siendo mayor que el determinado para GalF (~100 veces). En cuanto a los otros parámetros cinéticos calculados para los sustratos, el  $S_{0,5}$  para Glc-1P aumentó ligeramente en comparación con el valor observado en la forma tetramérica; mientras que no se observó variación en los parámetros para el UTP y el  $Mg^{2+}$  (Tabla VI.2.3).

#### VI.2.1.4. Análisis de los residuos críticos en la actividad PPasa

Como ya se ha mencionado, GalU y GalF presentan un alto grado de identidad de secuencia de aminoácidos e incluso se conservan residuos descriptos como importantes para la actividad de las UDP-Glc PPasas bacetianas (Figura VI.2.1). Sin embargo, GalF exhibió una actividad baja en comparación con GalU y otras UDP-Glc PPasas procariotas previamente informadas (Bonofiglio y col., 2005a; Bosco y col., 2009; Asencion Diez y col., 2012; Asencion Diez y col., 2013). En el apartado anterior se determinó que la estructura cuaternaria adoptada por estas enzimas es diferente y que el estado de oligomerización influye sobre la actividad de las mismas. Sin embargo, el estudio mostró que GalU incluso en su forma monomérica exhibe parámetros cinéticos distintos a GalF (Tabla VI.2.3). Esto nos llevó a plantearnos sobre diferencias en residuos claves de las secuencias que pudieran causar tales discrepancias cinéticas.

Con el fin de identificar estos residuos críticos para la actividad de la enzima, se analizaron las secuencias de GalU y GalF en comparación con otras PPasas. Se ha descrito que el motivo GXG(T/S)R está altamente conservado entre todas las PPasas hasta ahora informadas (Figura VI.2.4 A) (Jin y col., 2005) y ha sido identificado como parte del sitio de unión de los NTP (Brown y col., 1999; Sivaraman y col., 2002; Jin y col., 2005; Koropatkin y col., 2005; Steiner y col., 2007; Pelissier y col., 2010). Como se muestra en el alineamiento de secuencias de la Figura VI.2.4 A, este motivo está conservado en GalU; mientras que en GalF los residuos Thr<sup>20</sup> y Arg<sup>21</sup> de GalU son sustituidos por los residuos Met<sup>15</sup> e His<sup>16</sup>, respectivamente.

Además, se realizó un modelado molecular por homología para GalU (Figura VI.2.4 B) y para GalF (Figura VI.2.4 C) con el posicionamiento de la UDP-Glc y el Mg<sup>2+</sup> utilizado por estas enzimas como cofactor esencial. Como molde para incluir estos

compuestos se utilizó la proteína GalU de *C. glutamicum*, cuya estructura cristalina (PDB: 2PA4) fue resuelta con el producto y dos iones de  $Mg^{2+}$  (Thoden y Holden, 2007a). El catión incluido en nuestros modelos es el asociado a los átomos de oxígeno de los fosfatos  $\alpha$  y  $\beta$  de la UDP-Glc y al residuo de Asp<sup>142</sup> en GalU de *C. glutamicum*. Se ha establecido también que este ión metálico está presente, en la misma posición, en la timidililtransferasa de *E. coli* (Sivaraman y col., 2002). Como muestra el modelo de GalU (Figura VI.2.4 B), los residuos Thr<sup>20</sup> y Arg<sup>21</sup> forman parte del bolsillo catalítico. En GalF la sustitución de estos residuos (por Met e His, respectivamente) podrían generar cambios estructurales en este sitio (Figura VI.2.4 C).

Con el objeto de determinar si estos residuos eran importantes en la actividad de las enzimas se construyeron dobles mutantes en GalU (GalU T20M/R21H) y en GalF (GalF M15T/H16R), para así obtener los respectivos intercambios estructurales de cada proteína en este dominio específico. Las mutantes fueron producidas y purificadas a homogeneidad (> 90%) electroforética, de manera similar a lo descrito previamente para las enzimas salvajes. GalF M15T/H16R exhibió un aumento en la  $V_{max}$  de un orden de magnitud respecto a GalF (Tabla VI.2.3). Aunque el  $S_{0,5}$  para ambos sustratos fue ligeramente superior en la mutante, el comportamiento cinético de saturación para la Glc-1P fue más parecido al exhibido por GalU, ya que GalF M15T/H16R mostró una curva prácticamente hiperbólica para el sustrato (Tabla VI.2.3). Para el ión  $Mg^{2+}$  se observó una disminución en el  $S_{0,5}$  y un aumento en el  $n$ , exhibiendo un comportamiento cinético en su curva de saturación más semejante a GalU. Por otro lado, se realizó la caracterización de la mutante GalU T20M/R21H. En cuanto a los parámetros cinéticos determinados para el UTP y el  $Mg^{2+}$ , no se observaron cambios significativos en esta doble mutante (Tabla VI.2.3). Pero la misma exhibió una disminución en la  $V_{max}$  de tres órdenes de magnitud y el  $S_{0,5}$  de para la Glc-1P se incrementó en ~60 veces comparada

con la de la proteína salvaje (Tabla VI.2.3). Los resultados obtenidos a partir de la caracterización de las dobles mutantes indican que los residuos de Thr y Arg del motivo GXG(T/S)R son relevantes en la actividad de la UDP-Glc PPasa y la sustitución de los mismos en la secuencia de aminoácidos de GalF producen una disminución en la  $V_{\max}$  de la enzima.

Otra región estructural importante, altamente conservada entre las PPasas, es aquella donde se encuentra el residuo Lys<sup>202</sup> de GalU (Thorson y col., 1994; Blankenfeldt y col., 2000a; Thoden y Holden, 2007a) (Figura VI.2.4 A). El modelado molecular de GalU (Figura VI.2.4 B) muestra que este residuo interactúa con el  $\beta$ -fosfato de la UDP-Glc. En GalF esta Lys también se encuentra conservada (Lys<sup>198</sup>, Figura VI.2.4 A). Sin embargo, analizando el modelo 3D de GalF (Figura VI.2.4 C), la Lys<sup>198</sup> no sería capaz de formar un puente hidrógeno con la molécula de UDP-Glc, como si ocurre en GalU. Para comprobar esta hipótesis planteada se realizaron mutantes sitio-dirigidas, en GalU y GalF, de este residuo que sería clave en la catálisis enzimática (GalU K202A y GalF K198A). Esto permitiría explorar más a fondo las relaciones entre la estructura de proteínas y sus propiedades cinéticas. Los mutantes fueron producidas y purificadas a homogeneidad (> 90% pureza según SDP-PAGE, datos no mostrados).

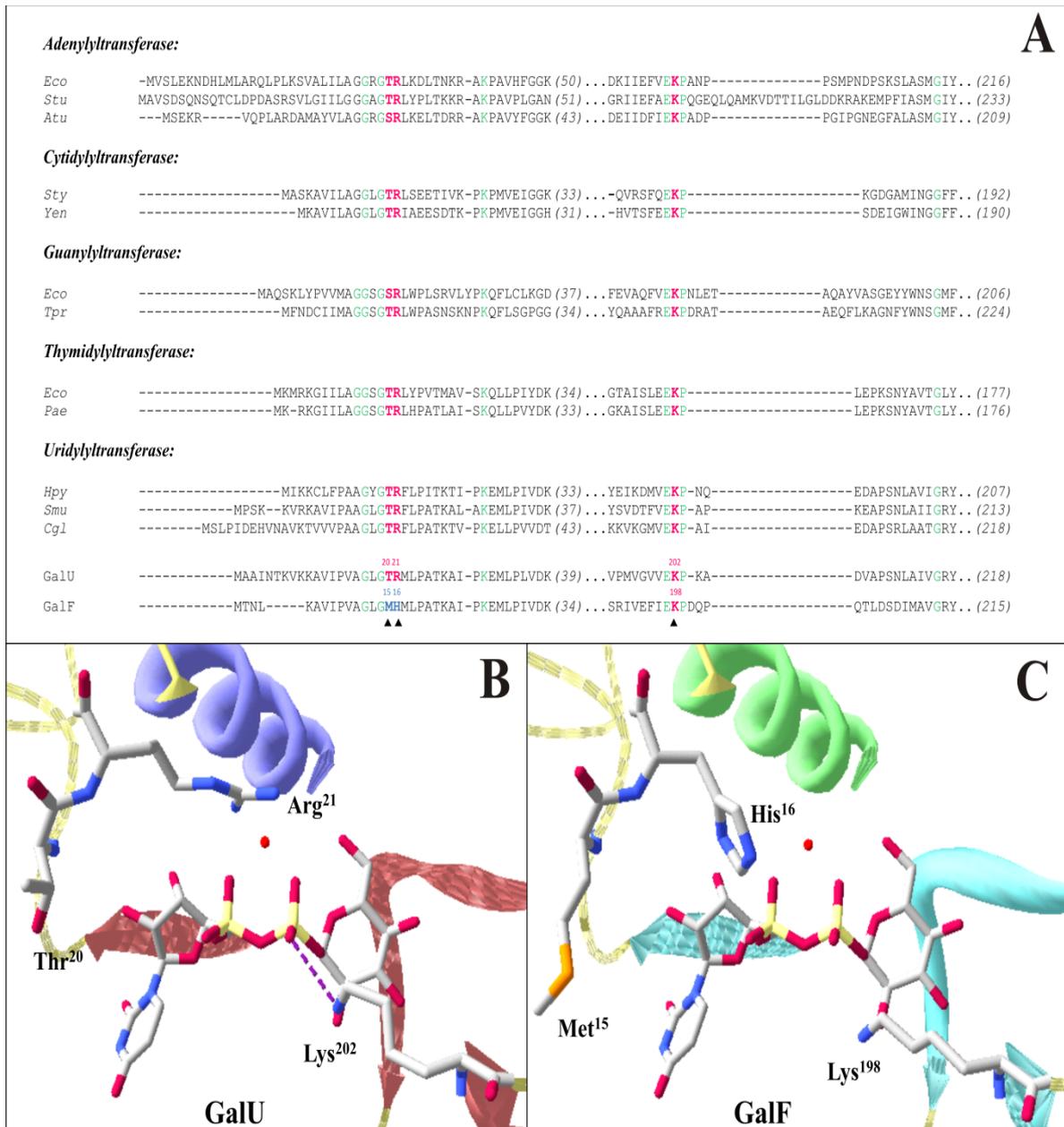
GalU K202A exhibió una  $V_{\max}$  similar a la enzima salvaje; sin embargo, el  $S_{0,5}$  para la Glc-1P se incrementó significativamente (~40 veces) (Tabla VI.2.3). Por lo tanto, la eficiencia catalítica ( $V_{\max}/S_{0,5}$ ) de la enzima para la utilización de Glc-1P disminuyó en dos órdenes de magnitud debido a la mutación puntual en el residuo Lys<sup>202</sup>. Para el UTP no se observaron cambios significativos en los parámetros cinéticos, pero para el ión  $Mg^{2+}$  GalU K202A exhibió un  $S_{0,5}$  ~3 veces menor que GalU. En paralelo GalFK198A exhibió los mismos parámetros cinéticos que la enzima salvaje

para los sustratos UTP y Glc-1P (Tabla VI.2.3). Para el cofactor esencial GalFK198A mostró un  $S_{0,5}$  ligeramente inferior a la de GalF (Tabla VI.2.3). Estos resultados muestran que el residuo de Lys<sup>202</sup> de GalU estaría involucrado en la interacción de la enzima con la Glc-1P, mientras que en GalF la unión del azúcar involucraría otros residuos. Es posible, entonces, que la estructura del sitio catalítico se encuentre modificada en GalF, esto sería responsable de su baja afinidad relativa por la Glc-1P y la  $V_{\max}$  mucho menor que la calculada para GalU.

Además de su caracterización cinética, se determinó la estructura cuaternaria de las mutantes producidas para GalU y GalF mediante cromatografía de filtración por gel. Las distintas mutantes exhibieron perfiles de elución similar a las respectivas enzimas salvajes: para GalU T20M/R21H y GalU K202A se determinó una conformación tetramérica, mientras que para GalF M15T/H16R y Gal FK198A una conformación monomérica.

		GalU		GalF				
		Tetramérica	Monomérica	T20M/R21H	K202A	WT	M15T/H16R	K198A
<b>UTP</b>	$S_{0,5}$ (mM)	$0,17 \pm 0,02$	$0,14 \pm 0,01$	$0,27 \pm 0,04$	$0,13 \pm 0,01$	$0,36 \pm 0,02$	$0,46 \pm 0,04$	$0,20 \pm 0,01$
	$n$	$1,1 \pm 0,1$	$1,4 \pm 0,1$	$1,2 \pm 0,1$	$1,6 \pm 0,2$	$1,4 \pm 0,1$	$1,2 \pm 0,1$	$1,5 \pm 0,1$
<b>Glc-1P</b>	$S_{0,5}$ (mM)	$0,035 \pm 0,005$	$0,082 \pm 0,003$	$2,3 \pm 0,2$	$1,3 \pm 0,1$	$0,52 \pm 0,06$	$0,75 \pm 0,06$	$0,51 \pm 0,06$
	$n$	$1,2 \pm 0,1$	$1,2 \pm 0,1$	$1,7 \pm 0,2$	$1,4 \pm 0,1$	$0,63 \pm 0,05$	$0,95 \pm 0,06$	$0,61 \pm 0,04$
<b>Mg<sup>2+</sup></b>	$S_{0,5}$ (mM)	$2,2 \pm 0,1$	$2,0 \pm 0,1$	$2,6 \pm 0,1$	$0,82 \pm 0,02$	$3,1 \pm 0,1$	$2,2 \pm 0,1$	$2,1 \pm 0,1$
	$n$	$3,7 \pm 0,5$	$2,4 \pm 0,3$	$2,8 \pm 0,2$	$2,3 \pm 0,2$	$2,3 \pm 0,2$	$3,3 \pm 0,4$	$2,1 \pm 0,2$
<b><math>V_{\max}</math> (U/mg)</b>		$351 \pm 10$	$18,4 \pm 0,5$	$0,74 \pm 0,05$	$370 \pm 30$	$0,015 \pm 0,001$	$0,16 \pm 0,01$	$0,017 \pm 0,003$

**Tabla VI.2.3. Parámetros cinéticos determinados para GalU, GalF y sus respectivos mutantes.** Los parámetros se calcularon a partir de datos promedio de tres experimentos independientes.



**Figura VI.2.4. Modelos moleculares del sitio activo de GalU y GalF. (A)** Alineamiento de las secuencia de las UDP-Glc PPasas de *E. coli* (GalU y GalF) con distintas PPasas de diferentes organismos. Los residuos 100% conservados se muestran

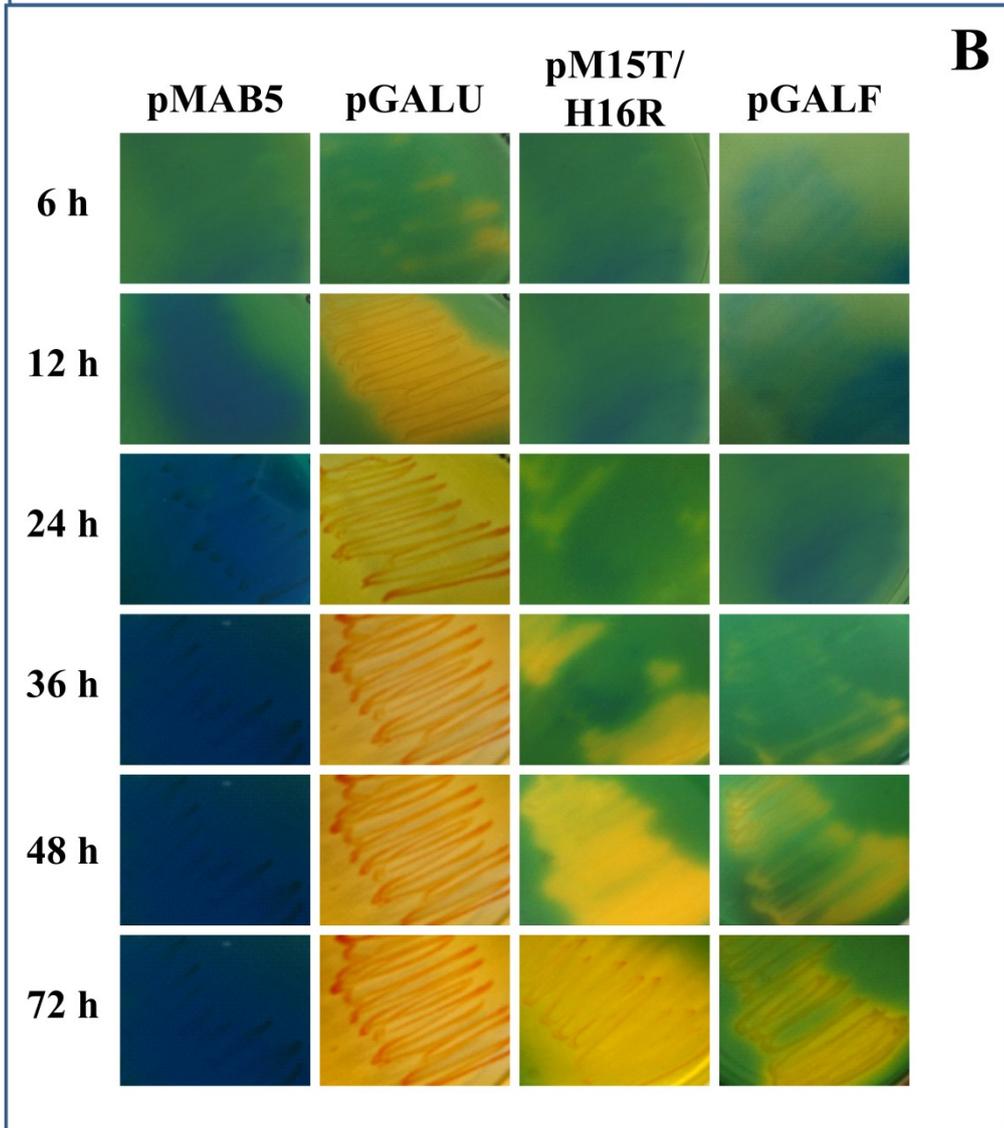
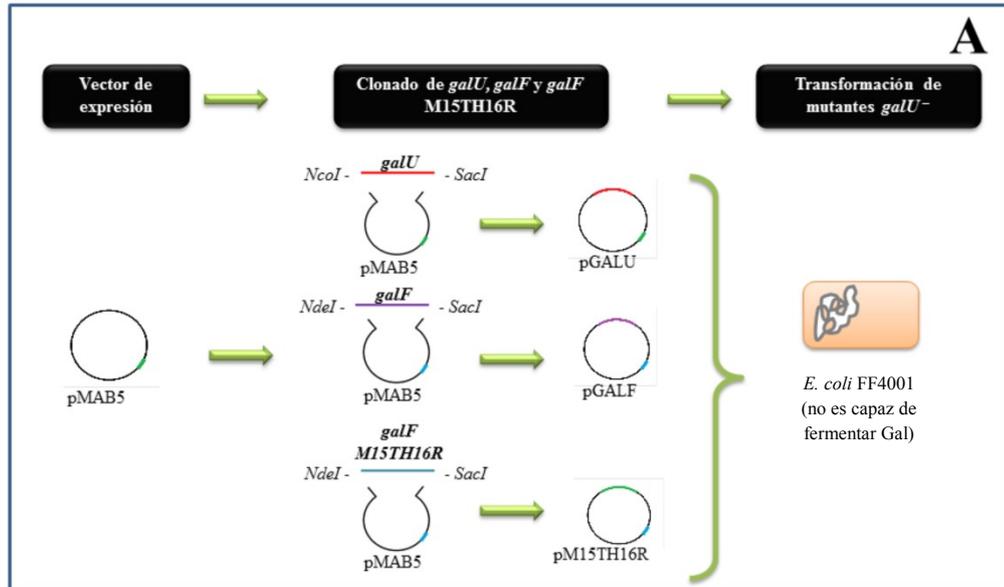
en verde. Los residuos clave analizados en este trabajo se muestran en rosado. Los residuos estudiados en este trabajo que no se encuentran conservados en GalF se muestran en azul. Las secuencias y números de acceso de las adenililtransferasas (ADP-Glc PPasa, EC: 2.7.7.27) son: *Eco*, *E. coli* K-12, P00584; *Stu*, *Solanu tuberosum* subunidad  $\alpha$ , P23509; *Atu*, *Agrobacterium tumefaciens*, P39669. Las secuencias y números de acceso de las citidililtransferasas ( $\alpha$ -D-glucosa-1-fosfato citidililtransferasa, EC: 2.7.7.33) son: *Sty*, *Salmonella typhi* 1TZF; *Yen*, *Yersinia enterocolitica* LC20, AHM71362. Las secuencias y números de acceso de las guanililtransferasas (GDP-manosa-1-fosfato guanililtransferasa, EC: 2.7.7.22) son: *Eco*, *E. coli* K-12, AAC75110; *Tpr*, *Treponema primitia*, WP\_015708896. Las secuencias y números de acceso de las timidililtransferasas (dTTP:  $\alpha$ -D-glucosa-1-fosfato timidililtransferasa, EC: 2.7.7.24) son: *Eco*, *E. coli*, WP\_000783975; *Pae*, *Pseudomonas aeruginosa*, WP\_003105518. Las secuencias y números de acceso de las uridililtransferasas (UDP-Glc PPasa, EC: 2.7.7.9) son: *Hpy*, *Helicobacter pylori* 26695, 3JUI\_A; *Smu*, *Streptococcus mutans*, AGI47014; *Cgl*, *C. glutamicum* ATCC 13032, NP\_600109; GalU, *E. coli*, WP\_000718996; GalF, *E. coli*, WP\_001537247. **(B)** Modelo molecular de GalU; el producto, UDP-Glc, y el ión  $Mg^{2+}$  fueron heredados de la estructura cristalina de la UDP-Glc PPasa de *C. glutamicum* (2PA4) (Tholden). El modelo muestra los principales residuos mutados en este estudio: Thr<sup>20</sup>, Arg<sup>21</sup> y Lys<sup>202</sup>. El potencial puente hidrógeno entre la Lys<sup>202</sup> y el  $\beta$ -fosfato de la UDP-Glc se indica mediante la línea discontinua violeta. **(C)** Modelado por homología de la estructura de GalF con el producto y el cofactor añadidos. Los residuos clave estudiados se muestran: Met<sup>15</sup>, His<sup>16</sup> y Lys<sup>198</sup>.

## VI.2.1.5. Ensayos de complementación de la cepa deficiente en GalU

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este trabajo y habiéndose comprobado que GalF es una UDP-Glc PPasa funcionalmente activa, podría suponerse que esta enzima es capaz de compensar la ausencia de GalU. Sin embargo, se sabe que las mutantes de *E. coli* nulas en el gen *galU* no son capaces de fermentar Gal y fallan en la incorporación de Glc y Gal en sus membranas celulares; lo que resulta en la síntesis incompleta de los LPS (Weissborn y col., 1994). Un motivo para esta característica fisiológica puede ser que *in vivo* la producción natural de GalF en las células no sea suficiente para generar las cantidades de UDP-Glc necesarias para la correcta ejecución del metabolismo. A partir de este postulado, un incremento en la expresión de esta enzima podría superar la limitación de su baja actividad enzimática y, además, la expresión de GalF M15T/H16R podría ser aún más eficiente para compensar la ausencia de GalU.

Para analizar esta posible funcionalidad de GalF y GalF M15T/H16R *in vivo* se transformó la cepa de *E. coli* FF4001 (deficiente en GalU) (Harding y col., 1993) con las construcciones pGALU, pGALF, pM15TH16R o el vector pMAB5, como se esquematiza en la Figura VI.2.5 A y se detalla en Materiales y Métodos. Las células transformantes se cultivaron en medio Hugh-Leifson suplementado con Gal o Glc (control, datos no mostrados). El cambio de color del medio de cultivo a amarillo indica la acidificación debido al consumo de azúcar; mientras que el color azul indica la incapacidad del cultivo para fermentar la Gal. La Figura VI.2.5 B muestra los cultivos de células transformadas con los plásmidos pGALU, pGALF, pM15TH16R o pMAB5 a diferentes tiempos de incubación a 37 °C. Como puede observarse, la expresión de las enzimas permitió que las bacterias consuman la Gal tornando el medio amarillo. Las células complementadas con *galU* metabolizaron la Gal dentro de las primeras 12 h de

incubación, mientras que aquellas complementadas con la mutante GalF M15T/H16R y GalF necesitaron un mayor tiempo (48 y 72 h de incubación, respectivamente) para lograr un consumo apreciable del azúcar. Durante el curso del experimento las células utilizadas como control (transformadas con pMAB5) no fueron capaces de utilizar galactosa como fuente de carbono (Figura VI.2.5 B).



**Figura VI.2.5. Ensayos de complementación de la cepa *E. coli* FF4001, deficiente en la expresión de GalU.** (A) Representación esquemática de la estrategia utilizada para realizar el ensayo. Los plásmidos pGALU, pGALF y pM15TH16R se construyeron como se detalla en Materiales y Métodos. (B) *E. coli* FF4001 transformadas con las construcciones y el vector pMAB5 (control). Los cultivos se incubaron a 37 °C en medio de Hugh-Leifson suplementado con 1% (p/v) de D-Gal. El amarillo indica fermentación del azúcar, mientras que el azul indica la incapacidad para utilizar Gal como fuente de carbono.

### VI.2.2. Discusión

En la presente sección se caracterizaron cinética y bioquímicamente los productos de dos genes de *E. coli* que codifican para la UDP-Glc PPasa procariota (GalU) y una enzima homóloga putativa (GalF). Los genes fueron amplificados por PCR y clonados en un vector de expresión para la producción de las proteínas recombinantes. Ambas enzimas purificadas fueron funcionalmente activas, pero exhibieron diferentes propiedades cinéticas y estructurales. La diferencia más relevante estuvo dada por la  $V_{\max}$  exhibida por GalF, ya que este parámetro fue sustancialmente menor (cuatro órdenes de magnitud) que el observado para GalU. Sin embargo, y a pesar de la baja actividad de GalF, estos resultados representan una información novedosa y útil, ya que en *E. coli* esta proteína había sido informada como inactiva, aunque en estudios que emplearon métodos de relativamente baja sensibilidad analítica (Marolda y Valvano, 1996). En base a las similitudes en las secuencias de aminoácidos, varios grupos (Schnaitman y Klena, 1993; Varon y col., 1993; Hossain y col., 1994; Macpherson y col., 1994; Thorson y col., 1994) han postulado que GalU y GalF serían isoenzimas. Sin embargo, Marolda y col. (Marolda y Valvano, 1996) informaron que

GalF de *E. coli* no era un homólogo funcional y, en cambio, cumpliría un rol como subunidad reguladora de GalU. Contrario a esto, se ha establecido que en *Klebsiella pneumoniae* GalF es factor de virulencia importante, ya que la enzima es capaz de sintetizar UDP-Glc (Ho y col., 2011). Sin embargo, en la literatura es escasa la información sobre las propiedades cinéticas o bioquímicas de estas enzimas. El presente trabajo presenta la primera caracterización de una proteína GalF funcionalmente activa.

Considerando que GalU y GalF son proteínas homólogas (que comparten el 56,6% de identidad) resulta esencial el análisis de los cambios estructurales que pudiesen explicar las diferencias en la actividad de las enzimas recombinantes. Esto podría deberse a: (i) la ausencia de residuos clave en GalF y/o (ii) la presencia de residuos que afectan a su interacción con los sustratos y (iii) la diferencia en la conformación activa que cada una presenta. El análisis *in silico* nos permitió identificar residuos críticos conservados implicados en la actividad PPasa. En base a esto, construimos las doble mutantes GalU T20M/R21H y GalF M15T/H16R y las mutantes simples GalU K202A y GalF K198A. Los resultados sustentan la relevancia del motivo GLGTR (residuos 17 a 21) en GalU: la doble mutante de GalF aumentó la actividad de la enzima, mientras que en GalU las mutaciones disminuyeron su actividad. El residuo de Arg de diferentes PPasas, análogos a la Arg<sup>21</sup> en GalU, sería crítico en la catálisis enzimática, ya que el sitio constituido por el *loop* GXG(T/S)R uniría al NTP, generándose enlaces entre los residuos del dominio y los fosfatos  $\beta$  y  $\gamma$  del nucleótido. La Arg sería uno de los residuos responsables de contrarrestar las cargas negativas de los grupos fosfato, que conduce al correcto posicionamiento del NTP, con la subsiguiente unión de la Glc-1P (Blankenfeldt y col., 2000a; Sivaraman y col., 2002; Jin y col., 2005; Führung y col., 2013).

La UDP-Glc PPasa es estructuralmente similar a la Glc-1P timidililtransferasas (Blankenfeldt y col., 2000b) y a la UDP-N-acetilglucosamina PPasa (GlmU) (Brown y col., 1999). Además, comparte cierta identidad estructural (aunque menor) con la ADP-Glc PPasa (Bejar y col., 2006b) y la Glc-1P citidililtransferasa (Thorson y col., 1994). En trabajos previos se ha observado que la mutación de la Arg análoga en diferentes PPasas afecta significativamente la actividad de la enzima. Para la ADP-Glc PPasa de papa (Ballicora y col., 2005) la mutación de la Arg<sup>33</sup> de la subunidad catalítica ( $\alpha$ ) provocó la reducción de la actividad enzimática. Además, en la subunidad regulatoria ( $\beta$ ) la mutación del residuo análogo a la Arg, Lys<sup>44</sup>, generó una mutante activa. De igual manera, las mutaciones análogas en la UDP-Glc PPasa de *Helicobacter pylori* (R15A) (Kim y col., 2010) y la GlmU de *E. coli* (R18A) (Brown y col., 1999) producen una reducción en la actividad en un 86% y unas 6000 veces, respectivamente.

Es evidente que la sustitución de los residuos de Arg/Thr en GalF no es el único factor responsable de la baja actividad de esta enzima. Posiblemente, la presencia de residuos que afectan a la correcta unión de los sustratos lleva a una menor eficiencia catalítica. El modelo molecular de GalU mostró que la Lys<sup>202</sup> interactúa con el grupo  $\beta$ -fosforilo de la UDP-Glc, como también fue observado para la GalU de *C. glutamicum*, la Glc-1P timidililtransferasa de *P. aeruginosa* y la Glc-1P citidililtransferasa de *S. typhi* (Thoden y Holden, 2007a). Los resultados obtenidos se corresponden con estos informes previos, ya que la mutante GalU K202A exhibió un notable aumento del  $S_{0,5}$  para la Glc-1P. Este residuo de Lys está altamente conservado en las enzimas de la familia. Para la ADP-Glc PPasa de *E. coli* (Hill y col., 1991) el residuo análogo Lys<sup>195</sup> tiene un rol fundamental para la correcta unión de la Glc-1P en el sitio catalítico. Los autores postulan que el gran aumento en el  $S_{0,5}$  cuando este residuo está mutado explica la conservación absoluta del mismo en la amplia gama de PPasas

hasta ahora secuenciadas (Hill y col., 1991). La forma, el tamaño y la carga del residuo de Lys parecen necesarios para la correcta unión de la Glc-1P y el funcionamiento de la enzima.

En GalF el residuo Lys está presente (Lys<sup>198</sup>), aunque en el modelado 3D se observa una falta de interacción entre el mismo y el producto. Los resultados obtenidos apoyan este análisis *in silico*, ya que GalF exhibió un mayor  $S_{0,5}$  que GalU (~15 veces mayor) para la Glc-1P y la mutante GalF K198A no mostró diferencias con la enzima salvaje. Esto sugiere que el sitio de unión a sustrato se encuentra alterado en GalF, lo que sería un punto crítico para explicar su reducida afinidad aparente por la Glc-1P en comparación con GalU. Haciendo un análisis combinado con los resultados obtenidos con las mutantes dobles GalU T20M/R21H y GalF M14T/H16R, podemos concluir que el cambio producido en la estructura del sitio afecta a la afinidad por la Glc-1P en GalU pero no en GalF. De esta forma, se podría pensar que el cambio estructural cuando se producen las mutantes en la Lys se minimiza, debido a que el sitio de unión de sustrato ya se encuentra modificado.

La cromatografía de exclusión molecular mostró que GalU (y sus mutantes analizadas en este trabajo) presenta una conformación homotetramérica [como anteriormente informaron (Thoden y Holden, 2007b)], mientras que GalF (y sus mutantes) se expresa como un monómero. Numerosas enzimas tienen formas oligoméricas activas y formas monoméricas inactivas (o viceversa) y, de hecho, en varios casos (Torshin, 1999; Peneff y col., 2001; Wilczynska y col., 2003; Kleczkowski y col., 2005) la oligomerización es uno de los procesos regulatorios clave que modulan la función/actividad de las proteínas. Por lo tanto, la diferencia en el estado de oligomerización puede ser un factor relevante que afecta a la actividad de GalF. Ha sido informado que el estado de oligomerización de la UDP-Glc PPasa de cebada afecta a su

actividad enzimática (Martz y col., 2002; Kleczkowski y col., 2005); y que ciertos *buffers* tienen efectos opuestos sobre la integridad estructural de la proteína (Kleczkowski y col., 2005). En el presente trabajo, el *buffer* HEPES favoreció la presencia de la forma monomérica de GalU; lo cual también se observó para la enzima de planta (Kleczkowski y col., 2005). Kleczkowski y col. (2005) plantean que los diferentes efectos de los *buffers* sobre el estado oligomérico pueden deberse a la estructura química de los mismos. El HEPES fue encontrado unido específicamente a varias proteínas cristalizadas (Ji y col., 1997; Trievel y col., 2002) y las interacciones proteína-HEPES se estabilizan tanto por interacciones hidrofóbicas como por interacciones con las cadenas laterales cargadas positivamente. Por lo que la hidrofobicidad y estructura química de este *buffer*, en comparación con el Tris, podría ser responsable de los cambios en la estructura cuaternaria de estas UDP-Glc PPasas.

Más allá de los factores que influyen sobre la estructura cuaternaria de la enzima, es importante resaltar que la fracción monomérica de GalU exhibió una  $V_{\max}$  inferior (20 veces) que la forma tetramérica. El análisis estructural de GalU de *E. coli* reveló que la proteína es un tetrámero organizada como un dímero de dímeros. El C-terminal de esta proteína presenta dos hélices (Lys<sup>269</sup>-Arg<sup>282</sup> y Gly<sup>287</sup>-Met<sup>298</sup>) que forman un dímero fuertemente unido por interacción entre las subunidades (Thoden y Holden, 2007b). El análisis de las secuencias de aminoácidos muestra que el C-terminal de GalF difiere significativamente de GalU. De esto surge la hipótesis de que esta diferencia es responsable de la forma monomérica de GalF y las mutantes GalF M15T/H16R y GalF K198A.

El producto del gen *galU* es fundamental para el metabolismo de la Gal. Las bacterias que no producen GalU no pueden fermentar este monosacárido y utilizarlo como fuente de carbono. Este efecto fisiológico fue revertido con la sobre-expresión de

GalU, GalF y GalF M15T/H16R. De esta forma, los ensayos de complementación validaron nuestros hallazgos *in vitro*: GalF es una UDP-GlcPPasa funcionalmente activa. La enzima endógena probablemente no puede producir suficiente cantidad de UDP-Glc como GalU, pero esta limitación puede ser superada con el aumento de su expresión. Además, la doble mutante de GalF (GalF M15T/H16R) afectó a su nivel de actividad con consecuencias *in vivo*.

En su conjunto, los resultados evidenciaron que GalU y GalF son proteínas homologas funcionalmente activas. Sin embargo, la baja actividad de GalF nos lleva a postular que estas enzimas divergieron de un ancestro común y que adaptaciones evolutivas llevaron a la obtención de proteínas con diferentes roles. Posiblemente, *galF* es una duplicación del gen *galU* y mutaciones posteriores produjeron una marcada disminución en la capacidad catalítica de su producto. Este mecanismo natural podría ser de utilidad para la adquisición de propiedades reguladoras en GalF. Aunque más experimentos son necesarios para probar esta hipótesis, es plausible pensar que *in vivo* estas dos proteínas podrían interaccionar formando hetero-oligómeros. GalF expresada en forma recombinante adquiere una conformación monomérica y el análisis *in silico* muestra que las secuencias de aminoácidos de GalU y GalF del extremo C-terminal (importante para la interacción entre las subunidades del homotetrámero de GalU) difieren, lo cual es probablemente la causa de que GalF no forma estructuras oligoméricas superiores. Sin embargo, la posibilidad de formar complejos con GalU no debería ser descartada. Los estudios para analizar esta posible interacción y su efecto sobre la funcionalidad de las enzimas están siendo objeto de tareas experimentales futuras en nuestro laboratorio.

## VII. ENZIMAS DEL METABOLISMO DE HIDRATOS DE CARBONO EN PROTOZOOS

En organismos eucariotas no fotosintéticos la Glc-1P es utilizada principalmente por la UDP-Glc PPasa para la síntesis de UDP-Glc. El azúcar activado de esta forma es sustrato de diferentes glicosiltransferasas que lo conducen hacia los diferentes caminos metabólicos. La UDP-Glc PPasa eucariota (como la procariota) no es una enzima regulada alostéricamente por metabolitos y el control de la producción de los diferentes compuestos a los cuales se deriva la Glc estaría dado a nivel de las glicosiltransferasas. Por ejemplo, la vía de síntesis de glucógeno está extensamente estudiada en levaduras y animales (Wilson y col., 2010; Roach y col., 2012). A partir de estos estudios se ha establecido que la GSasa eucariota es regulada alostéricamente por Glc-6P y por fosforilación reversible. Sin embargo no hay estudios cinéticos sobre la GSasa de eucariotas inferiores, como por ejemplo la de *G. lamblia*. Este protozoo flagelado pertenece a la rama divergente más temprana del linaje eucariota (Morrison y col., 2007). Tiene un repertorio metabólico limitado en comparación con otros parásitos y con eucariotas superiores y presenta adaptación a entornos microaerofílicos (Lloyd y Harris, 2002; Morrison y col., 2007). La pared quística protectora del estado infectivo presenta un arreglo característico de polisacáridos de GalNAc y esta estructura es responsable de la supervivencia del parásito fuera del huésped (Lujan y col., 1997; Lopez y col., 2003). Además, *G. lamblia* acumula glucógeno que sirve como una reserva de energía en trofozoítos (Ladeira y col., 2005) y también juega un papel crítico en su diferenciación a la forma de quiste (Pradhan y col., 2012).

A pesar de la relevancia de oligo- y poli-sacáridos para la supervivencia y la patogenicidad de *G. lamblia*, la caracterización completa de las enzimas implicadas en el metabolismo de los hidratos de carbono está lejos de ser completa. La vía para la

síntesis de la pared del quiste ha sido la más estudiada y las propiedades cinéticas de la UDP-GlcNAc PPasa (enzima involucrada en la producción de los glicoconjugados de la pared quística) se determinaron con cierto detalle, ya sea para la enzima purificada a partir de la fuente (Bulik y col., 1998) o producida de forma recombinante (Mok y col., 2005). Por el contrario, ningún informe está disponible en relación con la caracterización de las enzimas involucradas en la biosíntesis del glucógeno (UDP-Glc PPasa y GSasa). De hecho, hasta el momento ninguna GSasa de protozoos ha sido estudiada en detalle.

Por otro lado, nuestro grupo de trabajo ha informado que la UDP-Glc PPasa de *Entamoeba histolytica* es una enzima regulada mediante mecanismos de óxido-reducción (Martinez y col., 2011). Este trabajo ha abierto la perspectiva sobre la posible modificación de la actividad de este tipo de enzimas en otros organismos protozoos. En forma concordante para la UDP-Glc PPasa de caña de azúcar ha sido informado recientemente que un ambiente reductor incrementa la actividad de la UDP-Glc PPasa (Soares y col., 2014). Resulta necesario, entonces, un estudio comparativo de estas enzimas de distintos protozoos para establecer un mecanismo para este tipo de modificación post-traducciona.

Debido a que *Giardia* es un eucariota considerado como “primitivo”, el estudio de su metabolismo presenta cierto atractivo desde el punto de vista evolutivo. Además, la importancia de la Glc en componentes esenciales para la capacidad infectiva del microorganismo hace necesario el análisis de las enzimas involucradas en la biosíntesis del compuesto que actúa como reserva de este azúcar. De esta manera, el conocimiento de las características cinéticas y regulatorias de la UDP-Glc PPasa y de la GSasa de *G. lamblia* permitirán un mejor panorama del metabolismo de carbohidratos de este

parásito y será un punto de partida para el conocimiento de la síntesis de glucógeno en algunos protozoos.

## VII.1. Capítulo: “Estudio de la UDP-Glc PPasa de *Giardia lamblia*. Análisis comparativo de la enzima con otras PPasas en su regulación y uso de sustratos alternativos”

### VII.1.1. Resultados

#### VII.1.1.1. Clonado y expresión heteróloga de los genes que codifican para la UDP-Glc PPasa y la UDP-GlcNAc PPasa de *Giardia lamblia*

Se ha informado que *G. lamblia* acumula glucógeno para el almacenamiento de carbono y energía (Ladeira y col., 2005; Pradhan y col., 2012). Para tener un mejor panorama de la ocurrencia y síntesis del polisacárido de reserva en este parásito realizamos el estudio de las enzimas de esta vía. La UDP-Glc PPasa cataliza la síntesis del donante de residuos glucosilo (UDP-Glc) para la elongación de glucógeno en las células de eucariotas heterótrofos (Ballicora y col., 2003, 2004). El análisis del genoma de *G. lamblia* ATCC50803 mostró dos genes relacionados con PPasas UTP-dependientes (Morrison y col., 2007; Aurrecoechea y col., 2009): una secuencia de nucleótidos que codifica para una UDP-Glc PPasa putativa (*ugp*, Gene ID: 5699477) y otro gen que codifica para la UDP-GlcNAc PPasa (*uap*, Gene ID: 5700112); siendo esta última una enzima ya estudiada en detalle (Bulik y col., 1998; Mok y Edwards, 2005; Mok y col., 2005).

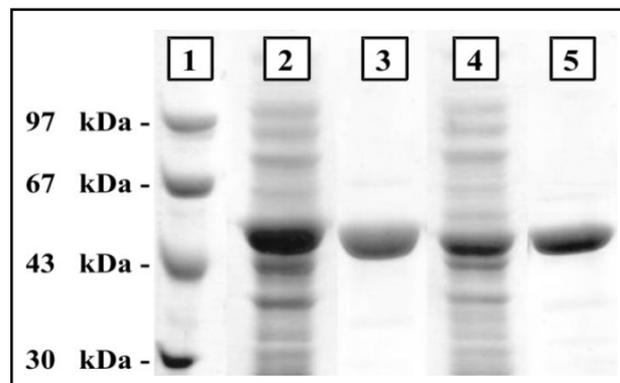
La secuencia del gen *ugp* predice una proteína de 450 aminoácidos (*Gla*UDP-Glc PPasa) con un MM teórica de 49,3 kDa, que comparte ~30% de identidad con las UDP-Glc PPasas de otros protozoos: *E. histolytica* (*Ehi*UDP-Glc PPasa) (Martinez y col., 2011), *Trypanosoma brucei* (Marino y col., 2010) y *Leishmania major* (Lamerz y col., 2006). Además, la secuencia predicha de la *Gla*UDP-Glc PPasa tiene un grado de identidad similar con las enzimas homólogas de otros eucariotas no protozoos:

de *Saccharomyces cerevisiae* (33,3%) (Roeben y col., 2006) y de hígado bovino (35,5%) (Konishi y col., 1993). Curiosamente, se observa una identidad aún superior (ligera mente por encima de 40%) entre las UDP-Glc PPasas de *G. lamblia* y la de cebada (Martz y col., 2002). Por otro lado, el gen *uap* codifica para una proteína de 436 aminoácidos, con una MM de 48,3 kDa, de acuerdo con informes anteriores sobre la caracterización de la UDP-GlcNAc PPasa de *G. lamblia* (Bulik y col., 1998; Mok y Edwards, 2005; Mok y col., 2005).

Se diseñaron cebadores específicos (Tabla VII.1.1) para amplificar los genes *ugp* (1353 pb de longitud) y *uap* (1311 pb) a partir de ADN genómico de *G. lamblia*, mediante PCR. Después de confirmar la identidad por secuenciación de ADN, los productos amplificados se clonaron en los vectores pET19b (*ugp*) y pRSETA (*uap*). Con estas construcciones se transformaron células de *E. coli* BL21 (DE3) para la producción heteróloga de *Gla*UDP-Glc PPasa y *Gla*UDP-GlcNAc PPasa, respectivamente. Ambas proteínas recombinantes se sobre-expresaron en las fracciones solubles (Figura VII.1.1, carriles 2 y 4) y mediante un único paso de IMAC ( $\text{Ni}^{2+}$ ) se purificaron a homogeneidad, a juzgar por el análisis en SDS-PAGE (Figura VII.1.1, carriles 3 y 5). En experimentos de cromatografía de filtración por gel, en Superdex 200, la *Gla*UDP-Glc PPasa eluyó como un único pico correspondiente a una MM de 50 kDa. No se observaron conformaciones oligoméricas superiores, sugiriendo así la estabilidad de la forma monomérica, de acuerdo con informes anteriores referentes a la enzima de *E. histolytica* (Martinez y col., 2011) y *L. major* (Lamerz y col., 2006). La *Gla*UDP-GlcNAc PPasa también eluyó en un solo pico con una MM estimada de 50 kDa, lo cual es similar a los resultados previamente informados para esta enzima (Mok y col., 2005).

Oligo	Secuencia	Sitio de corte	T <sub>A</sub> (°C)	t <sub>E</sub> (min)
<i>ugp-Fo</i>	5'- <u>CATATG</u> TCCTATCAGGATCTGCTCAGCGC-3'	<i>Nde</i> I	62	2
<i>ugp-Re</i>	5'-GAATTCTCACTGTCCCAGAGTGCAAT-3'	<i>Eco</i> RI	63	2
<i>uap-Fo</i>	5'- <u>GGATCC</u> ATGCCAGGCCTGGAGGAGTTTCTT-3'	<i>Bam</i> HI	64	2
<i>uap-Re</i>	5'-GAATTCCTAGACGGCCTTCACGCTAGA-3'	<i>Eco</i> RI	65	2

**Tabla VII.1.1. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de *ugp* y *uap* de *G. lamblia*.** En negrita y subrayado se indican los respectivos sitios de acción de nucleasas. T<sub>A</sub>, temperatura de apareamiento y t<sub>E</sub>, tiempo de elongación.



**Figura VII.1.1. SDS-PAGE de las enzimas recombinantes *Glu*UDP-Glc PPasa y *Glu*UDP-GlcNAc PPasa.** Carril 1: marcadores de MM; Carril 2: sobre-expresión en el extracto crudo de la *Glu*UDP-Glc PPasa; Carril 3: *Glu*UDP-Glc PPasa luego del paso de purificación con IMAC; Carril 4: sobre-expresión en el extracto crudo de la *Glu*UDP-GlcNAc PPasa; Carril 5: *Glu*UDP-GlcNAc PPasa purificada mediante IMAC.

#### VII.1.1.2. Caracterización cinética de la UDP-Glc PPasa y la UDP-GlcNAc PPasa de *Giardia lamblia*

El estudio de las propiedades cinéticas de la *Glu*UDP-Glc PPasa permite un análisis más profundo de la producción de uno de los metabolitos esenciales en el

organismo: la UDP-Glc. Además, explorar la utilización de sustratos alternativos y, por consiguiente, la síntesis de otros compuestos, es importante para el entendimiento del metabolismo de hidratos de carbono en el protozoo. Como era de esperar, la enzima mostró una estricta dependencia por  $Mg^{2+}$  para llevar a cabo la síntesis de UDP-Glc. Los parámetros cinéticos se resumen en la Tabla VII.1.2; la  $V_{max}$  determinada para la enzima es comparable a la informada para distintas UDP-Glc PPasas procedentes de otras fuentes eucarióticas que también exhiben alta actividad específica (Roeben y col., 2006; Gupta y col., 2008; Meng y col., 2008). Las curvas de saturación para ambos sustratos (UTP y Glc-1P) presentan un comportamiento hiperbólico, con valores de  $S_{0,5}$  alrededor de  $\sim 0,15$  mM (Tabla VII.1.2), de acuerdo con el comportamiento cinético determinado previamente para esta enzima en otros eucariotas (Lamerz y col., 2006; Meng y col., 2008; Marino y col., 2010). Sin embargo, la *Gla*UDP-Glc PPasa tiene un valor inferior de  $S_{0,5}$  para los sustratos en comparación con las enzimas homólogas de tubérculo de papa (Gupta y col., 2008), *E. histolytica* (la cual también muestra una  $V_{max}$  inferior) (Martinez y col., 2011) y cebada (Decker y col., 2012).

Para estudiar con mayor detalle las propiedades cinéticas de la *Gla*UDP-Glc PPasa hemos examinado su capacidad de usar sustratos alternativos, que permitirían la producción de diferentes NDP-azúcares. En cuanto a los nucleótidos, la enzima fue capaz de utilizar TTP, pero no ATP, GTP ni CTP (ensayados hasta 2 mM cada uno). Para la síntesis de TDP-Glc la enzima exhibió un valor de  $V_{max}$  menor (30 veces), así como un mayor  $S_{0,5}$  para ambos sustratos (6 veces para TTP y 3 veces para Glc-1P), con un comportamiento cinético que mostró un ligero aumento en el valor de  $n$  para los dos sustratos cuando se compara con la producción de UDP-Glc (Tabla VII.1.2). De esta forma, la eficiencia catalítica ( $V_{max}/S_{0,5}$ ) de *Gla*UDP-Glc PPasa

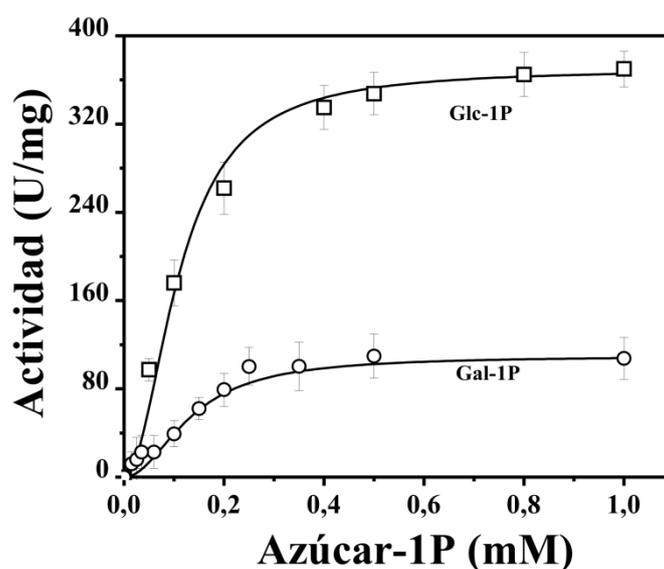
para el uso de UTP fue aproximadamente dos órdenes de magnitud mayor que para TTP.

Además, se analizó la especificidad de *Gla*UDP-Glc PPasa por Glc-1P utilizando como sustratos alternativos diferentes azúcares-1P: Man-1P, Fru-1P, Gal-1P, GlcNAc-1P, GlcN-1P o GalN-1P (ensayados cada uno en una concentración de 2 mM). A excepción de la Gal-1P, la actividad exhibida por la enzima con estos monosacáridos alternativos fue significativamente baja (menos del 1% del uso de Glc-1P). Distintivamente, la actividad ensayada con 2 mM de Gal-1P fue considerable, alcanzando un valor del ~30% de la que presenta con Glc-1P. Por consiguiente, se determinaron los parámetros cinéticos para el uso de Gal-1P y se analizaron en comparación con Glc-1P. Como se muestra en la Figura VII.1.2, la *Gla*UDP-Glc PPasa exhibió una afinidad aparente similar para el uso de ambas hexosas-1P; aunque la  $V_{\max}$  determinada para cuando la enzima utiliza Gal-1P fue inferior y el  $n$  aumentó en comparación con el uso de Glc-1P (Tabla VII.1.2). De esta manera, la eficiencia catalítica para el uso del sustrato alternativo Gal-1P es similar al del sustrato principal Glc-1P, mientras que para UTP es ~3 veces mayor cuando el nucleótido se utiliza en combinación con Gal-1P en lugar de Glc-1P.

Tras estos resultados, decidimos analizar el posible uso de distintos azúcares-1P (como sustrato alternativo de la Glc-1P) por la enzima de *E. histolytica*, previamente caracterizada en nuestro laboratorio (Martinez y col., 2011). En nuestras manos la *Ehi*UDP-Glc PPasa mostró actividad insignificante con cualquiera de los sustratos alternativos, incluyendo la Gal-1P. Resultados similares se obtuvieron con la *Gla*UDP-GlcNAc PPasa, que resultó altamente específica para GlcNAc-1P, lo cual es concordante a lo previamente informado por otros autores (Mok y col., 2005).

Síntesis de	Sustrato	$S_{0,5}$ (mM)	$n$	$V_{\max}$ (U/mg)	$V_{\max}/(S_{0,5})^n$
UDP-Glc	Glc-1P	$0.13 \pm 0.01$	1.1	$400 \pm 21$	3773
	UTP	$0.14 \pm 0.02$	1.1		3478
TDP-Glc	Glc-1P	$0.36 \pm 0.04$	1.2	$14 \pm 2$	47
	TTP	$0.90 \pm 0.02$	1.5		16
UDP-Gal	Gal-1P	$0.09 \pm 0.01$	1.5	$75 \pm 8$	2778
	UTP	$0.08 \pm 0.01$	1.9		9103

**Tabla VII.1.2. Parámetros cinéticos de la *Gla*UDP-Glc PPasa para los distintos sustratos.** Los parámetros fueron calculados a partir de datos promedio de tres experimentos independientes, tal como se detalla en Materiales y Métodos.

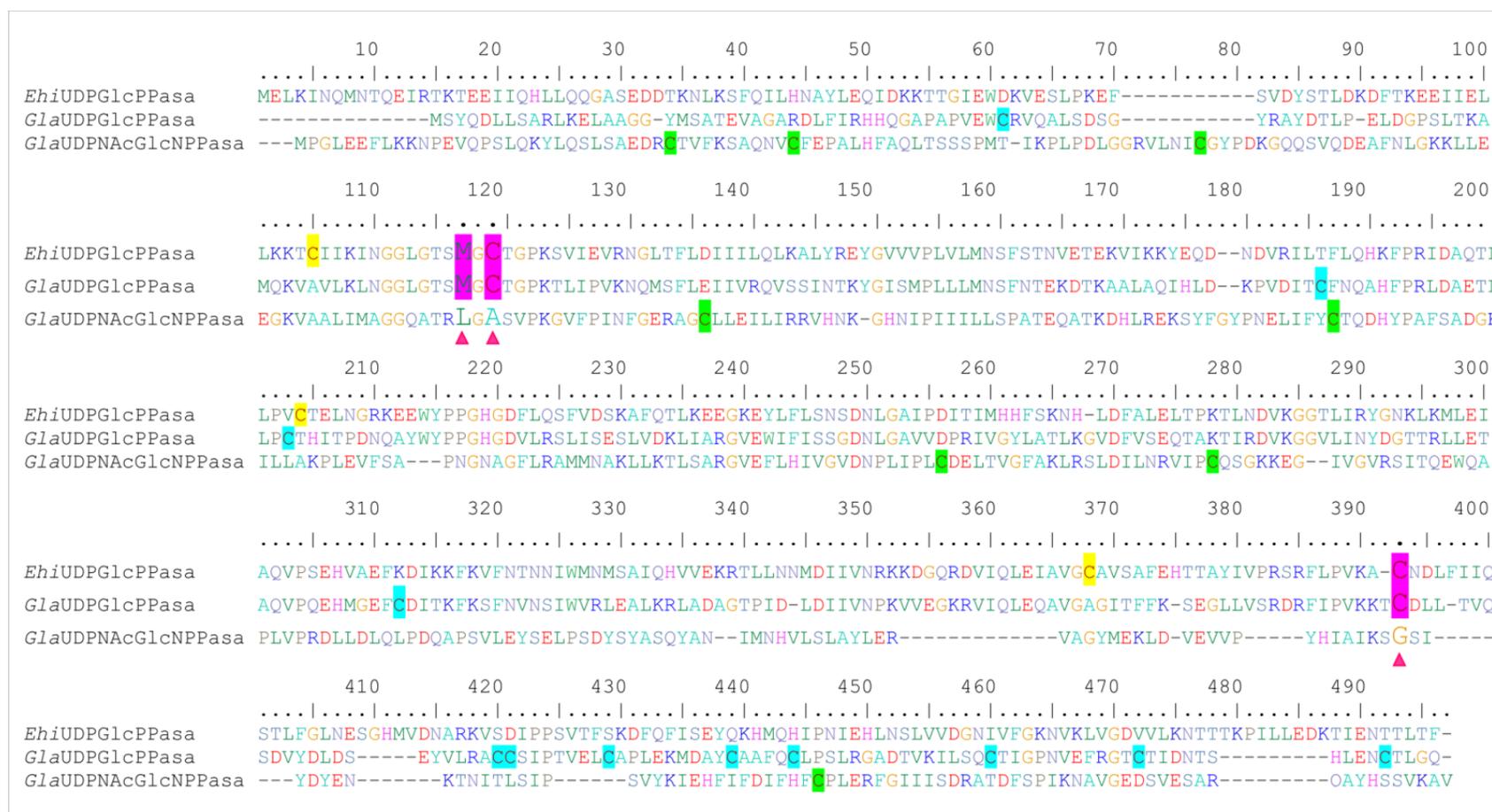


**Figura VII.1.2. Curvas de saturación de la *Gla*UDP-Glc PPasa para Glc-1P (cuadrados) o Gal-1P (círculos).** La actividad se midió como se detalla en Materiales y Métodos. Los valores son datos promedio de tres mediciones independientes.

### VII.1.1.3. Modificación redox de *Gla*UDP-Glc PPasa y *Gla*UDP-GlcNAc PPasa

Nuestro grupo de trabajo demostró que la *Ehi*UDP-Glc PPasa es regulada mediante un mecanismo pos-traducciona l de tipo redox (Martinez y col., 2011): la enzima se inactiva por oxidación con especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS y RNS, respectivamente) de localización intracelular y la actividad es restaurada mediante la acción de agentes reductores, incluyendo compuestos de acción fisiológica. 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 VII.1.3 muestra un alineamiento de aminoácidos entre la enzima de *Entamoeba* y las dos PPasas de *G. lamblia* analizadas en este trabajo. En este alineamiento se pueden identificar claramente los residuos críticos que serían responsables de las modificaciones de óxido-reducción. La *Ehi*UDP-Glc PPasa contiene cinco residuos de cisteína y once de metionina, pero en el trabajo de nuestro grupo hemos demostrado que sólo los residuos Cys<sup>108</sup>, Cys<sup>378</sup> y Met<sup>106</sup> serían críticos para la modulación redox de la actividad de la enzima (Martinez y col., 2011). En comparación, la *Gla*UDP-Glc PPasa (compartiendo 33% de identidad con la enzima homóloga de la ameba) contiene catorce residuos de cisteína y nueve de metionina. La Figura VII.1.3 muestra las regiones críticas del alineamiento entre las enzimas, detallando los residuos clave implicados en la regulación redox de *Ehi*UDP-Glc PPasa que también están presentes en la *Gla*UDP-Glc PPasa (Cys<sup>92</sup>, Cys<sup>362</sup> y Met<sup>90</sup>, respectivamente). Por otro lado, el análisis *in silico* también muestra que la *Gla*UDP-GlcNAc PPasa (que comparte sólo el 13% de identidad con la *Ehi*UDP-Glc PPasa) carece de estos residuos. Es importante mencionar que la *Gla*UDP-GlcNAc PPasa tiene ocho residuos de Cys, aunque ninguno de estos se encuentra conservado en las otras dos PPasas analizadas (ver detalles en la

Figura VII.1.3). En base a estos análisis y para evaluar el efecto de los compuestos redox sobre la actividad de las enzimas en estudio, ambas PPasas de *Giardia* fueron expuestas a distintos agentes redox.



**Figura VII.1.3.** Alineamiento entre las UDP-Glc PPasa de *E. histolytica* (EhiUDP-Glc PPasa) y *G. lamblia* (GlaUDP-Glc PPasa) y la UDP-GlcNAc PPasa de *G. lamblia* (GlaUDP-GlcNAcPPasa). Los residuos de Cys de las tres enzimas se resaltan en amarillo, celeste y verde, respectivamente. Los residuos de Cys y Met que participarían en la regulación redox [de acuerdo a lo informado en (Martinez y col., 2011)] se encuentran en rosado.

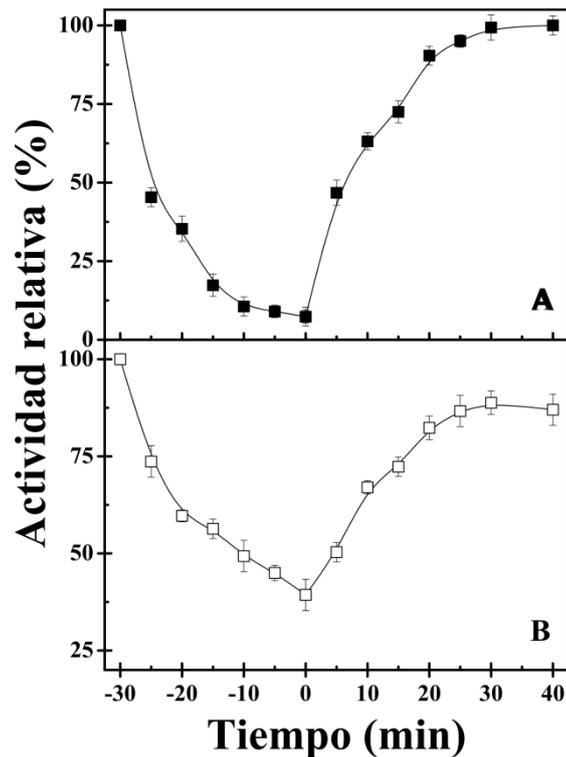
#### A. Oxidación de las enzimas con diamida y reducción con DTT

Para determinar si las reacciones de óxido-reducción modifican la actividad de las enzimas recombinantes *Gla*UDP-Glc PPasa y *Gla*UDP-GlcNAc PPasa, en primer lugar se realizaron ensayos de oxidación y posterior reducción utilizando agentes químicos. En este ensayo se utilizó diamida como oxidante y DTT como reductor, dos reactivos ampliamente utilizados para evaluar el efecto redox sobre la actividad de distintas enzimas (Martinez y col., 2011). Para realizar el estudio, cantidades equivalentes de ambas enzimas se oxidaron por preincubación con diamida (1 mM para *Gla*UDP-Glc PPasa y 10 mM para *Gla*UDP-GlcNAc PPasa) a 25° C. De esta mezcla de reacción se tomaron alícuotas a distintos tiempos, se diluyeron apropiadamente y se ensayó la actividad enzimática para así evaluar el efecto de la oxidación sobre la funcionalidad catalítica, luego de la incubación se eliminó el agente oxidante mediante ultrafiltración y se adicionó a la mezcla un volumen mínimo de DTT para alcanzar una concentración final de 5 mM. Se continuó incubando la reacción, tomando alícuotas a distintos tiempos, diluyéndolas y midiendo su actividad según corresponda, para evaluar de esta forma el efecto de la reducción sobre la actividad de ambas enzimas.

La Figura VII.1.4 muestra cómo se fue modificando la actividad de las dos PPasas en presencia del compuesto oxidante y reductor. Para la *Gla*UDP-Glc PPasa se observa claramente la pérdida de actividad de la enzima a medida que aumenta el tiempo de incubación con el oxidante, llevando a la inactivación completa de la misma. A su vez, esta inhibición puede ser revertida en presencia de un agente reductor como el DTT, alcanzándose una mayor recuperación conforme avanza el tiempo de incubación, hasta alcanzar la recuperación del 100% de la actividad. En el caso de la *Gla*UDP-GlcNAc PPasa (Figura VII.1.4 B), fue necesaria una concentración de oxidante mayor y aun así la pérdida de actividad de la enzima por oxidación (en las

condiciones de ensayo) no alcanzó un valor mayor al 40% de inactivación. Además, para esta enzima la oxidación fue revertida por reducción con DTT, pero no se logró una completa recuperación de la actividad bajo las condiciones ensayadas (Figura VII.1.4 B).

A partir de los resultados obtenidos se observa que, *in vitro*, las enzimas *Gla*UDP-Glc PPasa y *Gla*UDP-GlcNAc PPasa pierden su actividad enzimática al experimentar reacciones de oxidación causadas por diamida y en presencia de un agente reductor como el DTT esa actividad puede ser recuperada. Sin embargo, resulta llamativa la diferencia que se da en la oxidación de las dos enzimas. Mientras que la *Gla*UDP-GlcNAc PPasa pierde solamente un ~60% de su actividad en presencia de concentraciones relativamente altas de agente oxidante, a una concentración 10 veces menor de diamida la *Gla*UDP-Glc PPasa muestra una clara sensibilidad a la oxidación con pérdida total de funcionalidad. Si bien estos ensayos se realizaron con compuestos químicos que no se encuentran implicados en regulaciones redox intracelulares, los resultados obtenidos sugieren que *in vivo* las enzimas (o al menos la UDP-Glc PPasa) podrían ser blanco de regulación por este tipo de mecanismo.



**Figura VII.1.4. Tratamiento con agentes oxidantes y reductores. (A)** Oxidación de la *GluUDP-Glc PPasa* con 1 mM diamida y posterior tratamiento con 5 mM DTT. **(B)** La *GluUDP-GlcNAc PPasa* fue tratada con 10 mM diamida y luego reducida con 5 mM DTT. Al comienzo de los ensayos de oxidación ambas enzimas estaban completamente activas (100%): 400 U/mg para *GluUDP-Glc PPasa* y 75 U/mg para *GluUDP-GlcNAc PPasa*. Los resultados son medias de tres ensayos independientes.

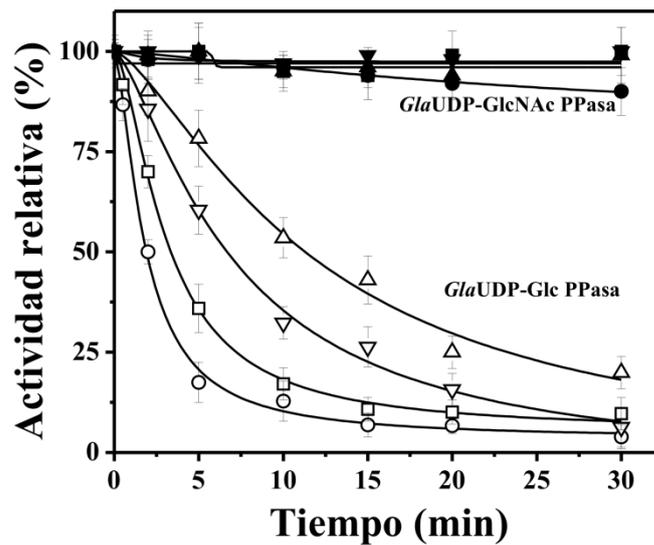
#### B. Oxidación por compuestos de relevancia fisiológica

En el ensayo anterior quedó en evidencia que la actividad tanto de la *GluUDP-Glc PPasa* como de la *GluUDP-GlcNAc PPasa* puede inhibirse al ser oxidadas con diamida, aunque la última requiere condiciones más drásticas para su inactivación. Para poder vincular tales resultados con un posible mecanismo de regulación post-traducciona de tipo redox *in vivo*, la pérdida de actividad de las enzimas debería tener lugar frente a agentes oxidantes que actúan a nivel fisiológico. Para llevar a cabo

tales estudios se realizaron oxidaciones *in vitro* con compuestos que, bajo determinadas condiciones, pueden sintetizarse dentro de la célula:  $H_2O_2$  y  $\bullet NO$  (generado a través del NPS). Para analizar el comportamiento de la inhibición de las enzimas por oxidación se siguió el mismo protocolo que para los ensayos con diamida.

En primer lugar se efectuaron curvas de la actividad porcentual en función del tiempo de incubación de las enzimas en estudio, con una dada concentración de cada agente oxidante. La Figura VII.1.5 muestra que la *Gla*UDP-Glc PPasa fue sensible a la incubación de los dos compuestos analizados:  $H_2O_2$  y NPS; exhibiendo una pérdida de actividad enzimática en función del tiempo de incubación con los mismos. Como se observa en la Figura VII.1.5, bajo las mismas condiciones ensayadas la *Gla*UDP-GlcNAc PPasa no exhibió pérdida de actividad; requiriéndose concentraciones mayores de oxidante para inhibir parcialmente a la enzima (datos no mostrados). Un análisis más detallado, variando la concentración de cada reactivo durante la incubación mostró, en todos los casos, que la inactivación no sólo depende del tiempo sino también de la concentración de agente oxidante. En este escenario, la regulación *in vivo* de la *Gla*UDP Glc PPasa parece ser plausible, pero no la de la *Gla*UDP-GlcNAc PPasa.

Por cromatografía de exclusión molecular se analizó si la oxidación de la *Gla*UDP-Glc PPasa producía cambios en su estructura oligomérica. La respuesta a este planteo fue de resultado negativo, ya que luego de la inactivación por oxidación la proteína eluyó como un único pico de MM 50 kDa, al igual que lo que ocurría cuando la enzima se encontraba en estado completamente activo (reducida).

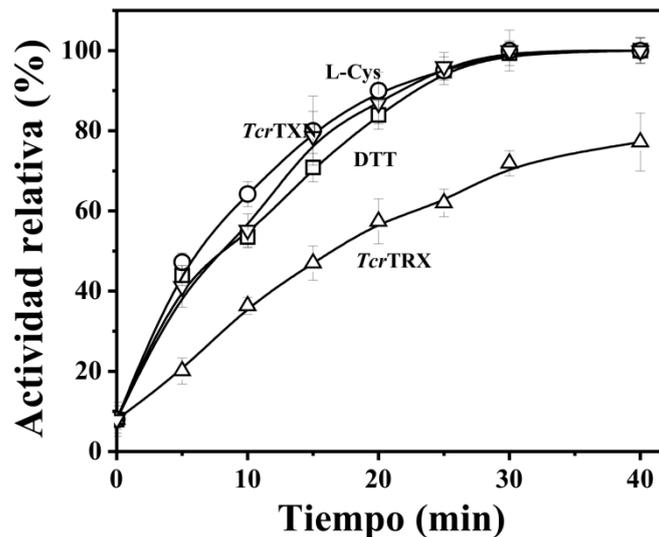


**Figura VII.1.5. Oxidación de la *GlaUDP-Glc PPasa* (blanco) o la *GlaUDP-GlcNAc PPasa* (negro).** Cada enzima se oxidó con 0,5 mM (cuadrados) y 2 mM (círculos) de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o 0,5 mM (triángulos) y 2 mM (triángulos invertidos) de NPS. Al comienzo de los ensayos de oxidación ambas enzimas se encontraban completamente activas (100%): 400 U/mg para la *GlaUDP-Glc PPasa* y 75 U/mg para la *GlaUDP-GlcNAc PPasa*. Los resultados son medias de tres ensayos independientes.

### C. Recuperación de la actividad por acción de agentes reductores

Como se ha descrito antes (Martínez y col., 2011), la modulación redox de la *EhiUDP-Glc PPasa* implica no sólo la inactivación de la enzima por oxidación, sino también la recuperación de su actividad mediante agentes reductores. En el presente trabajo observamos un comportamiento similar para la *GlaUDP-Glc PPasa*, ya que diferentes agentes químicos (DTT, L-Cys) y biológicos [tiorredoxina (*TcrTRX*) y triparredoxina (*TcrTXN*) de *T. cruzi*, previamente reducidas] fueron eficaces en restablecer la actividad biológica de la enzima a partir de su estado oxidado inactivo. Como se muestra en la Figura VII.1.6, la enzima de *G. lamblia* previamente oxidada por

$\text{H}_2\text{O}_2$  (más de 90% de pérdida de actividad) fue completamente reactivada por tratamientos con DTT, L-Cys o *TcrTXN*. El tratamiento con *TcrTRX* sólo logró una recuperación parcial de la actividad de la enzima, a un máximo de ~70% del valor original. Similares resultados fueron observados cuando el oxidante era NPS. Para la enzima *GlaUDP-GlcNAc PPasa* no se observó una recuperación completa de la actividad, mostrando que la enzima es más insensible a los cambios de actividad asociadas a una diferenciación redox del medio.



**Figura VII.1.6. Efecto de agentes reductores sobre la *GlaUDP-Glc PPasa* inactivada.** La enzima se oxidó durante 30 minutos con 0,5 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  y después se trató durante los tiempos especificados con: 2,5 mM DTT (cuadrados), 5 mM L-Cys (círculos), 50  $\mu\text{M}$  *TcrTRX* (triángulos) o 50  $\mu\text{M}$  de *TcrTXN* (triángulos invertidos).

#### D. Titulación redox y cálculo del potencial de reducción

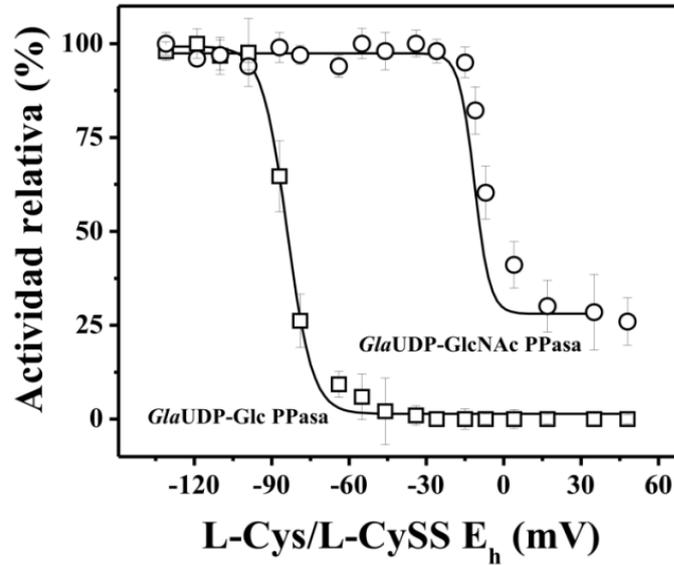
La oxidación y reducción de moléculas involucra el intercambio de electrones. El potencial de reducción o potencial redox ( $E_h$ ) es una medida de la tendencia de un

compuesto a adquirir los electrones de otro, que se oxida, y por lo tanto representa su capacidad de ser reducido. El potencial redox medio de una proteína a un pH dado ( $E_{m,pH}$ ) es el valor de potencial para el cual las concentraciones de las formas oxidada y reducida de la misma son iguales. En *Giardia*, la L-Cys es el principal tiol de bajo peso molecular y, por lo tanto, sería el responsable de mantener las condiciones redox intracelulares (Brown y col., 1993). Es decir, el par L-Cys/L-CySS podría funcionar *in vivo* como un *buffer* redox para mantener las condiciones fisiológicas adecuadas.

Para un mejor análisis de la posible modulación pos-traducciona l de las PPasas por mecanismos de óxido-reducción, se realizó una titulación de la actividad de las enzimas a distintos valores  $E_h$ . Para esto se utilizaron proporciones específicas de L-Cys y L-CySS en el medio de ensayo donde se incubaron las enzimas y luego de alcanzado el equilibrio ensayaron los niveles de actividad. Como se muestra en la Figura VII.1.7, la actividad de ambas enzimas disminuyó a medida que el  $E_h$  se hacía más oxidante. En el caso de la *Gla*UDP-Glc PPasa se inactivó casi completamente a - 64 mV, calculándose un valor de  $E_m$  de - 84 mV. Estos resultados son coherentes con el hecho de que la actividad de la enzima es mayor cuando se encuentra totalmente reducida. Como era de esperarse, la enzima mostró la misma sensibilidad redox cuando se ensayó para la actividad con el sustrato alternativo Gal-1P. Por otro lado, se observó una pérdida parcial de la actividad de la *Gla*UDP-GlcNAc PPasa a valores de  $E_h$  mayores que los necesarios para inactivar la *Gla*UDP-Glc PPasa; la enzima alcanzó una inhibición máxima de 75% en valores de  $E_h$  positivos (Figura VII.1.7), siendo el  $E_m = - 11$  mV.

Estos resultados apoyan la hipótesis de una regulación de la síntesis de UDP-Glc (y UDP-Gal) mediante mecanismos redox pos-traduccionales en *G. lamblia*. Además, este estudio aporta otro ejemplo para este tipo de mecanismo en organismos

protozoarios, como es el caso de la enzima de *E. histolytica* (Martinez y col., 2011). Esto nos lleva a pensar que podría tratarse de una característica común de las UDP-Glc PPasas de protozoos y quizás de otros eucariotas, como las plantas (Soares y col., 2014).



**Figura VII.1.7.** Actividad de la *GlaUDP-Glc PPasa* y la *GlaUDP-GlcNAc PPasa* determinada en diferentes condiciones redox. Cada enzima se incubó a diferentes potenciales de reducción establecidos por diferentes relaciones de L-Cys/L-CySS (L-Cys/L-CySS E<sub>h</sub>) hasta alcanzar el equilibrio. A continuación, se ensayó la actividad respectiva: para la *GlaUDP-Glc PPasa* (cuadrados) se utilizaron UTP (1,5 mM) y Glc-1P (1 mM) como sustratos; mientras que para la *GlaUDP-GlcNAc PPasa* (círculos) fue empleado UTP (1 mM) y GlcNAc-1P (1,5 mM). El 100% de la actividad corresponde a 400 U/mg (*GlaUDP-Glc PPasa*), o 75 U/mg (*GlaUDP-GlcNAc PPasa*).

### VII.1.2. Discusión

En el presente estudio se llevó a cabo la caracterización bioquímica de una UDP-Glc PPasa de *G. lamblia* funcionalmente activa. Se clonó la única secuencia de nucleótidos publicada en la base de datos de *G. lamblia* que codifica para una UTP:glucosa-1-fosfato uridililtransferasa (*ugp*), y seguidamente se procedió a su producción mediante expresión heteróloga en *E. coli*. La enzima recombinante purificada presentó una estructura monomérica y exhibió características distintivas, principalmente por su capacidad de utilizar TTP y Gal-1P como sustratos alternativos al uso de UTP y Glc-1P, respectivamente. La oxidación por compuestos fisiológicos ( $H_2O_2$  y el óxido nítrico generado por NPS) inactivó la enzima y el proceso pudo ser revertido por reducción con L-Cys y TRX, entre otros compuestos. Teniendo en cuenta la escasa información disponible sobre el tema, los resultados obtenidos son de gran relevancia en el marco de la función que desempeñan los NDP-azúcares (UDP-Glc y UDP-Gal) en la fisiología de *Giardia*.

En parásitos, la formación de NDP-azúcares seguido de su uso por glicosiltransferasas específicas son procesos críticos, ya que la síntesis de ciertos oligo y polisacáridos estructurales determinan la capacidad de interacción con otras células (Dickmanns y col., 2011). Por lo tanto, los compuestos glicosídicos en estos organismos desempeñan un papel importante en la unión y la invasión, así como también en la inducción y modulación de la respuesta inmune del huésped (Ortega-Barria y col., 1990). En particular en *G. lamblia*, la participación de la UDP-Glc y UDP-Gal como metabolitos principales está dada por: (i) la capacidad del parásito para acumular glucógeno (para el almacenamiento de carbono y energía, que determinan la supervivencia y la capacidad patogénica) (Ladeira y col., 2005; Pradhan y col., 2012) y (ii) la Glc y Gal están presentes en gran porcentaje en las estructuras glicosídicas de las

membranas de distintas formas celulares del parásito: la Glc representa un 46 y un 54%, y la Gal un 14 y un 26% de azúcares totales presentes en las membranas de trofozoítos y quistes, respectivamente (Ortega-Barria y col., 1990).

La vía de Leloir se considera como una ruta de conexión entre la Gal y la Glc que consta de 3 etapas: la fosforilación de Gal por la galactoquinasa (EC: 2.7.1.6), la activación de la Gal-1P en UDP-Gal mediada por la UDP-Glc:α-D-Gal-1P uridililtransferasa (GalT; EC 2.7.7.12), y una última reacción que implica la epimerización del azúcar en el C4 por la UDP-Glc 4-epimerasa (EC 5.3.1.2) (Figura VII.1.8 A) (Frey, 1996). En la mayoría de los protozoos la GalT está ausente; sin embargo, se han descrito algunas vías alternativas para la síntesis de UDP-Gal (Figura VII.1.8 A) (Lobelle-Rich y Reeves, 1983; Damerow y col., 2010; Yang y Bar-Peled, 2010). Por ejemplo, en *L. major* se ha informado una UDP-azúcar PPasa (EC: 2.7.7.64) con amplia especificidad para el azúcar-1P (Damerow y col., 2010); aunque la enzima utiliza preferentemente Glc-1P y Gal-1P, con una eficiencia catalítica 2,4 veces mayor para el último monosacárido. En *T. cruzi*, también se ha informado una UDP-azúcar PPasa que utiliza Gal-1P y Glc-1P como sustratos principales (Yang y Bar-Peled, 2010). Esta enzima presenta una eficiencia catalítica 3,8 veces inferior para Gal-1P respecto a la eficiencia para Glc-1P (Yang y Bar-Peled, 2010).

Realizamos un análisis *in silico* del genoma de *G. lamblia*, donde no se encontró ningún gen que codifique para las enzimas galactoquinasa o GalT. Sin embargo, durante la búsqueda se encontró un gen que codifica para una UDP-Glc epimerasa putativa, que comparte 26% de identidad con la enzima homóloga de *T. cruzi*. Además, *G. lamblia* carece de un gen que codifique una UDP-azúcar PPasa y sólo presenta dos genes vinculados a PPasas dependientes de UTP: aquellos que codifican para la UDP-Glc PPasa y la UDP-GlcNAc PPasa. Esta última enzima se ha caracterizado

extensamente y en nuestras manos los resultados fueron similares a los previamente informados (Mok y Edwards, 2005; Mok y col., 2005) respecto a los parámetros cinéticos y la alta especificidad hacia GlcNAc-1P. Contrariamente, la *Gla*UDP-Glc PPasa mostró la capacidad de utilizar Gal-1P como un sustrato alternativo, lo que conduciría a la síntesis de UDP-Gal; la afinidad aparente y la eficiencia catalítica determinadas fueron prácticamente similares cuando cataliza la producción de UDP-Glc o de UDP-Gal. En este escenario, los roles funcionales para la síntesis de estos nucleótido-azúcares y la vía de salvataje de monosacáridos pueden ser atribuidos a la *Gla*UDP-Glc PPasa caracterizada en este estudio (Figura VII.1.8 B); mientras que la *Gla*UDP-GlcNAc PPasa estaría implicada únicamente en el metabolismo de UDP-GlcNAc (y tal vez otro UDP-aminoazúcar) (Mok y Edwards, 2005). Esta última enzima es de gran importancia para la supervivencia del parásito, ya que la viabilidad del quiste en el medio ambiente depende de una pared protectora que consiste en un conjunto de glicoproteínas que presentan un único homopolímero  $\beta(1-3)$ GalNAc (Sener y col., 2004). La UDP-GalNAc, el precursor de este polisacárido, es sintetizada mediante la epimerización de la UDP-GlcNAc por la enzima UDP-GlcNAc 4'epimerasa.

La hipótesis planteada sobre el posible metabolismo de Gal en *G. lamblia* a través de la reacción catalizada por *Gla*UDP-Glc PPasa presenta el problema de la ausencia de una galactoquinasa en el parásito. Trabajos previos han informado que la glucoquinasa (CE 2.7.1.2) (Henze y col., 2001) y la fosfoglucomutasa (PGM; EC 5.4.2.2) (Mitra y col., 2010) presentes en este organismo exhiben propiedades funcionales marcadamente distintivas, por lo que podrían suplir la carencia recién detallada. Además, es importante considerar que *Giardia* es un organismo eucariota de divergencia evolutiva temprana con muchas características inusuales en su

ultraestructura, metabolismo e incluso secuencia de genes (Lloyd y Harris, 2002). Por lo tanto, es tentador especular con respecto a las propiedades de estas enzimas, las cuales podrían presentar cierto grado de promiscuidad hacia el uso azúcares (aún no comprobados para Gal), estableciendo así un camino de dos pasos para convertir Gal en Gal-1P (Figura VII.1.8 B).

La síntesis de UDP-azúcares en *Giardia* parece presentar diferencias singulares respecto a otros protozoos. Por ejemplo, *G. lamblia* carece de una UDP-azúcar PPasa de amplio espectro, tal como se encontró en *T. cruzi* y *L. major* (Damerow y col., 2010; Yang y Bar-Peled, 2010). La ocurrencia de una única enzima, la *Gla*UDP-Glc PPasa, para la producción de UDP-Glc y UDP-Gal también aparece como una característica distintiva respecto a la enzima homóloga de *E. histolytica*. Se encontró que la *Ehi*UDP-Glc PPasa recientemente caracterizada (Martinez y col., 2011) exhibe menos de 1% de la actividad con Gal-1P y es altamente específica para la Glc-1P. Estos resultados apoyan lo informado previamente (Lobelle-Rich y Reeves, 1983), donde en los extractos obtenidos a partir del microorganismo la actividad de UDP-Gal PPasa (EC 2.7.7.10) y la de UDP-Glc PPasa se observaron en dos fracciones separadas. Por otro lado, las UDP-Glc PPasas de mamíferos pueden usar UDP-Gal, pero con una capacidad significativamente menor en comparación con el uso de UDP-Glc (Turnquist y col., 1974). Esto se ha observado también en la enzima de cebada, ya que se ha informado recientemente de que la UDP-Glc PPasa de esta fuente es capaz de catalizar el consumo de Gal-1P, pero con una eficiencia muy baja en comparación con Glc-1P (Decker y col., 2012).

Algunas UDP-Glc PPasas bacterianas presentan cierto grado de promiscuidad respecto al uso del nucleótido, siendo capaces de utilizar TTP (Weissborn y col., 1994; Bosco y col., 2009; Asencion Diez y col., 2012; Asencion Diez y col., 2013). Sin

embargo, estas enzimas no son homólogas a las de eucariotas, compartiendo no más que el 8% de identidad a nivel de secuencia de aminoácidos (Kleczkowski y col., 2004; Kleczkowski y col., 2011b). La capacidad de *Gla*UDP-Glc PPasa para el uso de TTP como un sustrato alternativo al UTP también constituye un comportamiento singular, ya que las enzimas homólogas de plantas, hongos y protozoos son altamente específicas para el uso de UTP (Martz y col., 2002; Lamerz y col., 2006; Roeben y col., 2006; Martinez y col., 2011). Una excepción es una UDP-Glc PPasa de mamífero que es capaz de catalizar la pirofosforólisis de TDP-Glc, pero con baja eficiencia (Turnquist y col., 1974). En un análisis global, la comparación con respecto a la especificidad de sustrato exhibida por *Gla*UDP-Glc PPasa y *Gla*UDP-GlcNAc PPasa sugiere que la primera sería la única enzima implicada principalmente en la síntesis de UDP-Glc y UDP-Gal en *Giardia*.

La UDP-Glc PPasa *G. lamblia* presenta homología con las UDP-Glc PPasas eucariotas (~30-40% de identidad, como se mencionó anteriormente), y una identidad inferior a las UDP-azúcar y UDP-GlcNAc PPasas (menor al 15%). Se sabe que durante la evolución las PPasas han conservado el mismo plegamiento estructural y algunos residuos claves para la unión de los sustratos y la catálisis de la reacción (Damerow y col., 2010; Yang y Bar-Peled, 2010); en particular, el motivo rico en glicina, implicado en la interacción con el nucleótido, está presente en todas las proteínas de la familia (Damerow y col., 2010; Yang y Bar-Peled, 2010). Sin embargo, los residuos presentes en las UDP-Glc PPasas que intervienen en la unión a la Glc no están conservados en las UDP-azúcar PPasas y es probable que la inserción de *loops* entre los dominios estructurales generados hayan provocado cambios evolutivos para permitir que la enzima sea apta para aceptar diferentes sustratos (Damerow y col., 2010; Yang y Bar-Peled, 2010).

Para explorar las posibles relaciones entre la estructura de la proteína y la capacidad de utilizar de sustratos alternativos, se realizó un alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la *Gla*UDP-Glc PPasa con sus ortólogas altamente específicas para UTP y Glc-1P. En la Figura VII.1.9 se señala el *loop* de unión a nucleótidos (región Lys<sup>80</sup>-Lys<sup>95</sup>) y el *loop* de unión del azúcar (región Arg<sup>249</sup>-Arg<sup>261</sup>). Además se marcan los residuos identificados como críticos para la unión de sustratos en la enzima de *L. major* (Steiner y col., 2007; Führung y col., 2013): para la unión de Glc-1P, los residuos Asn<sup>219</sup>, Glu<sup>284</sup>, Asn<sup>306</sup>, Thr<sup>307</sup>, Asn<sup>308</sup> y Phe<sup>376</sup>; y los residuos de unión del UTP Met<sup>130</sup>, Gln<sup>162</sup>, Gly<sup>190</sup>, His<sup>191</sup>, Asn<sup>219</sup>, Asp<sup>221</sup>. Como puede observarse todos estos residuos están estrictamente conservados, a excepción de Asn<sup>219</sup> y Thr<sup>307</sup> que en la *Gla*UDP-Glc PPasa están sustituido por Ser y Val, respectivamente. Aunque posiblemente las diferencias en la capacidad de uso de sustratos alternativos estén relacionadas con residuos que producen cambios estructurales que permiten una mayor flexibilidad para la unión de los compuestos.

A pesar de compartir un mismo tipo de plegamiento estructural, las PPasas adoptan diversas conformaciones cuaternarias. En particular, para las UDP-Glc PPasas eucariotas se han descrito dos de acuerdo al organismo: aquellas pertenecientes a hongos y animales adquieren una conformación activa octamérica (Konishi y col., 1993; Roeben y col., 2006), mientras que las enzimas de plantas y protozoos son activas en forma de monómeros (Martz y col., 2002; Kleczkowski y col., 2005; Lamerz y col., 2006; Marino y col., 2010; Martinez y col., 2011). En este trabajo, se determinó que la *Gla*UDP-Glc PPasa es activa en una conformación monomérica, así como también la *Gla*UDP-GlcNAc PPasa. En trabajos previos (Martz y col., 2002; Kleczkowski y col., 2005), se ha mostrado que la enzima de cebada puede adoptar diferentes estructuras oligoméricas que afectan fuertemente su capacidad catalítica; para la enzima *G. lamblia*

no se detectó ninguna otra conformación (además del monómero), incluso en su estado oxidado. Esto concuerda con los resultados descritos para la enzima de *E. histolytica* (Martinez y col., 2011) y de *L. major* (Lamerz y col., 2006). De acuerdo a esto podría plantearse que, distinto a lo que sucede con las UDP-Glc PPasas de plantas (Kleczkowski y col., 2005), en las enzimas de protozoos la regulación por formación de estructuras oligoméricas mayores no sería tan relevante.

Es importante señalar que, a pesar de su conformación monomérica, la *GlaUGP-Glc* PPasa mostró cooperatividad positiva para el uso de sustratos (especialmente para los sustratos alternativos). Tradicionalmente, para la ocurrencia de cooperatividad la participación de múltiples sitios de unión espacialmente distintos es vista como un requisito y esto está en estrecha relación con proteínas oligoméricas. Sin embargo, se han registrado algunos ejemplos de enzimas monoméricas que exhiben efectos cooperativos (Moukil y Van Schaftingen, 2001; Cornish-Bowden y Cardenas, 2010; Porter y Miller, 2012), y se han descrito diferentes modelos que podrían explicar este comportamiento cinético no hiperbólico (Porter y Miller, 2012). Un ejemplo ampliamente estudiado es la glucoquinasa de mamíferos (Moukil y Van Schaftingen, 2001). Esta enzima es capaz de utilizar como sustratos distintos azúcares y donantes del grupo fosforilo que presentan un comportamiento cinético distintivo. La glucoquinasa muestra una curva sigmoidea de saturación para la Glc, pero la cooperatividad se pierde cuando se utiliza ITP como sustrato (Moukil y Van Schaftingen, 2001). Además, cuando la enzima utiliza el sustrato análogo 2-desoxiglucosa, la curva de saturación se convierte en hiperbólica (Moukil y Van Schaftingen, 2001). Se han propuesto varios modelos para este comportamiento (Lin y Neet, 1990; Kamata y col., 2004) y la elucidación de la estructura de la proteína (Kamata y col., 2004) permitió proponer un mecanismo que explica la cooperatividad positiva exhibida con algunos sustratos y no

otros. Estudios previos demostraron que esto sería consecuencia de diferencias en las velocidades de transición conformacional inducidos por estos (Cardenas y col., 1984; Lin y Neet, 1990; Moukil y Van Schaftingen, 2001). Por lo tanto, el modelo propuesto para la glucoquinasa parece un buen ejemplo para explicar la ocurrencia de cooperatividad para el uso de Gal-1P y TTP (y no para Glc-1P y UTP) por la *Gla*UDP-Glc PPasa monomérica.

Con respecto a la regulación de UDP-Glc PPasas, se han notificado diferentes modificaciones post-transcripcionales (Kleczkowski y col., 2011a) y post-traduccionales (Rutter y col., 2002; Wells y col., 2003; Kleczkowski y col., 2004; Martinez y col., 2011) para las enzimas de eucariotas. En particular, centramos este estudio en el mecanismo de regulación de tipo redox. Es ampliamente conocido que una manera de modular la actividad de las enzimas implica su inactivación/activación a través de reacciones de oxidación-reducción (Piattoni y col., 2006; Piattoni y col., 2013). Ciertamente, dentro de las UDP-Glc PPasas, la enzima de *E. histolytica* fue la primera en ser caracterizada como regulada por mecanismos redox (Martinez y col., 2011). En el presente trabajo hemos abordado con mayor profundidad este punto en las dos enzimas involucradas en el metabolismo de UDP-azúcares en *G. lamblia*. Los resultados mostraron que la modulación redox de la actividad de la *Gla*UDP-Glc PPasa está mediada por agentes oxidantes y reductores que normalmente se encuentran *in vivo*. La enzima es sensible a la inactivación oxidativa por compuestos fisiológicos ( $H_2O_2$ ,  $\bullet NO$ ); mientras que los metabolitos de bajo peso molecular y proteínas que participan en el metabolismo redox (como L-Cys, *Tcr*TXN) pueden reducir la enzima oxidada y lograr la completa recuperación de su actividad. Tal regulación no se observó para la *Gla*UDP-GlcNAc PPasa. Esta última fue menos sensible a cambios redox, ya que para

disminuir su actividad se requerían condiciones oxidantes extremas, y para revertir el proceso también se requirieron mayores concentraciones de agentes reductores.

El peróxido de hidrógeno y el óxido nítrico son metabolitos redox clave implicados en la señalización intracelular en diferentes condiciones fisiológicas y de estrés (Hess y col., 2005; Rhee, 2006; Foster y col., 2009). Los protozoos parasíticos no sólo tienen que eliminar sus metabolitos tóxicos endógenos, sino que también deben hacer frente a la respuesta oxidativa del sistema inmune del huésped (Muller y col., 2003). Por lo tanto, los sistemas antioxidantes y de detoxificación, tales como L-Cys y TRX, desempeñan un papel crítico en la degradación de las especies reactivas de oxígeno y en los mecanismos de regulación de la actividad de las enzimas a través modificaciones post-traduccionales (Muller y col., 2003; Meyer y col., 2009). Así, en *G. lamblia* [como también en *E. histolytica* (Martinez y col., 2011) y probablemente en otros protozoos] estos mediadores celulares oxidantes/reductores podrían estar implicados en la modificación de proteínas específicas, siendo la UDP-GlcPPasa uno de sus blancos de acción.

Además, en los experimentos de titulación redox se observó que la actividad de la *Gla*UDP-Glc PPasa disminuyó conforme el  $E_h$  se volvía más oxidante, con una inhibición completa a - 60 mV. Dentro del organismo se ha observado que este valor de  $E_h$  y la presencia de un *buffer* redox L-Cys/L-CySS son funcionales (Muller y col., 2003); esto respalda la idea de una posible implicancia fisiológica de la regulación redox de la UDP-Glc PPasa y por lo tanto de la síntesis de UDP-azúcares, en *G. lamblia*. En contraste, bajo las mismas condiciones la *Gla*UDP-GlcNAc PPasa permaneció totalmente activa; la enzima requirió valores de  $E_h$  más altos (fuera del rango fisiológico esperado) para que su capacidad catalítica fuese inhibida. Se sabe que *G. lamblia* es un parásito microaerofílico que tiene una capacidad limitada para la

detoxificación de O<sub>2</sub> y sus especies reactivas (Lloyd y col., 2000); además, difiere de otros eucariotas en que carece de glutatión como *buffer* redox. Sin embargo, se ha especulado que la propia L-Cys podría actuar como el antioxidante clave y/o *buffer* redox (Muller y col., 2003) y, además, ha sido identificado en el microorganismo una tiorredoxina reductasa que utiliza Cys como aceptor de electrones primario (Brown y col., 1996).

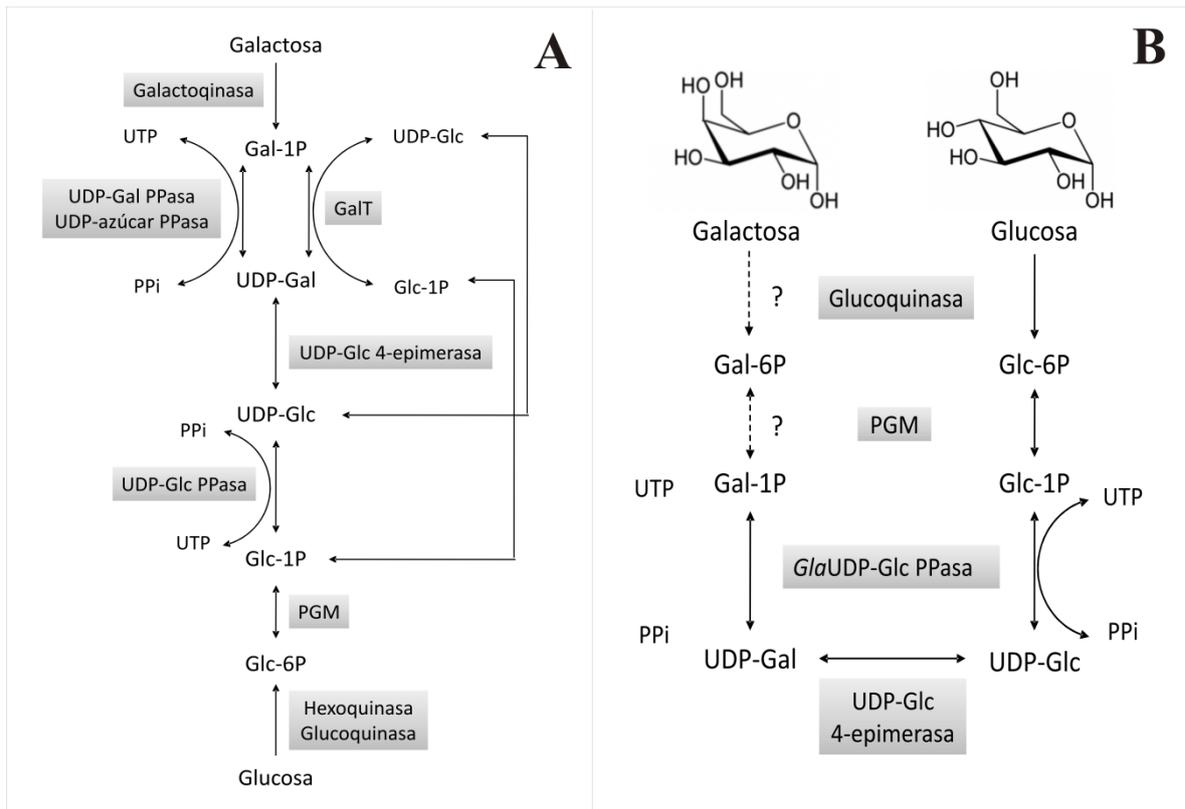
En su conjunto, los resultados sugieren que en *G. lamblia* la UDP-Glc PPasa podría ser la encargada de la producción de diversos nucleótido-azúcares para la síntesis de diferentes sacáridos (glucógeno u oligo- y poli-sacáridos estructurales) que determinan la supervivencia y la patogénesis del parásito. Las propiedades de la enzima caracterizadas en el presente trabajo apoyan firmemente la idea de que el metabolismo de hidratos de carbono que utilizan UDP-Glc y UDP-Gal estaría estrictamente controlado por los niveles de metabolitos redox en el medio ambiente intracelular. Además, la sensibilidad a estos agentes, observada para la *Gla*UDP-Glc PPasa [similar a la informada para la enzima de *E. histolytica* (Martinez y col., 2011)], constituyen un nuevo ejemplo del posible mecanismo de óxido-reducción para regular el metabolismo de los hidratos de carbono en protozoos. Por otro lado, la capacidad de la enzima para usar Gal-1P y producir UDP-Gal abre una visión singular del metabolismo del monosacárido que ocurre en *G. lamblia*. Sin embargo, son necesarios más estudios para establecer el cuadro completo de una vía tan específica, sobre todo para determinar qué enzimas están implicadas específicamente en la conversión de Gal en Gal-1P. Una mejor comprensión de este metabolismo en *G. lamblia* es crítica, debido a la participación del azúcar como componente principal de ciertas estructuras celulares que son vitales para la fisiología parásito. El peróxido de hidrógeno y el óxido nítrico son metabolitos redox clave implicados en la señalización intracelular en diferentes

condiciones fisiológicas y de estrés (Hess y col., 2005; Rhee, 2006; Foster y col., 2009). Los protozoos parasíticos no sólo tienen que eliminar sus metabolitos tóxicos endógenos, sino que también deben hacer frente a la respuesta oxidativa del sistema inmune del huésped (Muller y col., 2003). Por lo tanto, los sistemas antioxidantes y de detoxificación, tales como L-Cys y TRX, desempeñan un papel crítico en la degradación de las especies reactivas de oxígeno y en los mecanismos de regulación de la actividad de las enzimas a través modificaciones post-traduccionales (Muller y col., 2003; Meyer y col., 2009). Así, en *G. lamblia* [como también en *E. histolytica* (Martinez y col., 2011) y probablemente en otros protozoos] estos mediadores celulares oxidantes/reductores podrían estar implicados en la modificación de proteínas específicas, siendo la UDP-GlcPPasa uno de sus blancos.

Además, en los experimentos de titulación redox se observó que la actividad de la *Gla*UDP-Glc PPasa disminuyó conforme el  $E_h$  se volvía más oxidante, con una inhibición completa a - 60 mV (Figura VII.1.7). Dentro del organismo se ha observado que este valor de  $E_h$  y la presencia de un *buffer* redox L-Cys/L-CySS son funcionales (Muller y col., 2003); esto respalda la idea de una posible implicancia fisiológica de la regulación redox de la UDP-Glc PPasa y por lo tanto de la síntesis de UDP-azúcares, en *G. lamblia*. En contraste, bajo las mismas condiciones la *Gla*UDP-GlcNAc PPasa permaneció totalmente activa; la enzima requirió valores de  $E_h$  más altos (fuera del rango fisiológico esperado) para que su capacidad catalítica fuese inhibida (Figura VII.1.7). Se sabe que *G. lamblia* es un parásito microaerofílico que tiene una capacidad limitada para la detoxificación de  $O_2$  y sus especies reactivas (Lloyd y col., 2000); además, difiere de otros eucariotas en que carece de glutatión como *buffer* redox. Sin embargo, se ha especulado que la propia L-Cys podría actuar como el antioxidante clave y/o *buffer* redox (Muller y col., 2003) y, además, ha sido identificado en el

microorganismo una tiorredoxina reductasa que utiliza L-Cys como aceptor de electrones primario (Brown y col., 1996).

En su conjunto, los resultados sugieren que en *G. lamblia* la UDP-Glc PPasa podría ser la encargada de la producción de diversos nucleótido-azúcares para la síntesis de diferentes sacáridos (glucógeno u oligo- y poli-sacáridos estructurales) que determinan la supervivencia y la patogénesis del parásito. Las propiedades de la enzima caracterizadas en el presente trabajo apoyan firmemente la idea de que el metabolismo de hidratos de carbono que utilizan UDP-Glc y UDP-Gal estaría estrictamente controlado por los niveles de metabolitos redox en el medio ambiente intracelular. Además, la sensibilidad a estos agentes, observada para la *Gla*UDP-Glc PPasa [similar a la informada para la enzima de *E. histolytica* (Martinez y col., 2011)], constituyen un nuevo ejemplo del posible mecanismo de óxido-reducción para regular el metabolismo de los hidratos de carbono en protozoos. Por otro lado, la capacidad de la enzima para usar Gal-1P y producir UDP-Gal abre una visión singular del metabolismo del monosacárido que ocurre en *G. lamblia*. Sin embargo, son necesarios más estudios para establecer el cuadro completo de una vía tan específica, sobre todo para determinar qué enzimas están implicadas específicamente en la conversión de Gal en Gal-1P. Una mejor comprensión de este metabolismo en *G. lamblia* es crítica, debido a la participación del azúcar como componente principal de ciertas estructuras celulares que son vitales para la fisiología parásito.



**Figura VII.1.8. Vías metabólicas para UDP-Glc y UDP-Gal.** (A) Metabolismo alternativo para la síntesis de Gal. La vía de Leloir conecta los azúcares Gal y Glc e implica las etapas catalizadas por la galactoquinasa, la GalT y la UDP-Glc 4-epimerasa. Una vía alternativa, es la activación de Gal-1P en UDP-Gal por una UDP-Gal PPasa (Frey, 1996) o por una UDP-azúcar PPasa. (B) Esquema propuesto para el metabolismo que tiene lugar *en G. lamblia*. El sistema se basa en la ausencia de las enzimas GalT, UDP-Gal PPasa y UDP-azúcar PPasa, así como de las propiedades estudiadas en el presente trabajo para la *Gla*UDP-Glc PPasa, relacionadas con su capacidad para catalizar la síntesis de UDP-Gal a partir de Gal-1P y UTP. El metabolismo propuesto implica dos pasos para convertir la Gal en Gal-1P mediada por la glucoquinasa (Henze y col., 2001) y la PGM (Damerow y col., 2010; Mitra y col., 2010), que podrían exhibir algún grado de promiscuidad respecto al uso de sustratos.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
GlaUDPglcPPase	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
LmaUDPglcPPase	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
EhiUDPglcPPase	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
AthUDPglcPPase	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
SceUDPglcPPase	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
		NB loop				M <sup>130</sup>			Q <sup>162</sup>	
GlaUDPglcPPase	T---KAMQKVAVL	KINGGLGTSNSCTGPK	TLIPVKNQMS	FLSIIVRQVSS	INTKYGISMP	LLMNSFNT	EKDTKAAL	QIHI---	LDKPV	ITCFNQAHP
LmaUDPglcPPase	ECNNAVLQSTVVI	KINGGLGTSNSLCAK	TLLEVKDGKT	FLDFTALQV	YLRQHCSEHL	RFLMDSFNT	SASTKSFL	KARYPWLY	QVDFSEVELM	QNOVP
EhiUDPglcPPase	BII-ELLKKTCTII	KINGGLGTSNSCTGPK	SVIEVRNGLT	FLDI IILQL	KALYREYGVV	PLVLMNSFSTN	VETEKVI	KYB---	QDNDV	RILTFLOHKFP
AthUDPglcPPase	ETK-NLLDKLVVL	KINGGLGTSNSCTGPK	SVIEVRDGLT	FLDLIVIQI	ENLNKYGCK	KVPLVLMNSFNT	HDDTHKI	VEKYT---	NSN-V	IHTFNQSKYP
SceUDPglcPPase	N-----LSKLAVL	KINGGLGTSNSCTGPK	SVIEVRNGT	FLDLSVRQI	EYLNKQYSD	SDVPLLMNSFNT	DKDTEHL	IKKYS---	ANR-IR	IRSFNQSRFP
		G <sup>190</sup> -H <sup>191</sup>			N <sup>219</sup> -D <sup>221</sup>			SB loop		
GlaUDPglcPPase	RIDAETLLPCTHIT	PPDNQAYWYPPGHG	DVLSRLSIS	SLVDKLI	ARGVWEIF	ISSGDNLGA	VDDPRIV	GYLATL	KGVDFVSE	QTAKTIRVYGGV
LmaUDPglcPPase	KILQDTLLEPAAWA	ENPAYEWA	PPGHGDI	IYALYGS	GKLQELV	EQGYRMPV	SNGDNLGA	TIDKR	VLAYMEK	K-IDFLMEV
EhiUDPglcPPase	RIDAQTLLEPVCT	ELNGRKEE	WYPPGHG	DFLQSFV	DSKAPQTL	KEGKBYL	FLSNSDNLGA	IPDIT	IMHFS	KNH-LDPAL
AthUDPglcPPase	RVVADLFPVWPS	KGKTKK	GWYPPGHG	DVFPAL	MNSGKLD	TFLSQG	KYVVFVANS	DNLGA	IVDLT	ILKHLIQNK-N
SceUDPglcPPase	RVYKDSLLEPVPT	EYDSDPLDA	WYPPGHG	DLFBSL	HVSGELDAL	IAQGRSIL	FLVSN	DNLGA	TVDLK	ILNMIETG-ASY
		E <sup>284</sup>			N <sup>306</sup> -N <sup>308</sup>					
GlaUDPglcPPase	TTR-----LL	TAQVPQEHMG	FCDI	TKFSFV	NSI	WVRL	EALKRL	ADAGT	PID-LD	IIVNPKVVEG
LmaUDPglcPPase	YVKGKDGQPD	AENKRVLL	LRSAQ	CPKAD	MSFPQ	INKYSF	FNTN	NLWIR	LPVLL	BTMQEHGGT
EhiUDPglcPPase	KLK-----ML	IAQVPSEHVA	SFKD	IKKPKV	FNTN	NLWIR	WIRMS	AIQHV	VEKRT	LLNNMD
AthUDPglcPPase	KVQ-----LL	IAQVPOEHV	NEFKS	IEKFKI	FNTN	NLWIR	WNLK	AIKGL	VEAD	ALK--MEI
SceUDPglcPPase	QVR-----LL	VAQVPKEH	HIDBF	KNIRK	FNTN	NLWIR	WNLK	AVKRL	IESS	NLE--MEI
		F <sup>376</sup>								
GlaUDPglcPPase	-SEGLLVSRDRFI	PVKKTC	DLL-TVQ	SDVY	DLDS----	EYVLR	ACCSIPT	VELCAP	LEKMD	AYCAAFQC-LP
LmaUDPglcPPase	SASAI	VPRSRFA	PVKT-CAD	LLALR	SDAYV	TDDFRL	VLDOR	CHGHP	FPVVD	LDSAHY
EhiUDPglcPPase	HTTAYI	VPRSRFL	PVKA-CND	LFI	IQSTL	FLG	NESGH	MVD	NARKV	SDI
AthUDPglcPPase	NAIGVN	VPRSRFL	PVKA-SSD	LLL	VQSD	LYTL	VDFG	VTR	KNKART	NPSN
SceUDPglcPPase	GAGGVV	VPRSRFL	PVKT-CSD	LLL	VKSD	LFRL	EH-GSL	KLD	PSR	FGP-NPL
GlaUDPglcPPase	IDNTS-----	HLNCT	LGQ-----							
LmaUDPglcPPase	IEN	TDSAS	AFV	IPD	GAK	LD	TTAS	PQ	QST	NK
EhiUDPglcPPase	L	KN	T	T	K	P	I	L	L	E
AthUDPglcPPase	V	A	A	S	G	V	K	L	E	I
SceUDPglcPPase	I	V	C	S	D	G	H	K	I	D

**Figura VII.1.9. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos entre las UDP-Glc 6PAsas de *G. lamblia* (*Gla*), *L. major* (*Lma*), *E. histolytica* (*Ehi*), *A. thaliana* (*Ath*) y *S. cerevisiae* (*Sce*).** Se resaltan las secuencias involucradas en la unión a sustratos, tomado de la estructura cristalizada de la enzima de *L. major* (Führung y col., 2013): en verde, los residuos pertenecientes al *loop* de unión a nucleótidos (*loop* NB). En rosa se especifica el bucle de unión al azúcar (*loop* SB). Las flechas verdes indican residuos identificados como responsables de la interacción con el nucleótido. Las flechas de color rosa señalan los residuos involucrados en la unión de la Glc-1P.

## VII.2. Capítulo: “La GSasa de *Giardia lamblia*. Análisis cinético y evolutivo de la enzima responsable de la acumulación del poliglucano de reserva”

### VII.2.1. Resultados

#### VII.2.1.1. Análisis filogenético de las GSasas

La función catalítica glucógeno/almidón sintasa se agrupa en 2 familias de glicosiltransferasas, GT3 y GT5, según la base de datos *on-line* CAZy [*Carbohydrate-Active enZYmesdatabase* (Cantarel y col., 2009)]. En la familia GT3 encontramos agrupadas principalmente las secuencias de GSasas de hongos y mamíferos (EC 2.4.1.11) que utilizan preferentemente UDP-Glc como dador glucosilo y poseen una MM de ~80 kDa. En tanto que en GT5 se encuentran las secuencias correspondientes a las glucógeno/almidón sintasa de fuentes bacterianas y vegetales (EC 2.4.1.21), que utilizan como dador glucosilo ADP-Glc y son más pequeñas (~50 kDa).

La acumulación de glucógeno es un proceso crítico para *Giardia* por lo que el estudio de las enzimas que participan en su biosíntesis es de gran relevancia para la comprensión del metabolismo de este parásito. Un análisis del genoma de *G. lamblia* ATCC50803 (Morrison y col., 2007; Aurrecoechea y col., 2009) muestra un gen que codifica para una GSasa putativa (*gsasa*, Gene ID: 5699620). A partir de la secuencia nucleotídica de *gsasa* se predice una proteína de 753 aminoácidos (*GlaGSasa*), con una MM teórica de 85 kDa, tamaño similar a las enzimas eucariotas descritas hasta el momento (Tabla VII.2.1). *Giardia* es un organismo de divergencia temprana en el linaje eucariota, por lo que el microorganismo presenta ciertas características compartidas con células procariotas, como el hecho de compartir algunas

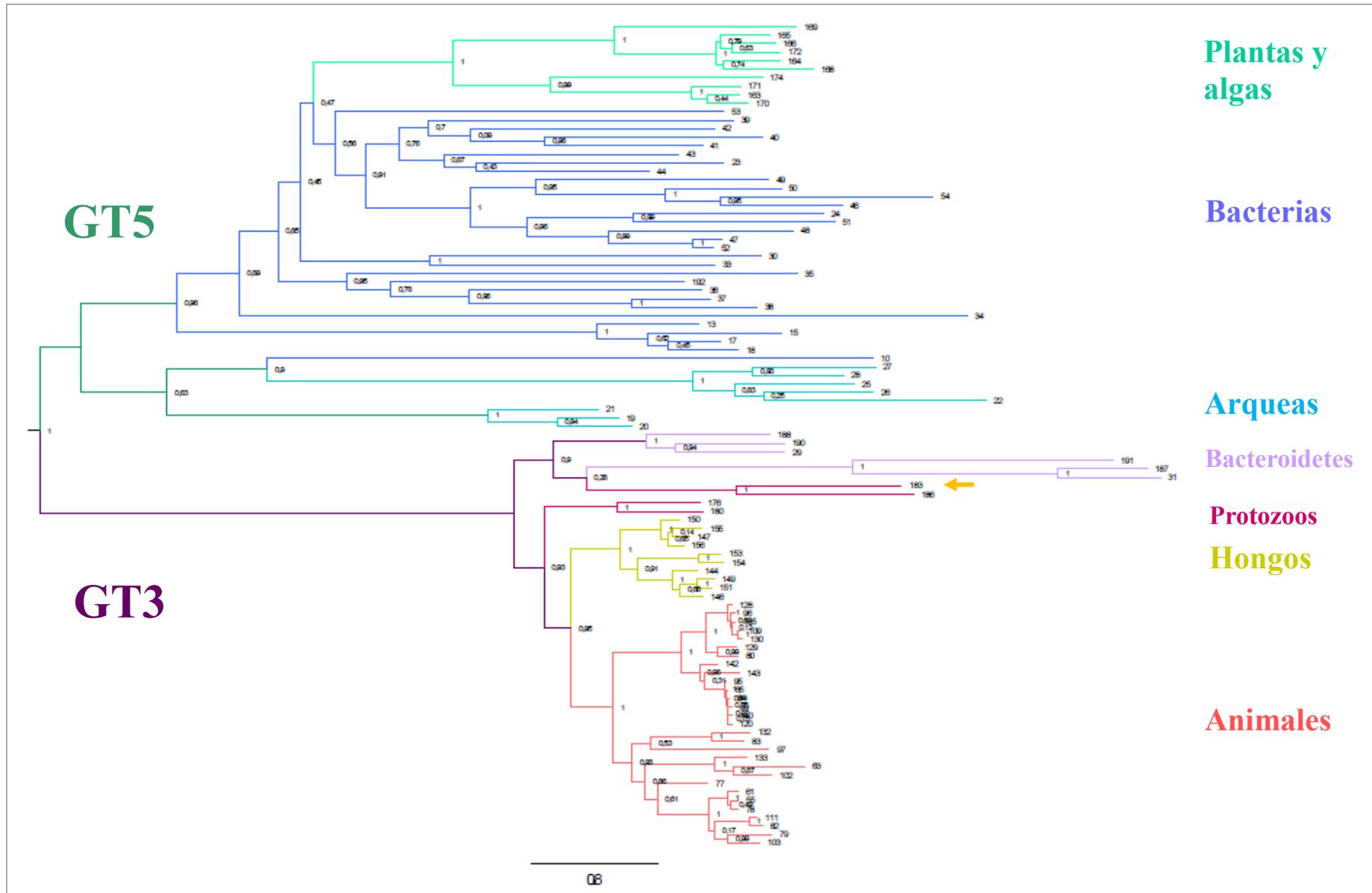
de las rutas metabólicas típicas de bacterias (Adam, 2001). En base a esto decidimos analizar a qué familia de glicosiltransferasas, GT3 o GT5, pertenecía la *GlaGSasa*.

Para este estudio se construyó un árbol filogenético a partir de las secuencias peptídicas de distintas GSasas y almidón sintasas. Los resultados muestran dos claros polos correspondientes a los grupos GT3 y GT5 (Figura VII.2.1). Coherente con lo esperado, en el grupo de las enzimas de tipo GT5 se agrupan aquellas que pertenecen a bacterias y plantas. Además, el análisis de secuencias proveniente de arqueas muestra que son más cercanas a las enzimas de la familia GT5, pese a las características intermedias entre ambas familias [como el uso alternativo de NDP-Glc (Zea y Pohl, 2005), pero más pequeñas que las GT3]. Mientras que en el otro polo se agrupan las proteínas GT3 a las cuales pertenecen principalmente las secuencias de las enzimas de mamíferos y hongos. Además, las GSasas bacterianas pertenecientes a la división taxonómica Bacteroidetes se encuentran más cercanas evolutivamente a las enzimas de mamíferos/fúngicas que a las del resto de las bacterias y de plantas, agrupándose así dentro de las GT3. Finalmente, las enzimas de protistas, entre ellas la *GlaGSasa* (Figura VII.2.1), se encuentran dentro del grupo de las GT3, en una posición intermedia entre las GSasas de Bacteroidetes y las de eucariotas superiores.

Un análisis comparativo de la secuencia primaria de la *GlaGSasa* con distintas glicosiltransferasas GT3 y GT5 (Tabla VII.2.1) muestra una clara homología de la enzima de *Giardia* con aquellas que pertenecen al primer grupo. Su secuencia de aminoácidos presenta ~20-30% de identidad con distintas GSasas de mamíferos, hongos y Bacteroidetes, mientras que presenta menor identidad de secuencia con las almidón sintasas de plantas y las glucógeno sintasas bacterianas y de arqueas (5-10% identidad, Tabla VII.2.1). Además, la Tabla VII.2.1 muestra las características de diferentes GSasas (y almidón sintasas) de distintos organismos y la comparación con la proteína

en estudio (*GlaGSasa*). De acuerdo a este análisis *in silico* la *GlaGSasa* se clasifica dentro del grupo de enzimas que utilizan principalmente UDP-Glc como sustrato para la elongación del  $\alpha$ -1,4-poliglucano de reserva. Sin embargo, es importante considerar que comparte una identidad considerable con las enzimas de bacterias que se agrupan dentro de las GT3 y evolutivamente estarían en una posición intermedia entre estas y las GSasas de organismos eucariotas superiores (Figura VII.2.1).

Este análisis filogenético nos lleva a considerar que la *GlaGSasa* podría exhibir características presentes en eucariotas superiores, como el uso de UDP-Glc como principal sustrato de la reacción catalizada y la modulación de su actividad por Glc-6P y fosforilación, o bien presentar características intermedias entre las enzimas de bacterias y de eucariotas. Si bien las GSasas de Bacteroidetes se agrupan dentro de las GT3, las mismas no son enzimas reguladas. En nuestro grupo de trabajo se han realizado estudios sobre la proteína de *Prevotella intermedia* mostrando que es capaz de utilizar distintos NDP-Glc como donador glucosilo en la biosíntesis de glucógeno y su actividad no es afectada por la presencia de metabolitos que podrían actuar como efectores alostéricos (Machtey, 2012). Para poder determinar las características funcionales de la *GlaGSasa* y su relación con este estudio filogenético, se procedió a su producción recombinante y caracterización bioquímica.



**Figura VII.2.1. Árbol filogenético de las GSasas.** Los colores de cada grupo se corresponden con las secuencias dentro del mismo. La flecha amarilla indica la ubicación de la *GlaGSasa*.

	<b>Organismo</b>	<b>Largo (aa)</b>	<b>Identidad (%)</b>	<b>NDP-Glc</b>
<b>Protozoos</b>	<i>Giardia lamblia</i>	753	100	UDP-Glc>ADP-Glc
<b>Animales GT3</b>	<i>Homo sapiens</i> GYS1	737	26,9	UDP-Glc
	<i>Homo sapiens</i> GYS2	703	29	UDP-Glc
	<i>Mus musculus</i>	704	25,3	UDP-Glc
<b>Hongos GT3</b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> GYS 1	708	24,6	UDP-Glc
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> GYS 2	705	24,2	UDP-Glc
	<i>Neurospora crassa</i>	706	25,9	UDP-Glc>>ADP-Glc
<b>Bacteroidetes GT3</b>	<i>Prevotella intermedia</i>	549	20,1	ADP~TDP> UDP-Glc
	<i>Emericella nidulans</i>	622	24,7	
	<i>Moraxella catarrhalis</i>	607	21,3	
<b>Plantas y algas GT5</b>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	792	10,4	ADP-Glc
	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	645	4,6	ADP-Glc
<b>Bacterias GT5</b>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	387	11,3	ADP-Glc
	<i>Escherichia coli</i>	477	9,7	ADP-Glc
	<i>Nitrosomonas europaea</i>	495	8,4	ADP-Glc
<b>Arqueas GT5</b>	<i>Pyrococcus furiosus</i>	451	7,7	ADP~UDP>GDP>TDP-Glc
	<i>Pyrococcus abyssi</i>	440	8,4	ADP/UDP-Glc

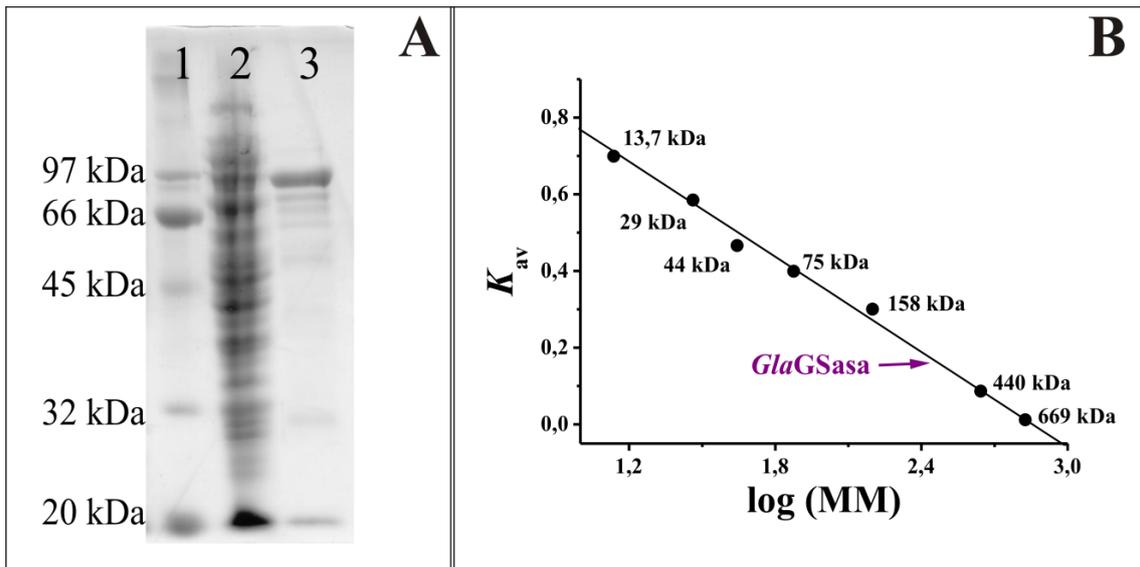
**Tabla VII.2.1. Comparación de la secuencia peptídica de la *GlaGSasa* con diferentes glicosiltransferasas de las familias GT3 y GT5.**

VII.2.1.2. Obtención de la *GlaGSasa* en forma recombinante

El genoma de *G. lamblia* ha sido completamente secuenciado (Morrison y col., 2007; Aurrecochea y col., 2009) y de acuerdo al análisis en la base de datos del mismo existe un único gen (*gsasa*, 2262 pb) que codifica para la GSasa. En base a esto, se diseñaron cebadores específicos (Tabla VII.2.2) para su amplificación, mediante PCR y a partir del ADN genómico de *G. lamblia* ATCC50803. Después de confirmar su identidad por secuenciación de ADN, el producto amplificado fue clonado en el vector de expresión pRSETA. La construcción se utilizó para transformar células de *E. coli* BL21 (DE3) y de esta manera producir en forma recombinante la *GlaGSasa*. Mediante esta expresión heteróloga fue posible obtener la enzima en forma soluble (Figura VII.2.2 A, carril 2) y purificarla en un único paso cromatográfico de IMAC ( $\text{Ni}^{2+}$ ), obteniéndose un alto grado de pureza ( $> 90\%$ ) a juzgar por el análisis en SDS-PAGE (Figura VII.2.2 A, carriles 3). Para la determinación de la estructura cuaternaria de la enzima, se realizó una cromatografía de filtración por gel en Superdex 200. La *GlaGSasa* eluyó como un único pico correspondiente a una MM de  $\sim 250$  kDa (Figura VII.2.2 B), lo cual indicaría que la enzima adopta una conformación nativa de trímero.

Primer	Secuencia de oligonucleótido	Sitio de corte	T <sub>A</sub> (°C)	t <sub>E</sub> (min)
<i>gsasa</i> Fo	5' - <u>GGATCC</u> ATGGAGGAGGAGCAGATGTA- 3'	<i>Bam</i> HI	60	2,5
<i>gsasa</i> Re	5' - <u>GGTACC</u> TCAGTTGAAATGCTTTCTCCG- 3'	<i>Kpn</i> I	58	2,5

**Tabla VII.2.2. Secuencia de oligonucleótidos específicos para la amplificación del gen *gsasa* de *G. lamblia*.** Los sitios de restricción utilizados para la estrategia de clonado se muestran subrayados. T<sub>A</sub>, temperatura de apareamiento y t<sub>E</sub>, tiempo de elongación.



**Figura VII.2.2. Determinación la estructura de la GSasa.** (A) SDS-PAGE de la GSasa de *G. lamblia* producida en forma recombinante. Carril 1: marcadores de MM; carril 2: expresión de la GSasa en el extracto crudo; carril 3: la GSasa purificada. (B) Determinación de la MM de la enzima mediante cromatografía de filtración por geles.

### VII.2.1.3. Caracterización cinética de la GlaGSasa

Algunos estudios (Ladeira y col., 2005; Pradhan y col., 2012) han demostrado que *G. lamblia* acumula glucógeno y este polisacárido serviría como una reserva de energía en los trofozoítos jugando un papel crítico en su diferenciación a las formas del quiste. Si bien ha sido posible caracterizar que el producto almacenado es glucógeno (Pradhan y col., 2012) e incluso medir en extractos del parásito la actividad de algunas enzimas involucradas en el metabolismo de este compuesto (Ladeira y col., 2005; Pradhan y col., 2012), en estos trabajos no fue posible detectar la actividad de la GlaGSasa. La producción de la enzima en forma recombinante nos permitió realizar la

caracterización cinética de la misma y ampliar así el panorama de la principal vía de almacenamiento de energía en este microorganismo.

En primer lugar, se estableció el pH óptimo de la reacción, evaluando la actividad enzimática en un rango entre 6,0 y 9,5. Como se muestra en la Figura VI.2.3, la actividad de la enzima fue decreciendo hacia los extremos del rango, haciéndose prácticamente nula a pH 6,0 y a pH 9,5 y presentando un pico de actividad a pH 7,5. A partir de estos resultados se procedió a la caracterización cinética utilizando el pH 7,5 como condición óptima de medida. De acuerdo a la homología con GSasas eucariotas, la enzima de *Giardia* utilizaría UDP-Glc como donador glucosilo, por lo que en primer lugar se realizó la caracterización con este NDP-Glc. La  $V_{\max}$  determinada para la enzima de *G. lamblia* fue de 2 U/mg y los valores de  $S_{0,5}$  calculados para los sustratos fueron 0,7 mM para la UDP-Glc y 0,8 mM para el glucógeno (Tabla VII.2.3). La enzima exhibió un comportamiento hiperbólico en la curva de saturación de la UDP-Glc; mientras que para el otro sustrato se observó una curva ligeramente sigmoidea, denotando un comportamiento de cooperatividad positiva (Tabla VII.2.3).

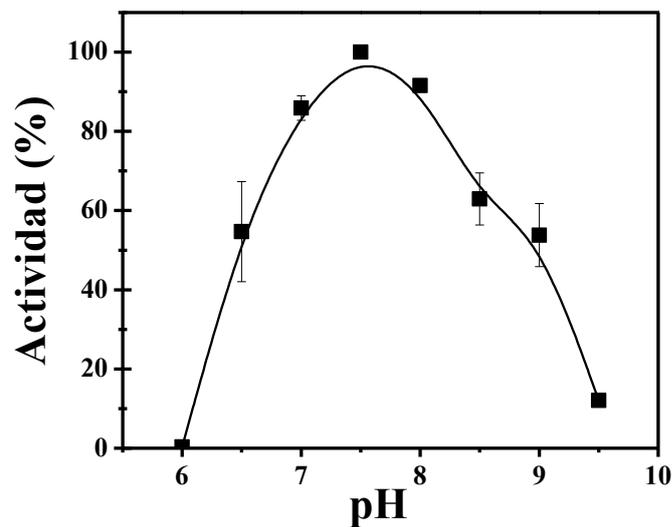
En general, las GSasas pertenecientes a la familia GT3 se caracterizan por ser específicas para el uso de UDP-Glc. Sin embargo, la *Gla*GSasa exhibió actividad utilizando también ADP-Glc como dador glucosilo. Para esta reacción se observó una disminución de la  $V_{\max}$  de ~10 veces respecto a la reacción catalizada con UDP-Glc (Tabla VII.2.3). El  $S_{0,5}$  para la ADP-Glc fue menor que para el otro NDP-Glc, mientras que para el glucógeno aumentó ligeramente (Tabla VII.2.3). Los valores de  $n$  determinados para ambos sustratos disminuyeron, indicando una cooperatividad negativa para los mismos (Tabla VII.2.3). De esta forma, comparando las eficiencias catalíticas ( $V_{\max}/S_{0,5}$ ) de la enzima para el uso de los NDP-Glc alternativos, se observa que la misma disminuye cuando la enzima utiliza ADP-Glc (Tabla VII.2.3). Además, se

evaluó la actividad de la *GlaGSasa* con TDP-Glc, pero este NDP-Glc no resultó ser utilizado como sustrato por la enzima. A diferencia de las PPasas de *G. lamblia* descritas en el capítulo anterior, donde la presencia de  $Mg^{2+}$  es requerido para que ocurra la reacción, el catión no es esencial para la actividad de la *GlaGSasa*. Sin embargo, la actividad de la enzima en presencia de 10 mM  $Mg^{2+}$  aumentó 2 veces respecto a la actividad en ausencia del catión. Este efecto del metal es similar a lo que se ha observado para otras GSasas (Nakai y Thomas, 1975; Huang y Robinson, 1976; Haverstick y Gold, 1980).

Se sabe que en mamíferos y hongos el punto de regulación de la vía de síntesis del glucógeno está dado a nivel de la GSasa. Estas enzimas son inhibidas/activadas mediante el mecanismo de regulación post-traducciona l de fosforilación/desfosforilación. Además, en su mayoría, son activadas alostéricamente por la Glc-6P. Es así que se ensayaron concentraciones crecientes del metabolito (hasta 20 mM) en la reacción de la *GlaGSasa*. El azúcar no resultó ser un efector para la enzima de *Giardia* bajo las condiciones ensayadas. Además, se ensayaron diferentes metabolitos que pudieran actuar como efectores: Glc, Glc-1P, Fru-1,6-bisP, Fru-6P, 3-PGA, ATP, P<sub>i</sub> y Pi. A excepción del Pi, ninguno de estos compuestos modificó la actividad de la enzima. El Pi, en cambio, resultó un inhibidor débil de la *GlaGSasa* que a concentraciones de 1,5 mM disminuyó en un 50% la actividad enzimática (Figura VII.2.4).

En un estudio que permita establecer un panorama más claro de la regulación de la ruta metabólica del glucógeno no habría que descartar la posibilidad de que la actividad de la *GlaGSasa* fuese modulada mediante fosforilación, como ocurre en las enzimas de hongos y animales. Si bien durante el trabajo de esta tesis no se ha logrado realizar ensayos que permitan comprobar este tipo de regulación, el análisis de

predicción de sitios de fosforilación mostró que dentro de la secuencia de la *GlaGSasa* existen residuos que podrían ser susceptibles a este tipo de modificaciones post-traduccionales (Figura VII.2.5) e incluso dos de estos aminoácidos predichos como posibles blancos para la acción de las quinasas están conservados en las secuencias de las enzimas de humanos y levaduras (Figura VII.2.5). Los estudios necesarios para verificar esta hipótesis quedan como objetivos experimentales próximos de nuestro grupo.

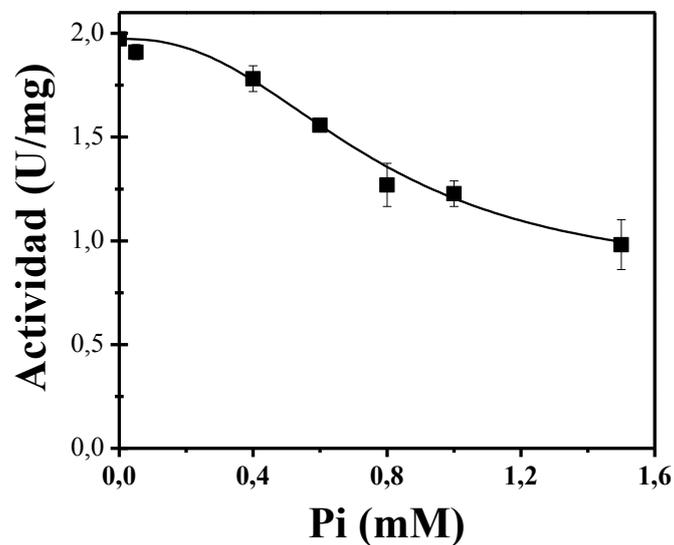


**Figura VI.2.3.** Actividad de la *GlaGSasa* a diferentes pH. Se midió la actividad GSasa utilizando UDP-Glc como dador glucosilo.

Sustrato	$S_{0,5}$ (mM)	$n$	$V_{\max}$ (U/mg)	$V_{\max}/S_{0,5}$ (U/mg mM)
UDP-Glc	$0,70 \pm 0,09$	1,0	$2,3 \pm 0,4$	3,5
Glucógeno	$0,80 \pm 0,08$	1,2		3,0
ADP-Glc	$0,40 \pm 0,06$	0,6	$0,21 \pm 0,02$	0,4
Glucógeno	$1,2 \pm 0,2$	0,9		0,2

**Tabla VII.2.3. Parámetros cinéticos de la *GlaGSasa* para los diferentes sustratos.**

Los parámetros fueron calculados a partir de datos promedio de tres experimentos independientes.



**Figura VII.2.4. Curva de inhibición de Pi para la *GlaGSasa*.** Se midió actividad GSasa utilizando UDP-Glc como sustrato en presencia de concentraciones crecientes de Pi.

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
Gla  -----MEEEQMYDVEGGPGPDVICMEFCYEVIVKVGGIETVVRTKAPAMVNEYGDNYFMVGPPLSWDDKDFATNFEEAERNEESEI---
Sce2  -----MSRDLQ-----NHLLEFETATEVANRVGGIYSVLKSKAPITVAQYKDYHLLIGPLN--KATYQNEVDILDWKKPEAFSDE
Sce1  -----MARDLQ-----NHLLEFVATEVTRVGGIYSVLKSKAPVTVAQYGDNYTLLGPLN--KATYESEVEKLDWEDESIFPEE
Hsa M  MPLNRTLMSSSLPGLEDWE-DEFDLE-----NAVLFVAVAWEVANKVGGIYTVLQTKAKVTGDEWGDNYFLVGPYT--EQGVRTQVELLEAPTPA----
Hsa L  MLRGRSLSVTSLGGLPQWEVEELPVE-----ELLLFEVAVAWEVTKVGGIYTVIQTAKAKTTADEWGENYFLIGPYF--EHNMKTQVEQCEPVNDA----

      110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
Gla  ---LYKLIDSFEARYGKIGVKYGRWLTAGNPQVFLLPMIYNSGTHFEHKIDHARNILRTACNLEIPNPGFGEREPIWNAFLFG-VVWGWCFVSHAMSFLF
Sce2  MRPVQHALQTMESR-GVH-FVYGRWLEI GAPKVI LFDLSVRGYSNEWKGD-----LWSLVGIPSPENDFETND-----AILLGYTVAW-FLGEV-AHLD
Sce1  LLPIQKTLMSMREK-GVN-FVYGNWLEI GAPRVILFELDLSVRHFLNEWKAD-----LWSLVGIPSPEDHDETND-----AILLGYVVVW-FLGEV-SKLD
Hsa M  ---LKRTLDSMNSK-GCK-VYFGRWLEI EGGLPVLLDVGASAWALERWKGE-----LWDICNIGVPWYDREAND-----AVLFGFLTW-FLGEFLAQSE
Hsa L  ---VRRAVDAMNKH-GCQ-VHFGRWLEI EGSPYVLLFDIGYSAWNLDRWKGD-----LWEACSVGIPYHDREAND-----MLIFGSLTAW-FLKEVTDHAD

      210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
Gla  TDVNVIMHSHIEWIGCVAQVLYSRNGNCEITGQRENHLHFLFTTHATTLGRHLSA-GNICLMDCLQVLKEKSADQCASHWDMEASRRKIAVEHRIERAAAHHT
Sce2  SQHAIVAHFHEWLAGVALPLCRK-----RRIDVVTIFTTHATTLGRYLCAAGSDFYNCLESV-----DVDHEAGRFGIYHRYCIERAAAHHS
Sce1  SSHAIIGHFHEWLAGVALPLCRK-----KRIDVVTIFTTHATTLGRYLCAAGVDYFNNLQYF-----DVDQEAGKRGIYHRYCIERAAAHHT
Hsa M  EKPHVVAHFHEWLAGVGLCLCRA-----RRLPVATIFTTHATTLGRYLCA-GAVDFYNNLENF-----NVDKEAGERQIYHRYCMERAAAHHC
Hsa L  GKY-VVAQFHEWQAGIGLILSRA-----RKLPIATIFTTHATTLGRYLCA-ANIDFYNNLDFK-----NIDKEAGERQIYHRYCMERASVHC
      ▲ ▲

      310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
Gla  ADVFTTVSEITGREAEFLGKTPDVITYNGMDVDSARSVGS DIGASHSYHKGILDFCRGHFYGT-TFNPEKTIIFISAGRLEYKNKGDMFLDALHSLN
Sce2  ADVFTTVSQITAFEAHLLKRPDPGILPNGLNVKIQAF-HEFQNLHALKKEKINDFVRGHFHGCFDFDL DNTLYFFIAGRYEYKNKGADMFI EALARLN
Sce1  ADVFTTVSQITALEAEHLLKRPDPGILPNGLNVKIQAV-HEFQNLHALKDKINDFVRGHFHGCFDFDL DNTVYFFIAGRYEYKNKGADMFI ESLARLN
Hsa M  AHVFTTVSQITAEAQHLLKRPDI VTPNGLNVKQFSAM-HEFQNLHAQSKARIOEFVRGHFYGHLD FNLDKTLYFFIAGRYEFSNKGADVFLEALARLN
Hsa L  AHVFTTVSEITAIEAEHMLKRPDVVTPNGLNVKQFSAV-HEFQNLHAMYKARIOEFVRGHFYGHLD FDL EKTFLFIAGRYEFSNKGADIFLESLSRLN

      410     420     430     440     450     460     470     480     490     500
Gla  ERFFRDPLEEDYKDITVVGII IAPSQVSQYQVDTLKGISLMQEI KDCRLLANKISTNLVDLLTNTALSQNLASL--TLGDILSKNDIVLMKRCQQSYAS
Sce2  YR-----LKVSGSKKTVVAFIVMPAKNNSFTVEALKQA EVRALENTVHEVTTSIGKRIFDHAI RYPHNGLTTELPTDLGELLKSSDKVMLKRRILALRR
Sce1  YR-----LKVSGSKKTVVAFIIMPAKTNSFTVEALKSQAIVKSL ENTVNEVTASIGKRIFEHTMRYPHNGLESELPTNLDELLKSSSEKVL LKRRV LALRR
Hsa M  YL-----LRVNGSEQTVVAFFIMPARTN FNVE TLKGQAVRKQLWD TANTVKEKFGKRKLYESLLV-----GSLP-DMNKMLDKEDFTMMKRAIFATQR
Hsa L  FL-----LRMHKSDITVVFVFI MPAKTNNFNVE TLKGQAVRKQLWDVAHSVKEKFGK KLYDALLR-----GEIP-DLNDILDRDDLTIMKRAIFSTQR

      510     520     530     540     550     560     570     580     590     600
Gla  R-NNLPSIMTHTLRDP SLQDATEPILVRMRELGLVNQKESRVKVVWIP E FVSKTSPV-GLDYNEFTLGGSLGVFCSLYEPWGYTSP ECCCAGTSPSIVSNL
Sce2  PEGQLPPIVTHNMVD---DANDLILNKIRQVQLFN SPSDRVKMIFHPEFLNANNPILGLDYDEFVRGCHLGVFPSYEPWGYTPAECTVMGVP SITNV
Sce1  PYGELPPVVTHNMCD---DANDPILNQIRHVLFN DSSDRVKVIFHPEFLNANNPILGLDYDEFVRGCHLGVFPSYEPWGYTPAECTVMGVP SITNV
Hsa M  Q--SFPPVCTHNMLD---DSSDPILTIRRI GLFNSSADRVKVI FHP EFLSSTSPLLPVDYEEFVRGCHLGVFPSYEPWGYTPAECTVMGIP SITNL
Hsa L  Q--SLPPVTHNMID---DSTDPI LSTIRRI GLFNRRTRDKVILHPEFLSSTSPLLPMDYEEFVRGCHLGVFPSYEPWGYTPAECTVMGIP SVTTNL
      ▲

```

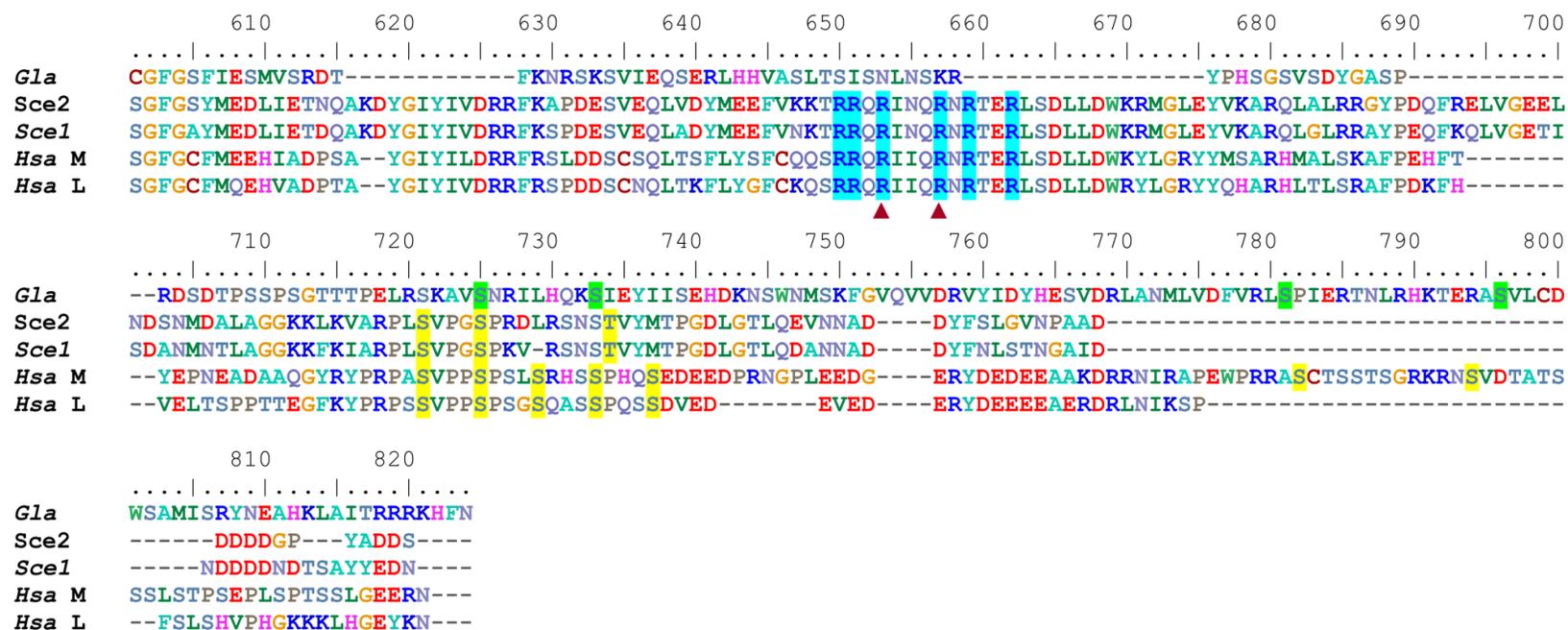


Figura VII.2.5. Alineamiento de secuencias de las GSasas de *G. lamblia* (*Gla*), *S. cereviceae* isoforma 1 (*Sce1*) *S. cereviceae* isoforma 2 (*Sce2*), y las GSasas de humano muscular (*Hsa M*) y de hígado (*Hsa L*). En amarillo se resaltan los residuos de Ser y Thr involucrados en la fosforilación de la enzima, y en verde alguno de los posibles sitios de fosforilación de la *Gla*GSasa. El motivo de regulación de Arg se muestra reasaltado en celeste. Los triángulos indican los residuos que interaccionan con la Glc-6P en el sitio de unión al ligando.

### VII.2.2. Discusión

Mediante técnicas de microscopía electrónica se ha determinado la acumulación de partículas de glucógeno en el citoplasma de trofozoítos de *Giardia* (Sogayar y Gregorio, 1991; Lanfredi-Rangel y col., 1999). Estas partículas fueron caracterizadas estructuralmente (Ladeira y col., 2005) e incluso estudiadas en su acumulación y degradación durante el ciclo de vida del microorganismo (Pradhan y col., 2012). Y si bien en estos trabajos se ha logrado ensayar la actividad de la glucógeno fosforilasa en los extractos crudos de cultivos, hasta el momento no ha sido posible detectar la actividad de la enzima encargada de la síntesis del polímero.

En la base de datos del genoma del parásito se identifica una secuencia que codifica para una GSasa putativa (*gsasa*). A partir de la expresión heteróloga de este gen en *E. coli* BL21 (DE3), se obtuvo la enzima en forma recombinante con alto grado de pureza. De esta forma, pudo realizarse la caracterización bioquímica de una GSasa funcionalmente activa de *G. lamblia*, perteneciente a la familia de glicosiltransferasas del tipo GT3. Se determinó una estructura cuaternaria activa trimérica y la enzima exhibió actividad utilizando tanto UDP-Glc como ADP-Glc como dador de grupo glucosilo para la elongación de una molécula preformada de glucógeno; aunque presentó mayor eficiencia catalítica con UDP-Glc. Además, a diferencia de las enzimas de mamíferos y hongos, la *GlaGSasa* no exhibió regulación alostérica por Glc-6P, ni otros metabolitos ensayados. Aunque fue ligeramente inhibida por Pi, disminuyendo su actividad en un 50% en presencia de 1,5 mM del mismo.

La familia GT3 agrupa principalmente las GSasas de hongos y mamíferos; además, en este grupo también se encuentran las GSasas bacterianas pertenecientes a la división taxonómica Bacteroidetes y las enzimas de protozoos parásitos. En tanto que dentro de las GT5 encontramos las secuencias correspondientes a las

glucógeno/almidón sintasa de fuentes bacterianas y vegetales y las secuencias de las enzimas de arqueas. Las proteínas de mamíferos y hongos se diferencian del resto de las GSasas en que utilizan preferentemente UDP-Glc como dador de residuo glucosilo y son finamente reguladas por fosforilación reversible y efectores alostéricos, principalmente Glc-6P (Horcajada y col., 2006; Voet y Voet, 2006; Baskaran y col., 2010; Roach y col., 2012); de esta forma, la regulación de la vía está dada directamente a nivel la enzima que elonga el glucano (Ball y col., 2011). Por el contrario, en bacterias y plantas estas enzimas no son reguladas y la producción del compuesto de reserva (glucógeno y almidón, respectivamente) es controlada en la reacción de síntesis de nucleótido-azúcar (ADP-Glc) (Ballicora y col., 2003, 2004; Preiss, 2009). En cambio las GSasas de arqueas son capaces de utilizar diferentes NDP-Glc como dador glucosilo y muy poco ha sido descrito sobre su regulación (Zea y Pohl, 2005; Horcajada y col., 2006).

La *GlaGSasa* pertenece a la familia de las GT3, comparte un 29% de identidad en la secuencia de aminoácidos con la enzima de hígado de humano y un ~25% con las secuencias de hongos, aunque un análisis filogenético mostró a la proteína evolutivamente cercana a las enzimas de Bacteroidetes. El estudio *in silico* y los resultados obtenidos *in vitro* (como el uso de ambos NDP-Glc, UDP- y ADP-Glc, y la falta de regulación alostérica por Glc-6P) indican características intermedias por parte de esta enzima. Si bien la *GlaGSasa* es capaz de utilizar ADP-Glc como sustrato alternativo, resulta importante considerar que dentro del genoma de *Giardia* no hay un gen que codifique para una ADP-Glc PPasa, como ocurre en la mayoría de organismos eucariotas heterótrofos y en algunas bacterias como *P. intermedia* (Machtley, 2012). En nuestro grupo de trabajo se ha caracterizado a la GSasa de este microorganismo que comparte un 20% de identidad con la *GlaGSasa* y es capaz de utilizar diferentes

donantes glucosilos en la reacción, aunque tiene una mayor eficiencia catalítica para el uso de ADP-Glc (y TDP-Glc) que para el de UDP-Glc (Machtey, 2012). En el genoma de *P. intermedia* no se encuentra un gen para la enzima encargada de la síntesis de ADP-Glc, por lo que se propone que la TDP-Glc actuaría como glucosilo en esta bacteria. Sin embargo, en *Giardia* tampoco hay un gen que codifique para una timidililtransferasa y no se detectó actividad de la *GlaGSasa* utilizando este NDP-Glc. En el caso de *N. crassa*, se ha informado (Fontana y Krisman, 1978) la síntesis de glucógeno utilizando tanto UDP- como ADP-Glc, aunque el primero mostró ser un mejor sustrato para la producción del polímero. Pero a diferencia de la *GlaGSasa* la enzima de este organismo es regulada alostéricamente por Glc-6P (Fontana y Krisman, 1978; Takahara y Matsuda, 1978). Por otro lado, estudios realizados en extractos de *E. histolytica* (Takeuchi y col., 1977) mostraron que la actividad de la *GSasa* no se modificaba en presencia de este azúcar-P, por lo que es posible que este tipo de regulación se encuentre únicamente en enzimas de organismos eucariotas superiores y no en las de protozoos.

Mediante estudios estructurales de la isoforma 2 de la *GSasa* de levadura [*Gsy2p*; (Baskaran y col., 2010)] ha sido determinado el sitio de unión al efector, Glc-6P. Estos residuos involucrados en la interacción de la enzima con el activador forman un motivo que se encuentra conservado en todas las *GSasas* de eucariotas superiores; este motivo se encuentra sobre la superficie entre las subunidades, lo cual es esperable para un ligando alostérico que induce cambios conformacionales tan grandes (Baskaran y col., 2010). La estructura cristalina de la *Gsy2p* activada con Glc-6P (PDB: 3NB0) mostró al dominio -6P del ligando completamente secuestrado en un bolsillo de unión que comprende cinco residuos ( $\text{His}^{286}$ ,  $\text{Lys}^{290}$ ,  $\text{His}^{500}$ ,  $\text{Arg}^{583}$  y  $\text{Arg}^{587}$ ) conservados en todas las secuencias de eucariotas (Baskaran y col., 2010). Además, se

identificaron en la región C-terminal de las enzimas GSasas eucariotas un grupo de seis residuos de arginina altamente conservadas que median la sensibilidad de las enzimas a la Glc-6P y la fosforilación (Pederson y col., 2000). Los miembros del grupo GT5 carecen de estas argininas conservadas y no están sujetos a estos mecanismos de regulación. La comparación de secuencias de la *GlaGSasa* con enzimas eucariotas muestra que la mayoría de estos residuos tampoco están conservados en la enzima del parásito, lo que da un indicio de la falta de regulación alostérica por la Glc-6P.

Además de la activación por la Glc-6P, se sabe que en las enzimas GT3 eucariotas se producen modificaciones post-traduccionales que modulan su actividad. La acción de quinasas en determinados residuos de Ser/Thr inhiben a las GSasas (Roach, 2002). En levadura, la fosforilación se produce en residuos conservados de Ser localizados hacia el C-terminal, mientras que en las GSasas de mamíferos los sitios de fosforilación conocidos se sitúan hacia el N- y hacia el C-terminal (Baskaran y col., 2010). En todos los casos, la inhibición puede ser superada por el activador alostérico Glc-6P o invertida por la acción de Ser/Thr fosfatasas (Roach, 2002). En comparación con otros organismos eucariotas el conjunto de proteínas involucradas en los procesos de fosforilación presentes en *G. lamblia* es el más pequeño y evolutivamente divergente (Manning 2011). Sin embargo, dentro de las quinasas y fosfatasas presentes se encuentran algunas enzimas involucradas en la regulación de diversos metabolismos (Manning y col., 2011). El análisis de predicción de sitios de fosforilación mostró que dentro de la secuencia de la *GlaGSasa* existen residuos que serían susceptibles a este tipo de modificaciones post-traduccionales e incluso algunos de estos se encuentran conservados en las enzimas de humanos y levaduras, pero no en la de *P. intermedia*. Si bien son necesarios más estudios para establecer una regulación por fosforilación, es

factible pensar que este tipo de modificación post-traduccionaI podría ocurrir dentro del parásito para modular la actividad de la *GlaGSasa*.

La enzima de *Giardia* exhibió inhibición por Pi. Ya ha sido observado esta misma propiedad en la enzima de mamífero (Lin y col., 1972; Moses y col., 1972; Nakai y Thomas, 1975; Haverstick y Gold, 1980; Nuttall y Gannon, 1993), por lo que podría considerarse una característica importante en la regulación de las GSasas GT3 que es compartida por la *GlaGSasa*.

En su conjunto, los resultados muestran que la *GlaGSasa* exhibió propiedades distintivas en comparación con otras GSasas de la familia GT3 descritas hasta el momento. Posee características que podrían considerarse intermedias entre las de enzimas de bacterias y de eucariotas. De esta manera, los resultados contribuyen a un mejor conocimiento del metabolismo del parásito y también establecen aportes relacionados con el análisis evolutivo de estas enzimas. Por otra parte, la novedad de las propiedades de la *GlaGSasa* abre una serie de interrogantes que serán relevantes de responder en el trabajo a futuro en nuestro laboratorio.

## VIII. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta tesis nos han permitido arribar a las siguientes conclusiones:

- Se desarrollaron y se optimizaron sistemas de expresión para la obtención recombinante de distintas enzimas, de bacterias y protozoos, relacionadas con el metabolismo de los hidratos de carbono, particularmente los poliglucanos de reserva y la partición de Glc-1P. En la mayoría de los casos, los sistemas de expresión logrados nos permitieron obtener las enzimas fusionadas a una etiqueta de histidinas que permitió purificarlas en un único paso, con altos rendimientos y grado de pureza, superando así lo complicado que resulta la purificación a homogeneidad en cantidades relativamente elevadas de las enzimas a partir de fuente. Además, el disponer de un sistema de expresión inducible y que permite purificar la proteína de manera sencilla hizo factible el diseño, expresión y purificación de mutantes en determinados residuos aminoácidos para estudiar su función en la actividad o regulación de cada enzima. En el caso particular de la ADP-Glc PPasa y la GalU de *E. coli*, con la estrategia utilizada no fue posible la expresión de las mismas fusionadas a una etiqueta de histidinas. Sin embargo, la sobre-expresión de las proteínas recombinantes en forma homóloga permitió obtenerlas en un alto grado de pureza mediante dos pasos cromatográficos de intercambio iónico.

- A modo general, se profundizó el estudio de las propiedades cinéticas, regulatorias y estructurales de las enzimas involucradas en la partición de Glc-1P de procariontas. El presente trabajo de tesis contribuye a incrementar el conocimiento sobre las propiedades funcionales y estructurales de la ADP-Glc PPasa y las UDP-Glc PPasas de *E. coli*:

- En la ADP-Glc PPasa de *E. coli*, modelo de estudio de este grupo de enzimas, se determinó un cierto grado de promiscuidad respecto al uso de sustratos alternativos. Siendo que estas enzimas siempre han sido vistas como altamente específicas, los resultados obtenidos abren las puertas a reevaluar su actividad y propiedades regulatorias con sustratos variados. Lo que resulta más importante aún es el efecto de los activadores alostéricos (Fru-1,6-bisP y Pyr), ya que incrementan la eficiencia catalítica de la enzima para el uso de ATP, pero no para los otros NTP. Además, los parámetros cinéticos para Glc-1P y  $Mg^{2+}$  cambian solamente cuando la reacción transcurre con ATP. Es decir, la Fru-1,6-bisP tiene un efecto “selectivo” sobre el NTP, incrementando la eficiencia de la reacción sólo cuando se utiliza el correcto (ATP) y de esta manera aumenta la especificidad de la enzima. Con respecto al uso de los azúcares-1P alternativos, el efector incrementó la eficiencia catalítica para el uso de todos los monosacáridos ensayados, aunque la misma siempre fue mayor utilizando Glc-1P. El uso de cationes divalentes distintos del  $Mg^{2+}$  ( $Co^{2+}$  y  $Mn^{2+}$ ) incrementó el fenómeno de promiscuidad de la *EcoADP-Glc PPasa* ya que la  $V_{max}$  determinada cuando la reacción transcurre con UTP y estos metales ( $Co^{2+}$  y  $Mn^{2+}$ ) fue mayor, pero en presencia del efector no hubo cambios en los parámetros cinéticos determinados. Por lo cual, el efecto del activador resultó en el incremento de la eficiencia catalítica del uso del ATP, independientemente del cofactor utilizado. Estos resultados plantean que el activador alostérico jugaría un papel crítico en la determinación del uso específico de ATP como sustrato, favoreciendo así la síntesis de ADP-Glc necesaria para el metabolismo organismo. Este punto de vista de los efectores como una herramienta para aumentar la especificidad de la enzima abre nuevas perspectivas para la comprensión de los mecanismos de

regulación alostérica y posibles eventos evolutivos de las ADP-Glc PPasas, así como también para otras enzimas.

- Por otro lado, se determinó que GalF es una UDP-Glc PPasa funcionalmente activa, contrariamente a lo que estaba informado. Aunque la eficiencia catalítica para esta isoforma resultó sustancialmente inferior a la de GalU. A pesar de que ambas enzimas comparten más del 50% de identidad en su secuencia de aminoácidos y de que muchos de los residuos claves para la actividad están presentes en GalF, las proteínas presentan diferencias que podrían ser las responsables de las propiedades distintivas. Los ensayos realizados en este trabajo de tesis y la producción de mutantes puntuales nos permitieron determinar que la baja actividad de GalF es consecuencia de la ausencia de residuos clave, sumado a la presencia de residuos que afectan a su interacción con los sustratos, así como también la diferencia en la conformación activa que cada una presenta. Los resultados sugieren que el ancestro común de GalU y GalF era una subunidad activa y la actividad catalítica de la última resultó marcadamente reducida por mutaciones en residuos esenciales. Este proceso posiblemente involucra eventos evolutivos que condujeron a la enzima a una función diferente dentro del microorganismo, como por ejemplo actuar como subunidad reguladora.

- Por otro lado, se realizó el estudio de las propiedades cinéticas, regulatorias y estructurales de las enzimas involucradas en la síntesis del poliglucano de reserva en *G. lamblia*. El presente trabajo de tesis contribuye a incrementar el conocimiento sobre las propiedades funcionales y estructurales de la UDP-Glc PPasa y GSasa de este parásito:

- Los resultados sugieren que en *G. lamblia* la UDP-Glc PPasa es regulada mediante un mecanismo post-traducciona l de tipo redox; además, presenta propiedades

distintivas a las UDP-Glc PPasas de otros protozoos previamente estudiados, ya que la enzima exhibe la capacidad de sintetizar UDP-Glc y UDP-Gal y de utilizar TTP como sustrato alternativo al UTP. De esta forma, jugaría un papel clave proporcionando sustratos a las glicosiltransferasas para la producción de oligo- y poli-sacáridos. Por un lado, este organismo acumula glucógeno como fuente de carbono y energía que permiten la supervivencia y diferenciación de las células. Pero además, la Glc es utilizada en la síntesis de estructuras glicosídicas que forman parte de la membrana de trofozoítos y quistes. Con lo cual la UDP-Glc es un metabolito de gran relevancia en la utilización de este azúcar. Por otro lado, estas estructuras presentes en la membrana presentan un contenido relativamente alto de Gal, por lo que la activación de este azúcar resulta de gran importancia en la fisiología del parásito. Siendo que la vía de Leloir se ve interrumpida por la ausencia de una de las enzimas que forman parte de la misma (GalT), la capacidad de utilizar Gal-1P de la *Gla*UDP-Glc PPasa sería clave en el metabolismo del parásito. Las propiedades de la *Gla*UDP-Glc PPasa caracterizados en el presente trabajo apoyan firmemente que el metabolismo de los hidratos de carbono que utilizan UDP-Glc y UDP-Gal podría ser controlado estrictamente en dependencia de los niveles de metabolitos redox en el medio ambiente intracelular y contribuye como un nuevo ejemplo de la posible ocurrencia de un mecanismo redox para modular el metabolismo de carbohidratos en protozoos.

- Se llevó a cabo la caracterización bioquímica de la *Gla*GSasa. La proteína recombinante exhibió una estructura cuaternaria de trímero y fue capaz de utilizar tanto UDP-Glc como ADP-Glc como donador glucosilo, aunque el primero resultó ser el sustrato preferencial. La actividad de la *Gla*GSasa fue inhibida por la presencia de Pi, pero no exhibió regulación alostérica por ninguno de los otros

metabolitos ensayados. Es así que no fue activada por la Glc-6P, como lo son las GSasas de hongos y mamíferos. Además, mediante estudios *in silico* se observó que en la secuencia de la enzima de *G. lamblia* están conservados residuos que podrían ser blancos de la acción de quinasas. Por lo que, en principio, la actividad de esta enzima podría ser modulada de mediante fosforilación reversible. Sin embargo, son necesarios más estudios para tener un claro panorama de la regulación de esta enzima. Hasta el momento no se ha informado la caracterización de ninguna GSasa de protozoos, siendo la enzima de *G. lamblia* la primera en ser expresada en forma recombinante y caracterizada cinéticamente. La enzima del parásito se ubica dentro de la familia de las GT3 y exhibe propiedades intermedias entre las proteínas de bacterias y de organismos eucariotas, lo cual la hace única entre todas las GSasas caracterizadas hasta el momento.

Con todo, los resultados de este trabajo de tesis proporcionan un importante aporte al entendimiento del metabolismo de la síntesis de carbohidratos relevantes en bacterias y protozoos y a la relación estructura/función y regulación de las enzimas implicadas en el mismo.

## IX. BIBLIOGRAFÍA

- Abascal, F., Zardoya, R. y Posada, D. (2005). *ProtTest: selection of best-fit models of protein evolution*. *Bioinformatics* 21(9): 2104-2105.
- Adam, R.D. (2001). *Biology of Giardia lamblia*. *Clin Microbiol Rev* 14(3): 447-475.
- Ahluwalia, D., Bienstock, R.J. y Schaaper, R.M. (2012). *Novel mutator mutants of E. coli nrdAB ribonucleotide reductase: insight into allosteric regulation and control of mutation rates*. *DNA Repair (Amst)* 11(5): 480-487.
- Alonso, M.D., Lomako, J., Lomako, W.M. y Whelan, W.J. (1995). *A new look at the biogenesis of glycogen*. *Faseb J* 9(12): 1126-1137.
- Anderson, C. y Tatchell, K. (2001). *Hyperactive glycogen synthase mutants of Saccharomyces cerevisiae suppress the glc7-1 protein phosphatase mutant*. *J Bacteriol* 183(3): 821-829.
- Ando, N., Brignole, E.J., Zimanyi, C.M., Funk, M.A., Yokoyama, K., Asturias, F.J., Stubbe, J. y Drennan, C.L. (2011). *Structural interconversions modulate activity of Escherichia coli ribonucleotide reductase*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(52): 21046-21051.
- Asencion Diez, M.D., Aleanzi, M.C., Iglesias, A.A. y Ballicora, M.A. (2014). *A novel dual allosteric activation mechanism of Escherichia coli ADP-glucose pyrophosphorylase: the role of pyruvate*. *PLoS One* 9(8): e103888.
- Asencion Diez, M.D., Ebrecht, A.C., Martinez, L.I., Aleanzi, M.C., Guerrero, S.A., Ballicora, M.A. y Iglesias, A.A. (2013). *A Chimeric UDP-Glucose Pyrophosphorylase Produced by Protein Engineering Exhibits Sensitivity to Allosteric Regulators*. *Int J Mol Sci* 14(5): 9703-9721.
- Asencion Diez, M.D., Peiru, S., Demonte, A.M., Gramajo, H. y Iglesias, A.A. (2012). *Characterization of recombinant UDP- and ADP-glucose pyrophosphorylases and glycogen synthase to elucidate glucose-1-phosphate partitioning into oligo- and polysaccharides in Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol* 194(6): 1485-1493.
- Aurrecoechea, C., Brestelli, J., Brunk, B.P., Carlton, J.M., Dommer, J., Fischer, S., Gajria, B., Gao, X., Gingle, A., Grant, G., Harb, O.S., Heiges, M., Innamorato, F., Iodice, J., Kissinger, J.C., Kraemer, E., Li, W., Miller, J.A., Morrison, H.G., Nayak, V., Pennington, C., Pinney, D.F., Roos, D.S., Ross, C., Stoeckert, C.J., Jr., Sullivan, S., Treatman, C. y Wang, H. (2009). *GiardiaDB and TrichDB: integrated genomic resources for the eukaryotic protist pathogens Giardia lamblia and Trichomonas vaginalis*. *Nucleic Acids Res* 37(Database issue): D526-530.
- Ball, S., Colleoni, C., Cenci, U., Raj, J.N. y Tirtiaux, C. (2011). *The evolution of glycogen and starch metabolism in eukaryotes gives molecular clues to understand the establishment of plastid endosymbiosis*. *J Exp Bot* 62(6): 1775-1801.
- Ballicora, M.A., Dubay, J.R., Devillers, C.H. y Preiss, J. (2005). *Resurrecting the ancestral enzymatic role of a modulatory subunit*. *J Biol Chem* 280(11): 10189-10195.
- Ballicora, M.A., Erben, E.D., Yazaki, T., Bertolo, A.L., Demonte, A.M., Schmidt, J.R., Aleanzi, M., Bejar, C.M., Figueroa, C.M., Fusari, C.M., Iglesias, A.A. y Preiss, J. (2007). *Identification of regions critically affecting kinetics and allosteric regulation of the Escherichia coli ADP-glucose pyrophosphorylase by modeling and pentapeptide-scanning mutagenesis*. *J Bacteriol* 189(14): 5325-5333.

- Ballicora, M.A., Frueauf, J.B., Fu, Y., Schurmann, P. y Preiss, J. (2000). *Activation of the potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase by thioredoxin*. J Biol Chem 275(2): 1315-1320.
- Ballicora, M.A., Iglesias, A.A. y Preiss, J. (2003). *ADP-glucose pyrophosphorylase, a regulatory enzyme for bacterial glycogen synthesis*. Microbiol Mol Biol Rev 67: 213-225.
- Ballicora, M.A., Iglesias, A.A. y Preiss, J. (2004). *ADP-glucose pyrophosphorylase: a regulatory enzyme for plant starch synthesis*. Photosynth Res 79(1): 1-24.
- Ballicora, M.A., Sesma, J.I., Iglesias, A.A. y Preiss, J. (2002). *Characterization of chimeric ADPglucose pyrophosphorylases of Escherichia coli and Agrobacterium tumefaciens. Importance of the C-terminus on the selectivity for allosteric regulators*. Biochemistry 41(30): 9431-9437.
- Barton, W.A., Lesniak, J., Biggins, J.B., Jeffrey, P.D., Jiang, J., Rajashankar, K.R., Thorson, J.S. y Nikolov, D.B. (2001). *Structure, mechanism and engineering of a nucleotidyltransferase as a first step toward glycorandomization*. Nat Struct Biol 8(6): 545-551.
- Baskaran, S., Roach, P.J., DePaoli-Roach, A.A. y Hurley, T.D. (2010). *Structural basis for glucose-6-phosphate activation of glycogen synthase*. Proc Natl Acad Sci U S A 107(41): 17563-17568.
- Bassford, P.J., Jr., Diedrich, D.L., Schnaitman, C.L. y Reeves, P. (1977). *Outer membrane proteins of Escherichia coli. VI. Protein alteration in bacteriophage-resistant mutants*. J Bacteriol 131(2): 608-622.
- Becker, A., Katzen, F., Puhler, A. y Ielpi, L. (1998). *Xanthan gum biosynthesis and application: a biochemical/genetic perspective*. Appl Microbiol Biotechnol 50(2): 145-152.
- Bejar, C.M., Ballicora, M.A., Iglesias, A.A. y Preiss, J. (2006a). *ADPglucose pyrophosphorylase's N-terminus: structural role in allosteric regulation*. Biochem Biophys Res Commun 343(1): 216-221.
- Bejar, C.M., Jin, X., Ballicora, M.A. y Preiss, J. (2006b). *Molecular architecture of the glucose 1-phosphate site in ADP-glucose pyrophosphorylases*. J Biol Chem 281(52): 40473-40484.
- Bilgen, T. (2004). *Metabolic Evolution and the origin of life. en: functional metabolism: regulation and adaptation*. New Jersey, USA.
- Biswas, S. y Biswas, I. (2006). *Regulation of the glucosyltransferase (gtfBC) operon by CovR in Streptococcus mutans*. J Bacteriol 188(3): 988-998.
- Blankenfeldt, W., Asuncion, M., Lam, J.S. y Naismith, J.H. (2000a). *The structural basis of the catalytic mechanism and regulation of glucose-1-phosphate thymidyltransferase (RmlA)*. Embo J 19(24): 6652-6663.
- Blankenfeldt, W., Giraud, M.F., Leonard, G., Rahim, R., Creuzenet, C., Lam, J.S. y Naismith, J.H. (2000b). *The purification, crystallization and preliminary structural characterization of glucose-1-phosphate thymidyltransferase (RmlA), the first enzyme of the dTDP-L-rhamnose synthesis pathway from Pseudomonas aeruginosa*. Acta crystallogr 56(11): 1501-1504.
- Bonafonte, M.A., Solano, C., Sesma, B., Alvarez, M., Montuenga, L., Garcia-Ros, D. y Gamazo, C. (2000). *The relationship between glycogen synthesis, biofilm formation and virulence in salmonella enteritidis*. FEMS Microbiol Lett 191(1): 31-36.
- Bonofiglio, L., Garcia, E. y Mollerach, M. (2005a). *Biochemical characterization of the pneumococcal glucose 1-phosphate uridylyltransferase (GalU) essential for capsule biosynthesis*. Curr Microbiol 51(4): 217-221.

- Bonofiglio, L., Garcia, E. y Mollerach, M. (2012). *The galU gene expression in Streptococcus pneumoniae*. FEMS Microbiol Lett 332(1): 47-53.
- Bonofiglio, L., Ojeda, M.I., de Mier, C., Vay, C., Famiglietti, A., Gutkind, G. y Mollerach, M. (2005b). *Phenotypic and genotypic characterization of macrolide resistant Streptococcus pneumoniae recovered from adult patients with community-acquired pneumonia in an Argentinian teaching hospital*. Int J Antimicrob Agents 25(3): 260-263.
- Bosco, M.B., Machtay, M., Iglesias, A.A. y Aleanzi, M. (2009). *UDPglucose pyrophosphorylase from Xanthomonas spp. Characterization of the enzyme kinetics, structure and inactivation related to oligomeric dissociation*. Biochimie 91(2): 204-213.
- Bourassa, L. y Camilli, A. (2009). *Glycogen contributes to the environmental persistence and transmission of Vibrio cholerae*. Mol Microbiol 72(1): 124-138.
- Bradford, M.M. (1976). *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem 72: 248-254.
- Brown, D.M., Upcroft, J.A. y Upcroft, P. (1993). *Cysteine is the major low-molecular weight thiol in Giardia duodenalis*. Mol Biochem Parasitol 61(1): 155-158.
- Brown, D.M., Upcroft, J.A. y Upcroft, P. (1996). *A thioredoxin reductase-class of disulphide reductase in the protozoan parasite Giardia duodenalis*. Mol Biochem Parasitol 83(2): 211-220.
- Brown, K., Pompeo, F., Dixon, S., Mengin-Lecreulx, D., Cambillau, C. y Bourne, Y. (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): 4096-4107.
- Bulik, D.A., Lindmark, D.G. y Jarroll, E.L. (1998). *Purification and characterization of UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase from encysting Giardia*. Mol Biochem Parasitol 95(1): 135-139.
- Buschiazzo, A., Ugalde, J.E., Guerin, M.E., Shepard, W., Ugalde, R.A. y Alzari, P.M. (2004). *Crystal structure of glycogen synthase: homologous enzymes catalyze glycogen synthesis and degradation*. Embo J 23(16): 3196-3205.
- Busi, M.V., Palopoli, N., Valdez, H.A., Fornasari, M.S., Wayllace, N.Z., Gomez-Casati, D.F., Parisi, G. y Ugalde, R.A. (2008). *Functional and structural characterization of the catalytic domain of the starch synthase III from Arabidopsis thaliana*. Proteins 70(1): 31-40.
- Cantarel, B.L., Coutinho, P.M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V. y Henrissat, B. (2009). *The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics*. Nucleic Acids Res 37(Database issue): D233-238.
- Cardenas, M.L., Rabajille, E. y Niemeyer, H. (1984). *Suppression of kinetic cooperativity of hexokinase D (glucokinase) by competitive inhibitors. A slow transition model*. Eur J Biochem 145(1): 163-171.
- Carranza, P.G. y Lujan, H.D. (2010). *New insights regarding the biology of Giardia lamblia*. Microbes Infect 12(1): 71-80.
- Cline, G.W., Rothman, D.L., Magnusson, I., Katz, L.D. y Shulman, G.I. (1994). *<sup>13</sup>C-nuclear magnetic resonance spectroscopy studies of hepatic glucose metabolism in normal subjects and subjects with insulin-dependent diabetes mellitus*. J Clin Invest 94(6): 2369-2376.
- Cornish-Bowden, A. y Cardenas, M.L. (2010). *Specificity of non-Michaelis-Menten enzymes: necessary information for analyzing metabolic pathways*. J Phys Chem B 114(49): 16209-16213.

- Crevillen, P., Ballicora, M.A., Merida, A., Preiss, J. y Romero, J.M. (2003). *The different large subunit isoforms of Arabidopsis thaliana ADP-glucose pyrophosphorylase confer distinct kinetic and regulatory properties to the heterotetrameric enzyme*. J Biol Chem 278(31): 28508-28515.
- Cupp-Vickery, J.R., Igarashi, R.Y., Perez, M., Poland, M. y Meyer, C.R. (2008). *Structural analysis of ADP-glucose pyrophosphorylase from the bacterium Agrobacterium tumefaciens*. Biochemistry 47(15): 4439-4451.
- Chang, H.Y., Huang, H.C., Lee, J.H. y Peng, H.L. (1999). *Characterization of a putative Pseudomonas UDP-glucose pyrophosphorylase*. Proc Natl Sci Coun Repub China B 23(2): 74-84.
- Cho, K.M., Lim, W.J., Math, R.K., Asraful Islam, S.M., Hong, S.J., Kim, H. y Yun, H.D. (2008). *Comparative analysis of the glg operons of Pectobacterium chrysanthemi PY35 and other prokaryotes*. J Mol Evol 67(1): 1-12.
- Damerow, S., Lamerz, A.C., Haselhorst, T., Fuhring, J., Zarnovican, P., von Itzstein, M. y Routier, F.H. (2010). *Leishmania UDP-sugar pyrophosphorylase: the missing link in galactose salvage?* J Biol Chem 285(2): 878-887.
- Daran, J.M., Bell, W. y Francois, J. (1997). *Physiological and morphological effects of genetic alterations leading to a reduced synthesis of UDP-glucose in Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiol Lett 153(1): 89-96.
- Daran, J.M., Dallies, N., Thines-Sempoux, D., Paquet, V. y Francois, J. (1995). *Genetic and biochemical characterization of the UGPI gene encoding the UDP-glucose pyrophosphorylase from Saccharomyces cerevisiae*. Eur J Biochem 233(2): 520-530.
- Decker, D., Meng, M., Gornicka, A., Hofer, A., Wilczynska, M. y Kleczkowski, L.A. (2012). *Substrate kinetics and substrate effects on the quaternary structure of barley UDP-glucose pyrophosphorylase*. Phytochemistry 79: 39-45.
- Degeest, B. y de Vuyst, L. (2000). *Correlation of activities of the enzymes alpha-phosphoglucomutase, UDP-galactose 4-epimerase, and UDP-glucose pyrophosphorylase with exopolysaccharide biosynthesis by Streptococcus thermophilus LY03*. Appl Environ Microbiol 66(8): 3519-3527.
- Dickmanns, A., Damerow, S., Neumann, P., Schulz, E.C., Lamerz, A.C., Routier, F.H. y Ficner, R. (2011). *Structural basis for the broad substrate range of the UDP-sugar pyrophosphorylase from Leishmania major*. J Mol Biol 405(2): 461-478.
- Diez, M.D., Ebrecht, A.C., Martinez, L.I., Aleanzi, M.C., Guerrero, S.A., Ballicora, M.A. y Iglesias, A.A. (2013). *A chimeric UDP-glucose pyrophosphorylase produced by protein engineering exhibits sensitivity to allosteric regulators*. Int J Mol Sci 14(5): 9703-9721.
- Edgar, R.C. (2004). *MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity*. BMC Bioinformatics 5: 113.
- Escalante, A., Wachter-Rodarte, C., Garcia-Garibay, M. y Farres, A. (1998). *Enzymes involved in carbohydrate metabolism and their role on exopolysaccharide production in Streptococcus thermophilus*. J Appl Microbiol 84(1): 108-114.
- Espada, J. (1962). *Enzymic synthesis of adenosine diphosphate glucose from glucose 1-phosphate and adenosine triphosphate*. Journal of Biological Chemistry 237: 3577-3581.
- Fairman, J.W., Wijerathna, S.R., Ahmad, M.F., Xu, H., Nakano, R., Jha, S., Prendergast, J., Welin, R.M., Flodin, S., Roos, A., Nordlund, P., Li, Z., Walz, T. y Dealwis, C.G. (2011). *Structural basis for allosteric regulation of human ribonucleotide reductase by nucleotide-induced oligomerization*. Nat Struct Mol Biol 18(3): 316-322.

- Figueroa, C.M., Esper, M.C., Bertolo, A., Demonte, A.M., Aleanzi, M., Iglesias, A.A. y Ballicora, M.A. (2011). *Understanding the allosteric trigger for the fructose-1,6-bisphosphate regulation of the ADP-glucose pyrophosphorylase from Escherichia coli*. *Biochimie* 93(10): 1816-1823.
- Figueroa, C.M., Kuhn, M.L., Falaschetti, C.A., Solamen, L., Olsen, K.W., Ballicora, M.A. y Iglesias, A.A. (2013). *Unraveling the activation mechanism of the potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase*. *PLoS One* 8(6): e66824.
- Fischer, E. (1984). *Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme*. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 27: 2985-2983.
- Flores-Diaz, M., Alape-Giron, A., Persson, B., Pollesello, P., Moos, M., von Eichel-Streiber, C., Thelestam, M. y Florin, I. (1997). *Cellular UDP-glucose deficiency caused by a single point mutation in the UDP-glucose pyrophosphorylase gene*. *J Biol Chem* 272(38): 23784-23791.
- Fontana, J.D. y Krisman, C.R. (1978). *Glycogen synthesis in the fungus Neurospora crassa*. *Biochim Biophys Acta* 540(2): 183-189.
- Foster, M.W., Hess, D.T. y Stamler, J.S. (2009). *Protein S-nitrosylation in health and disease: a current perspective*. *Trends Mol Med* 15(9): 391-404.
- Frey, P.A. (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): 461-470.
- Frueauf, J.B., Ballicora, M.A. y Preiss, J. (2001). *Aspartate residue 142 is important for catalysis by ADP-glucose pyrophosphorylase from Escherichia coli*. *J Biol Chem* 276(49): 46319-46325.
- Frueauf, J.B., Ballicora, M.A. y Preiss, J. (2002). *Alteration of inhibitor selectivity by site-directed mutagenesis of Arg(294) in the ADP-glucose pyrophosphorylase from Anabaena PCC 7120*. *Arch Biochem Biophys* 400(2): 208-214.
- Führing, J., Cramer, J.T., Routier, F.H., Lamerz, A.-C., Baruch, P., Gerardy-Schahn, R. y Fedorov, R. (2013). *Catalytic mechanism and allosteric regulation of UDP-glucose pyrophosphorylase from Leishmania major*. *ACS Catal.* 3(12): 2976-2985.
- Fukasawa, T., Jokura, K. y Kurahashi, K. (1962). *A new enzymic defect of galactose metabolism in Escherichia coli K-12 mutants*. *Biochem Biophys Res Commun* 7: 121-125.
- Fusari, C., Demonte, A.M., Figueroa, C.M., Aleanzi, M. y Iglesias, A.A. (2006). *A colorimetric method for the assay of ADP-glucose pyrophosphorylase*. *Anal Biochem* 352(1): 145-147.
- Gao, H. y Leary, J.A. (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): 269-275.
- Gardiol, A. y Preiss, J. (1990). *Escherichia coli E-39 ADP-glucose synthetase has different activation kinetics from the wild-type allosteric enzyme*. *Arch Biochem Biophys* 280(1): 175-180.
- Geisler, M., Wilczynska, M., Karpinski, S. y Kleczkowski, L.A. (2004). *Toward a blueprint for UDP-glucose pyrophosphorylase structure/function properties: homology-modeling analyses*. *Plant Mol Biol* 56(5): 783-794.
- Genevaux, P., Bauda, P., DuBow, M.S. y Oudega, B. (1999). *Identification of Tn10 insertions in the rfaG, rfaP, and galU genes involved in lipopolysaccharide core biosynthesis that affect Escherichia coli adhesion*. *Arch Microbiol* 172(1): 1-8.

- Georgelis, N., Shaw, J.R. y Hannah, L.C. (2009). *Phylogenetic analysis of ADP-glucose pyrophosphorylase subunits reveals a role of subunit interfaces in the allosteric properties of the enzyme*. *Plant Physiol* 151(1): 67-77.
- Gerlt, J.A. y Babbitt, P.C. (2001). *Divergent evolution of enzymatic function: mechanistically diverse superfamilies and functionally distinct suprafamilies*. *Annu Rev Biochem* 70: 209-246.
- Gest, H. (2003). *Microbes. An Invisible universe*. Washington, D.C., ASM Press
- Giraud, M.F. y Naismith, J.H. (2000). *The rhamnose pathway*. *Curr Opin Struct Biol* 10(6): 687-696.
- Gomez-Casati, D.F., Igarashi, R.Y., Berger, C.N., Brandt, M.E., Iglesias, A.A. y Meyer, C.R. (2001). *Identification of functionally important amino-terminal arginines of Agrobacterium tumefaciens ADP-glucose pyrophosphorylase by alanine scanning mutagenesis*. *Biochemistry* 40(34): 10169-10178.
- Gouy, M., Guindon, S. y Gascuel, O. (2010). *SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building*. *Mol Biol Evol* 27(2): 221-224.
- Gupta, S.K., Sowokinos, J.R. y Hahn, I.S. (2008). *Regulation of UDP-glucose pyrophosphorylase isozyme UGP5 associated with cold-sweetening resistance in potatoes*. *J Plant Physiol* 165(7): 679-690.
- Haldane, J.B.S. (1930). *Enzymes*. London, Longmans, Green.
- Halliwell, B. (2006). *Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life*. *Plant Physiol* 141(2): 312-322.
- Harding, N.E., Raffo, S., Raimondi, A., Cleary, J.M. y Ielpi, L. (1993). *Identification, genetic and biochemical analysis of genes involved in synthesis of sugar nucleotide precursors of xanthan gum*. *J Gen Microbiol* 139(3): 447-457.
- Hardy, T.A. y Roach, P.J. (1993). *Control of yeast glycogen synthase-2 by COOH-terminal phosphorylation*. *J Biol Chem* 268(32): 23799-23805.
- Haverstick, D.M. y Gold, A.H. (1980). *Comparative catalytic properties of liver glycogen synthases from adult and newborn rats*. *J Biol Chem* 255(4): 1351-1357.
- Helenius, A. y Aebi, M. (2004). *Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum*. *Annu Rev Biochem* 73: 1019-1049.
- Henze, K., Horner, D.S., Suguri, S., Moore, D.V., Sanchez, L.B., Muller, M. y Embley, T.M. (2001). *Unique phylogenetic relationships of glucokinase and glucosephosphate isomerase of the amitochondriate eukaryotes Giardia intestinalis, Spironucleus barkhanus and Trichomonas vaginalis*. *Gene* 281(1-2): 123-131.
- Hess, D.T., Matsumoto, A., Kim, S.O., Marshall, H.E. y Stamler, J.S. (2005). *Protein S-nitrosylation: purview and parameters*. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(2): 150-166.
- Hill, M.A., Kaufmann, K., Otero, J. y Preiss, J. (1991). *Biosynthesis of bacterial glycogen. Mutagenesis of a catalytic site residue of ADP-glucose pyrophosphorylase from Escherichia coli*. *J Biol Chem* 266(19): 12455-12460.
- Hill, M.A. y Preiss, J. (1998). *Functional analysis of conserved histidines in ADP-glucose pyrophosphorylase from Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* 244(2): 573-577.
- Ho, J.Y., Lin, T.L., Li, C.Y., Lee, A., Cheng, A.N., Chen, M.C., Wu, S.H., Wang, J.T., Li, T.L. y Tsai, M.D. (2011). *Functions of some capsular polysaccharide biosynthetic genes in Klebsiella pneumoniae NTUH K-2044*. *PLoS One* 6(7): e21664.

- Hofer, A., Crona, M., Logan, D.T. y Sjoberg, B.M. (2012). *DNA building blocks: keeping control of manufacture*. Crit Rev Biochem Mol Biol 47(1): 50-63.
- Holden, H.M., Rayment, I. y Thoden, J.B. (2003). *Structure and function of enzymes of the Leloir pathway for galactose metabolism*. J Biol Chem 278(45): 43885-43888.
- Horcajada, C., Guinovart, J.J., Fita, I. y Ferrer, J.C. (2006). *Crystal structure of an archaeal glycogen synthase: insights into oligomerization and substrate binding of eukaryotic glycogen synthases*. J Biol Chem 281(5): 2923-2931.
- Hossain, S.A., Tanizawa, K., Kazuta, Y. y Fukui, T. (1994). *Overproduction and characterization of recombinant UDP-glucose pyrophosphorylase from Escherichia coli K-12*. J Biochem 115(5): 965-972.
- Huang, K.P. y Robinson, J.C. (1976). *Purification and properties of the glucose-6-phosphate-dependent form of human placental glycogen synthase*. Arch Biochem Biophys 175(2): 583-589.
- Hugh, R. y Leifson, E. (1953). *The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram negative bacteria*. J Bacteriol 66(1): 24-26.
- Iglesias, A.A., Ballicora, M.A., Sesma, J.I. y Preiss, J. (2006). *Domain swapping between a cyanobacterial and a plant subunit ADP-glucose pyrophosphorylase*. Plant Cell Physiol 47(4): 523-530.
- Iglesias, A.A., Barry, G.F., Meyer, C., Bloksberg, L., Nakata, P.A., Greene, T., Laughlin, M.J., Okita, T.W., Kishore, G.M. y Preiss, J. (1993). *Expression of the potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase in Escherichia coli*. J Biol Chem 268(2): 1081-1086.
- Islam, B., Khan, S.N. y Khan, A.U. (2007). *Dental caries: from infection to prevention*. Med Sci Monit 13(11): RA196-203.
- Janssen, D.B., Dinkla, I.J., Poelarends, G.J. y Terpstra, P. (2005). *Bacterial degradation of xenobiotic compounds: evolution and distribution of novel enzyme activities*. Environ Microbiol 7(12): 1868-1882.
- Jensen, R.A. (1976). *Enzyme recruitment in evolution of new function*. Annu Rev Microbiol 30: 409-425.
- Ji, X., Tordova, M., O'Donnell, R., Parsons, J.F., Hayden, J.B., Gilliland, G.L. y Zimniak, P. (1997). *Structure and function of the xenobiotic substrate-binding site and location of a potential non-substrate-binding site in a class pi glutathione S-transferase*. Biochemistry 36(32): 9690-9702.
- Jiang, X.M., Neal, B., Santiago, F., Lee, S.J., Romana, L.K. y Reeves, P.R. (1991). *Structure and sequence of the rfb (O antigen) gene cluster of Salmonella serovar typhimurium (strain LT2)*. Mol Microbiol 5(3): 695-713.
- Jin, X., Ballicora, M.A., Preiss, J. y Geiger, J.H. (2005). *Crystal structure of potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase*. Embo J 24(4): 694-704.
- Kamata, K., Mitsuya, M., Nishimura, T., Eiki, J. y Nagata, Y. (2004). *Structural basis for allosteric regulation of the monomeric allosteric enzyme human glucokinase*. Structure 12(3): 429-438.
- Kasting, J.F. y Siefert, J.L. (2002). *Life and the evolution of Earth's atmosphere*. Science 296(5570): 1066-1068.
- Khersonsky, O., Roodveldt, C. y Tawfik, D.S. (2006). *Enzyme promiscuity: evolutionary and mechanistic aspects*. Curr Opin Chem Biol 10(5): 498-508.
- Kiel, J.A., Boels, J.M., Beldman, G. y Venema, G. (1994). *Glycogen in Bacillus subtilis: molecular characterization of an operon encoding enzymes involved in glycogen biosynthesis and degradation*. Mol Microbiol 11(1): 203-218.

- Kim, H., Choi, J., Kim, T., Lokanath, N.K., Ha, S.C., Suh, S.W., Hwang, H.Y. y Kim, K.K. (2010). *Structural basis for the reaction mechanism of UDP-glucose pyrophosphorylase*. *Molecules and cells* 29(4): 397-405.
- Kleczkowski, L.A., Decker, D. y Wilczynska, M. (2011a). *UDP-sugar pyrophosphorylase: a new old mechanism for sugar activation*. *Plant Physiol* 156(1): 3-10.
- Kleczkowski, L.A., Geisler, M., Ciereszko, I. y Johansson, H. (2004a). *UDP-glucose pyrophosphorylase. An old protein with new tricks*. *Plant Physiol* 134(3): 912-918.
- Kleczkowski, L.A., Geisler, M., Fitzek, E. y Wilczynska, M. (2011b). *A common structural blueprint for plant UDP-sugar-producing pyrophosphorylases*. *Biochem J* 439(3): 375-379.
- Kleczkowski, L.A., Martz, F. y Wilczynska, M. (2005). *Factors affecting oligomerization status of UDP-glucose pyrophosphorylase*. *Phytochemistry* 66(24): 2815-2821.
- Klena, J.D. y Schnaitman, C.A. (1993). *Function of the rfb gene cluster and the rfe gene in the synthesis of O antigen by Shigella dysenteriae 1*. *Mol Microbiol* 9(2): 393-402.
- Komeda, Y., Icho, T. y Iino, T. (1977). *Effects of galU mutation on flagellar formation in Escherichia coli*. *J Bacteriol* 129(2): 908-915.
- Konishi, Y., Tanizawa, K., Muroya, S. y Fukui, T. (1993). *Molecular cloning, nucleotide sequencing, and affinity labeling of bovine liver UDP-glucose pyrophosphorylase*. *J Biochem* 114(1): 61-68.
- Koo, H.M., Yim, S.W., Lee, C.S., Pyun, Y.R. y Kim, Y.S. (2000). *Cloning, sequencing, and expression of UDP-glucose pyrophosphorylase gene from Acetobacter xylinum BRC5*. *Biosci Biotechnol Biochem* 64(3): 523-529.
- Koplin, R., Arnold, W., Hotte, B., Simon, R., Wang, G. y Puhler, A. (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): 191-199.
- Koropatkin, N.M., Cleland, W.W. y Holden, H.M. (2005). *Kinetic and structural analysis of alpha-D-Glucose-1-phosphate cytidyltransferase from Salmonella typhi*. *J Biol Chem* 280(11): 10774-10780.
- Koropatkin, N.M. y Holden, H.M. (2004). *Molecular structure of alpha-D-glucose-1-phosphate cytidyltransferase from Salmonella typhi*. *J Biol Chem* 279(42): 44023-44029.
- Koshland, D.E. (1958). *Application of a Theory of enzyme specificity to protein synthesis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 44(2): 98-104.
- Koshland, D.E., Jr., Nemethy, G. y Filmer, D. (1966). *Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits*. *Biochemistry* 5(1): 365-385.
- Kostrewa, D., D'Arcy, A., Takacs, B. y Kamber, M. (2001). *Crystal structures of Streptococcus pneumoniae N-acetylglucosamine-1-phosphate uridylyltransferase, GlmU, in apo form at 2.33 Å resolution and in complex with UDP-N-acetylglucosamine and Mg(2+) at 1.96 Å resolution*. *J Mol Biol* 305(2): 279-289.
- Kuhn, M.L., Falaschetti, C.A. y Ballicora, M.A. (2009). *Ostreococcus tauri ADP-glucose pyrophosphorylase reveals alternative paths for the evolution of subunit roles*. *J Biol Chem* 284(49): 34092-34102.

- Kumar, A., Ghosh, P., Lee, Y.M., Hill, M.A. y Preiss, J. (1989). *Biosynthesis of bacterial glycogen. Determination of the amino acid changes that alter the regulatory properties of a mutant Escherichia coli ADP-glucose synthetase*. J Biol Chem 264(18): 10464-10471.
- Kumar, A., Tanaka, T., Lee, Y.M. y Preiss, J. (1988). *Biosynthesis of bacterial glycogen. Use of site-directed mutagenesis to probe the role of tyrosine 114 in the catalytic mechanism of ADP-glucose synthetase from Escherichia coli*. J Biol Chem 263(29): 14634-14639.
- Ladeira, R.B., Freitas, M.A., Silva, E.F., Gontijo, N.F. y Gomes, M.A. (2005). *Glycogen as a carbohydrate energy reserve in trophozoites of Giardia lamblia*. Parasitol Res 96(6): 418-421.
- Laemmli, U.K. (1970). *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature 227(5259): 680-685.
- Lairson, L.L., Henrissat, B., Davies, G.J. y Withers, S.G. (2008). *Glycosyltransferases: structures, functions, and mechanisms*. Annu Rev Biochem 77: 521-555.
- Lamerz, A.C., Haselhorst, T., Bergfeld, A.K., von Itzstein, M. y Gerardy-Schahn, R. (2006). *Molecular cloning of the Leishmania major UDP-glucose pyrophosphorylase, functional characterization, and ligand binding analyses using NMR spectroscopy*. J Biol Chem 281(24): 16314-16322.
- Lanfredi-Rangel, A., Diniz, J.A., Jr. y de Souza, W. (1999). *Presence of a protrusion on the ventral disk of adhered trophozoites of Giardia lamblia*. Parasitol Res 85(12): 951-955.
- Lapp, D. y Elbein, A.D. (1972). *Purification and properties of the adenosine diphosphate-glucose and uridine diphosphate-glucose pyrophosphorylases of Mycobacterium smegmatis: inhibition and activation of the adenosine diphosphate-glucose pyrophosphorylase*. J Bacteriol 112(1): 327-336.
- Larsson, K.M., Jordan, A., Eliasson, R., Reichard, P., Logan, D.T. y Nordlund, P. (2004). *Structural mechanism of allosteric substrate specificity regulation in a ribonucleotide reductase*. Nat Struct Mol Biol 11(11): 1142-1149.
- Lee, Y.M., Kumar, A. y Preiss, J. (1987). *Amino acid sequence of an Escherichia coli ADP-glucose synthetase allosteric mutant as deduced from the DNA sequence of the glg C gene*. Nucleic Acids Res 15(24): 10603.
- Lee, Y.M. y Preiss, J. (1986). *Covalent modification of substrate-binding sites of Escherichia coli ADP-glucose synthetase. Isolation and structural characterization of 8-azido-ADP-glucose-incorporated peptides*. J Biol Chem 261(3): 1058-1064.
- Leloir, L.F. (1951). *The enzymatic transformation of uridine diphosphate glucose into a galactose derivative*. Arch Biochem Biophys 33(2): 186-190.
- Leloir, L.F. (1971). *Two decades of research on the biosynthesis of saccharides*. Science 172(990): 1299-1303.
- Leloir, L.F. (1983). *Far away and long ago*. Annu Rev Biochem 52: 1-15.
- Lin, D.C., Segal, H.L. y Massaro, E.J. (1972). *Purification and properties of glycogen synthetase from trout liver*. Biochemistry 11(24): 4466-4471.
- Lin, S.X. y Neet, K.E. (1990). *Demonstration of a slow conformational change in liver glucokinase by fluorescence spectroscopy*. J Biol Chem 265(17): 9670-9675.
- Lobelle-Rich, P.A. y Reeves, R.E. (1983). *Separation and characterization of two UTP-utilizing hexose phosphate uridylyltransferases from Entamoeba histolytica*. Mol Biochem Parasitol 7(2): 173-182.

- Lopez, A.B., Sener, K., Jarroll, E.L. y van Keulen, H. (2003). *Transcription regulation is demonstrated for five key enzymes in Giardia intestinalis cyst wall polysaccharide biosynthesis*. Mol Biochem Parasitol 128(1): 51-57.
- Lujan, H.D., Mowatt, M.R. y Nash, T.E. (1997). *Mechanisms of Giardia lamblia differentiation into cysts*. Microbiol Mol Biol Rev 61(3): 294-304.
- Luthy, R., Bowie, J.U. y Eisenberg, D. (1992). *Assessment of protein models with three-dimensional profiles*. Nature 356(6364): 83-85.
- Lloyd, D. y Harris, J.C. (2002). *Giardia: highly evolved parasite or early branching eukaryote?* Trends Microbiol 10(3): 122-127.
- Lloyd, D., Harris, J.C., Maroulis, S., Biagini, G.A., Wadley, R.B., Turner, M.P. y Edwards, M.R. (2000). *The microaerophilic flagellate Giardia intestinalis: oxygen and its reaction products collapse membrane potential and cause cytotoxicity*. Microbiology (Reading, England) 146 Pt 12: 3109-3118.
- Macpherson, D.F., Manning, P.A. y Morona, R. (1994). *Characterization of the dTDP-rhamnose biosynthetic genes encoded in the rfb locus of Shigella flexneri*. Mol Microbiol 11(2): 281-292.
- Machtey, M. (2012). *Relaciones de estructura a función y evolución de enzimas del metabolismo del carbono. Caracterización de enzimas del metabolismo de hidratos de carbono en bacterias autótrofas y heterótrofas* Tesis doctoral, UNL.
- Machtey, M., Kuhn, M.L., Flasch, D.A., Aleanzi, M., Ballicora, M.A. y Iglesias, A.A. (2012). *Insights into glycogen metabolism in chemolithoautotrophic bacteria from distinctive kinetic and regulatory properties of ADP-glucose pyrophosphorylase from Nitrosomonas europaea*. J Bacteriol 194(22): 6056-6065.
- Maniatis, T.F., Fritsch, E.F., Sambrook, J. (1982). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Manning, G., Reiner, D.S., Lauwaet, T., Dacre, M., Smith, A., Zhai, Y., Svard, S. y Gillin, F.D. (2011). *The minimal kinome of Giardia lamblia illuminates early kinase evolution and unique parasite biology*. Genome Biol 12(7): R66.
- Marino, K., Guther, M.L., Wernimont, A.K., Amani, M., Hui, R. y Ferguson, M.A. (2010). *Identification, subcellular localization, biochemical properties, and high-resolution crystal structure of Trypanosoma brucei UDP-glucose pyrophosphorylase*. Glycobiology 20(12): 1619-1630.
- Marolda, C.L., Feldman, M.F. y Valvano, M.A. (1999). *Genetic organization of the O7-specific lipopolysaccharide biosynthesis cluster of Escherichia coli VW187 (O7:K1)*. Microbiology (Reading, England) 145 ( Pt 9): 2485-2495.
- Marolda, C.L. y Valvano, M.A. (1995). *Genetic analysis of the dTDP-rhamnose biosynthesis region of the Escherichia coli VW187 (O7:K1) rfb gene cluster: identification of functional homologs of rfbB and rfbA in the rff cluster and correct location of the rffE gene*. J Bacteriol 177(19): 5539-5546.
- Marolda, C.L. y Valvano, M.A. (1996). *The GalF protein of Escherichia coli is not a UDP-glucose pyrophosphorylase but interacts with the GalU protein possibly to regulate cellular levels of UDP-glucose*. Mol Microbiol 22(5): 827-840.
- Martin, W. y Herrmann, R.G. (1998). *Gene transfer from organelles to the nucleus: how much, what happens, and Why?* Plant Physiol 118(1): 9-17.
- Martinez, L.I., Piattoni, C.V., Garay, S.A., Rodrigues, D.E., Guerrero, S.A. y Iglesias, A.A. (2011). *Redox regulation of UDP-glucose pyrophosphorylase from Entamoeba histolytica*. Biochimie 93(2): 260-268.

- Martz, F., Wilczynska, M. y Kleczkowski, L.A. (2002). *Oligomerization status, with the monomer as active species, defines catalytic efficiency of UDP-glucose pyrophosphorylase*. *Biochem J* 367(Pt 1): 295-300.
- Melendez-Hevia, E., Waddell, T.G. y Shelton, E.D. (1993). *Optimization of molecular design in the evolution of metabolism: the glycogen molecule*. *Biochem J* 295 (Pt 2): 477-483.
- Melendez, R., Melendez-Hevia, E. y Canela, E.I. (1999). *The fractal structure of glycogen: A clever solution to optimize cell metabolism*. *Biophys J* 77(3): 1327-1332.
- Melendez, R., Melendez-Hevia, E. y Cascante, M. (1997). *How did glycogen structure evolve to satisfy the requirement for rapid mobilization of glucose? A problem of physical constraints in structure building*. *J Mol Evol* 45(4): 446-455.
- Mendez, C. y Salas, J.A. (2001). *Altering the glycosylation pattern of bioactive compounds*. *Trends Biotechnol* 19(11): 449-456.
- Meng, M., Wilczynska, M. y Kleczkowski, L.A. (2008). *Molecular and kinetic characterization of two UDP-glucose pyrophosphorylases, products of distinct genes, from Arabidopsis*. *Biochim Biophys Acta* 1784(6): 967-972.
- Meyer, C.R., Bork, J.A., Nadler, S., Yirsa, J. y Preiss, J. (1998a). *Site-directed mutagenesis of a regulatory site of Escherichia coli ADP-glucose pyrophosphorylase: the role of residue 336 in allosteric behavior*. *Arch Biochem Biophys* 353(1): 152-159.
- Meyer, C.R., Yirsa, J., Gott, B. y Preiss, J. (1998b). *A kinetic study of site-directed mutants of Escherichia coli ADP-glucose pyrophosphorylase: the role of residue 295 in allosteric regulation*. *Arch Biochem Biophys* 352(2): 247-254.
- Meyer, Y., Buchanan, B.B., Vignols, F. y Reichheld, J.P. (2009). *Thioredoxins and glutaredoxins: unifying elements in redox biology*. *Annual review of genetics* 43: 335-367.
- Mitra, S., Cui, J., Robbins, P.W. y Samuelson, J. (2010). *A deeply divergent phosphoglucomutase (PGM) of Giardia lamblia has both PGM and phosphomannomutase activities*. *Glycobiology* 20(10): 1233-1240.
- Mochalkin, I., Lightle, S., Zhu, Y., Ohren, J.F., Spessard, C., Chirgadze, N.Y., Banotai, C., Melnick, M. y McDowell, L. (2007). *Characterization of substrate binding and catalysis in the potential antibacterial target N-acetylglucosamine-1-phosphate uridyltransferase (GlmU)*. *Protein Sci* 16(12): 2657-2666.
- Mok, M.T. y Edwards, M.R. (2005). *Kinetic and physical characterization of the inducible UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase from Giardia intestinalis*. *J Biol Chem* 280(47): 39363-39372.
- Mok, M.T., Tay, E., Sekyere, E., Glenn, W.K., Bagnara, A.S. y Edwards, M.R. (2005). *Giardia intestinalis: molecular characterization of UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase*. *Gene* 357(1): 73-82.
- Mollerach, M. y Garcia, E. (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): 77-86.
- Mollerach, M., Lopez, R. y Garcia, E. (1998). *Characterization of the galU gene of Streptococcus pneumoniae encoding a uridine diphosphoglucose pyrophosphorylase: a gene essential for capsular polysaccharide biosynthesis*. *The Journal of experimental medicine* 188(11): 2047-2056.
- Monis, P.T., Caccio, S.M. y Thompson, R.C. (2009). *Variation in Giardia: towards a taxonomic revision of the genus*. *Trends Parasitol* 25(2): 93-100.

- Monod, J., Wyman, J. y Changeux, J.P. (1965). *On the Nature of Allosteric Transitions: A Plausible Model*. J Mol Biol 12: 88-118.
- Morrison, H.G., McArthur, A.G., Gillin, F.D., Aley, S.B., Adam, R.D., Olsen, G.J., Best, A.A., Cande, W.Z., Chen, F., Cipriano, M.J., Davids, B.J., Dawson, S.C., Elmendorf, H.G., Hehl, A.B., Holder, M.E., Huse, S.M., Kim, U.U., Lasek-Nesselquist, E., Manning, G., Nigam, A., Nixon, J.E., Palm, D., Passamaneck, N.E., Prabhu, A., Reich, C.I., Reiner, D.S., Samuelson, J., Svard, S.G. y Sogin, M.L. (2007). *Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite Giardia lamblia*. Science 317(5846): 1921-1926.
- Morrison, H.G., Roger, A.J., Nystul, T.G., Gillin, F.D. y Sogin, M.L. (2001). *Giardia lamblia expresses a proteobacterial-like DnaK homolog*. Mol Biol Evol 18(4): 530-541.
- Moses, S.W., Bashan, N. y Gutman, A. (1972). *Properties of glycogen synthetase in erythrocytes*. Eur J Biochem 30(2): 205-210.
- Moukil, M.A. y Van Schaftingen, E. (2001). *Analysis of the cooperativity of human beta-cell glucokinase through the stimulatory effect of glucose on fructose phosphorylation*. J Biol Chem 276(6): 3872-3878.
- Muller, S., Liebau, E., Walter, R.D. y Krauth-Siegel, R.L. (2003). *Thiol-based redox metabolism of protozoan parasites*. Trends Parasitol 19(7): 320-328.
- Nakai, C. y Thomas, J.A. (1975). *Effects of magnesium on the kinetic properties of bovine heart glycogen synthase D*. J Biol Chem 250(11): 4081-4086.
- Nash, T. (1992). *Surface antigen variability and variation in Giardia lamblia*. Parasitol Today 8(7): 229-234.
- Nash, T.E. (2002). *Surface antigenic variation in Giardia lamblia*. Mol Microbiol 45(3): 585-590.
- Nelson, D.L. y Cox, M.M. (2004). *Lehninger Principles of Biochemistry*, W. H. Freeman.
- Nobeli, I., Favia, A.D. y Thornton, J.M. (2009). *Protein promiscuity and its implications for biotechnology*. Nat Biotechnol 27(2): 157-167.
- Nuttall, F.Q. y Gannon, M.C. (1993). *Allosteric regulation of glycogen synthase in liver. A physiological dilemma*. J Biol Chem 268(18): 13286-13290.
- Orskov, I., Orskov, F., Jann, B. y Jann, K. (1977). *Serology, chemistry, and genetics of O and K antigens of Escherichia coli*. Bacteriol Rev 41(3): 667-710.
- Ortega-Barria, E., Ward, H.D., Evans, J.E. y Pereira, M.E. (1990). *N-acetyl-D-glucosamine is present in cysts and trophozoites of Giardia lamblia and serves as receptor for wheatgerm agglutinin*. Mol Biochem Parasitol 43(2): 151-165.
- Padilla, L., Kramer, R., Stephanopoulos, G. y Agosin, E. (2004a). *Overproduction of trehalose: heterologous expression of Escherichia coli trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase in Corynebacterium glutamicum*. Appl Environ Microbiol 70(1): 370-376.
- Padilla, L., Morbach, S., Kramer, R. y Agosin, E. (2004b). *Impact of heterologous expression of Escherichia coli UDP-glucose pyrophosphorylase on trehalose and glycogen synthesis in Corynebacterium glutamicum*. Appl Environ Microbiol 70(7): 3845-3854.
- Parker, C.G., Fessler, L.I., Nelson, R.E. y Fessler, J.H. (1995). *Drosophila UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase: sequence and characterization of an enzyme that distinguishes between denatured and native proteins*. Embo J 14(7): 1294-1303.
- Parodi, A.J. (2000). *Protein glucosylation and its role in protein folding*. Annu Rev Biochem 69: 69-93.

- Parsons, T.F. y Preiss, J. (1978a). *Biosynthesis of bacterial glycogen. Incorporation of pyridoxal phosphate into the allosteric activator site and an ADP-glucose-protected pyridoxal phosphate binding site of Escherichia coli B ADP-glucose synthase*. J Biol Chem 253(17): 6197-6202.
- Parsons, T.F. y Preiss, J. (1978b). *Biosynthesis of bacterial glycogen. Isolation and characterization of the pyridoxal-P allosteric activator site and the ADP-glucose-protected pyridoxal-P binding site of Escherichia coli B ADP-glucose synthase*. J Biol Chem 253(21): 7638-7645.
- Pauling, L. (1948). *Nature of forces between large molecules of biological interest*. Nature 161(4097): 707-709.
- Pederson, B.A., Cheng, C., Wilson, W.A. y Roach, P.J. (2000). *Regulation of glycogen synthase. Identification of residues involved in regulation by the allosteric ligand glucose-6-P and by phosphorylation*. J Biol Chem 275(36): 27753-27761.
- Pelissier, M.C., Lesley, S.A., Kuhn, P. y Bourne, Y. (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): 27468-27476.
- Peneff, C., Ferrari, P., Charrier, V., Taburet, Y., Monnier, C., Zamboni, V., Winter, J., Harnois, M., Fassy, F. y Bourne, Y. (2001). *Crystal structures of two human pyrophosphorylase isoforms in complexes with UDPGlc(Gal)NAc: role of the alternatively spliced insert in the enzyme oligomeric assembly and active site architecture*. Embo J 20(22): 6191-6202.
- Piattoni, C.V., Blancato, V.S., Miglietta, H., Iglesias, A.A. y Guerrero, S.A. (2006). *On the occurrence of thioredoxin in Trypanosoma cruzi*. Acta tropica 97(2): 151-160.
- Piattoni, C.V., Guerrero, S.A. y Iglesias, A.A. (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): 8073-8092.
- Porter, C.M. y Miller, B.G. (2012). *Cooperativity in monomeric enzymes with single ligand-binding sites*. Bioorganic chemistry 43: 44-50.
- Pradhan, P., Lundgren, S.W., Wilson, W.A. y Brittingham, A. (2012). *Glycogen storage and degradation during in vitro growth and differentiation of Giardia intestinalis*. The Journal of parasitology 98(2): 442-444.
- Prager, R., Strutz, U., Fruth, A. y Tschape, H. (2003). *Subtyping of pathogenic Escherichia coli strains using flagellar (H)-antigens: serotyping versus fliC polymorphisms*. Int J Med Microbiol 292(7-8): 477-486.
- Preiss, J. (1996). *ADPglucose pyrophosphorylase: basic science and applications in biotechnology*. Biotechnol Annu Rev 2: 259-279.
- Preiss, J. (2009). Glycogen Synthesis. *Encyclopedia of Microbiology*. (Echaechter, M.). San Diego, CA, USA.
- Preiss, J., Ball, K., Smith-White, B., Iglesias, A., Kakefuda, G. y Li, L. (1991). *Starch biosynthesis and its regulation*. Biochem Soc Trans 19(3): 539-547.
- Preiss, J. y Greenberg, E. (1981). *Biosynthesis of bacterial glycogen: activator specificity of the adenosine diphosphate glucose pyrophosphorylases from the genus Rhodospirillum*. J Bacteriol 147(3): 711-719.
- Preiss, J. y Sivak, M.N. (1998). *Biochemistry, molecular biology and regulation of starch synthesis*. Genet Eng (N Y) 20: 177-223.
- Priebe, G.P., Dean, C.R., Zaidi, T., Meluleni, G.J., Coleman, F.T., Coutinho, Y.S., Noto, M.J., Urban, T.A., Pier, G.B. y Goldberg, J.B. (2004). *The galU Gene of Pseudomonas aeruginosa is required for corneal infection and efficient systemic*

- spread following pneumonia but not for infection confined to the lung.* Infect Immun 72(7): 4224-4232.
- Raetz, C.R. y Whitfield, C. (2002). *Lipopolysaccharide endotoxins.* Annu Rev Biochem 71: 635-700.
- Raushel, F.M. y Holden, H.M. (2000). *Phosphotriesterase: an enzyme in search of its natural substrate.* Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol 74: 51-93.
- Recondo, E., Dankert, M. y Leloir, L.F. (1963). *Isolation of adenosine diphosphate D-glucose from corn grains.* Biochem Biophys Res Commun 12: 204-207.
- Recondo, E. y Leloir, L.F. (1961). *Adenosine diphosphate glucose and starch synthesis.* Biochem Biophys Res Commun 6: 85-88.
- Rhee, S.G. (2006). *Cell signaling. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a necessary evil for cell signaling.* Science 312(5782): 1882-1883.
- Rhee, S.H. (2014). *Lipopolysaccharide: basic biochemistry, intracellular signaling, and physiological impacts in the gut.* Intestinal Res 12(2): 90-95.
- Riley, M., Abe, T., Arnaud, M.B., Berlyn, M.K., Blattner, F.R., Chaudhuri, R.R., Glasner, J.D., Horiuchi, T., Keseler, I.M., Kosuge, T., Mori, H., Perna, N.T., Plunkett, G., 3rd, Rudd, K.E., Serres, M.H., Thomas, G.H., Thomson, N.R., Wishart, D. y Wanner, B.L. (2006). *Escherichia coli K-12: a cooperatively developed annotation snapshot--2005.* Nucleic Acids Res 34(1): 1-9.
- Roach, P.J. (2002). *Glycogen and its metabolism.* Curr Mol Med 2(2): 101-120.
- Roach, P.J., Depaoli-Roach, A.A., Hurley, T.D. y Tagliabracci, V.S. (2012). *Glycogen and its metabolism: some new developments and old themes.* Biochem J 441(3): 763-787.
- Roeben, A., Plitzko, J.M., Korner, R., Bottcher, U.M., Siegers, K., Hayer-Hartl, M. y Bracher, A. (2006). *Structural basis for subunit assembly in UDP-glucose pyrophosphorylase from Saccharomyces cerevisiae.* J Mol Biol 364(4): 551-560.
- Romano, A.H. y Conway, T. (1996). *Evolution of carbohydrate metabolic pathways.* Res Microbiol 147(6-7): 448-455.
- Ropolo, A.S., Saura, A., Carranza, P.G. y Lujan, H.D. (2005). *Identification of variant-specific surface proteins in Giardia muris trophozoites.* Infect Immun 73(8): 5208-5211.
- Ros, S., Garcia-Rocha, M., Dominguez, J., Ferrer, J.C. y Guinovart, J.J. (2009). *Control of liver glycogen synthase activity and intracellular distribution by phosphorylation.* J Biol Chem 284(10): 6370-6378.
- Ross, P., Mayer, R. y Benziman, M. (1991). *Cellulose biosynthesis and function in bacteria.* Microbiol Rev 55(1): 35-58.
- Rouhier, N., Gelhaye, E., Gualberto, J.M., Jordy, M.N., De Fay, E., Hirasawa, M., Duplessis, S., Lemaire, S.D., Frey, P., Martin, F., Manieri, W., Knaff, D.B. y Jacquot, J.P. (2004). *Poplar peroxiredoxin Q. A thioredoxin-linked chloroplast antioxidant functional in pathogen defense.* Plant Physiol 134(3): 1027-1038.
- Rudick, V.L. y Weisman, R.A. (1974). *Uridine diphosphate glucose pyrophosphorylase of Acanthamoeba castellanii. Purification, kinetic, and developmental studies.* J Biol Chem 249(24): 7832-7840.
- Rutter, J., Probst, B.L. y McKnight, S.L. (2002). *Coordinate regulation of sugar flux and translation by PAS kinase.* Cell 111(1): 17-28.
- Sa-Correia, I., Fialho, A.M., Videira, P., Moreira, L.M., Marques, A.R. y Albano, H. (2002). *Gellan gum biosynthesis in Sphingomonas paucimobilis ATCC 31461: genes, enzymes and exopolysaccharide production engineering.* J Ind Microbiol Biotechnol 29(4): 170-176.

- Sali, A. y Blundell, T.L. (1993). *Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints*. J Mol Biol 234(3): 779-815.
- Samuelson, J., Banerjee, S., Magnelli, P., Cui, J., Kelleher, D.J., Gilmore, R. y Robbins, P.W. (2005). *The diversity of dolichol-linked precursors to Asn-linked glycans likely results from secondary loss of sets of glycosyltransferases*. Proc Natl Acad Sci U S A 102(5): 1548-1553.
- Sanwal, B.D., Duckworth, H.W. y Hollier, M.L. (1972). *Regulation of phosphoglucomutase*. Biochem J 128(1): 26P-27P.
- Schnaitman, C.A. y Klena, J.D. (1993). *Genetics of lipopolysaccharide biosynthesis in enteric bacteria*. Microbiol Rev 57(3): 655-682.
- Schwede, T., Kopp, J., Guex, N. y Peitsch, M.C. (2003). *SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server*. Nucleic Acids Res 31(13): 3381-3385.
- Seibold, G.M. y Eikmanns, B.J. (2007). *The glgX gene product of Corynebacterium glutamicum is required for glycogen degradation and for fast adaptation to hyperosmotic stress*. Microbiology (Reading, England) 153(7): 2212-2220.
- Sener, K., Shen, Z., Newburg, D.S. y Jarroll, E.L. (2004). *Amino sugar phosphate levels in Giardia change during cyst wall formation*. Microbiology (Reading, England) 150(5): 1225-1230.
- Sheng, F., Jia, X., Yep, A., Preiss, J. y Geiger, J.H. (2009). *The crystal structures of the open and catalytically competent closed conformation of Escherichia coli glycogen synthase*. J Biol Chem 284(26): 17796-17807.
- Sheng, J., Charng, Y.Y. y Preiss, J. (1996). *Site-directed mutagenesis of lysine382, the activator-binding site, of ADP-glucose pyrophosphorylase from Anabaena PCC 7120*. Biochemistry 35(9): 3115-3121.
- Sheng, J. y Preiss, J. (1997). *Arginine294 is essential for the inhibition of Anabaena PCC 7120 ADP-glucose pyrophosphorylase by phosphate*. Biochemistry 36(42): 13077-13084.
- Sillje, H.H., Paalman, J.W., ter Schure, E.G., Olsthoorn, S.Q., Verkleij, A.J., Boonstra, J. y Verrips, C.T. (1999). *Function of trehalose and glycogen in cell cycle progression and cell viability in Saccharomyces cerevisiae*. J Bacteriol 181(2): 396-400.
- Singh, S., Phillips, G.N., Jr. y Thorson, J.S. (2012). *The structural biology of enzymes involved in natural product glycosylation*. Nat Prod Rep 29(10): 1201-1237.
- Sivaraman, J., Sauve, V., Matte, A. y Cygler, M. (2002). *Crystal structure of Escherichia coli glucose-1-phosphate thymidyltransferase (RffH) complexed with dTTP and Mg<sup>2+</sup>*. J Biol Chem 277(46): 44214-44219.
- Skurat, A.V. y Roach, P.J. (1995). *Phosphorylation of sites 3a and 3b (Ser640 and Ser644) in the control of rabbit muscle glycogen synthase*. J Biol Chem 270(21): 12491-12497.
- Skurat, A.V., Wang, Y. y Roach, P.J. (1994). *Rabbit skeletal muscle glycogen synthase expressed in COS cells. Identification of regulatory phosphorylation sites*. J Biol Chem 269(41): 25534-25542.
- Smith-White, B.J. y Preiss, J. (1992). *Comparison of proteins of ADP-glucose pyrophosphorylase from diverse sources*. J Mol Evol 34(5): 449-464.
- Smith, C.H., Brown, N.E. y Larner, J. (1971). *Molecular characteristics of the totally dependent and independent forms of glycogen synthase of rabbit skeletal muscle. II. Some chemical characteristics of the enzyme protein and of its change on interconversion*. Biochim Biophys Acta 242(1): 81-88.

- Smith, T.L. y Rutter, J. (2007). *Regulation of glucose partitioning by PAS kinase and Ugp1 phosphorylation*. Mol Cell 26(4): 491-499.
- Soares, J.S., Gentile, A., Scorsato, V., Lima, A.D., Kiyota, E., Santos, M.L., Piattoni, C.V., Huber, S.C., Aparicio, R. y Menossi, M. (2014). *Oligomerization, membrane association and in vivo phosphorylation of sugarcane UDP-glucose pyrophosphorylase*. J Biol Chem.
- Sogayar, M.I. y Gregorio, E.A. (1991). *Ultrastructure of Giardia duodenalis trophozoites group from hamster: some relevant aspects*. Mem Inst Oswaldo Cruz 86(4): 443-446.
- Spatafora, G., Rohrer, K., Barnard, D. y Michalek, S. (1995). *A Streptococcus mutans mutant that synthesizes elevated levels of intracellular polysaccharide is hypercariogenic in vivo*. Infect Immun 63(7): 2556-2563.
- Spector, M.P. (2009). Metabolism, Central (Intermediary). *Encyclopaedia of Microbiology*. (Echaechter, M.). San Diego, CA, USA, American Press.
- Steiner, T., Lamerz, A.C., Hess, P., Breithaupt, C., Krapp, S., Bourenkov, G., Huber, R., Gerardy-Schahn, R. y Jacob, U. (2007). *Open and closed structures of the UDP-glucose pyrophosphorylase from Leishmania major*. J Biol Chem 282(17): 13003-13010.
- Stephanopoulos, G. (1998). *Metabolic engineering*. Biotechnol Bioeng 58(2-3): 119-120.
- Stick, R.B. y Williams, S.J. (2009). *Carbohydrates: The Essential Molecules of Life*. Oxford, UK.
- Sundararajan, T.A., Rapin, A.M. y Kalckar, H.M. (1962). *Biochemical observations on E. coli mutants defective in uridine diphosphoglucose*. Proc Natl Acad Sci U S A 48: 2187-2193.
- Sussman, M. (1997). *Escherichia coli, Mechanisms of Virulence*. Cambridge, United Kingdom, Cambridge University Press.
- Takahara, H. y Matsuda, K. (1978). *Biosynthesis of glycogen in Neurospora crassa. Purification and properties of the UDPglucose:glycogen 4-alpha-glucosyltransferase*. Biochim Biophys Acta 522(2): 363-374.
- Takata, H., Takaha, T., Okada, S., Takagi, M. y Imanaka, T. (1997). *Characterization of a gene cluster for glycogen biosynthesis and a heterotetrameric ADP-glucose pyrophosphorylase from Bacillus stearothermophilus*. J Bacteriol 179(15): 4689-4698.
- Takeuchi, T., Weinbach, E.C. y Diamond, L.S. (1977). *Entamoeba histolytica: localization and characterization of phosphorylase and particulate glycogen*. Exp Parasitol 43(1): 107-114.
- Thoden, J.B. y Holden, H.M. (2007a). *Active site geometry of glucose-1-phosphate uridylyltransferase*. Protein Sci 16(7): 1379-1388.
- Thoden, J.B. y Holden, H.M. (2007b). *The molecular architecture of glucose-1-phosphate uridylyltransferase*. Protein Sci 16(3): 432-440.
- Thoden, J.B., Ruzicka, F.J., Frey, P.A., Rayment, I. y Holden, H.M. (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): 1212-1222.
- Thorson, J.S., Kelly, T.M. y Liu, H.W. (1994). *Cloning, sequencing, and overexpression in Escherichia coli of the alpha-D-glucose-1-phosphate cytidylyltransferase gene isolated from Yersinia pseudotuberculosis*. J Bacteriol 176(7): 1840-1849.

- Torshin, I. (1999). *Activating oligomerization as intermediate level of signal transduction: analysis of protein-protein contacts and active sites in several glycolytic enzymes*. *Front Biosci* 4: D557-570.
- Triebel, R.C., Beach, B.M., Dirk, L.M., Houtz, R.L. y Hurley, J.H. (2002). *Structure and catalytic mechanism of a SET domain protein methyltransferase*. *Cell* 111(1): 91-103.
- Trombetta, E.S. y Parodi, A.J. (2003). *Quality control and protein folding in the secretory pathway*. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19: 649-676.
- Tsuboi, K.K., Fukunaga, K. y Petriccioni, J.C. (1969). *Purification and specific kinetic properties of erythrocyte uridine diphosphate glucose pyrophosphorylase*. *J Biol Chem* 244(3): 1008-1015.
- Turnock, D.C. y Ferguson, M.A. (2007). *Sugar nucleotide pools of Trypanosoma brucei, Trypanosoma cruzi, and Leishmania major*. *Eukaryot Cell* 6(8): 1450-1463.
- Turnquist, R.L., Gillett, T.A. y Hansen, R.G. (1974). *Uridine diphosphate glucose pyrophosphorylase. Crystallization and properties of the enzyme from rabbit liver and species comparisons*. *J Biol Chem* 249(23): 7695-7700.
- Uppsten, M., Farnegardh, M., Domkin, V. y Uhlin, U. (2006). *The first holocomplex structure of ribonucleotide reductase gives new insight into its mechanism of action*. *J Mol Biol* 359(2): 365-377.
- Uppsten, M., Farnegardh, M., Jordan, A., Eliasson, R., Eklund, H. y Uhlin, U. (2003). *Structure of the large subunit of class Ib ribonucleotide reductase from Salmonella typhimurium and its complexes with allosteric effectors*. *J Mol Biol* 330(1): 87-97.
- Valdez, H.A., Busi, M.V., Wayllace, N.Z., Parisi, G., Ugalde, R.A. y Gomez-Casati, D.F. (2008). *Role of the N-terminal starch-binding domains in the kinetic properties of starch synthase III from Arabidopsis thaliana*. *Biochemistry* 47(9): 3026-3032.
- Varki, A. (2006). *Nothing in glycobiology makes sense, except in the light of evolution*. *Cell* 126(5): 841-845.
- Varon, D., Boylan, S.A., Okamoto, K. y Price, C.W. (1993). *Bacillus subtilis gtaB encodes UDP-glucose pyrophosphorylase and is controlled by stationary-phase transcription factor sigma B*. *J Bacteriol* 175(13): 3964-3971.
- Verma, S.K., Jaiswal, M., Kumar, N., Parikh, A., Nandicoori, V.K. y Prakash, B. (2009). *Structure of N-acetylglucosamine-1-phosphate uridylyltransferase (GlmU) from Mycobacterium tuberculosis in a cubic space group*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 65(Pt 5): 435-439.
- Voet, D. y Voet, J. (2006). *Bioquímica*. Buenos Aires, Editorial médica Panamericana.
- Wackett, L.P. (2004). *Evolution of enzymes for the metabolism of new chemical inputs into the environment*. *J Biol Chem* 279(40): 41259-41262.
- Wang, L., Huskic, S., Cisterne, A., Rothemund, D. y Reeves, P.R. (2002). *The O-antigen gene cluster of Escherichia coli O55:H7 and identification of a new UDP-GlcNAc C4 epimerase gene*. *J Bacteriol* 184(10): 2620-2625.
- Wang, L., Rothemund, D., Curd, H. y Reeves, P.R. (2003). *Species-wide variation in the Escherichia coli flagellin (H-antigen) gene*. *J Bacteriol* 185(9): 2936-2943.
- Wang, L. y Wise, M.J. (2011). *Glycogen with short average chain length enhances bacterial durability*. *Naturwissenschaften* 98(9): 719-729.
- Weissborn, A.C., Liu, Q., Rumley, M.K. y Kennedy, E.P. (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): 2611-2618.
- Wells, L., Whelan, S.A. y Hart, G.W. (2003). *O-GlcNAc: a regulatory post-translational modification.* Biochem Biophys Res Commun 302(3): 435-441.
- Whelan, W.J. (1961). *Recent advances in the biochemistry of glycogen and starch.* Nature 190: 954-957.
- Whelan, W.J. (2003). *The maximum size of glycogen molecules.* IUBMB Life 55(2): 109-110.
- Whitfield, C. (2006). *Biosynthesis and assembly of capsular polysaccharides in Escherichia coli.* Annu Rev Biochem 75: 39-68.
- Wilczynska, M., Lobov, S. y Ny, T. (2003). *The spontaneous polymerization of plasminogen activator inhibitor type-2 and Z-antitrypsin are due to different molecular aberrations.* FEBS Lett 537(1-3): 11-16.
- Wilkinson, J.F. (1963). *Carbon and Energy Storage in Bacteria.* J Gen Microbiol 32: 171-176.
- Wilson, W.A., Roach, P.J., Montero, M., Baroja-Fernandez, E., Munoz, F.J., Eydallin, G., Viale, A.M. y Pozueta-Romero, J. (2010). *Regulation of glycogen metabolism in yeast and bacteria.* FEMS Microbiol Rev 34(6): 952-985.
- Xiang, S.H., Hobbs, M. y Reeves, P.R. (1994). *Molecular analysis of the rfb gene cluster of a group D2 Salmonella enterica strain: evidence for its origin from an insertion sequence-mediated recombination event between group E and D1 strains.* J Bacteriol 176(14): 4357-4365.
- Yang, T. y Bar-Peled, M. (2010). *Identification of a novel UDP-sugar pyrophosphorylase with a broad substrate specificity in Trypanosoma cruzi.* Biochem J 429(3): 533-543.
- Yao, Z. y Valvano, M.A. (1994). *Genetic analysis of the O-specific lipopolysaccharide biosynthesis region (rfb) of Escherichia coli K-12 W3110: identification of genes that confer group 6 specificity to Shigella flexneri serotypes Y and 4a.* J Bacteriol 176(13): 4133-4143.
- Young, F.G. (1957). *Claude Bernard and the discovery of glycogen; a century of retrospect.* Br Med J 1(5033): 1431-1437.
- Zea, C.J. y Pohl, N.L. (2005). *Unusual sugar nucleotide recognition elements of mesophilic vs. thermophilic glycogen synthases.* Biopolymers 79(2): 106-113.
- Zhang, G., Dai, J., Wang, L., Dunaway-Mariano, D., Tremblay, L.W. y Allen, K.N. (2005). *Catalytic cycling in beta-phosphoglucomutase: a kinetic and structural analysis.* Biochemistry 44(27): 9404-9416.
- Zhu, J.W., Yuan, J.F., Yang, H.M., Wang, S.T., Zhang, C.G., Sun, L.L., Yang, H. y Zhang, H. (2012). *Extracellular cysteine (Cys)/cystine (CySS) redox regulates metabotropic glutamate receptor 5 activity.* Biochimie 94(3): 617-627.
- Zuccotti, S., Zanardi, D., Rosano, C., Sturla, L., Tonetti, M. y Bolognesi, M. (2001). *Kinetic and crystallographic analyses support a sequential-ordered bi bi catalytic mechanism for Escherichia coli glucose-1-phosphate thymidyltransferase.* J Mol Biol 313(4): 831-843.