

**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**Análisis bioquímico, funcional y estructural de AceA,  
una  $\alpha$ -manosiltransferasa involucrada en la biosíntesis  
del exopolisacárido acetano**

**PATRICIA L. ABDIAN**

**DIRECTOR: LUIS IELPI**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOQUÍMICAS  
FUNDACIÓN INSTITUTO LOEIRO**

**TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR DE LA UNIVERSIDAD DE  
BUENOS AIRES**

**2005**

*A mi Mamá Teresa*

*A mis dos Amores, Marcelo y nuestro bebé Félix*

*A la memoria de mi suegro Félix Bassi*

## **Agradecimientos**

A Luis Ielpi, por el respaldo, la paciencia y la comprensión que permitieron que pudiera realizar esta tesis. Por darme la oportunidad de formarme, conocer otros laboratorios y crecer en lo profesional y en lo humano.

A Roberto Geremía, por confiar en mí, por alentarme a seguir y por ser una guía permanente desde la distancia.

A la Universidad de Buenos Aires, el FOMECEC, la Fundación Antorchas, la Fundación Instituto Leloir y el ECOS, por el apoyo económico que permitió llevar a cabo esta tesis.

A la Fundación Instituto Leloir por darme la posibilidad de realizar este trabajo de tesis en sus instalaciones.

Al Dr. Louis Gastinel por darme lugar en su laboratorio, por sus enseñanzas y su tiempo.

A las Dras. Rosa Lederkremer y Carla Marino y al Lic. Pablo Barrios por confiar en AceA e invertir su tiempo en el duro camino de la síntesis química.

A Valerie Chazalet, Anouk, Emanuelle, Christelle Breton, Annemarie Lellouch y Anne Imberty del CERMAV (Francia) por su amistad y por su gran ayuda en la realización de esta tesis.

A Catherine Gautier por la forma curiosa de comunicarnos tan claramente, aún hablando distintos idiomas.

A Nehmé Saksouk por el compañerismo, por encontrarme un techo en el atestado Grenoble, y por la ayuda en el día más difícil.

A Yolande Pierron, por su calidez, su confianza y por estar conmigo hasta muy tarde el día más difícil.

A Viviana Pinto, por su amistad, por traer un bocanada de aire puro “Balneariense” al laboratorio, por compartir las clases de francés, por divertirme todo ese tiempo y hacerme ver todo mejor.

A Maxi Barreras, por su amistad, por su enorme paciencia, por compartir todos los días, por aguantarme, por escuchar mis idas y venidas, por soportarme durante todo mi embarazo, por compartir el tema de trabajo y que no haya habido egoísmos y por los innumerables favores de todos los días.

A Matías Kappel PSUBP!!!!.....y además por la enorme ayuda con los últimos experimentos de la tesis, por la traspasada en el 207 sin chistar, por las horas de cuarto frío, por el buen humor, por recordarme mis años más jóvenes.

A mis compañeros de laboratorio que ya no están, Cristian Oddo y Eyleen O’Rourke por el tiempo compartido. A Federico Katzen por haberme introducido en el mundo de la biología molecular y de *Xanthomonas*.

A Julio Caramelo, por haber sido una presencia determinante en muchos aspectos de mi vida, por evacuar mis dudas de bióloga y por su amistad.

A Pato Craig por presentarme al señor “SWISS-MODEL”.

A Juan Manuel Centeno, por compartir sus conocimientos sobre cristalización y por dejarme romper varios de sus cristales en el afán de aprender a cargarlos en un loop.

A Maria Laura Cerutti, Carolina Carrillo, Mariela Urrutia, Fabiana Stollowicz, Vanesa Zilberman, Fernanda Lodeiro, Diego Alvarez, Martín Radrizani, Silvana Fucito, Veronica de Pino, Fabiola Parussinni, Veronica Baez, Alejandro Senn, Daniel Caporaletti, por estar en la misma y compartir todos estos años.

A Marta Bravo, por su ayuda, y por compartir sus conocimientos conmigo, a Susana Raffo, Gaston Mayol y Jimena Ortega, por la asistencia técnica.

A Mónica, Cristina y especialmente a Georgina de Biblioteca, por su calidez y por estar siempre dispuestas a brindarme su ayuda.

A Silvia Guevara e Irene, por ocuparse de lo que menos me gusta todos estos años, y por la paciencia en las instancias finales.

A Dora por el buen humor contagioso de todos los días, por escucharme, por entretener a Félix con el teclado y darme un tiempo.

A Darío, Pablo, Horacio y Benjamín de Soporte, por resolver a tiempo mis terribles problemas informáticos.

A Aída Kaufman, por haberme escuchado tantas veces y por sus sabios consejos.

A Fancisco, Liliana, Hugo, Walter, Laura, Eva, Cristian, Nora, Rodolfo y a todo el personal de Mantenimiento y Administrativo, por el trabajo diario y muchas veces silencioso, que hace que todo funcione.

A Milagros, por su cariño a Félix, su paciencia, su comprensión, por hacer las cosas con responsabilidad y dedicación, porque sin su ayuda diaria no hubiera podido con esto.

A mis suegro Felix, por su cariño, su apoyo en mis primeros tiempos en Buenos Aires, por ser para mi un ejemplo a seguir.

A mi familia, papá León, Dora, a la tía Amalia, a Adri y en especial a mi mamá Teresa por su sacrificio, su ayuda enorme y su amor incondicional. A Félix y a Marcelo por su amor, por acompañarme y por cuidarme.

## INDICE GENERAL

<b>1. Resumen</b>	<b>1</b>
<b>2. Abstract</b>	<b>2</b>
<b>3. Abreviaturas</b>	<b>3</b>
<b>4. Introducción</b>	<b>4</b>
<b>4.1. Polisacáridos bacterianos extracelulares.</b>	<b>4</b>
4.1.1. Exopolisacáridos.	4
4.1.1.i. Homopolisacáridos.	5
a) Dextranos y polisacáridos relacionados	5
b) $\beta$ -D-Glucanos	5
4.1.1.ii. Heteropolisacáridos.	6
a) Precursores	6
b) Alginatos	8
c) Heteropolisacáridos sintetizados a partir de unidades repetitivas	9
<b>4.2. Glicosiltransferasas.</b>	<b>14</b>
4.2.1. Clasificación	14
4.2.2. Mecanismos de reacción	16
4.2.2.i. Sitios de unión de los sustratos	20
4.2.2.ii. Utilización de iones divalentes	20
4.2.3. Plegamiento y dominios conservados	21
4.2.3.i. Plegamiento GT-A	23
4.2.3.ii. Plegamiento GT-B	24
<b>4.3. Manosiltransferasas.</b>	<b>29</b>
<b>5. Objetivos</b>	<b>33</b>
<b>6. Materiales y Métodos</b>	<b>34</b>
<b>6.1. Cepas y plásmidos.</b>	<b>34</b>
<b>6.2. Medios y condiciones de cultivo.</b>	<b>35</b>
<b>6.3. Construcción de plásmidos.</b>	<b>35</b>
<b>6.4. Procedimientos de introducción de material genético en <i>E. coli</i> y <i>X. campestris</i>.</b>	<b>37</b>
<b>6.5. Sobreexpresión de proteínas recombinantes.</b>	<b>37</b>
<b>6.6. Obtención de un suero inmune contra AceA.</b>	<b>37</b>
<b>6.7. Preparación de extractos y fraccionamiento subcelular.</b>	<b>38</b>
<b>6.8. Solubilización de AceA a partir de la fracción de membranas de <i>X. campestris</i>.</b>	<b>38</b>
6.8.1. Solubilización con proteasa	38
6.8.2. Solubilización con buffer alcalino	38
6.8.3. Solubilización con Triton X-114	38
<b>6.9. Purificación de proteínas.</b>	<b>38</b>
6.9.1. Purificación de Stag-aceA	38
6.9.2. Purificación de AceA-Histag	39
<b>6.10. Actividad enzimática.</b>	<b>39</b>
6.10.1. Sustratos	39
6.10.1.i. Nucleótido azúcares	39
6.10.1.ii. Aceptores obtenidos de <i>X. campestris</i>	39
6.10.1.iii. Sustratos comerciales	40

6.10.1.iv. Sustratos obtenidos por síntesis química	40
6.10.2. Ensayos enzimáticos	40
6.10.2.i. Incubaciones con células permeabilizadas FC2 para la obtención del sustrato aceptor	40
6.10.2.ii. Ensayos de actividad manosiltransferasa <i>in vitro</i>	41
6.10.2.iii. Ensayos de incorporación de [ <sup>14</sup> C]Man en células XcH permeabilizadas	41
6.10.2.iv. Tratamiento con $\alpha$ -manosidasa.	42
<b>6.11. Cromatografía en capa delgada y detección de oligosacáridos radioactivos.</b>	<b>42</b>
6.11.1. Análisis de los productos de reacción	42
6.11.2. Comprobación de la estabilidad del aceptor sintético (fitanil-PP-celobiosa)	42
<b>6.12. Cuantificación y análisis estructural del xantano.</b>	<b>42</b>
<b>6.13. Mutagénesis sitio-dirigida.</b>	<b>42</b>
<b>6.14. Modificación química.</b>	<b>43</b>
<b>6.15. Cristalización.</b>	<b>43</b>
<b>6.16. Métodos bioinformáticos.</b>	<b>44</b>
6.16.1. Modelado por homología de la estructura de AceA	44
<b>7. Resultados</b>	<b>45</b>
<b>7.1. Clonado y expresión de AceA.</b>	<b>45</b>
7.1.1. Obtención de Stag-AceA recombinante	45
7.1.2. Obtención de AceA-Histag recombinante	46
7.1.3. Obtención de pBBR-AceA	46
<b>7.2. Localización intracelular de AceA.</b>	<b>47</b>
7.2.1. Localización de AceA en una cepa deletada en la región <i>gum</i>	47
7.2.2. Búsqueda del sitio de anclaje a membrana	48
7.2.3. Estudio del tipo de interacción	48
<b>7.3. Solubilización de membrana y purificación de AceA.</b>	<b>50</b>
<b>7.4. Caracterización de la actividad enzimática.</b>	<b>52</b>
7.4.1. Actividad <i>in vitro</i> de Stag-AceA	53
7.4.2. Caracterización del enlace glicosídico sintetizado por AceA	54
7.4.3. Utilización de iones divalentes	55
7.4.4. Especificidad por el sustrato aceptor	56
7.4.5. Síntesis química de un aceptor para AceA	58
7.4.6. Actividad hidrolítica sobre GDP-Man	59
7.4.7. Determinación preliminar de parámetros cinéticos	60
<b>7.5. Predicción de estructura secundaria y localización de residuos conservados en AceA.</b>	<b>61</b>
<b>7.6. Análisis funcional de las mutantes a Alanina de AceA.</b>	<b>64</b>
7.6.1. Caracterización de las mutantes expresadas en <i>E. coli</i>	64
7.6.2. Efecto de las mutaciones sobre la complementación de la cepa XcH	65
7.6.3. Análisis del xantano producido por XcH complementada con mutantes de AceA	66
7.6.4. Incorporación de [ <sup>14</sup> C]Man en células permeabilizadas XcH complementadas	67
7.6.5. Localización de las mutantes de AceA en XcH	67
<b>7.7. Sustituciones conservativas de residuos importantes para la actividad enzimática de AceA.</b>	<b>68</b>
7.7.1. Actividad <i>in vitro</i>	68
7.7.2. Actividad <i>in vivo</i>	69
<b>7.8. Modificación química de AceA.</b>	<b>70</b>
<b>7.9. Obtención de cristales de AceA.</b>	<b>71</b>
<b>7.10. Modelado de la estructura tridimensional de AceA.</b>	<b>72</b>

<b>8. Discusión</b>	<b>79</b>
8.1. Caracterización bioquímica y funcional de AceA.	79
8.2. Caracterización estructural de AceA.	83
<b>9. Bibliografía</b>	<b>87</b>

## 1. Resumen

Trabajos anteriores mostraron que el gen *aceA* está involucrado en la biosíntesis del exopolisacárido acetano producido por *Acetobacter xylinum*. El producto de *aceA* cataliza la tercer etapa en la síntesis de la unidad repetitiva heptasacáridica del acetano.

En esta tesis se informa sobre la producción heteróloga y la caracterización de AceA. El producto del gen *aceA* fue sobreexpresado en *Escherichia coli* y su función fue caracterizada utilizando un ensayo de actividad desarrollado para la enzima. Se encontró que AceA se localiza en la membrana bacteriana y que la unión a la misma es determinada por interacciones hidrofóbicas y electrostáticas. La enzima fue solubilizada y purificada a homogeneidad en presencia de detergente. Se determinaron parámetros cinéticos preliminares de la enzima purificada para lo cual fue necesario sintetizar un análogo del sustrato aceptor.

AceA es una enzima que actúa con retención de la configuración, y pertenece a la familia 4 de la clasificación CAZY para la cual, al momento de escribir esta tesis, no hay información mecánica ni estructural. Identificamos una serie de residuos conservados sobre los que se realizó mutagénesis sitio-dirigida. El análisis, con un ensayo de actividad *in vitro* y un ensayo *in vivo* por complementación heteróloga, nos permitió clasificarlos en cuatro grupos según el fenotipo de las mutantes. Dos glutamatos (E287, E295) y un residuo de lisina (K211) formarían parte del sitio activo de AceA. La importancia de los residuos ácidos fue evaluada por modificación química. Este análisis mostró que al menos un residuo ácido es esencial para la actividad de AceA. A partir de los resultados de mutagénesis, proponemos que este residuo es E287.

Finalmente, realizamos el modelado por homología de la estructura 3D de AceA. La superposición de residuos del sitio activo de AceA con los de la glucógeno sintasa de *Agrobacterium tumefaciens* y la trealosa-6-P-sintasa de *E. coli*, reveló un alto grado de similitud y permitió validar los resultados experimentales. El modelo estructural de AceA, también ha sido de ayuda en la localización de otros aminoácidos importantes del sitio activo, en la identificación del probable sitio de unión del aceptor, y en el modo de operar de AceA en la superficie de la membrana.

Algunos de los resultados obtenidos en esta tesis fueron publicados en:

**Abdian, P.L., Lellouch, A. C., Gautier, C., Ielpi, L. and Geremía, R.A.** 2000. Identification of essential aminoacids in the bacterial  $\alpha$ -mannosyltransferase AceA. *J. Biol. Chem.* **275** (51): 40568-40575.

**Abdian, P.L., Barreras, M., Barrios, P., Lederkremer, R., Marino, C., Geremia, R. A. and Ielpi, L.** AceA, a membrane associated  $\alpha$ -mannosyltransferase from *Acetobacter xylinum*: solubilization, purification, and characterization of the conserved EX<sub>7</sub>E motif by mutagenesis and chemical modification.  
En preparación.

Palabras clave: glicosiltransferasa,  $\alpha$ -manosiltransferasa, exopolisacárido, mutagénesis sitio-dirigida, modificación química, modelado molecular, *Acetobacter xylinum*, poliprenol, CAZY.



## 2. Abstract

In earlier work it was shown that the *aceA* gene is involved in the biosynthesis of the exopolysaccharide acetan, produced by *Acetobacter xylinum*. The *aceA* gene product catalyzes the third step in the synthesis of the heptasaccharide repeating unit of acetan.

The heterologous production and characterisation of AceA is reported in this thesis. The *aceA* gene product was overproduced in *Escherichia coli* and its function was characterised using an activity assay developed for the enzyme. It was found that AceA is located in the bacterial membrane and that hydrophobic and electrostatic interactions are implicated in membrane attachment. The enzyme was solubilized and purified to homogeneity in the presence of detergent. Preliminary kinetic parameters were determined for the purified enzyme, for which it was necessary to synthesise an acceptor analogue.

AceA is a retaining CAZY family 4 glycosyltransferase, for which there is no mechanistic or structural information at the time of writing. We identified a series of conserved aminoacids and performed site directed mutagenesis on them. The analysis, by both an *in vitro* activity assay and an *in vivo* rescue assay, permitted us to classify them into four groups on the basis of the mutant phenotypes. Two glutamate residues (E287, E295) and a lysine (K211) were proposed to form part of the active site. The importance of acidic residues was assessed by chemical modification. This analysis indicated that at least one acidic residue is essential for AceA activity. From the mutagenesis results, we propose that this residue is E287.

Finally, we have performed homology modelling of the 3D structure of AceA. The superposition of the active site residues of AceA with those of glycogen synthase from *Agrobacterium tumefaciens* and trehalose-6-P-synthase from *E. coli*, revealed striking similarities and allowed validation of experimental data. The structural model of AceA has also been helpful to locate other important aminoacids in the active site, the probable binding site of the acceptor substrate and the function of AceA at the membrane surface.

Some of the results obtained in this Ph.D. thesis were included in the following publication:

**Abdian, P.L., Lellouch, A. C., Gautier, C., Ielpi, L. and Geremía, R.A.** 2000. Identification of essential aminoacids in the bacterial  $\alpha$ -mannosyltransferase AceA. *J. Biol. Chem.* **275** (51): 40568-40575.

**Abdian, P.L., Barreras, M., Barrios, P., Lederkremer, R., Marino, C., Geremia, R. A. and Ielpi, L.** AceA, a membrane associated  $\alpha$ -mannosyltransferase from *Acetobacter xylinum*: solubilization, purification, and characterization of the conserved EX<sub>7</sub>E motif by mutagenesis and chemical modification.

In preparation.

Keywords: glycosyltransferase,  $\alpha$ -mannosyltransferase, exopolysaccharide, site-directed mutagenesis, chemical modification, molecular modeling, *Acetobacter xylinum*, polyprenol, CAZY.

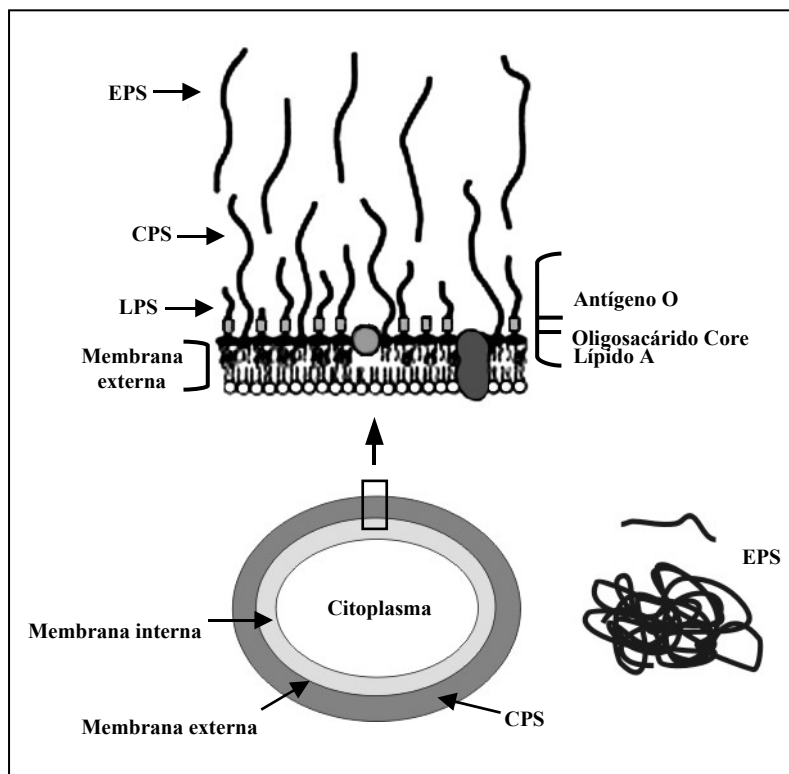
### 3. Abreviaturas

**2FGlc**: 2-deoxi-2-fluoro glucosa  
**3D**: tridimensional  
**Alg**: proteína de la síntesis de alginato  
**CAZY**: Carbohydrate active enzymes  
**CBM**: módulo de unión de carbohidrato  
**CPS**: polisacárido capsular  
**EDAC**: 1-(3-dimetil-aminopropil)-3-etilcarbodiimida  
**EPS**: exopolisacárido  
**Fru**: fructosa  
**Fuc**: fucosa  
**Gal**: galactosa  
**GalA**: ácido galacturónico  
**GalT**: galactosiltransferasa  
**GH**: glicosilhidrolasa  
**Glc-1-P**: glucosa-1-fosfato  
**Glc<sub>2</sub>**: celobiosa  
**GlcA**: ácido glucurónico  
**GlcAT**: glucuroniltransferasa  
**GlcNAcT**: N-acetil-glucosaminiltransferasa  
**GlcT**: glucosiltransferasa  
**GSA**: glucógeno sintasa de *Agrobacterium tumefaciens*  
**GT**: glicosiltransferasa  
**GT I**: glicosiltransferasa que cataliza la primer reacción en la síntesis de una unidad repetitiva de oligosacárido  
**GT-4**: glicosiltransferasa perteneciente a la familia 4 de la clasificación CAZY  
**GT-A**: glicosiltransferasa con plegamiento tipo A  
**GT-B**: glicosiltransferasa con plegamiento tipo B  
**GT-C**: glicosiltransferasa con plegamiento tipo C  
**GulA**: ácido gulurónico  
**Gum**: proteína de la síntesis de xantano  
**HCA**: análisis de clusters de hidrofobicidad  
**KDO**: ácido 2-ceto-3-deoxi octulosónico  
**Lip-P**: poliprenol fosfato  
**Lip-PP**: poliprenol difosfato  
**LOS**: lipooligosacárido  
**LPS**: lipopolisacárido  
**M**: maltooligosacárido  
**MalP**: maltodextrina fosforilasa  
**Man**: Manosa  
**ManA**: ácido manurónico  
**Man-Glc<sub>2</sub>**: manosa $\alpha$ 1-3glucosa $\beta$ 1-4glucosa  
**ManT**: manosiltransferasa  
**MCS**: sitio de clonado múltiple  
**MPA1**: proteínas auxiliares de transporte de polisacáridos de membrana interna  
**NAcNeu**: ácido N-acetil neuramínico  
**nt-azúcar**: nucleótido azúcar  
**OMA**: proteínas auxiliares de transporte de polisacáridos de membrana externa  
**PAGE**: electrofresis en gel de poli(acrilamida)  
**PBS**: buffer fosfato salino  
**PDB**: Protein Data Bank  
**PEG**: polietilenglicol  
**PHEA**: feniletilamina  
**PI**: poliisoprenol  
**PMSF**: fluoruro de fenil metil sulfonilo  
**PST1**: proteínas de transporte específicas de polisacárido  
**PVDF**: poli(fluoruro de vinilideno)  
**Rha**: rhamnosa  
**Rif**: rifampicina  
**SDS**: dodecil sulfato de sodio  
**T4 BGT**: glucosiltransferasa del fago T4  
**Tamb**: temperatura ambiente  
**TLC**: cromatografía en capa fina  
**Tris**: 2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol

## 4. Introducción

### 4.1. Polisacáridos bacterianos extracelulares

Los polisacáridos son constituyentes importantes de la célula bacteriana y pueden encontrarse en el citoplasma o fuera de él. Estos últimos cumplen un rol crítico en la interacción de la célula con el medio ambiente. Los polisacáridos bacterianos extracelulares incluyen: a) los lipopolisacáridos (LPS), componentes integrales de la membrana externa de las bacterias gram-negativas, b) los lipooligosacáridos (LOS) de estructura similar a los LPS, excepto por la ausencia de antígeno O, c) los polisacáridos capsulares (CPS) de las bacterias gram-positivas y gram-negativas, que se mantienen unidos covalentemente a la célula, d) los exopolisacáridos (EPS) secretados activamente por ambos tipos de bacterias (151). En la Fig. 1 se muestra la localización de los distintos tipos de polisacáridos bacterianos.



**Figura 1. Polisacáridos bacterianos.** Los LPS presentes en bacterias gram-negativas, están compuestos por el lípido A, el núcleo o “core” oligosacáridico y el antígeno O. Los polisacáridos extracelulares pueden ser liberados al medio en forma de limo

En esta introducción se tratarán brevemente aspectos estructurales y funcionales de los EPS en general, y en particular se detallarán características de dos EPS sintetizados por bacterias gram-negativas: el xantano, que produce la bacteria fitopatógena *Xanthomonas campestris*; y el acetano, producto de la biosíntesis de *Acetobacter xylinum*.

#### 4.1.1. Exopolisacáridos

Un gran número de bacterias produce EPS que se encuentran en el medio extracelular en forma de “limo”. Son polímeros de carbohidratos y se caracterizan por carecer de uniones covalentes con la envoltura celular, lo que los diferencia de los polisacáridos capsulares mencionados anteriormente. En el medio ambiente en que se encuentran los microorganismos, estos polímeros cumplen diversas funciones: están asociados con la virulencia de patógenos de animales y plantas, intervienen en interacciones simbióticas planta-bacteria, cumplen un rol estructural en el desarrollo de “biofilms”, o bien ejercen una función protectora contra los efectos adversos de la desecación o el ataque por bacteriófagos (175).

Según su composición y estructura química, o el sitio donde son sintetizados, se pueden establecer diversas diferenciaciones sobre los EPS. Pueden dividirse en homo o

heteropolisacáridos, según estén compuestos por uno o diversos tipos de monosacáridos. Dentro de estos últimos se pueden distinguir otras dos clases: los que se sintetizan con o sin formación previa de unidades repetitivas. Pueden clasificarse en lineales, ramificados o cíclicos de acuerdo a la disposición de los monosacáridos en la cadena que conforma el polímero. En cuanto al compartimento donde son sintetizados se los divide en EPSs de síntesis intra o extracelular.

Los componentes monosacáridicos más frecuentes son D-Glc, D-Man, D-Gal y D-GlcA; mientras que L-Rha y L-Fuc son menos comunes y D-ManA y L-GulA son raramente encontrados (174). Estos monosacáridos pueden unirse en diversas configuraciones como consecuencia de los múltiples grupos hidroxilo en cada uno de ellos que puede estar involucrado en la formación de un enlace glicosídico. Esto resulta en una gran diversidad de moléculas que se diferencian, no sólo en los monosacáridos componentes, sino en el tipo de unión entre ellos. La introducción de puntos de ramificación en la cadena polisacáridica y la sustitución de la misma (los sustituyentes más comunes son acetato, piruvato, hidroxibutirato y succinato (107)), aumentan aún más la complejidad estructural de los EPS.

#### 4.1.1.i. Homopolisacáridos

**a) Dextranos y polisacáridos relacionados.** Los dextranos son  $\alpha$ -D-glucanos producidos extracelularmente por bacterias que utilizan sacarosa como nutriente específico. En ausencia de sacarosa, las células son capaces de crecer, pero no de sintetizar EPS. Las bacterias que producen estos polímeros pertenecen a los géneros *Streptococcus* (84) y *Leuconostoc* (130). Los levanos, sintetizados por *Bacillus subtilis* y *Streptococcus mutans* (polímeros de Fru con uniones  $\beta$ -2,6 o  $\beta$ -2,1) (4) están incluidos en este grupo.

**b)  $\beta$ -D-Glucanos.** Son producidos intracelularmente a partir de diversas fuentes de carbono y luego secretados al medio.

##### *Celulosa*

*Acetobacter xylinum* y otras bacterias (que incluyen especies de *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Aerobacter*, *Azotobacter*, *Agrobacterium*, *Rhizobium* y *Sarcina*) producen celulosa (154). La celulosa es un polímero lineal de residuos de Glc unidos por enlaces  $\beta$ -1,4. Es sintetizada en el citoplasma a partir de UDP-Glc y luego polimerizada en una segunda etapa en la que interviene la enzima celulosa sintasa. Aunque la polimerización es una etapa importante, es sólo la primera de varias etapas en la biosíntesis de celulosa, la mayoría de las cuales ocurre en el exterior de la superficie celular. El proceso de ensamblado de la fibra de celulosa ha sido dividido en no menos de cuatro etapas. Agregados de celulosa son secretados al medio donde se asocian para formar la fibra de celulosa, constituida por 1000 cadenas de glucano aproximadamente (154).

##### *Glucanos de bajo peso molecular*

Comprende glucanos cíclicos, lineales y ramificados que se localizan en el periplasma o en el medio extracelular (173). Los enlaces son tipo  $\beta$ -1,2;  $\beta$ -1,3 y  $\beta$ -1,6. Pueden encontrarse como compuestos neutros o cargados, por la presencia de sustituyentes ácidos (128). Fueron primeramente identificados en *Agrobacterium tumefaciens* (126) y luego en *Rhizobium* spp. (203). Los glucanos cíclicos secretados por estas bacterias presentan un grado de polimerización entre 17 y 24 (2.7 y 3.9 kDa, respectivamente), aunque la masa molecular puede llegar hasta 6 kDa (173). Son sintetizados en tres etapas: la primera consiste en la autoglucosilación de una proteína de membrana (319 kDa) a partir de UDP-Glc; posteriormente se produce la elongación de la cadena de oligosacárido; y finalmente, el glucano es ciclado y liberado de la proteína. Las tres etapas son catalizadas por la misma proteína que actúa como aceptora del primer residuo de Glc (llamada NdvB en *R. meliloti* (87) o ChvB en *A. tumefaciens* (207)).

Glucanos lineales, ramificados y cíclicos son también sintetizados por algunas especies de *Xanthomonas*, y varias cepas de *A. xylinum*, *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae* (3).

*Curdulano*

Algunas especies de *Rhizobium* y *Agrobacterium* producen varios EPS bajo determinadas condiciones fisiológicas. Uno de ellos es un polímero neutro de Glc con enlaces tipo  $\beta$ -1,3 y masa molecular relativamente baja (74 kDa aprox.). El curdulano es sintetizado en cultivos en fase estacionaria que han sido privados de nitrógeno (175). Este EPS es insoluble en agua fría, pero posee la capacidad de formar geles a temperaturas superiores a 55 °C, propiedad explotada en la industria alimenticia.

**4.1.1.ii. Heteropolisacáridos**

El grupo más cuantioso y heterogéneo de EPS, es el de los heteropolisacáridos, polímeros constituidos por distintos tipos de monosacáridos. Todos ellos (excepto los alginatos) son sintetizados por el ensamblado de unidades repetitivas, lo que les confiere una estructura regular característica. Las unidades repetitivas son sintetizadas por la acción secuencial de glicosiltransferasas sobre un lípido-fosfato que actúa como aceptor. Los nucleótido azúcares (nt-azúcares) actúan como dadores de grupos glicosilo en las reacciones de transferencia. Los heteropolisacáridos también contienen sustituyentes no hidrocarbonados en proporciones variables que dependen de las condiciones de cultivo (193).

**a) Precursores***Nucleótido azúcares*

Con excepción de los dextranos y EPS relacionados (ver apartado en 4.1.1.i.a), la biosíntesis del resto de los homopolisacáridos y todos los heteropolisacáridos depende de la disponibilidad de nt-azúcares. Estos compuestos que son principalmente nucleótido-difosfato-azúcares (NDP-azúcares), proveen de una forma “activada” del monosacárido y son los precursores inmediatos de los oligosacáridos que componen los heteropolisacáridos.

En las células procariontas, la glucosa es convertida en Glc-1-P, a partir de la cual se sintetizan UDP-Glc y ADP-Glc, como se esquematiza a continuación:

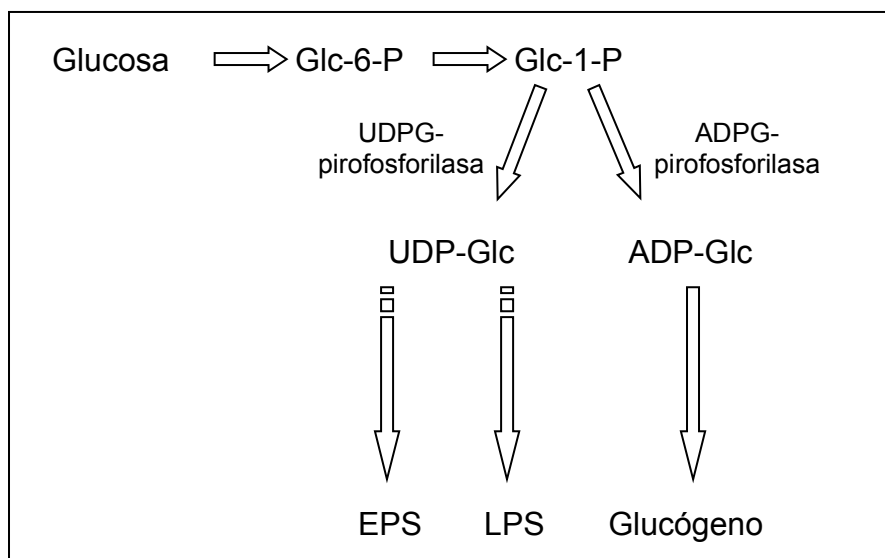


Figura 2. Metabolismo anabólico de Glc en células procariontas.

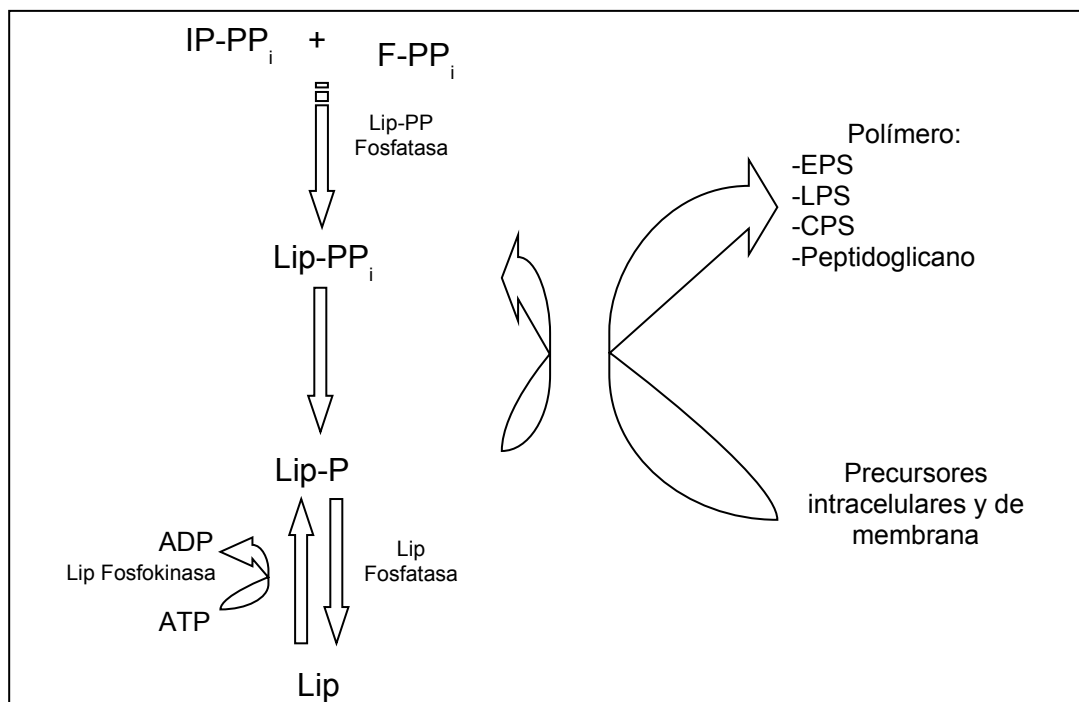
Los nt-azúcares funcionan como dadores de grupos glicosilo, pero también como precursores de varios monosacáridos: UDP-Glc es utilizado no sólo en la transferencia de residuos Glc, sino también como precursor de D-Gal, D-GlcA y otros monosacáridos (55). El destino de UDP-Glc y su utilización en la biosíntesis de diversos compuestos, sugieren un punto de control en la regulación de la síntesis de EPS a través de la disponibilidad de nt-azúcares.

Una excepción a la utilización de nt-azúcares en la síntesis de EPS, es la presencia de L-GulA en los alginatos. Este azúcar deriva de GDP-Man y GDP-ManA (siendo D-ManA el epímero de L-GulA en el C-5). L-GulA no es formado a partir de nt-azúcares, sino directamente sobre el polímero: una epimerasa convierte algunos residuos de D-ManA en L-GulA (69). Hasta el presente, es el único mecanismo de este tipo encontrado en la síntesis de EPS bacterianos.

#### *Intermediarios lipídicos*

Luego de la identificación de intermediarios lipídicos isoprenoides en la síntesis de LPS y peptidoglicano (192), (139), (198), se demostró que estos también estaban involucrados en la síntesis de heteropolisacáridos extracelulares bacterianos (181). En bacterias, el lípido isoprenoide mayoritario es el undecaprenol (C<sub>55</sub>), aunque también se han detectado otros con distinto largo de cadena (C<sub>50</sub>, C<sub>60</sub>). La presencia de poliprenol-fosfato de distinto largo de cadena, no parece ser un punto de control en la síntesis de polímeros. Más bien, la disponibilidad de lípido-fosfato, utilizado tanto para la síntesis de EPS como para la de componentes de la envoltura celular, sería un mecanismo de regulación, ya que la existencia de grupos de lípidos para cada polímero no es una alternativa probable (174).

Posteriormente a la síntesis, a partir de isopentenil-pirofosfato, el lípido se encuentra como pirofosfato (26). También se encuentra en esta forma luego de haberse completado la polimerización. Por lo tanto, para permitir el reciclado del lípido, se requiere la actividad de una fosfatasa. Esta enzima fue en un principio identificada en *Micrococcus lisodeikticus* (26) y se asumió que también se encontraba en otros microorganismos. La rápida degradación de undecaprenol-fosfato y la presencia del alcohol isoprenoide libre en especies de *Streptococcus*, *Staphylococcus* y otras bacterias, sugerían que estas fosfatasas específicas estaban ampliamente distribuidas. Recientemente la enzima de *E. coli* (producto del gen *bacA*) fue purificada a homogeneidad y caracterizada (50). Para retornar al lípido a su estado funcional, es necesaria la actividad de una fosfoquinasa dependiente de ATP. Esta enzima ha sido identificada en bacterias gram-negativas y gram-positivas (115, 158). Los procesos de síntesis y degradación de undecaprenol-fosfato pueden esquematizarse mediante las siguientes reacciones:



**Figura 3. Posibles puntos de regulación en la biosíntesis de lípidos "carrier".** IP-PP<sub>i</sub>, isopentenil-pirofosfato; F-PP<sub>i</sub>, farnesil-pirofosfato; Lip-PP<sub>i</sub>, undecaprenol-pirofosfato; Lip-P, undecaprenol-fosfato; Lip, undecaprenol (C<sub>55</sub>, alcohol isoprenoide).

La función del undecaprenol-fosfato en la biosíntesis de EPS adquiere gran importancia si se tiene en cuenta la compartimentalización durante el proceso de síntesis: los precursores y las enzimas que participan en el ensamblado de las unidades repetitivas se localizan en el citoplasma o bien en la cara interna de la membrana plasmática. En contraposición, el producto final se encuentra en el medio extracelular. El descubrimiento de que el poliisoprenol (PI) tiene la capacidad de inducir cambios estructurales en las membranas (transición de bicapa a monocapa) ha hecho sugerir que los PI facilitan el pasaje de los oligosacáridos a través de la membrana (186). Por otro lado, también se ha observado la presencia de secuencias de unión a PI (denominadas PIRS por "polyisoprenyl recognition sequence") en proteínas involucradas en la síntesis de polisacáridos bacterianos (180). Por lo tanto, el PI podría funcionar como elemento de anclaje en la membrana plasmática para glicosiltransferasas involucradas en una misma ruta de síntesis. Así el rol del PI sería organizar complejos multienzimáticos y hacer de enlace entre los procesos biosintéticos en el citoplasma y de exportación de la unidad repetitiva (206).

## b) Alginatos

Los alginatos son EPS producidos por dos grupos de bacterias muy disímiles: *Azotobacter vinelandii* y *Pseudomonas aeruginosa*. Están compuestos por dos tipos de monómeros: D-ManA y L-GulA. El polímero se encuentra sustituido con grupos acetilo en residuos de D-ManA. A diferencia del resto de los heteropolisacáridos, no son sintetizados a partir de unidades repetitivas. La estructura del polímero es irregular, contiene segmentos compuestos por un tipo de monosacárido o el otro, separados por secciones en las cuales ambos monosacáridos están presentes en secuencias irregulares (174).

No se han detectado intermediarios lipídicos en la síntesis de los alginatos. La biosíntesis de este polímero ha sido intensamente estudiada en los últimos años debido a su aparición durante infecciones pulmonares crónicas por *P. aeruginosa*, en pacientes con fibrosis quística. Tres proteínas (AlgA, C y D) son responsables de la síntesis citoplasmática del precursor GDP-

ManA. Los monosacáridos son polimerizados y transportados a través de la membrana interna, mecanismos que aún no se conocen en detalle. Luego de la polimerización algunos residuos ManA son epimerizados a GulA por la epimerasa AlgG, que se encuentra en el citoplasma, formando probablemente un complejo junto a otras proteínas involucradas en la síntesis y transporte de alginato. Luego de la epimerización algunos residuos ManA son acetilados por acción de las proteínas AlgF, J e I. Finalmente, el copolímero es transportado a través de la membrana externa bacteriana, donde se encuentra AlgE, una proteína de la familia de las porinas (149).

### c) Heteropolisacáridos sintetizados con formación previa de unidades repetitivas

Como se mencionó anteriormente, los heteropolisacáridos son polímeros complejos y su biosíntesis es llevada a cabo en varias etapas en las que intervienen un gran número de enzimas:

1) La síntesis de los precursores (nt-azúcares, undecaprenol-fosfato y sustituyentes no hidrocarbonados) es realizada por enzimas que se localizan en el citoplasma (193).

2) El ensamblado de la unidad repetitiva se produce por la acción secuencial de glicosiltransferasas específicas que probablemente se localizan en la cara interna de la membrana plasmática. Estas enzimas transfieren monosacáridos a la unidad repetitiva desde los nt-azúcares correspondientes a undecaprenol-P, que actúa como aceptor y se encuentra en la membrana plasmática (107).

3) La unidad repetitiva es luego “decorada” en el citoplasma por adición de sustituyentes como acetato, piruvato, succinato, hidroxibutirato y sulfato (107).

4) Terminada la síntesis de la unidad repetitiva, ésta es traslocada al periplasma, donde ocurriría la polimerización. Esta tiene lugar por transferencia del polímero en formación, desde su lípido aceptor al extremo no reductor de la unidad repetitiva sintetizada en último término. Esta reacción ha sido demostrada experimentalmente en la polimerización del EPS xantano (86) y en la del Antígeno O de *S. typhimurium* (125). Los procesos de polimerización y secreción al medio estarían acoplados.

Los detalles que conciernen a las etapas descriptas en 4), aún no han sido del todo aclarados. La información que proviene del estudio de sistemas de transporte de CPS, LPS y EPS, sumado al análisis de secuencias de proteínas involucradas en sistemas de transporte de polisacáridos, han permitido identificar dos familias de sistemas de exportación de carbohidratos, y proteínas auxiliares específicas para cada sistema (141). Los CPS tipo I producidos por *E. coli* y los EPS que se describirán en las siguientes secciones, son transportados por un sistema compuesto por tres componentes:

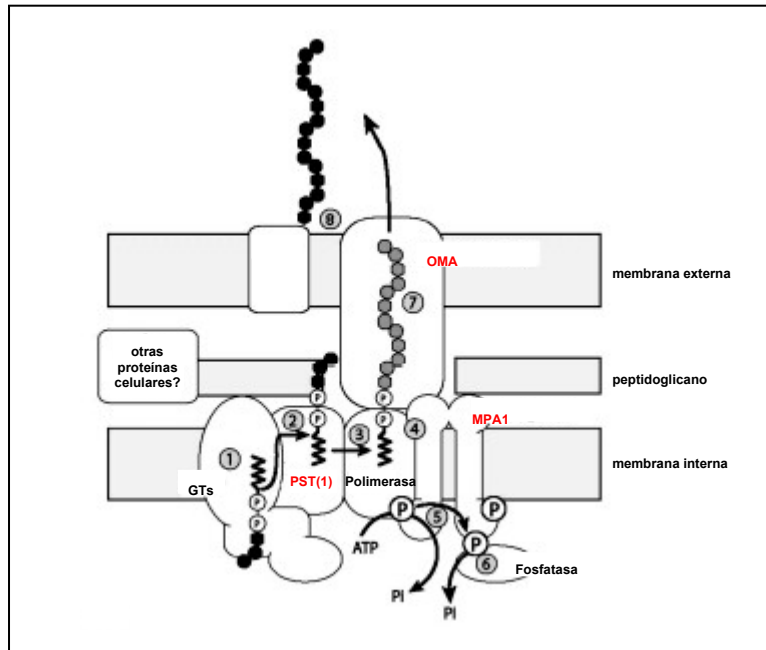
\* Una permeasa tipo PST(1) (“polysaccharide-specific transport”) ubicada en la membrana citoplasmática. Posee doce segmentos transmembrana y los extremos N y C-terminales se encuentran localizados en el citoplasma.

\* Una proteína auxiliar perteneciente a la familia MPA1-C (“cytoplasmic membrane-periplasmic auxiliary”), con dos segmentos que atraviesan la membrana plasmática y un largo “loop” periplásmico. El segmento hidrofílico C-terminal se encuentra en el citoplasma e incluye un dominio de unión de ATP.

\* Una proteína auxiliar de la familia OMA (“outer membrane auxiliary”) localizada en la membrana externa. En su extremo N-terminal posee secuencia de corte para la señal peptidasa II y un residuo de Cys conservado, que es modificado covalentemente y la transforma en una lipoproteína.

Los componentes proteicos de la síntesis de CPS y EPS, y la localización propuesta para cada uno de ellos se muestran en la Fig. 4.





**Figura 4. Complejo hipotético para la biosíntesis de EPS y CPS.** El complejo lleva a cabo una secuencia ordenada de reacciones (1-8). 1) Glicosiltransferasas (GTs) sintetizan la subunidad repetitiva sobre el lípido carrier, en la cara citoplasmática de la membrana interna. 2) El Lip-PP-oligosacárido es movilizado hacia el periplasma a través de la membrana externa en un proceso mediado por una proteína de la familia PST(1). 3) Las unidades repetitivas son polimerizadas. 4) Una proteína de la familia MPA1, cuya función es regulada por procesos de 5) y 6) fosforilación y oligomerización, es esencial en la obtención de altos niveles de polimerización. 7) La exportación del polímero a la superficie requiere de una proteína de la familia OMA en la membrana externa. Esta proteína probablemente interacciona con los otros componentes del sistema en forma directa o a través de proteínas celulares aún no identificadas. En la biosíntesis de CPS existe otra proteína en la membrana externa necesaria para el ensamblado final del polímero y su anclaje a la membrana. Los proteínas del sistema de transporte de tres componentes, se muestran en rojo. Adaptado de Whitfield y col. (194).

Gran parte del conocimiento actual de los procesos de ensamblado de la unidad repetitiva y polimerización, proviene de estudios realizados con sistemas enzimáticos libres de células de *Rhizobium meliloti* (153), *Xanthomonas campestris* (85) (86) y *Acetobacter xylinum* (28) (161). Uno de los sistemas más utilizados es el de células permeabilizadas con EDTA (44). El EDTA captura  $Mg^{2+}$  provocando la desestabilización de la estructura de la membrana, generando poros que permiten la entrada de sustratos agregados de manera exógena. La ventaja del sistema consiste en que se mantiene la organización del sistema enzimático que sintetiza el polisacárido. Trabajando con este sistema, se han podido identificar y caracterizar intermediarios en la síntesis de EPS y, en el caso del xantano, se ha podido detectar la polimerización *in vitro*. A continuación se describen características de la síntesis de los heteropolisacáridos mejor estudiados.

#### *Succinoglicano*

Es un heteropolímero constituido por unidades repetitivas de ocho azúcares (D-Glc y D-Gal en relación molar 7:1). Acetato, piruvato y succinato decoran la unidad repetitiva. La síntesis de succinoglicano ha sido extensamente estudiada en *R. meliloti*. Los genes responsables de la producción de este EPS se encuentran agrupados en la región *exo*, localizada en un megaplásmido (119). La caracterización bioquímica de mutantes *exo* permitió asignar funciones a los productos de los genes *exo* involucrados en las distintas etapas de producción y secreción del polímero (8, 14, 56, 108, 152, 153).

*Xantano*

Es un polímero ácido, producido por *X. campestris*. El polímero está compuesto de unidades pentasacáridicas formando un esqueleto de celulosa con cadenas laterales trisacáridicas compuestas por  $\text{Man}(\beta\text{-}1,4)\text{GlcA}(\beta\text{-}1,2)\text{Man}$ . Estas se unen a residuos alternados de Glc del esqueleto de celulosa por enlaces tipo  $\alpha\text{-}1,3$  (89). Aproximadamente la mitad de residuos de Man terminales están sustituidos con piruvato. Los residuos internos de Man, generalmente están O-acetilados en el C-6. La distribución y el contenido de sustituyentes depende de las cepas y de las condiciones de cultivo (18, 89).

La vía de síntesis del xantano ha sido caracterizada en detalle y constituye uno de los modelos más completos de biosíntesis de EPS. El aislamiento de mutantes no mucosos de *X. campestris*, obtenidas por mutagénesis química o por transposición de elementos móviles, permitió identificar varios loci involucrados en la síntesis de xantano (5, 22, 67, 68, 81, 178). Algunos de estos loci están vinculados a la síntesis de los nt-azúcares precursores, mientras que los genes relacionados con las etapas siguientes de la síntesis del xantano están localizados en la región *xpsI* o *gum* (22, 67). La región *gum* abarca 16 kb del genoma de *X. campestris* y contiene 12 marcos de lectura abierto (*gumB-gumM*) (GenBank U22511). Las funciones bioquímicas de los productos de los genes *gum* han sido asignadas, analizando la formación de intermediarios y polímeros *in vitro* (95). La utilización de cepas mutantes *gum* permeabilizadas con EDTA ha sido de gran ayuda en este tipo de estudios. Las etapas en la biosíntesis del xantano y las funciones de los genes *gum* se resumen en la Fig. 5.

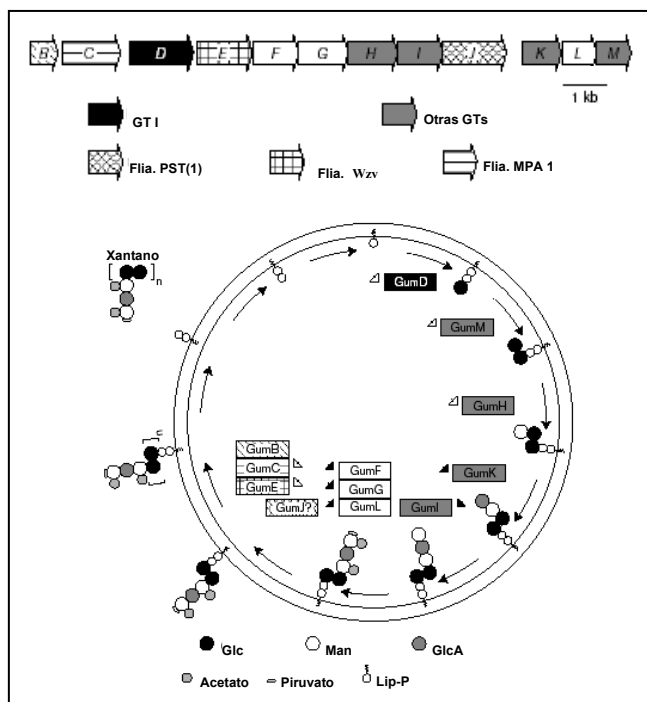


Figura 5. Mapa genético de la región *gum* de *X. campestris* y camino propuesto para la biosíntesis del xantano. Tomado de van Kranenburg y col. (187). Ver el texto.

La proteína GumD cataliza la transferencia de Glc-1-P a poliprenol-P que actúa como aceptor. Esta reacción es reversible y constituye el primer paso en la síntesis de la unidad repetitiva del xantano. La proteína GumM cataliza la adición de Glc con formación de un enlace  $\beta\text{-}1,4$ . GumH adiciona un residuo  $\alpha\text{-}1,3$  Man; seguida por GumK, que adiciona  $\beta\text{-}1,2$  GlcA y GumI que agrega la Man terminal en posición  $\beta\text{-}1,4$ . Las proteínas GumL, GumF y GumG agregan los sustituyentes a partir de acetyl CoA y PEP. GumL incorpora piruvato a la Man externa, mientras que los residuos acetato son adicionados por GumF en la Man interna y GumG en la Man externa (95). Mutantes en *gumB*, *gumC* y *gumE* son incapaces de sintetizar el polímero y se ha observado que acumulan unidades pentasacáridicas completas. Debido a esto se ha propuesto que los productos de estos genes actuarían en las etapas de polimerización y exportación del xantano. El rol de GumJ no ha sido aclarado, probablemente actúa en el transporte de la unidad repetitiva ya que ha sido agrupada en la familia PST, que incluye

permeasas específicas para polisacáridos, localizadas en la membrana interna (ver 4.1.1.ii.c) (7).

#### Acetano

*Acetobacter xylinum* siempre ha sido utilizada como modelo de estudio para la biosíntesis de celulosa. Sin embargo, los trabajos fundadores de Couso y col. (28, 29), demostraron que además de celulosa, es capaz de sintetizar un polímero por ensamblado de unidades repetitivas heptasacáridicas. El acetano, se compone de Glc, Man, GlcA y Rha en relación molar 4:1:1:1. La estructura de la unidad repetitiva se muestra en la Fig. 6.

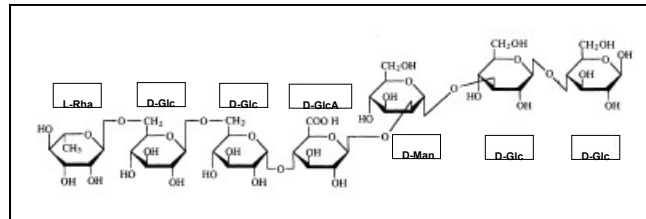
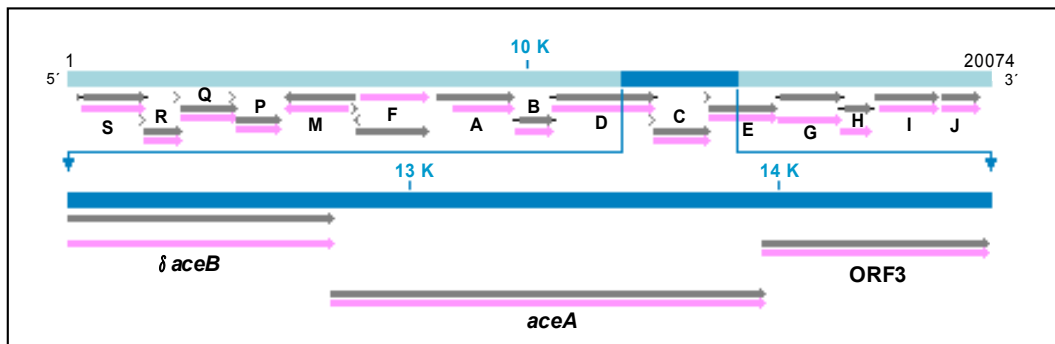


Figura 6. Estructura de la subunidad repetitiva del EPS acetano.

Utilizando células de *A. xylinum* permeabilizadas con EDTA y agregando los nt-azúcares precursores de manera exógena, fue posible identificar y caracterizar los intermediarios en cada etapa de la síntesis de la unidad repetitiva. Los intentos por detectar la polimerización *in vitro* con dicho método fueron infructuosos. Sin embargo, utilizando células permeabilizadas por electroporación fue posible detectar la polimerización *in vitro* de la unidad repetitiva heptasacáridica del acetano (161).

A pesar de que la biosíntesis de acetano ha sido dilucidada a nivel bioquímico, poco se sabe aún sobre los aspectos genéticos debido a la baja frecuencia de transformación de *A. xylinum*. Esto ha sido atribuido a la existencia de un sistema de modificación-restricción que sería responsable de la baja frecuencia de introducción y/o establecimiento de ADN exógeno en esta bacteria (145). También se ha sugerido la existencia de plásmidos crípticos en *Acetobacter* que serían incompatibles con los plásmidos introducidos (185). A pesar de esta limitación se ha progresado en la identificación de genes que codifican glicosiltransferasas (GTs) vinculadas a la síntesis de la unidad repetitiva del acetano (37, 59, 60, 88, 146). Algunas GTs han sido clonadas y caracterizadas, mientras que otras sólo han sido identificadas por homología de secuencia. Debido a que la información es fragmentaria y proviene de distintos laboratorios, la nomenclatura para los genes relacionados a la síntesis de acetano y sus productos proteicos es confusa. Tal como se ha observado en otros sistemas, los genes para la biosíntesis de acetano están organizados en un operón. Actualmente se conoce parte del mapa genético de esta región (GeneBank AB059427), que está organizado como se muestra en la Fig. 7.



**Figura 7. Mapa genético de la región involucrada en la síntesis de acetano.** La región de ~20 kb comprende genes de la biosíntesis de acetano y sus precursores. Las funciones de los genes han sido asignadas por homología de secuencia, excepto los genes C, Q, P y R, cuya función bioquímica ha sido demostrada (ver el texto). *aceS*, proteasa; *aceR*, RhaT; *aceQ*, HexosilT; *aceP*, GlcT; *aceM*, UDPG-deshidrogenasa; *aceF*, Man-6-P-isomerasa; *aceA*, GlcT; *aceB*, GlcT; *aceD* y *aceI*, proteínas de unión de ATP; *aceC*, ManT; *aceE*, proteína de transporte; *aceG* y *aceH*, proteínas de función desconocida; *aceI*, aciltransferasa. La zona ampliada (azul) muestra el fragmento de 2.3 kb clonado y secuenciado por Petroni y col. (146) a partir del cual se obtuvo la secuencia codificante de la ManT AceA. Nótese la nomenclatura diferente: *aceA* es la ManT III *aceC* de la secuencia del GeneBank. En gris se indica la secuencia completa del gen, en rosa sólo la secuencia codificante.

Los únicos genes que han sido caracterizados como GTs asociadas a la síntesis de acetano son *aceC*, *aceP*, *aceQ* y *aceR*. La asignación de funciones, en el caso de los tres últimos ha sido posible por la obtención de cepas mutantes y/o tratadas químicamente, que presentan una alta frecuencia de transformación. La obtención de mutantes por disrupción génica de estas cepas y el análisis de los intermediarios o los polisacáridos secretados por éstas, ha permitido establecer que *aceP* codifica para la GT VI (37), mientras que *aceQ* y *aceR*, codifican para las GT V y VII (88), respectivamente. A diferencia de estas últimas, el clonado y la caracterización de *aceC*, fue realizado en nuestro laboratorio, siguiendo una estrategia completamente distinta a la descrita (146). Por razones “históricas” y de hábito, de aquí en adelante el gen *aceC* será llamado *aceA*, tal como fue denominado por Petroni y col. en un principio. La estrategia para el clonado y caracterización de *aceA*, se basó en la similitud existente entre la estructuras del acetano y el xantano. Ambos polímeros pueden considerarse como “celulosas modificadas”, ya que constan de un esqueleto de celulosa con cadenas laterales que se ubican alternadamente sobre las Glc de la cadena principal. En el caso del xantano, las cadenas laterales son de tres azúcares, mientras que en el acetano son de cinco azúcares. La similitud estructural entre las unidades repetitivas de ambos polímeros es notable, los cuatro primeros azúcares son idénticos y se encuentran unidos por el mismo tipo de enlaces. Esto hace suponer que las enzimas que catalizan los cuatro primeros pasos en la síntesis de las unidades repetitivas deben presentar un alto grado de homología. Debido a las similitudes mencionadas fue posible realizar el análisis de una biblioteca genómica de *A. xylinum* por complementación de mutantes de *X. campestris* deficientes en la producción de xantano. De esta manera se logró aislar un fragmento de 2.3 kb, de la región cromosómica de *A. xylinum* involucrada en la síntesis de acetano (ver ampliación en la Fig. 7) (146). Esta región contenía al gen *aceA*, cuyo producto caracterizamos en esta tesis tal como se describirá más adelante.

## 4.2. Glicosiltransferasas

Las reacciones de glicosilación, que son de gran importancia biológica tanto en procariotas como en eucariotas, son catalizadas por un grupo numeroso y diverso de proteínas, las glicosiltransferasas (GTs). Estas enzimas transfieren azúcares desde de un dador activado a un aceptor. Las moléculas dadoras del residuo azúcar pueden ser disacáridos, azúcares-fosfato, lípido-azúcares y, más comúnmente nt-azúcares. Por su parte las moléculas aceptoras son de naturaleza variada, todas las categorías de macromoléculas (oligosacáridos, lípidos, ácidos nucleicos, proteínas) pueden ser glicosiladas, provocando efectos marcados en su función. Además de actuar en todos los procesos biosintéticos que involucran carbohidratos, las GTs constituyen blancos importantes de drogas utilizadas para combatir el cáncer, así como también, contra infecciones causadas por virus, bacterias y hongos (11). Las GTs también representan una importante herramienta biotecnológica en la síntesis quimio-enzimática de oligosacáridos (34, 160). Tomando en cuenta el amplio espectro de estructuras que producen y las funciones en que están involucradas, podría decirse que las GTs son el grupo de enzimas más diverso que existe.

A pesar de las múltiples aplicaciones de estas enzimas, su caracterización a nivel estructural y funcional no se ha desarrollado en forma acelerada. Esto se debe principalmente a las dificultades encontradas en la expresión de GTs, que frecuentemente son proteínas de membrana; y en la caracterización de mecanismos catalíticos con sustratos complejos. Los obstáculos encontrados en la caracterización de estas enzimas se ven reflejados en el hecho de que para mediados de 1999, sólo se había resuelto la estructura de una GT (190). Sin embargo, el desarrollo tecnológico de los últimos años, ha permitido obtener nuevas estructuras de GTs (28 hasta el momento de escribir esta tesis) que proveen no sólo valiosa información sobre las bases de la unión de los sustratos, la especificidad y la catálisis, sino también, ha abierto nuevas perspectivas en cuanto a la clasificación y los orígenes evolutivos de este vasto grupo de proteínas.

### 4.2.1. Clasificación

La secuenciación de genomas, ha ampliado de manera notable, el número de secuencias de GTs. Se ha estimado que aproximadamente el 1 % de los marcos de lectura abierto de cada genoma está involucrado en la tarea de sintetizar enlaces glicosídicos (30). La difícil caracterización de GTs ha ampliado enormemente la brecha existente entre el pequeño número de GTs de función conocida y miles de secuencias de GTs putativas que engrosan actualmente los bancos de datos. Para aprovechar al máximo los recursos genómicos es imprescindible establecer relaciones entre secuencia y estructura, mecanismo y especificidad de estas enzimas.

Existen al menos dos grandes grupos de GTs: las enzimas procesivas, como la celulosa sintasa, que transfieren múltiples residuos de azúcar al aceptor; y las enzimas no procesivas, como las que participan en la síntesis de unidades repetitivas de EPS y catalizan la transferencia de un único residuo azúcar al aceptor (159). Por otro lado, puede hacerse otra gran división entre GTs, basándose en la estereoquímica del enlace formado y del dador del residuo azúcar. Así pueden definirse dos grupos de GTs: las que actúan con retención o con inversión de la configuración del C-anomérico. Las primeras, catalizan la formación de enlaces glicosídicos de estereoquímica idéntica a la del sustrato dador; mientras que las que actúan con inversión producen enlaces glicosídicos de estereoquímica opuesta (35). Esta situación es idéntica a la descrita para glicosilhidrolasas (GHs), que catalizan la hidrólisis de azúcares con retención o inversión de la configuración (124). Las GHs han sido clasificadas en varias familias en base a su similitud en secuencia aminoacídica (76). La caracterización de estas enzimas ha demostrado que miembros de una determinada familia de GH poseen estructuras 3D similares y además utilizan el mismo mecanismo catalítico. Desafortunadamente, en el caso de GTs, la similitud en secuencia primaria es frecuentemente muy baja y esto impide su agrupamiento utilizando métodos corrientes de alineamiento de secuencias.

Las GTs, al igual que otros grupos de enzimas, han sido clasificadas basándose en la especificidad por sus sustratos y el producto formado, de acuerdo a las recomendaciones de la

Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB) (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>). La utilidad de este sistema de clasificación es limitada en el caso de GTs, ya que requiere una caracterización detallada de los sustratos y productos de la enzima para poder asignarle un número EC (Enzyme Commission number). Este sistema no puede lidiar adecuadamente con enzimas que actúan sobre varios sustratos distintos y sumado a esto, tampoco refleja características estructurales y mecanísticas de las enzimas.

Varios sistemas de nomenclatura han sido propuestos para GTs, y varios permanecen aún en uso (6, 94). En 1997, Campbell y col. proponen un sistema de clasificación para GTs dependientes de nt-azúcares (19), que constituye el cimiento del sistema más completo de clasificación de GTs con que se cuenta actualmente. Este fue ideado a partir de la utilidad del sistema de clasificación de GHs basado en similitud de secuencia. La principal ventaja de este tipo de sistema es que reúne enzimas en familias poli-específicas y permite distinguir relaciones evolutivas entre familias. La validez de estos sistemas de clasificación ha sido luego confirmada al encontrar un mismo tipo de plegamiento y un mecanismo catalítico conservado entre miembros de una familia. Como se mencionó anteriormente la baja similitud a nivel de secuencia aminoacídica entre GTs, hizo necesario hacer uso de otros métodos para el agrupamiento en familias. Como complemento a las búsquedas de homología por BLAST, se utilizó el análisis de grupos de hidrofobicidad (HCA) (19). El HCA (43, 111) constituye un método eficaz para la detección de semejanza estructural en proteínas que presentan baja homología de secuencia. El HCA ha sido utilizado con éxito en el agrupamiento de celulasas, que presentaban entre 11 y 15 % de identidad de secuencia, en familias de estructura similar (75). Este método también ha permitido predecir residuos catalíticos en otras GHs (72). La sensibilidad del HCA a bajos niveles de identidad, surge de la capacidad del método para detectar elementos de estructura secundaria en secuencias proteicas. Los fundamentos teóricos del HCA y su utilización en el estudio de la manosiltransferasa AceA se detallarán más adelante (ver sección 7.5.).

La clasificación de Campbell, que incluía 27 familias de GTs conteniendo las 600 secuencias disponibles entonces, ha crecido considerablemente y comprende más de 14.000 secuencias agrupadas en 78 familias en la actualidad. Asimismo la clasificación ha sido extendida para integrar GTs que utilizan lípido-azúcares y azúcares-fosfato como dadores activados. Todas estas enzimas catalizan reacciones de O-glicosilación, presumiblemente a través de estados de transición con carácter de ión oxocarbonio e involucran la partida de grupos salientes fosforilados generados a partir de los dadores de azúcar activados. Las enzimas que utilizan disacáridos, oligo o polisacáridos como dadores de azúcar (tal es el caso de ciclodextrinaglucanotransferasas, xiloglucan- endotransferasas, dextran-sacarasas, entre otras) no están incluídas en la clasificación de GTs. Estas enzimas son transglicosidasas, están relacionadas evolutiva y estructuralmente a las GHs y por lo tanto son incluídas en la clasificación de GHs (73, 74). Otras enzimas no consideradas GTs son las transferasas de azúcar-fosfato, como las que catalizan la conversión de UDP-azúcar y dolicol-fosfato a azúcar-difosfato-dolicol y UMP. Estas enzimas no son GTs ya que catalizan una reacción de sustitución en el átomo de fósforo del grupo fosfato.

Un principio fundamental de cualquier sistema de clasificación es que debe tener poder predictivo. Dado que la similitud de secuencia es indicativa de similitud estructural, la clasificación de GTs de Campbell (19, 20) es capaz de proveer información de la estructura 3D de una proteína, ya que se espera que la estructura tridimensional esté conservada entre miembros de una familia. Por otro lado, como el mecanismo catalítico es determinado por la posición relativa de ciertos grupos funcionales en la estructura terciaria de la proteína; también es de esperar que el mecanismo y la estereoquímica de la reacción catalizada estén conservados dentro de cada familia.

Como consecuencia de la enorme cantidad de secuencias provenientes de proyectos genoma, la mayoría de los miembros de familias de GTs corresponden a marcos de lectura abierto no caracterizados. Debido a las dificultades que presenta la producción y caracterización de GTs, esta situación probablemente empeorará y la proporción de secuencias no caracterizadas aumentará en el futuro. A pesar de ello, las GTs caracterizadas dan prueba de la validez del sistema de clasificación, y ha permitido corroborar su poder de predicción. Así, secuencias que

eran anotadas como “GTs putativas” hoy pueden anotarse como “GT putativa que actúa con inversión (o retención) perteneciente a la familia X”. A medida que nos adentramos en la era post-genómica, un sistema de clasificación de este tipo constituye una herramienta fundamental en un área compleja como es la glicobiología.

Sin embargo, la utilización de este sistema para predecir especificidad, debe tomarse con cautela, ya que existen casos documentados de GTs en las que el cambio de unos pocos aminoácidos alteró la especificidad de la enzima (162). Por lo tanto, si un marco de lectura abierto está relacionado con una gran familia poliespecífica de GTs, de las cuales sólo unos pocos miembros han sido caracterizados, como es comúnmente el caso, la especificidad por sus sustratos y el producto formado no pueden predecirse con confianza.

La comparación de estructura 3D, es el método más eficaz para establecer relación entre proteínas, aún cuando la similitud en secuencia sea casi inexistente. Teniendo en cuenta el número de familias en el esquema de clasificación de Campbell, la diversidad estructural y funcional de sus productos y su divergente historia evolutiva, sería lógico esperar que las GTs presentaran diversidad estructural significativa. En GHs, que catalizan la reacción inversa, se han identificado un gran número de tipos de plegamiento (32, 76). Sorprendentemente, este no es el caso de las GTs. La reciente resolución de la estructura de 28 GTs, ha mostrado que estas adoptan sólo dos tipos de plegamiento, que han sido denominados GT-A y GT-B (10). El hecho de que existan sólo dos tipos de estructura para este vasto grupo de enzimas, refleja por un lado, la limitación impuesta por contener un dominio de unión de nucleótido; y por otro lado, una potencial historia evolutiva originada a partir de unas pocas secuencias precursoras.

Cabe destacar que el tipo de plegamiento no está relacionado con la estereoquímica de la reacción: GTs que actúan con retención de la configuración claramente presentan estructuras relacionadas con GTs que invierten la configuración del C-anomérico. Esto señala un origen evolutivo común para ambos tipos de enzimas.

Por analogía con GHS, se ha propuesto el agrupamiento de familias de GTs que presentan el mismo plegamiento y mecanismo molecular en clanes. Para las GTs que actúan con inversión se han definido dos clanes: clan I, que presenta plegamiento tipo GT-A (familias 2, 7, 9, 13 y 43) y clan II con plegamiento tipo GT-B (familias 1, 28, 63). De manera similar, se definieron dos clanes para GTs que actúan con retención: clan III, con plegamiento GT-A (familias 6, 8, 15, 27, 64 y 78) y clan IV, con plegamiento GT-B (familias 5, 20 y 35) (ver Fig. 13 en sección 4.2.3.).

La conservación de la estructura de GTs tiene importantes implicancias en el campo de la síntesis de glicoconjugados y oligosacáridos: probablemente manipular GTs con fines prácticos, sea mucho más sencillo de lo que se pensó en un principio. La evidencia acumulada hasta el presente parece señalar que es posible identificar regiones o sólo residuos que determinan la especificidad y alterarlos para modificarlos o “relajarlos”. Así la principal limitante al uso de enzimas en síntesis química que era su “selectividad” parece no ser una barrera infranqueable.

La clasificación de Campbell de GTs está disponible en la web (<http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>) y forma parte de un sistema de clasificación expandido (CAZY “carbohydrate active enzymes”) que incluye también GHs, glicosil-esterasas, polisacárido-liasas y todos los módulos no catalíticos (CBM) asociados a estas enzimas.

#### 4.2.2. Mecanismos de reacción

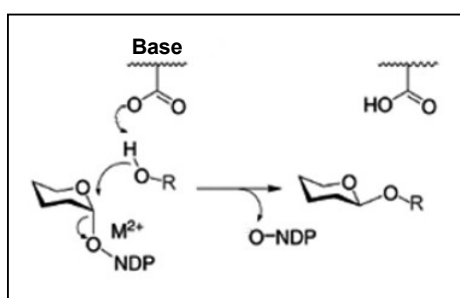
La síntesis de enlaces glicosídicos en la naturaleza ocurre a través de diferentes estrategias. Las GHs, que normalmente son consideradas enzimas degradativas, pueden, bajo determinadas condiciones actuar en sentido opuesto y catalizar la síntesis de enlaces glicosídicos (182). Esta estrategia se ve limitada por el hecho de que la mayoría de las reacciones tienen lugar en solución acuosa y los procesos hidrolíticos (degradativos) se ven favorecidos. En consecuencia, la gran mayoría de enlaces glicosídicos son sintetizados utilizando como dadores de azúcar precursores activados. Estos compuestos poseen “buenos grupos salientes” que dirigen la reacción a favor de la síntesis. Los dadores activados más comunes son los nt-azúcares.

Como se mencionó anteriormente, existen dos clases generales de GTs según inviertan o retengan la configuración anomérica. Las estructuras en anillo de los azúcares poseen un C-

anomérico. En la forma lineal del azúcar, este átomo es aquiral, pero cuando ocurre el ciclado, adquiere quiralidad y así, puede presentar una de dos estereoquímicas:  $\alpha$  o  $\beta$ . Por lo tanto las enzimas que catalizan una sustitución nucleofílica sobre este centro anomérico (es decir, las GTs y GHs) se agrupan en dos clases según provoquen la inversión o retención de la estereoquímica del centro anomérico.

En los nt-azúcares, dadores de un gran número de reacciones catalizadas por GTs, el residuo azúcar se encuentra invariablemente en configuración  $\alpha$ . Por lo tanto las reacciones de inversión dan lugar a productos con uniones  $\beta$  (la configuración anomérica ha sido invertida respecto a la del sustrato), mientras que, la retención de la configuración anomérica da lugar a productos con uniones  $\alpha$ , cuya estereoquímica es idéntica a la del residuo azúcar del sustrato dador.

Desde el punto de vista mecanístico, las enzimas que proceden con retención son las que han generado más polémica. Por el contrario, el mecanismo de las GTs que actúan con inversión puede delimitarse más fácilmente (Fig. 8)



**Figura 8. Mecanismo de reacción para GTs que actúan con inversión.** Es una reacción de desplazamiento simple, en la cual el dador de azúcar activado es atacado por el aceptor, resultando en la inversión de la configuración anomérica. (35)

Se trata de una reacción de desplazamiento simple en la cual el sustrato aceptor hace un ataque nucleofílico sobre el dador de azúcar. Un aminoácido (generalmente ácido) actúa como base de Brønsted provocando la deprotonación del sustrato aceptor y de esta manera contribuye al ataque nucleofílico. La partida del grupo saliente (NDP) es asistida por un ión metálico divalente ( $M^{2+}$ ). Este mecanismo catalítico deriva de trabajos que muestran la existencia de estados de transición con carácter de ión oxocarbenio y por comparación con los mecanismos de reacción más estudiados de GHs (100, 137, 167). La medición de efectos isotópicos secundarios en sacarosa sintasa de germen de trigo (166), glucógeno sintasa de conejo (101) y  $\beta$ 4Gal-T1 (100), apoyan un mecanismo en el cual el C-anomérico del sustrato dador posee carácter  $sp^2$  considerable. Más recientemente, se ha observado que la  $\alpha$ -1,3-FucT V no sólo presenta efectos isotópicos similares, sino que la guanosina-difosfato- $\beta$ -L(2-deoxi-2-fluoro)-fucosa, actúa como un potente inhibidor de la enzima ( $k_i = 4.2 \mu M$ ) (137). El efecto atrayente de electrones del grupo 2-fluoro ha sido tomado como evidencia de la acumulación de carga positiva en la posición anomérica de GDP-Fuc en el estado de transición. Estudios de inhibición similares realizados con  $\beta$ 4Gal-T1 (71),  $\alpha$ -1,3-FucT V (147) y  $\alpha$ -1,3-GalT (176) dan sostén a la formación de estados de transición con carácter de ión oxocarbonio en las reacciones de glicosilación.

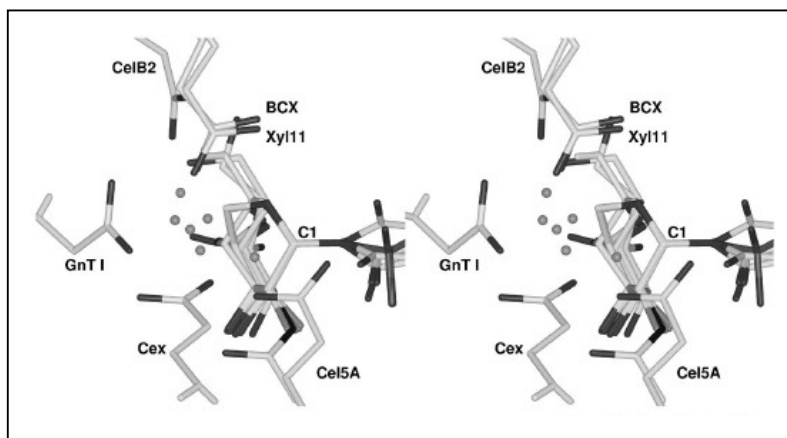
Numerosos estudios apoyan un mecanismo para GHs que actúan con retención, en el cual durante el curso de la reacción, se atraviesan dos estados de transición oxocarbenio y se forma un intermediario covalente glicosil-enzima (202). En el caso de GHs, este mecanismo está debidamente sustentado por evidencia experimental y existen varios ejemplos de GHs de las que se ha logrado aislar la enzima glicosilada que actúa como intermediario en la reacción. El ejemplo más contundente proviene del trabajo realizado por Vocadlo y col. que, en una revisión del muy estudiado mecanismo catalítico de la lisozima de huevo, demostraron la formación de un intermediario covalente glicosil-enzima en un residuo Asp de la proteína (189). De esta manera se pone fin a un largo debate respecto al mecanismo catalítico de esta enzima y se descarta la opción del "par iónico" como intermediario de la reacción.

La hidrólisis del intermediario covalente por una GH, se asemeja a la reacción catalizada por GTs que invierten la configuración. La disponibilidad de datos sobre intermediarios de GHs y



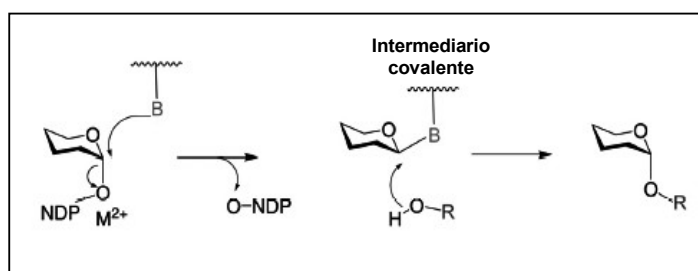
estructuras de GTs, permite hacer un paralelismo entre los mecanismos de GHs y GTs y analizarlo en términos de estructura. En la Fig. 9 se muestra la superposición de cinco intermediarios covalentes de  $\beta$ -GHs con la estructura del sitio activo de la GT GnT I formando complejo con el sustrato dador UDP-GlcNac.

**Figura 9. Estereoisomagen de la superposición del sitio activo de la GT GnT I con cinco intermediarios glicosil-enzima de GHs.** GntI de conejo (D291), *S. lividans* CelB2 (E203), *B. circulans* BCX (E172), *B. agaradhaerens* Xyl11 (E184), *Cellulomonas fimi* Cex (E127) y *B. agaradhaerens* CelA5 (E139). Las esferas corresponden a moléculas de agua. Las estructuras fueron superpuestas utilizando las posiciones de los átomos C1, O1, C2 y O5 del residuo de azúcar. Tomado de Unligil y Rini (183).



Los residuos que funcionan como base catalítica se encuentran a una distancia constante del C-1 del azúcar. En GnT I y cuatro de las GHs, la base catalítica está unida por un puente hidrógeno a una molécula de agua en posición adecuada para el ataque nucleofílico. En las GTs, el agua sería reemplazada por el nucleófilo entrante que aporta el sustrato acepto (183). Este análisis provee evidencia estructural que sugiere un mecanismo catalítico conservado entre GHs y GTs (184).

Por lo expuesto anteriormente y la información estructural obtenida hasta el presente, el mecanismo de GTs que proceden con inversión parece entenderse razonablemente. No ocurre lo mismo con GTs que retienen la configuración del C-anomérico. Aunque un mecanismo de doble desplazamiento (similar al descrito para GHs que actúan con retención) resulta la opción más lógica (Fig. 10) no hay evidencia experimental fuertemente sustentada de la existencia del intermediario glicosil-enzima, y la naturaleza del nucleófilo enzimático continúa en discusión.

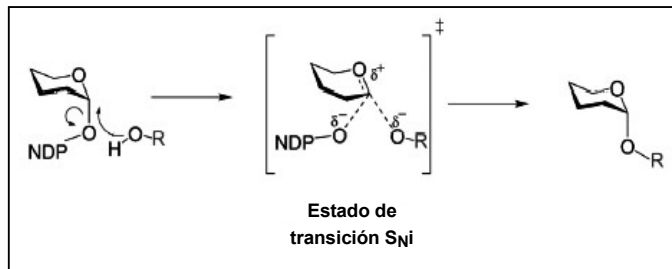


**Figura 10. Mecanismo de reacción propuesto para GTs que actúan con retención.** Por analogía con el mecanismo de GHs que retienen la configuración, la reacción ocurriría a través de un intermediario covalente glicosil-enzima (35).

Si las GTs que actúan con retención siguieran un mecanismo de doble desplazamiento sería esperable encontrar al nucleófilo por encima del plano (cara  $\beta$ ) del nt-azúcar. Además, por analogía con GHs, aminoácidos con grupos ácidos serían los candidatos óptimos para cumplir el rol del nucleófilo. Sin embargo, debido a que estos residuos frecuentemente no están conservados en determinadas familias de GTs, o no están ubicados apropiadamente en el sitio activo, es necesario identificar nucleófilos alternativos. En principio, el oxígeno carbonílico de un grupo amida en una cadena lateral (144) o incluso, en la cadena principal (129), podrían cumplir esa función.

La GalT LgtC de *Neisseria meningitidis*, fue la primer GT de retención que fue cristalizada (144). Un hecho notorio es que esta GT fue la primera en ser cristalizada en presencia de análogos de ambos sustratos. A pesar de este importante logro, la estructura 3D de LgtC no ha resuelto el enigma del mecanismo catalítico. Se ha propuesto que grupos hidroxilo del aceptor lactosa, actuarían como nucleófilo de la reacción. Sin embargo, los resultados obtenidos con

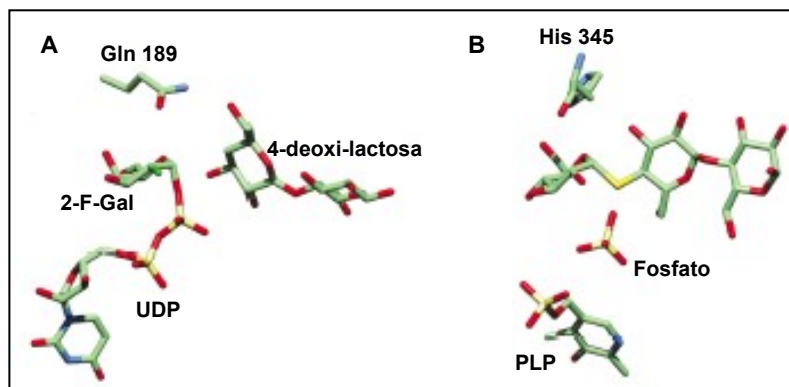
análogos del azúcar no fueron concluyentes. Otra posibilidad propuesta por Persson y col., es que la enzima utiliza un mecanismo muy poco usual llamado  $S_Ni$  (“internal return” mechanism). En éste, el ataque nucleofílico ejercido por el aceptor y la partida del grupo saliente ocurren simultáneamente sobre el mismo plano del azúcar (Fig. 11).



**Figura 11. Mecanismo tipo  $S_Ni$  propuesto para GTs que actúan con retención.** En el estado de transición, el grupo que ejerce el ataque nucleofílico y el grupo saliente se encuentran simultáneamente en el mismo plano del anillo azúcar (35).

Un mecanismo de este tipo, aunque poco usual, fue propuesto anteriormente para la enzima glucógeno fosforilasa (167). Esta enzima presenta una serie de similitudes estructurales con LgtC. De hecho, la glucógeno fosforilasa puede considerarse una GT de retención (aunque no dependiente de nt-azúcar) ya que utiliza Glc-1-P como dador de azúcar activado para la síntesis reversible de enlaces tipo  $\alpha$ -1,4.

En la Fig. 12 se observa la semejanza estructural entre los sitios activos de LgtC y la maltodextrina fosforilasa, lo que sugiere, que ambas enzimas utilizarían un mecanismo de reacción similar.



**Figura 12. El sitio activo de la GT LgtC es similar al de glucógeno y maltodextrina fosforilasas.** A) complejo de LgtC con los análogos de sustrato UDP-2-F-Gal y 4-deoxi-lactosa (PDB 1GA8). B) complejo de maltodextrina fosforilasa con el cofactor piridoxal fosfato (PLP), fosfato y un tio-oligosacárido. Tomado de Davies (35)

El cofactor piridoxal-5'-fosfato de la fosforilasa, ocupa el sitio de la porción nucleotídica del UDP-Gal en LgtC, mientras que la Glc-1-P en la fosforilasa se ubica en forma similar a Gal-P del nt-azúcar en LgtC. También es notable, la inusual conformación plegada de UDP-Gal, que se asemeja a la disposición de la Glc-1-P en el sitio activo de la fosforilasa (35).

El nucleófilo propuesto para la maltodextrina fosforilasa (grupo carbonilo de la cadena principal aportado por His 345) se superpone a la cadena lateral de Gln 189 en LgtC. Ambos grupos están ubicados sobre la cara  $\beta$  del sustrato dador, desde donde podrían afectar el ataque nucleofílico sobre el C-1 del azúcar. Sin embargo, la mutación de Gln 189 en LgtC, demostró que este aminoácido no es el nucleófilo de la reacción, ya que la enzima mutada conservaba un porcentaje considerable de actividad residual (144).

Más recientemente se ha reportado la “captura” de un intermediario covalente glicosil-enzima de LgtC (105). La obtención de una mutante en la que Gln189 fue sustituida por Glu, derivó (inesperadamente) en el aislamiento de la enzima unida a Gal. Sorprendentemente, el residuo implicado en la unión covalente no resultó ser Glu 189, sino el aminoácido contiguo Asp 190. Este residuo no se había tenido en cuenta como potencial nucleófilo catalítico debido a la distancia (8.9 Å) que separa al grupo carboxilato del centro de reacción en la estructura

cristalina de LgtC. Si Asp 190 fuera el nucleófilo de la reacción, debería ocurrir un cambio conformacional de la proteína, de manera que este aminoácido sea reorientado adecuadamente respecto al nt-azúcar. Un cambio conformacional significativo durante la catálisis ha sido propuesto a partir de la estructura 3D de la enzima Glicogenina (GT de la familia 8) en presencia del sustrato dador (51). Esta enzima transfiere un residuo de Glc a partir de UDP-Glc, al grupo hidroxilo de Tyr 195 que se encuentra en la superficie de otro monómero de glicogenina. El carboxilato del nucleófilo de esta enzima (Asp 163) se encuentra a 6.1 Å del C-anomérico del nt-azúcar dador.

El complejo LgtC-Gal constituye la primer observación directa de un intermediario covalentemente unido al sitio activo de una GT de retención. Aunque los resultados obtenidos por Lairson y col. (105), no son concluyentes, tienen importantes implicancias. Por un lado, señalan la necesidad de complementar los datos estructurales con otro tipo de estudios (cinética, mutagénesis, simulaciones de dinámica molecular) para la interpretación de mecanismos de reacción; y además, reflotan el controvertido mecanismo de doble desplazamiento que ha servido de modelo para el estudio mecanístico de GTs que actúan con retención de la configuración anomérica.

#### 4.2.2.i. Sitios de unión de los sustratos

Otra característica mecanística importante que surge de las estructuras 3D resueltas, es la interacción entre los sitios de unión del sustrato dador y del aceptor. En algunos casos (GnTI (184), LgtC (144)), el sitio de unión del aceptor se encuentra disponible sólo después de la unión del nt-azúcar, mientras que también existen ejemplos de lo contrario (GtfB (135), OleD (148)).

Como se describirá más adelante, la estructura de las GTs estudiadas muestra que estas adoptan dos tipos de plegamiento que se caracterizan por su simetría (GT-A y GT-B).

Cabe destacar que los sitios de unión del nt-azúcar se encuentran en el dominio N-terminal de enzimas que presentan plegamiento tipo GT-A, y en el dominio C-terminal de las que poseen plegamiento GT-B; mientras que los sustratos aceptores se unen a sitios ubicados en el otro dominio. Las características de ambos tipos de plegamiento se tratarán en la siguiente sección (ver 4.2.3).

#### 4.2.2.ii. Utilización de iones divalentes

Las GTs que presentan plegamiento GT-A se diferencian de las agrupadas como GT-B en su requerimiento de cationes divalentes. Todas las GTs caracterizadas como GT-A presentan una restricción estructural en la coordinación de un ión metálico por medio de dos átomos de oxígeno de los fosfatos del nt-azúcar y las cadenas laterales de residuos de la enzima. Estas cadenas laterales son aportadas por residuos de un motivo muy conservado que se ha denominado “DXD” (196), aunque existen variaciones del mismo y cualquiera de los Asp puede estar reemplazado por otro residuo o puede ocupar otra posición en el dominio. Así, variaciones del mismo (NDD, S/TDD, entre otros) se han encontrado en varias GTs cumpliendo la misma función, aunque en todas se ha observado que el dominio es precedido por una secuencia de aminoácidos no polares (ver sección 4.2.3.i.).

El motivo DXD cumple una doble función en la catálisis de GTs. Por una parte, participa en la unión de un ión metálico divalente (generalmente  $Mn^{2+}$ ) que es esencial para la catálisis, ayudando a anclar al grupo pirofosfato del nt-azúcar donador en el sitio activo de la enzima. Por otra, asiste la partida del grupo saliente (UDP), contrarrestando la carga negativa que se desarrolla sobre el fosfato- $\beta$  luego de la ruptura del enlace azúcar-fosfato en el sustrato dador (183).

A diferencia de aquellas, las GTs con plegamiento GT-B no presentan este requerimiento y no se ha detectado la presencia de iones metálicos en las estructuras 3D resueltas, excepto en el caso de BGT del fago T4, en la que se encontró un ión metálico unido en cercanía al fosfato- $\beta$  del nt-azúcar (132). A pesar de no presentar una dependencia estricta por cationes divalentes, se ha observado que en presencia de éstos algunos miembros de GT-B muestran una tasa de reacción aumentada, aunque se desconocen las causas (83, 90).

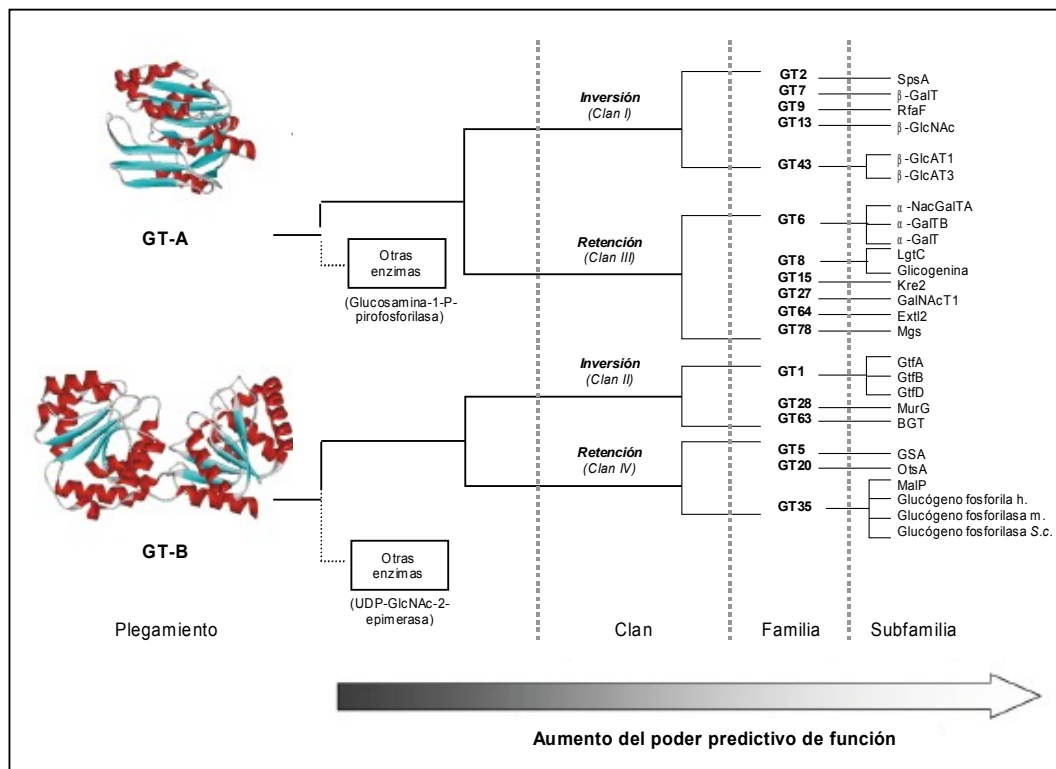
Un relevamiento de las GTs agrupadas en CAZY, muestra que el 71 % de las GTs contiene un motivo DXD o similar en alguna parte de su secuencia. El motivo también fue hallado en el 69 % de las GHs agrupadas en CAZY y también en el 51 % de las secuencias contenidas en Swiss Prot. La advertencia es clara: la aparición de un motivo tipo DXD no debe ser interpretada como diagnóstico de función GT, así como tampoco la presencia de más de una copia del motivo en una secuencia, indica la existencia de dos sitios activos (30).

#### 4.2.3. Plegamiento y dominios conservados.

La estructura 3D de la primer GT fue obtenida en 1994 (190), se trató de una enzima del bacteriófago T4, la  $\beta$ -GlcT (o T4BGT), que forma parte de un sistema de protección del ADN viral contra nucleasas virales y contra el sistema de endonucleasas del huésped. Esta enzima transfiere residuos de Glc a hidroximetil-citosina en ADN doble cadena. Otra enzima cuya estructura había sido resuelta, era la Glucógeno fosforilasa de *S. cerevisiae* (114). Esta enzima forma parte de la familia 35 en la clasificación CAZY y su estructura está relacionada con la de BGT, pero no será incluida en esta descripción ya que no utiliza nt-azúcar como sustrato dador y sólo se hará referencia ella con fines comparativos.

La importancia de la estructura de T4BGT para el estudio de otras GTs dependientes de nt-azúcares no fue advertida entonces, debido a que no posee homología de secuencia con ninguna otra GT (de hecho, fue recientemente rescatada del grupo de GTs no clasificadas en CAZY y es el único miembro de la familia 63); además, su aceptor (base modificada en ADN dúplex) es un sustrato atípico.

Desde entonces, se han publicado las estructuras cristalinas de 27 GTs que representan a 18 familias de las 78 que agrupa CAZY (Fig. 13).



**Figura 13. Clasificación jerárquica de GTs. Abarca tipo de plegamiento, clan, familia y subfamilia.** Para cada clan, se indica la estereoquímica de la reacción. SpsA, GT de *B. subtilis* (177);  $\beta$ -GalT,  $\beta$ -1,4-galactosiltransferasa bovina (47); RfàF, heptosiltransferasa II de *E. coli* (PDB 1PSW, Kniewel y col., 2003);  $\beta$ -GlcNAcT,  $\beta$ -1,2-N-acetilglucosaminiltransferasa I de conejo (184);  $\beta$ -1,3-glucuroniltransferasas I y III humanas (93, 143);  $\alpha$ -NacGalT,  $\alpha$ -1,3-acetilgalactosaminiltransferasa humana (140);  $\alpha$ -GalTB,  $\alpha$ -1,3-galactosiltransferasa humana (140);  $\alpha$ -GalT,  $\alpha$ -1,3-galactosiltransferasa bovina (46); LgtC,  $\alpha$ -galactosiltransferasa de *N. meningitidis* (144); Glicogenina de conejo (51); Kre2,  $\alpha$ -1,2-manosiltransferasa de *S. cerevisiae* (118); GalNAcT1, acetilgalactosaminiltransferasa de ratón (42); ExtI2,  $\alpha$ -1,4-hexosaminiltransferasa de ratón (142); Mgs, manosilglicerato sintasa de *Rhodothermus marinus* (PDB 2BO4, 2005); GtfA, GtfB y GtfD,  $\beta$ -epi-vancosaminiltransferasa,  $\beta$ -glucosiltransferasa y  $\beta$ -vancosaminiltransferasa de *Amocolatopsis orientalis* (134-136); MurG,  $\beta$ -N-acetilglucosaminiltransferasa de *E. coli* (64); BGT, DNA  $\beta$ -glucosiltransferasa del bacteriófago T4 (190); GSA, glucógeno sintasa de *A. tumefaciens* (17); OtsA, trealose-6-fosfato sintasa de *E. coli* [Gibson, 2002 #522]; MalP, maltodextrina fosforilasa de *E. coli* (138); glucógeno fosforilasa humana (hígado(150) y músculo (1Z8D, HPUB), de conejo (músculo) (58), glucógeno fosforilasa de *S. cerevisiae* (114). Adaptado de Coutino y col. (30)

El plegamiento de GTs, consiste básicamente en una estructura tipo “sandwich”  $\alpha/\beta/\alpha$ , similar al motivo estructural Rossman (seis hebras- $\beta$  paralelas con topología 321456) que se encuentra en muchas proteínas que unen nucleótidos (112).

Como se mencionó anteriormente, las estructuras de GTs pueden agruparse en dos superfamilias que representan los dos tipos básicos de plegamiento que se han encontrado; éstos han sido denominados GT-A y GT-B.

El plegamiento GT-A es un sandwich  $\alpha/\beta/\alpha$ , constituido por una lámina- $\beta$  de siete hebras con topología 3214657, con la hebra 6 antiparalela al resto. La lámina- $\beta$  central tiene a su lado otra más pequeña, y la asociación entre ambas contiene al sitio activo. Las enzimas con plegamiento GT-A tienen en común el motivo DXD, cuyos carboxilatos coordinan un ión metálico divalente (ver 4.2.2.ii.). Los residuos que preceden al motivo DXD en la secuencia proteica forman una hebra  $\beta$  a través del núcleo de la proteína. Esto explica la observación de que los residuos N-terminales a DXD son de naturaleza no polar. Los miembros de GT-A que actúan con inversión de la configuración presentan un carboxilato (Asp o Glu) equivalente en la estructura, que actúa como base catalítica. En algunos miembros de GT-A un residuo de Asp coordina el N3 de la uridina del nt-azúcar. Más allá de esta limitada similitud, no se han encontrado otras características conservadas en miembros de GT-A.

El plegamiento GT-B, se caracteriza por presentar dos dominios  $\alpha/\beta/\alpha$  tipo Rossman (dominio 1: lámina- $\beta$  de siete hebras paralelas con topología 3214567; dominio 2: lámina- $\beta$  de seis hebras paralelas con topología 321456) que están asociados más laxamente y separados por una hendidura profunda. El sitio de unión del nt-azúcar se encuentra en el fondo de la hendidura, donde sólo hace contactos con residuos del extremo C-terminal. El extremo N-terminal es responsable de la unión del aceptor. Los motivos característicos de este plegamiento también son limitados. Se han identificado un residuo Glu en una hélice- $\alpha$  del dominio C-terminal, que une por medio de puente hidrógeno la ribosa del nt-azúcar; y un loop rico en residuos Gly que sería responsable de la unión de los grupos fosfato del nt-azúcar (83). En algunas GTs, el residuo Glu mencionado forma parte de un motivo EX<sub>7</sub>E, que fue primeramente identificado en un grupo de manosiltransferasas procariontas (48) y posteriormente, fue identificado en GlcNAc transferasas (197), así como en otras GTs y fosforilasas, por lo que fue denominado motivo GPGTF (por “glycogen phosphorolase/glycosyltransferase”). La presencia del motivo es tomada como indicadora de plegamiento GT-B. El motivo siempre se encuentra en el dominio C-terminal; Asp/Glu/Lys en medio de una hélice- $\alpha$  ha sido llamada posición 1; mientras que Asp/Glu en el loop anterior a la hélice- $\alpha$ , se ha denominado posición 2, según Wrabl y col. (197). Para evitar confusiones, en esta tesis el motivo GPGTF será llamado EX<sub>7</sub>E tal como fue denominado por Geremía y col. (48) por primera vez. Los residuos Glu del motivo EX<sub>7</sub>E han sido vinculados al mecanismo de doble desplazamiento en GTs que actúan con retención (48, 94). Un mecanismo de este tipo requeriría de dos aminoácidos ácidos que actúen como ácido y base respectivamente. Sin embargo, hasta el presente no existen datos experimentales que apoyen esa teoría.

Recientemente, se ha informado sobre la aparición de un nuevo tipo de plegamiento de GTs. El único representante hasta el momento es la estructura 3D de la  $\alpha$ -2,3/8-sialiltransferasa CstII de *Campilobacter jejuni*, que utiliza como dador, un nucleótido-monofosfato-azúcar (CMP-NeuAc). Esta enzima pertenece a la familia GT-42, presenta plegamiento  $\alpha/\beta/\alpha$  con topología

diferente a los anteriores (lámina- $\beta$  de ocho hebras paralelas con topología 54321678) y no contiene motivo DXD (25). Utilizando el método 3DPSSM (96), Breton y col. predicen un plegamiento similar al de CstII para las familias GT-29 y GT-73 (12).

Por otro lado, también se ha predicho la aparición de un nuevo tipo de plegamiento de GTs, que ha sido denominado GT-C y que incluiría a proteínas con múltiples pasos transmembrana y un motivo DXD modificado. Aunque aún no se ha resuelto la estructura 3D de ninguna de estas proteínas, se espera que los miembros de las familias GT-22, 59, 39, 53, 57, 50 y 58, presenten el mismo tipo de plegamiento (99, 117).

Como modelo de los plegamientos más estudiados, se describirá la estructura de SpsA (177) (GT-A) que pertenece a la familia GT-2, la más numerosa y la más antigua evolutivamente de las familias que actúan con inversión; y las estructuras de MurG (64, 82) (inversión) y OtsA (52, 53) (retención) como ejemplos de plegamiento GT-B. Estas últimas han sido elegidas para la descripción que sigue, debido a su semejanza en cuanto al sustrato aceptor (MurG) y al mecanismo catalítico (OtsA) con la enzima que es objeto de estudio de esta tesis, la manosiltransferasa AceA.

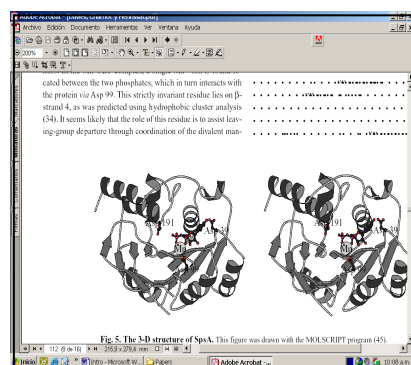
#### 4.2.3.i. Plegamiento GT-A

##### *La estructura 3D de SpsA de B. subtilis*

SpsA es una GT de función desconocida, involucrada en la producción de la cubierta durante el proceso de esporulación de *B. subtilis* (171). No se conoce la especificidad por los sustratos de esta enzima, pero su secuencia ha sido clasificada en la familia GT-2. El análisis de su secuencia no ha sido de ayuda en dilucidar su función ya que presenta similitud con enzimas que participan en procesos tan variados como: síntesis de ácido teicoico y colánico, transferencia de Gal y Rha, producción de LPS y síntesis de celulosa y quitina (34).

La estructura de SpsA fue resuelta por cristalografía de rayos X con una resolución de 1.5 Å, en forma nativa y en complejo con UDP/Mg<sup>2+</sup> y UDP/Mn<sup>2+</sup> (23).

La proteína presenta dos dominios, el N-terminal (residuos 2-100) forma un típico dominio de unión de nucleótido, con cuatro hebras- $\beta$  paralelas flanqueadas a ambos lados por dos hélices- $\alpha$ . El resto de la estructura (residuos 101-256) está compuesta por una lámina- $\beta$  mixta flanqueada por tres hélices- $\alpha$  a un lado y una al otro (Fig. 14).



**Figura 14. Estructura 3D de SpsA de *B. subtilis*.** Se muestra el complejo UDP-Mn<sup>2+</sup> de la enzima con los residuos ácidos que participan en la unión del nucleótido y D191, que actuaría como base catalítica.

El dominio C-terminal posee un surco abierto que probablemente, sea el sitio de unión del aceptor. En los complejos con UDP, la porción uracilo se une a un “bolsillo” hidrofóbico, donde se encuentra Tyr 11. Asp 39, en el extremo de la hebra- $\beta$ 2, une por puente hidrógeno el N-3 del uracilo. Este aminoácido es uno de los dos Asp estrictamente conservados en miembros de la familia 2. El otro Asp (Asp 99) está involucrado, junto con los grupos fosfato del UDP en la coordinación de Mn<sup>2+</sup>. Asp 99 se encuentra en la hebra- $\beta$ 4 y forma un motivo “DD”, equivalente al DXD que se encuentra en varias GTs. Por su parte, Asp 98 une los hidroxilos de la ribosa. La mayor conservación de secuencia en miembros de la familia 2, se encuentra en el extremo N-terminal. Allí existen tres zonas invariables, donde se encuentran los residuos descriptos que hacen contacto con el UDP del sustrato dador (Tyr 11, Asp 39 y Asp 99). El

mecanismo de las GTs que proceden con inversión requiere además de un residuo que actúe como base catalítica y provoque la deprotonación del sustrato aceptor. En SpsA este residuo es difícil de identificar debido a que el extremo C-terminal está mucho menos conservado. Los resultados de alineamientos de secuencias señalan a Asp 191 como candidato, pero los datos estructurales apuntan también a la tríada formada por Asp 158, His 159 y Cys 160, que se encuentran en una posición adecuada para activar al aceptor, aunque ninguno de estos residuos está conservado. Debido a la ubicación y la conservación de Asp 191, éste fue propuesto como base catalítica en SpsA. Otros estudios apoyan esta proposición: bases equivalentes han sido encontradas en las estructuras de  $\beta$ -GalT bovina (47) (flia. GT-28),  $\beta$ -GlcNac de conejo (184) (flia. GT-13) y en la  $\beta$ -GlcAT humana (143) (flia. GT-43). Además la mutagénesis de la GlcT ExoM de *S. meliloti* (45) (flia. GT-2) confirma los roles de los residuos equivalentes a Asp 39, Asp 99 y Asp 191 en esta enzima, relacionada con SpsA.

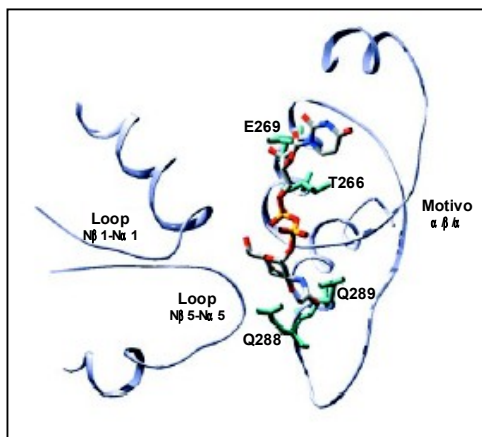
#### 4.2.3.ii. Plegamiento GT-B

##### *La estructura 3D de MurG de E. coli*

MurG cataliza la transferencia de un residuo de GlcNac desde UDP-GlcNac al OH del C-4 de N-acetil muramil pentapéptido-PP-undecaprenol, que es un intermediario en la síntesis de la pared celular bacteriana. El disacárido-PP-lípido resultante es luego transportado a través de la membrana citoplasmática y polimerizado.

La estructura del complejo MurG/UDP-GlcNac, resuelta a 2.5 Å (82), combinada con el estudio cinético de mutantes en residuos conservados, brinda información importante respecto a la selectividad por los sustratos y es extensible a otros miembros de la superfamilia GT-B.

Comparando la estructura del complejo MurG/UDP-GlcNac con la de la proteína sola (64), se observa que los dominios N- y C-terminales son similares en presencia o ausencia del sustrato dador. Sin embargo ocurre un cambio en la orientación relativa de ambos dominios, de manera que, en presencia de UDP-GlcNac, la proteína adquiere una conformación cerrada. El nt-azúcar hace contacto con residuos del extremo C-terminal, tal como había sido predicho para miembros de la superfamilia GT-B por comparación de secuencias (63, 64, 94). El motivo que había sido postulado sitio de unión del dador, consiste de un patrón de de residuos Pro y Gly conservados junto con otros residuos característicos. La estructura de MurG sola, mostró que este motivo tiene un plegamiento  $\alpha/\beta/\alpha$ , con las  $\alpha$ -hélices ubicadas cerca de la hendidura entre los dominios N- y C-terminales (Fig. 15).

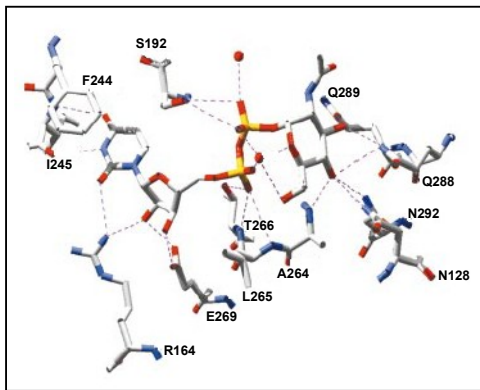


**Figura 15. Regiones conservadas en la hendidura central de MurG.** Porciones del N- y C-terminal de MurG que conforman el sitio activo. Se observa la unión de UDP-GlcNac en el C-terminal (motivo  $\alpha/\beta/\alpha$ ) y algunos de los residuos involucrados. En el N-terminal, se muestra el loop rico en Gly N $\beta$ 1-N $\alpha$ 1 y el loop N $\beta$ 5-N $\alpha$ 5 (o loop HEQN) que estaría involucrado en la unión del aceptor (82).

El nt-azúcar hace contacto con residuos de ambas  $\alpha$ -hélices y de los loops adyacentes. Este motivo, que puede ser identificado en la mayoría de los miembros de GT-B tiene la función de estabilizar al fosfato- $\alpha$  en ausencia de iones metálicos y también es responsable de anclar en su sitio la ribosa y la hexosa del nt-azúcar.

El fosfato- $\beta$  del nt-azúcar está en contacto con el loop GGS que conecta C $\beta$ 1 con C $\alpha$ 1. La posición del loop GGS cambia notablemente en la estructura de MurG con el sustrato dador: se

mueve hacia abajo, acercándose al motivo  $\alpha/\beta/\alpha$ . Este movimiento es mediado por el contacto entre el fosfato- $\beta$  y el residuo de Ser (S192 en MurG) (Fig. 16) muy conservado en homólogos de MurG y en algunos miembros de GT-B. La mutación de Ser192 a Ala afecta todos los parámetros cinéticos, incluso la  $K_m$  para el sustrato aceptor. Dado que MurG utiliza un mecanismo secuencial ordenado, en el cual se une primero el nt-azúcar, es probable que cambios conformacionales en el loop GGS estén involucrados en el ajuste requerido para la unión del aceptor.



**Figura 16. Sitio de unión del sustrato dador.** Se muestran los contactos entre UDP-GlcNAc y MurG. Los aminoácidos 264, 265, 269, 288, 289 y 292 se encuentran en el motivo  $\alpha/\beta/\alpha$ . S192 se encuentra en el loop GGS y N128 en el loop HEQN, ambos del dominio N-terminal (82).

El anillo uracilo del nt-azúcar se encuentra en un “bolsillo” delimitado de un lado por C $\beta$ 3 y la hebra que conecta los dominios N- y C-terminales, y por otro, por el loop GGS. La base se ancla por interacciones de puente de hidrógeno y por el anillo aromático de F244 que se encuentra rotado respecto a su posición en la enzima libre, ejerciendo interacciones de “stacking” con el anillo uracilo y cerrando el bolsillo (Fig. 16).

La mayoría de miembros de GT-B utiliza UDP-azúcares y se ha observado que, en general, estas enzimas no discriminan entre UDP y TDP. Sin embargo, este no es el caso de MurG, ya que TDP-GlcNAc no es aceptado como dador en la reacción de transferencia. La enzima también muestra preferencia de UDP sobre CDP, GDP o ADP. La estructura de MurG con UDP-GlcNAc revela los factores que determinan la selectividad de esta enzima. Por un lado, el bolsillo en que se encuentra el anillo uracilo es demasiado pequeño para acomodar una base purínica; mientras que los puentes de hidrógeno que estabilizan al uracilo, tendrían el efecto contrario sobre citosina. Así la preferencia por UDP parece deberse a una serie de factores estéricos y electrónicos. La cadena lateral de E269 hace contacto con los OH- 2' y 3' de la ribosa del UDP. El análisis de una mutante E269A y la utilización de un análogo 2'-deoxi de UDP-GlcNAc muestran que esta interacción es funcionalmente importante y cumple un rol clave en la capacidad de MurG de discriminar entre UDP y TDP. Por otro lado, la estructura del complejo muestra que la presencia de un sustituyente metílico en C-5 “chocaría” contra el loop GGS, lo que explica la incapacidad de MurG de utilizar TDP-GlcNAc (82).

MurG también presenta selectividad por la porción sacarídica del nt-azúcar. No es capaz de utilizar UDP-GalNAc como dador, lo que indica que la presencia del OH ecuatorial en C-4 es crítica. Las cadenas laterales de varios residuos y una amida del esqueleto carbonado participan de esta interacción (82).

La biosíntesis de peptidoglicano es un evento muy conservado en bacterias, por lo que existen homólogos de MurG en todas ellas. Por lo tanto, comparando sus secuencias es posible identificar los residuos que son esenciales para la unión de los sustratos y la catálisis. Estos residuos están confinados en dos regiones del C-terminal, el motivo  $\alpha/\beta/\alpha$  y el loop GGS; y en tres regiones del N-terminal, una de las cuales (loop HEQN) se encuentra justo frente al sitio de unión de la hexosa y formaría parte del sitio de unión del aceptor. Las otras dos regiones conservadas del dominio N-terminal son dos loops ricos en Gly, semejantes a los loops responsables de la unión de fosfato en proteínas que unen nucleótidos. En MurG estos loops estarían involucrados en la unión del di-fosfato del Lipido I, el sustrato aceptor (64).



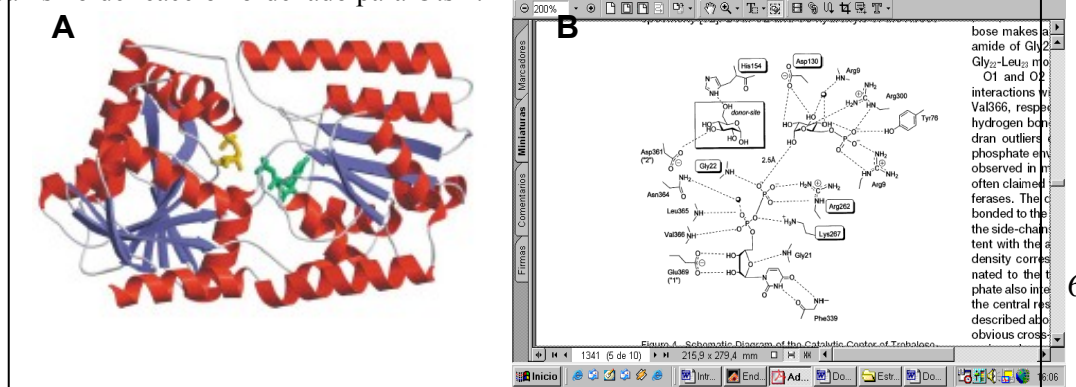
MurG se encuentra asociada a la membrana citoplasmática, pero carece de dominios transmembrana. La estructura revela una región de residuos hidrofóbicos rodeados de residuos básicos en el dominio N-terminal que ha sido propuesto como el sitio de unión a la membrana bacteriana (64). La asociación a través de esta región permitiría que los loops G del dominio N-terminal se acerquen a la superficie de la membrana donde se encuentra la porción di-fosfato del aceptor. De esta manera, el nt-azúcar dador también podría acceder a la hendidura entre los dominios N- y C-terminales, que aloja al sitio activo.

#### *La estructura 3D de OtsA de E. coli*

La trealosa es un disacárido no reductor que cumple diversas funciones biológicas, es utilizado como de carbohidrato de reserva y actúa en la protección contra factores de estrés ambiental, entre otras (38, 165). La ruta primaria de síntesis de este disacárido involucra la transferencia de Glc a Glc-6-P a partir de UDP-Glc, para dar  $\alpha$ , $\alpha$ -1,1-trealosa-6-P. Esta reacción, en la que la configuración de dos enlaces glicosídicos es establecida simultáneamente, es catalizada por la enzima trealosa-6-P sintasa (OtsA). La enzima selecciona al anómero  $\alpha$  del aceptor y actúa con retención de la configuración del nt-azúcar dador. La trealosa-6-P es posteriormente defosforilada en una reacción catalizada por la fosfatasa OtsB (53).

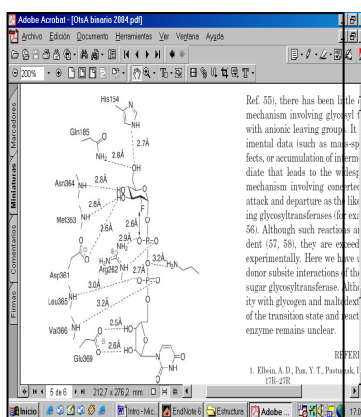
OtsA pertenece a la familia GT-20 de CAZY y se obtuvo una estructura con una resolución de 2.4 Å de la enzima en presencia de Glc-6-P y UDP, que constituyó la primer estructura 3D de una GT perteneciente a la superfamilia GT-B que actúa con retención (53). Recientemente, la estructura de OtsA en complejo con UDP-Glc y el análogo no transferible UDP-2-deoxi-2-fluoro-glucosa, ha sido resuelta a 2 Å (52).

Como el resto de los miembros de GT-B, OtsA presenta el típico plegamiento de dos dominios tipo Rossman con una profunda hendidura en la interfase entre ambos, donde se encuentra el sitio catalítico. La estructura de OtsA con UDP/Glc-6-P (53) permitió estudiar en detalle las interacciones en el sitio de unión del aceptor, y reveló la conformación cerrada de la proteína. Esto último sugiere que la unión de los sustratos provoca un cambio conformacional significativo. Luego se obtuvieron las estructuras de OtsA con UDP-Glc o UDP-2FGlc (que son esencialmente idénticas) (52), que muestran las interacciones en el sitio de unión del nt-azúcar dador y también el cambio conformacional que involucra la re-orientación de los dominios N- y C-terminal, y movimientos significativos de los loops que forman el sitio activo. Como en el resto de enzimas pertenecientes a GT-B, el aceptor Glc-6-P se une al dominio N-terminal de OtsA (53) (Fig. 17). Existe una interacción con Arg300 del dominio C-terminal, que junto con Arg9 forman un bolsillo de carga positiva donde se acomoda el grupo fosfato del aceptor. Esta interacción que aporta el C-terminal debe facilitar el cierre de la estructura en el complejo OtsA UDP/Glc-6-P. El hidroxilo de Tyr76 y otras interacciones mediadas por moléculas de agua, completan la coordinación del grupo fosfato. Los residuos involucrados en estas interacciones están conservados en homólogos de OtsA incluidos en la familia GT-20 de CAZY. Otra interacción que parece favorecer el cierre de la estructura, está dada por Gly22 del dominio N-terminal y el fosfato- $\alpha$  del UDP que se une al C-terminal en el complejo ternario. Los hidroxilos de las posiciones 2 y 3 del residuo de Glu forman puentes de hidrógeno con Asp130, pero las interacciones más interesantes son las que establece el hidroxilo de la posición 1. OtsA se caracteriza por su capacidad de seleccionar sólo el anómero- $\alpha$  de Glc-6-P. Los responsables de esta selectividad son Ile155 y Trp85, que forman un ambiente hidrofóbico donde no es posible la unión del anómero- $\beta$  del aceptor. La entrada al sitio de unión del aceptor es parcialmente bloqueada por Trp40, que cierra el sitio activo y reduce la entrada del solvente. El hecho de que el sitio de unión del dador se encuentre en el fondo de la hendidura, sumado a que la entrada al sitio activo esté adyacente al sitio de unión del aceptor, sugiere un mecanismo de reacción ordenado para OtsA.



**Figura 17. Diagrama de la estructura 3D de OtsA y del sitio activo.** A) Se muestra la estructura del complejo ternario con UDP (en verde) y el sustrato aceptor Glc-6-P (en amarillo). B) Esquema del centro catalítico con las interacciones que se describen en el texto. Los aminoácidos enmarcados son los residuos también conservados en las fosforilasas. La posición del residuo de Glc del dador se diagramó según la posición que ocupa el residuo en la estructura de MalP. D361 y E369 son los aminoácidos del motivo conservado EX<sub>7</sub>E (53).

La estructura de OtsA con UDP-Glc (52), muestra que en ausencia del aceptor, el loop que contiene a Arg9 mencionada anteriormente, sufre un cambio de conformación importante, que también afecta la posición de las hélices- $\alpha$  adyacentes. Ciertas regiones del esqueleto carbonado muestran una diferencia de 10 Å respecto a su posición en el complejo ternario, lo que resulta ahora en una conformación abierta de la proteína.



**Figura 18. Esquema de las interacciones de OtsA con UDP-2FGlc (52).**

La Figura 18 muestra las interacciones en el sitio de unión del nt-azúcar (52). El OH-6 de la Glc interacciona con la cadena lateral de His 154 y de Gln185. El OH-4 interacciona con Asp361 (que forma parte del motivo EX<sub>7</sub>E, ver sección 4.2.3.). Sin embargo, la mayoría de las interacciones de los OH de las posiciones 3 y 4 del residuo de Glc se establecen con grupos amida de la cadena principal de la proteína. Las interacciones del anillo de uracilo del nt-azúcar son idénticas a las observadas en el complejo ternario: el uracilo se encuentra ubicado en el fondo de la hendidura y hace contacto a través de O-4 y N-3 del anillo con Phe339. El oxígeno de la posición 2 del uracilo no establece ningún contacto, por lo cual, GDP podría sustituir a UDP. Esto explicaría la especificidad “relajada” de ciertos homólogos de OtsA. Los hidroxilos libres de la ribosa interactúan con Glu369 (el segundo Glu del motivo EX<sub>7</sub>E). Los grupos fosfato del UDP-Glc se encuentran plegados hacia atrás y quedan ubicados por debajo del plano del anillo de Glc. Esta conformación peculiar del nt-azúcar que permite una interacción

entre el fosfato- $\beta$  y el OH-2 de la Glc, también ha sido observada en el complejo de 2FGlc-1-P con la enzima glucógeno fosforilasa (122).

De las GTs que actúan con retención, la GalT LgtC (plegamiento GT-A) es la enzima cuyo mecanismo de reacción ha sido más estudiado. LgtC sigue un mecanismo secuencial ordenado, en el cual el nt-azúcar se une primero, seguido por el aceptor (120). Luego de la transferencia, el producto oligosacárido es liberado antes que el UDP. Las estructuras 3D de OtsA no aportan datos contundentes sobre el mecanismo de reacción. El estudio del complejo binario con el sustrato dador mostró que no habría una pre-formación del sitio de unión del aceptor como resultado de la unión de UDP-Glc, de hecho, en el complejo binario, los residuos que participan en la unión del aceptor aparecen a una distancia de 10 Å respecto a su localización en el complejo ternario (52).

La estructura del complejo binario de OtsA muestra por primera vez las interacciones con el sustrato dador de una enzima GT-B que actúa con retención. Sin embargo, la naturaleza del estado de transición y el mecanismo de reacción para este tipo de enzimas continúa siendo un desafío para la glicobiología.

### **4.3. Manosiltransferasas**

Como se mencionó anteriormente una característica de las GTs en general, es la baja homología a nivel de secuencia aminoacídica. A pesar de que muchas GTs utilizan el mismo sustrato dador, resulta difícil agrupar a estas enzimas en familias según la identidad de sus sustratos. Una excepción a esto último es el agrupamiento de sialiltransferasas, fucosiltransferasas, galactosiltransferasas y N-acetilgalactosaminiltransferasas, en familias reducidas de enzimas, generalmente de origen eucariota, para las cuales se han identificado residuos conservados involucrados en la unión de los sustratos. Pero las manosiltransferasas (ManT), constituyen un grupo muy heterogéneo debido a los distintos tipos de dadores de azúcar que utilizan (GDP-Man, Dol-P-Man, poliprenol-P-Man) a lo que se suma una amplia gama de aceptores.

Las ManT participan en diversos procesos celulares tanto en eucariotas como en procariotas. Están involucradas en la síntesis de exopolisacáridos (22) y lipopolisacáridos (98, 116) bacterianos; en los eventos de N- y O-glicosilación de proteínas eucariotas (170); en la síntesis de modulinas, glicolípidos presentes en la envoltura celular de bacterias patógenas (104); entre otros. La base de datos Uniprot (<http://www.pir.uniprot.org>) muestra 416 entradas para secuencias correspondientes a ManT caracterizadas o putativas, de origen eucariota y procariota. Las que han recibido mayor atención, son las ManT involucradas en eventos de reconocimiento o señalización. Algunos ejemplos con sus características más relevantes se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Características de manosiltransferasas representativas de la base de datos Uniprot.

Nombre	Organismo	Funcion	CAZY	Ref.
<b>Alg12</b>	<i>S. cerevisiae</i>	Adiciona el octavo residuo de Man en posición $\alpha$ -1,6 sobre el precursor Dol-PP-oligosacárido (dolicol-PP-Man(7)GlcNAc(2)) requerido para la glicosilación de proteínas en el R.E..	GT-22	(16)
<b>Bre-3</b>	<i>C. elegans</i>	$\beta$ -1,4-ManT probablemente involucrada en la biosíntesis de glicosíngolipidos	GT-2	(61)
<b>Dpm 1</b>	<i>Mus musculus</i>	Transfiere Man a partir de GDP-Man para dar Dol-P-Man, que es el dador de residuos Man en la N- y O-glicosilación de proteínas y en la síntesis de glicosilfosfatidilinositol (GPI) para el anclaje de proteínas a membrana.	GT-2	(179)
<b>Kre2</b>	<i>S. cerevisiae</i>	$\alpha$ -1,2-ManT involucrada en la glicosilación de proteínas en Golgi. Utiliza GDP-Man y el aceptor es un lipido-oligosacárido. Estructura 3D.	GT-15	(70)
<b>LpcC</b>	<i>R. leguminosarum</i>	Transfiere un residuo Man a ácido 3-deoxi-D-mono octulónico (KDO) formando un enlace $\alpha$ -1,5 durante la síntesis del core de LPS.	GT-4	(92)
<b>Mnn1</b>	<i>S. cerevisiae</i>	$\alpha$ -1,3-ManT de Golgi, responsable del agregado del residuo Man terminal a la cadena polisacáridica en la N-glicosilación de proteínas, y a mantriosa en la O-glicosilación.	GT-71	(200)
<b>Och1</b>	<i>S. pombe</i>	$\alpha$ -1,6-ManT del R.E. y/o Golgi. Transfiere Man a lipido-oligosacárido a partir de GDP-Man. Involucrada en el inicio de las cadenas de oligosacáridos del tipo Man (9)GlcNAc(2) unidas a Asn que se encuentran en la pared celular.	GT-32	(201)
<b>PimA</b>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Transfiere uno o más residuos de $\alpha$ -D-Man a partir de GDP-Man a las posiciones 2, 6 y otras en 1-fosfatidil-mio-inositol.	GT-4	(102)
<b>Pmt1</b>	<i>S. cerevisiae</i>	Utilizando Dol-P-Man transfiere Man a residuos de Ser/Thr de proteínas en el R.E..	GT-39	(172)
<b>POMT1</b>	<i>D. melanogaster</i>	Junto a POMT2, actúa en la O-glicosilación de proteínas en el R.E. Utiliza Dol-P-Man como dador. Ambas proteínas son esenciales para generar y mantener el desarrollo normal del músculo.	GT-39	(123)
<b>MtfA</b>	<i>E. coli</i>	Participa en la síntesis del homopolisacárido de Man O9 que constituye la porción externa del LPS. Cataliza la transferencia de Man en posición $\alpha$ -1, 2 a partir de GDP-Man.	GT-4	(98)
<b>RfbZ</b>	<i>Salmonella enterica C2</i>	Transfiere un residuo de Man en posición $\alpha$ -1,3, a partir de GDP-Man, a Gal-PP-decaprenol, intermediario en la síntesis de la unidad repetitiva del antígeno-O del LPS.	GT-4	(116)
<b>Alg1</b>	<i>S. cerevisiae</i>	Sintetiza $\beta$ -1,4-manosilquitobiosil-PP-dol en la superficie citoplasmática del R.E. utilizando GDP-Man. El producto es un precursor en la N-glicosilación de proteínas.	GT-33	(2)
<b>Mpg</b>	<i>Pyrococcus horikoshii</i>	Transfiere Man a P-glicerato a partir de GDP-Man para dar $\alpha$ -D-manosil-3-P-glicerato.	GT-55	(39)
<b>Alg3</b>	<i>S. cerevisiae</i>	Adiciona el primer residuo de Man a partir de Dol-P-Man en posición $\alpha$ -1,3, en la síntesis del precursor Man(5)GlcNAc(2)-PP-dol para la glicosilación de proteínas en el R.E..	GT-58	(1)
<b>Mnn9</b>	<i>S. cerevisiae</i>	Forma los complejos M-pol I y II que poseen actividad $\alpha$ -1, 6 y estarían involucrados en la elongación del esqueleto de Man de los N-glicanos en proteínas de periplasma y de la pared celular. Se localizan en R.E. y Golgi.	GT-62	(91)
<b>Cmt1</b>	<i>Cryptococcus neoformans</i>	Es una $\alpha$ -1, 3-ManT involucrada en la síntesis del CPS glucuronoxilomanano (GXM).	GT-69	(169)

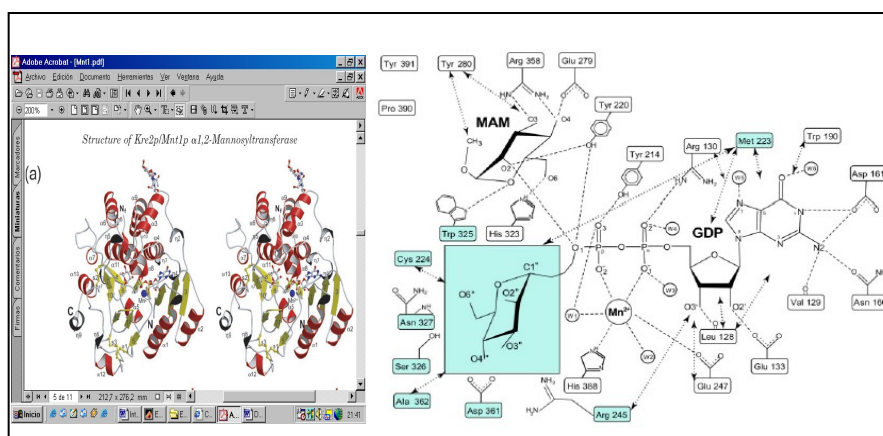
Recientemente se ha reportado la estructura cristalina de la primer ManT. Se trata de Kre2 o Mnt1 de *S. cerevisiae* (118). La enzima es una  $\alpha$ -1,2-ManT que se encuentra en el sistema de Golgi y esta involucrada en la biosíntesis de las glicoproteínas de la pared celular. Kre2 pertenece a la familia GT-15 y es el miembro más estudiado de la familia. Es una proteína de membrana tipo II, presenta un corto segmento N-terminal en el citoplasma, seguido por un dominio transmembrana, un “stem” de 90 aminoácidos y un largo dominio catalítico C-terminal que posee un sitio de N-glicosilación. La estructura 3D resuelta a 2 Å del dominio catalítico de Kre2, también fue obtenida en complejo binario, con GDP/Mn<sup>2+</sup>; y ternario, con GDP/Mn<sup>2+</sup>/aceptor (metil- $\alpha$ -manósido).

La proteína presenta el plegamiento mixto  $\alpha/\beta/\alpha$  del tipo GT-A (ver sección 4.2.3.) (Fig. 19A). El dominio C-terminal es estabilizado por tres puentes disulfuro entre residuos de Cys que parecen estar conservados en la mayor parte de miembros de la familia GT-15. Un N-glicano se encuentra unido al residuo Asn197. A pesar de haberse utilizado GDP-Man en los experimentos de cristalización, la densidad electrónica correspondiente al azúcar no es visible. La posición del residuo de Man fue modelada sobre la base de los complejos binarios y ternarios de otras enzimas GT-A (144, 184). El ión Mn<sup>2+</sup> es coordinado por un motivo DXD modificado (EPD), del cual, sólo el primer Glu está involucrado en una interacción directa. El C-1 del residuo Man modelado, se ubicaría en cercanía al O-2 de la Man aceptora y al residuo Tyr220, que a su vez, también puede unirse por un puente hidrógeno a este último.

Por ser la primer GT que une GDP, y como tal, resulta relevante al tema central de esta tesis, sólo nos referiremos a las interacciones que establece la enzima con el sustrato dador. En muchas de las estructuras de GTs, se ha observado que la unión del nt-azúcar provoca cambios conformacionales importantes en determinados loops. Estos rearrreglos aíslan al sitio activo del solvente y también estarían involucrado en la liberación del producto de la reacción. En el caso de Kre2, no se observan loops desordenados en el área del sitio activo, ni tampoco ocurren perturbaciones estructurales del esqueleto carbonado de la proteína al unir los sustratos, lo que sugiere que el sitio activo de la enzima se encuentra preformado.

La falta de densidad electrónica para la Man de GDP-Man puede deberse a que el residuo azúcar presenta una estructura desordenada, o bien ha sido clivado. Tal como se ha observado en otras GTs (204), los ensayos enzimáticos con Kre2, muestran que la enzima es capaz de clivar el residuo Man en ausencia de sustrato acepto. Esto da apoyo a la idea del sitio activo preformado y explica el hecho de que no ocurran cambios conformacionales al unir los sustratos.

Como se mencionó, la interacción del sustrato dador con la enzima resulta de interés, por ser la primer estructura de una GT con un nt-azúcar en que la base es guanina (Fig. 19).



**Figura 19. Diagrama de la estructura 3D de Kre2 y del sitio activo. A)** Estructura del complejo binario con GDP. **B)** Esquema del sitio activo que muestra las interacciones entre la enzima y los sustratos. El residuo de manosa fue modelado y los aminoácidos involucrados en su unión se muestran en verde (118).

La base se une a la proteína a través de interacciones de “stacking” y de van der Waals, principalmente. También existen interacciones de puente hidrógeno con cadenas laterales y otras mediadas por moléculas de agua. Una característica propia de la base de guanina son los sustituyentes -NH<sub>2</sub> y -O en las posiciones 2 y 6 del anillo. En Kre2, O-6 no interactúa con ningún aminoácido, por lo que la especificidad por el nucleótido de esta proteína parece estar

determinada por las interacciones que entabla el N-2. Este interactúa con Asn160 y Asp161 que están conservados en casi todos los miembros de la familia GT-15. Por otra parte, Arg130 hace una rotación de 140° en torno al enlace C $\gamma$ -C $\delta$  que permite acomodar el anillo de guanina. Este movimiento elimina el impedimento estérico y permite que Arg130 establezca una interacción de “stacking” con la base y un puente hidrógeno con el fosfato- $\alpha$  de GDP-Man (118).

Al igual que en las GTs EXTL2 (142) y GnTI (184), la ribosa se encuentra en conformación 2'-endo. En otras GTs que actúan con retención, como LgtC (144), Glicogenina (51) y  $\alpha$ -1,3GalT (9), la ribosa se encuentra en la conformación 3'-endo, sugiriendo que la ribosa puede adoptar distintas conformaciones para acomodar correctamente al sustrato dador.

En Kre2, el ion Mn<sup>2+</sup> presenta coordinación octaédrica y se observan cambios conformacionales en varios residuos que participan de esta interacción. Glu247, Pro258 y Asp249 constituyen el motivo DXD, pero solo Glu247 hace una interacción directa con Mn<sup>2+</sup> (Fig. 19). A diferencia de lo que ocurre en otras GTs con plegamiento GT-A, el segundo residuo ácido no establece ninguna interacción con el nt-azúcar. Por el contrario, es el oxígeno carbonílico de la cadena principal, aportado por Pro248, quien interacciona con una molécula de agua que coordina al Mn<sup>2+</sup>. Esto resulta en un  $\beta$ -turn con una estructura no-canónica. Por lo tanto el motivo DXD en Kre2 es atípico y es el primer ejemplo en el cual, el segundo grupo carboxilato del motivo, no participa en la coordinación del ión metálico o del sustrato dador.

El análisis de la estructura, la mutagénesis sitio-dirigida y el estudio cinético de Kre2, no permiten discernir cual de los dos posibles mecanismos de acción es el que opera: doble desplazamiento o S<sub>N</sub>i. Lo que sí es claro es la importancia del residuo Tyr220: en la mutante Y220F, se observa una reducción de 3000 veces en  $k_{cat}$ . La posición de Tyr220 respecto al C anomérico de la Man modelada del sustrato dador, sugiere que este aminoácido podría actuar como nucleófilo en un mecanismo de doble desplazamiento. Sin embargo, para que Tyr actúe como tal, debe ser primero activado (deprotonado) por una base catalítica, tal como se ha observado anteriormente (191). En la estructura de Kre2, no se observan candidatos sólidos que pudieran actuar como base catalítica. Sin embargo, no debe descartarse la ocurrencia de cambios conformacionales transientes en el sitio activo, que posicionen a algún residuo capaz de activar a la Tyr. Por otro lado, si se tratara de un mecanismo tipo S<sub>N</sub>i, Tyr 220 sería responsable de ubicar adecuadamente ambos sustratos para que ocurra la reacción. Dada la cercanía de este residuo al C anomérico del dador y al O-2 del aceptor, y el hecho de que la mutante Y220F también muestra un incremento en la Km para el aceptor, el mecanismo tipo S<sub>N</sub>i para Kre2, es igualmente factible (118).

## 5. Objetivos

A pesar de los grandes avances logrados en los últimos años en la comprensión de la relación estructura-función de glicosiltransferasas, aún quedan varias familias de GTs por estudiar, entre ellas la familia GT-4, una de las más numerosas y antigua en términos evolutivos. El objetivo general de esta tesis fue estudiar la  $\alpha$ -1,3-manosiltransferasa AceA de *A. xylinum*, representante de la familia GT-4, en el contexto de su actividad biológica, la síntesis del EPS acetano. Para ello nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

- Producción y purificación de la proteína recombinante
- Localización intracelular
- Desarrollo de un método para la medición de actividad enzimática y caracterización de la misma.
- Identificación de los residuos involucrados en la catálisis y en la unión de los sustratos.
- Análisis funcional por complementación *in vivo*.
- Cristalización
- Modelado de la estructura proteica.



## 6. Materiales y Métodos.

### 6.1. Cepas y plásmidos.

Las cepas de *X. campestris* y *E. coli*, así como los plásmidos utilizados en este trabajo se describen en la Tabla 2.

Tabla 2. Cepas bacterianas y plásmidos utilizados

Cepa	Características relevantes	Origen/referencia
<i>Xanthomonas campestris</i>		
FC2	Mutante estable Rif <sup>r</sup> de la cepa silvestre NRRL B-1459.	L. Ielpi, (95)
XcH	FC2 llevando el plásmido pGum52-18S integrado en el genoma. Km <sup>r</sup>	(95)
Xc1231	Rif <sup>r</sup> <i>gum</i>	(22)
<i>Escherichia coli</i>		
JM109	F <sup>'</sup> <i>traD36proA+B+lacI<sup>q</sup> Δ(lacA)M15/ΔNew England Biolabs (lac-proAB) glnV44e14-gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi hsdR17</i>	
XL1-Blue	F <sup>'</sup> [ <i>proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> lacZΔM15 Tn10 (tc<sup>r</sup>) supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac</i>	Stratagene
DH5α	F <sup>'</sup> <i>endA1 hsdR17 supE44 thi-1 recA1 gyrA relA1 ΔlacUI69 (φ80ΔlacZΔM15)</i>	(127)
S17-1	<i>E. coli</i> 294 RP4-2-Tc::Mu-Km::Tn7 integrado en el cromosoma	(164)
BL21(DE3)	F <sup>'</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm</i> (DE3)	Novagen
BL21(DE3)pLysS	F <sup>'</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm</i> (DE3) pLysS	Novagen
<b>Plásmidos</b>		
pUC18	ColE1 Ap <sup>r</sup> <i>lacZα<sup>+</sup></i>	(188)
pBBR1 MCS3	<i>lacZα<sup>+</sup> Tc<sup>r</sup></i>	(103)
pTAX1	pBluescript KS(+) conteniendo un fragmento cromosómico de 4400 pb de <i>A. xylinum</i> Ap <sup>r</sup>	(146)
pET29a	Ribonucleasa S en el N-terminal Km <sup>r</sup>	Novagen
pET22b	Histag en el C-terminal Ap <sup>r</sup>	Novagen
pDGC1	pUC18 conteniendo un fragmento de 1254 pb que incluye al gen <i>aceA</i>	Esta tesis
pDGC2	pUC18 conteniendo un fragmento de 1322 pb que incluye al gen <i>aceA</i> y un sitio de corte <i>SphI</i>	Esta tesis
pCrGC2	pET29a conteniendo un fragmento de 1273 pb que incluye al gen <i>aceA</i> , en el sitio <i>EcoRV</i>	Esta tesis
pDGC2-D109A	pDGC2 conteniendo la mutación D109A	Esta tesis
pDGC2-H127A	pDGC2 conteniendo la mutación H127A	Esta tesis
pDGC2-S162A	pDGC2 conteniendo la mutación S162A	Esta tesis
pDGC2-K211A	pDGC2 conteniendo la mutación K211A	Esta tesis
pDGC2-K211R	pDGC2 conteniendo la mutación K211R	Esta tesis
pDGC2-L270A	pDGC2 conteniendo la mutación L270A	Esta tesis
pDGC2-E287A	pDGC2 conteniendo la mutación E287A	Esta tesis
pDGC2-E287Q	pDGC2 conteniendo la mutación E287Q	Esta tesis
pDGC2-E295A	pDGC2 conteniendo la mutación E295A	Esta tesis
pDGC2-E295D	pDGC2 conteniendo la mutación E295D	Esta tesis
pDGC2-E295Q	pDGC2 conteniendo la mutación E295Q	Esta tesis
pCrGC2-D109A	pCrGC2 conteniendo la mutación D109A	Esta tesis
pCrGC2-H127A	pCrGC2 conteniendo la mutación H127A	Esta tesis

pCrGC2-S162A	pCrGC2 conteniendo la mutación S162A	Esta tesis
pCrGC2-K211A	pCrGC2 conteniendo la mutación K211A	Esta tesis
pCrGC2-K211R	pCrGC2 conteniendo la mutación K211R	Esta tesis
pCrGC2-L270A	pCrGC2 conteniendo la mutación L270A	Esta tesis
pCrGC2-E287A	pCrGC2 conteniendo la mutación E287A	Esta tesis
pCrGC2-E287D	pCrGC2 conteniendo la mutación E287D	Esta tesis
pCrGC2-E287Q	pCrGC2 conteniendo la mutación E287Q	Esta tesis
pCrGC2-E295A	pCrGC2 conteniendo la mutación E295A	Esta tesis
pCrGC2-E295D	pCrGC2 conteniendo la mutación E295D	Esta tesis
pCrGC2-E295Q	pCrGC2 conteniendo la mutación E295Q	Esta tesis
pBBR-AceA	pBBR1 MCS3 conteniendo un fragmento de 1259 pb que incluye al gen <i>aceA</i>	Esta tesis
pBBR-AceAD109A	pBBR-AceA conteniendo la mutación D109A	Esta tesis
pBBR-AceAH127A	pBBR-AceA conteniendo la mutación H127A	Esta tesis
pBBR-AceAS162A	pBBR-AceA conteniendo la mutación S162A	Esta tesis
pBBR-AceAK211A	pBBR-AceA conteniendo la mutación K211A	Esta tesis
pBBR-AceAK211R	pBBR-AceA conteniendo la mutación K211R	Esta tesis
pBBR-AceAL270A tesis	pBBR-AceA conteniendo la mutación L270A	Esta
pBBR-AceAE287A tesis	pBBR-AceA conteniendo la mutación E287A	Esta
pBBR-AceAE287D tesis	pBBR-AceA conteniendo la mutación E287D	Esta
pBBR-AceAE287Q tesis	pBBR-AceA conteniendo la mutación E287Q	Esta
pBBR-AceAE295A tesis	pBBR-AceA conteniendo la mutación E295A	Esta
pBBR-AceAE295D tesis	pBBR-AceA conteniendo la mutación E295D	Esta
pBBR-AceAE295Q tesis	pBBR-AceA conteniendo la mutación E295Q	Esta

## 6.2. Medios y condiciones de cultivo.

Las cepas de *X. campestris* fueron cultivadas a 28 °C con agitación continua en medio YM (66) o en medio mínimo (3) (para el aislamiento de polisacáridos). Los antibióticos utilizados fueron: rifampicina, kanamicina y tetraciclina (50, 30 y 12 µg/ml, respectivamente).

*E. coli* fue cultivada a 37 °C, con agitación continua, en medio LB con el agregado del antibiótico correspondiente (ampicilina 200 µg/ml, kanamicina 50 µg/ml, tetraciclina 12 µg/ml). Para la expresión de proteínas solubles las células fueron cultivadas a 37 °C en medio TB (157) adicionado con kanamicina 50 µg/mL y cloranfenicol 34 µg/mL.

## 6.3. Construcción de plásmidos.

La construcción de pCrGC2 se muestra en la Fig. 20. El marco de lectura abierto que codifica a AceA fue subclonado en pUC18 a partir de pTAX1, para dar pDGC1 como se describe a continuación: un fragmento *Bam*HI de 1254 pb que comprende a *aceA* con la adición de 18 pb en 5' y 30 pb en 3' del gen, junto con un fragmento de 20 pb del polilinker de pBluescript KS(+), fue subclonado en el sitio *Bam*HI del MCS de pUC18. Se creó un sitio de corte *Sph*I superpuesto al codón de inicio ATG de *aceA* por mutagénesis sitio-dirigida (ver sección 5.13), generando pDGC2. Para obtener pCrGC2, se obtuvo un fragmento *Sph*I de 1273 pb que comprende a *aceA* a partir de pDGC2; se digirieron los extremos protruyentes con T4 ADN polimerasa (77) y se clonó en el sitio *Eco*RV de pET29a. Esta construcción genera una proteína de fusión de AceA con el péptido Stag en su extremo N-terminal y un sitio de corte para trombina entre ambos.

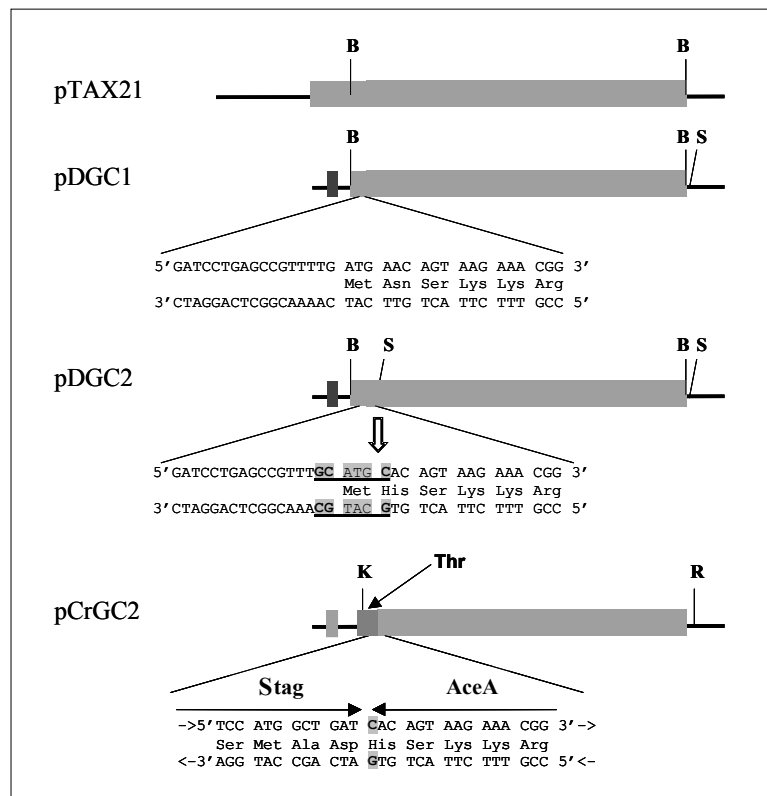


Figura 20. Construcción de pCrGC2 a partir de pTAX21. Ver detalles en el texto.

Un plásmido de amplio rango de huéspedes, pBBR1 MCS3, fue empleado para subclonar *aceA* y posteriormente transformar *X. campestris* XcH. El clonado en este vector se hizo de la siguiente manera: un fragmento *KpnI/PstI* de 1259 pb que comprendía al gen *aceA*, fue obtenido a partir de pDGC1, purificado de gel de agarosa (Fisher Gel-Rec, Fisher Scientific) y ligado (DNA ligation kit, Amersham) al vector digerido con las mismas enzimas y desfosforilado con fosfatasa alcalina. A esta construcción se la denominó pBBR-AceA.

Para el resto de las construcciones se generaron fragmentos por PCR, utilizando primers que portan secuencias blanco para enzimas de restricción en los extremos 5' y 3'. Como molde para la amplificación de la secuencia completa de AceA y la forma C-AceA (delección en el C-terminal) se utilizó la construcción pDGC1; mientras que para la forma N-AceA (delección en el N-terminal) el molde fue la construcción pPA (gen *aceA* clonado entre los sitios *NdeI* y *XhoI* de pET22b). Los primers y las enzimas utilizadas se detallan en la Tabla 3. Luego de ser digeridos con las enzimas específicas, los productos de PCR y el plásmido pET22b, fueron mezclados en proporción 10/1 y ligados con 10 U de T4-ADN ligasa (New England Biolabs) durante toda la noche (ON) a 16 °C.

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para clonar AceA.

Secuencia amplificada	Secuencia de los primers (5' y 3')	Sitios de restricción (5'y 3')
1-1196 (AceA)	CGTTCATATGAACAGTAAGAAACGGGGGGA CCTGGCTCGAGCTCCGCCCTGCCGCG	<i>NdeI-XhoI</i>
1-1092 (C-AceA)	CGTTCATATGAACAGTAAGAAACGGGGGGA GCATATTCATGCGCCACCTCGAGCCAGTCATAA	<i>NdeI-XhoI</i>
30-1196 (N-AceA)	GGGATGAACATATGAAAGTCTGC CCTGGCTCGAGCTCCGCCCTGCCGCG	<i>NdeI-XhoI</i>

#### 6.4. Procedimientos de introducción de material genético en *E. coli* y *X. campestris*.

La introducción de material genético en *E. coli* fue llevada a cabo mediante transformación de células tratadas con  $\text{CaCl}_2$  (133) o por electroporación. La electroporación fue realizada utilizando un electroporador Gene Pulser Transfection System (Bio-Rad). La preparación de células electrocompetentes y las condiciones de electroporación fueron las especificadas por el fabricante.

En *X. campestris* la introducción de material genético fue llevada a cabo por electroporación (siguiendo las mismas condiciones que las descritas para *E. coli*) o mediante conjugación bacteriana biparental. Los plásmidos fueron transferidos desde la cepa movilizadora de amplio rango de hospedador *E. coli* S17-1 a *X. campestris* siguiendo un protocolo ya descripto (163).

#### 6.5. Sobreexpresión de proteínas recombinantes.

Se cultivaron células de *E. coli* BL21(DE3) conteniendo la construcción pCrGC2, pPA o los plásmidos pET29a o pET22b como controles, en medio LB a 37 °C con agitación (200 rpm). Cuando los cultivos alcanzaron una  $\text{DO}_{600}$  de 0.8, se adicionó IPTG 1 mM y se incubaron a 37 °C con agitación continua por 2-3 h. Las células fueron cosechadas por centrifugación y lavadas tres veces con Tris-HCl 20 mM pH 8.0. La expresión fue analizada por SDS-PAGE. Alícuotas de los cultivos inducidos y controles fueron resuspendidas en buffer desnaturizante y hervidas durante 5 min. Las muestras se separaron por SDS-PAGE en un gel 10 % y las proteínas fueron detectadas por tinción con Coomassie Brilliant Blue R-250.

Para optimizar la expresión, a los cultivos de  $\text{DO}_{600}$  0.5, 0.8, 1.5, 2 ó 2.5; se adicionó IPTG 0.5 mM. Los cultivos fueron divididos y temperados por 20 min (previo a la adición de IPTG) para evaluar el efecto de distintas temperaturas en la inducción (37 °C, 30 °C ó 17 °C). Se tomaron alícuotas de cada cultivo a distintos tiempos luego de la inducción. Las muestras fueron analizadas por SDS-PAGE.

Para la obtención de Stag-AceA soluble, células de *E. coli* BL21(DE3)/pLysS/pCrGC2 fueron incubadas en medio TB a 37 °C hasta una  $\text{DO}_{600}$  de 0.8, e inducidas con 5  $\mu\text{M}$  IPTG durante 3 h. Para la detección del epítipo Stag, las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE, transferidas a membrana de PVDF y tratadas con el Stag Immunoblot kit (Novagen) según las instrucciones del fabricante. Para la detección del epítipo Histag se procedió de manera similar, utilizando un anticuerpo monoclonal de ratón (Sigma) en dilución 1/2000.

La secuenciación de los extremos N-terminal de las formas de AceA recombinante fue realizada por J-P. Andrieu en el Institut de Biologie Structurale (IBS), Grenoble, Francia.

#### 6.6. Obtención de un suero inmune contra AceA.

El antisuero contra la proteína AceA fue obtenido a partir de cuerpos de inclusión (CI) renaturalizados e inyectados en conejo. Los CI resultaron de la sobreexpresión de la proteína en *E. coli* BL21(DE3)/pCrGC2. Las células fueron colectadas por centrifugación y los extractos celulares se obtuvieron como se describe más abajo (ver sección 6.7). Estos fueron centrifugados a 3000 x g durante 5 min a 4 °C para remover agregados. Los CI fueron recuperados del sobrenadante de 3000 x g por centrifugación a 13000 x g durante 15 min a 4 °C. El precipitado fue resuspendido en Tris-HCl 10 mM, pH 7.5 y lavado 2 veces en el mismo buffer suplementado con urea 2 M y Tritón X-100 0.5 %. Los CI lavados fueron luego resuspendidos en Tris-HCl 50 mM pH 7.5, urea 8 M, e incubados con agitación a 4 °C durante 24 h para su solubilización. Se centrifugaron a 12000 x g, 10 min a 4 °C y el sobrenadante fue diluído hasta una concentración de urea 0.3 M. La urea fue removida por ultrafiltración con una membrana Amicon PM 10. La proteína obtenida fue liofilizada y luego utilizada para inmunizar conejos.

El antisuero obtenido fue purificado con una resina de afinidad, obtenida por incubación de un extracto inducido de BL21 (DE3)/pET29a con la resina Sepharosa 4B activada con CNBr (Pharmacia), según las instrucciones provistas por el fabricante. La incubación con la resina fue hecha en modo de batch a 4 °C ON. Sólo las proteínas inespecíficas del antisuero quedan retenidas en la resina, obteniéndose en el eluído, el suero inmune enriquecido en anticuerpos específicos contra AceA. Los anticuerpos inespecíficos que no pudieron ser removidos en el

paso anterior, fueron eliminados, incubando el antisuero con extractos celulares de *E. coli* BL21(DE3)/pET29a y *X. campestris* Xc1231 a 4 °C ON.

### **6.7. Preparación de extractos y fraccionamiento subcelular.**

Se cultivaron células de *E. coli* o *X. campestris* bajo las condiciones indicadas más arriba. Las células fueron cosechadas, lavadas y resuspendidas en Tris-HCl 70 mM pH 8.0, MgCl<sub>2</sub> 20 mM. Los cultivos celulares destinados a la purificación de proteínas fueron lavados con Tris-HCl 20 mM pH 8.0 y resuspendidos en el buffer de lisis correspondiente (ver 6.9). Los extractos se obtuvieron pasando la suspensión celular 3 veces por French Press (18000 psi). El extracto fue luego centrifugado sucesivamente a 2000 x g (10 min), 15000 x g (15 min) y 100000 x g (1 h). Los precipitados de cada centrifugación fueron resuspendidos en un volumen igual al volumen inicial del extracto. Como control de la separación de fracciones subcelulares se midió el marcador de membrana KDO (49). Se tomaron alícuotas de cada fracción y se analizaron por SDS-PAGE o inmunoblot. Los sobrenadantes de 100000 x g de *E. coli* fueron utilizados para la purificación de proteína, como se describe más adelante.

### **6.8. Solubilización de AceA a partir de la fracción de membranas de *X. campestris*.**

Una fracción de membrana total de XcH complementada con AceA fue obtenida en el precipitado de 100000 x g como se describió en la sección 6.7. Para estudiar el tipo de interacción de AceA con la membrana, esta fracción fue sometida a distintos tratamientos, como se describe a continuación.

#### **6.8.1. Solubilización con proteasa.**

Un stock de proteinasa K 1 mg/ml o diluído 1/10 en buffer Tris-HCl 20 mM pH 8.0, fue incubado con la fracción de membranas de XcH/pBBR-AceA (2.7 µg proteínas/µl) a 37 °C, variando la relación en masa de sustrato/proteasa (25:1, 5:1, 1:1) e incubando por distintos tiempos (10 min, 30 min, 1 h, 2 h). La digestión con proteasa se detuvo agregando PMSF 5 mM. Luego las muestras fueron centrifugadas a 100000 x g durante 1 h. Alícuotas del precipitado y la fracción solubilizada de membrana fueron analizadas por inmunoblot.

#### **6.8.2. Solubilización con buffer alcalino.**

La fracción de membranas de XcH/pBBR-AceA fue resuspendida en Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 100 mM pH 11.4 para obtener una concentración final de proteínas de 1.5 mg/ml. La solución fue incubada en hielo durante 30 min con agitación. Luego de la incubación se separaron la fracción solubilizada y el precipitado por centrifugación a 100000 x g durante 1 h. Las proteínas presentes en ambas fracciones fueron detectadas por SDS-PAGE e inmunoblot. AceA fue cuantificada por densitometría utilizando Gelworks 1D Analysis Software (Nonlinear Dynamics Ltd.).

#### **6.8.3. Solubilización con Tritón X-114.**

El tratamiento de las membranas con Tritón X-114 fue realizado según Brusca y col. (13). Se preparó una solución de Tritón X-114 2 % (v/v) en PBS. La proporción proteína-detergente fue 1:10. Las membranas fueron resuspendidas en la solución de detergente e incubadas a 4 °C durante 2 h. Luego se centrifugó a 13000 x g por 10 min para remover material insoluble. El sobrenadante fue incubado a 37 °C para inducir la separación de fases. Una fase acuosa y una fase detergente fueron obtenidas al centrifugar a 13000 x g por 10 min. La fase acuosa (proteína solubilizada y monómeros de detergente) fue lavada con la solución de Tritón X-114 en PBS; la fase detergente (proteínas integrales de membrana y micelas de detergente) fue lavada con PBS. Se tomaron alícuotas de cada fase y las proteínas fueron precipitadas con acetona y separadas por SDS-PAGE. AceA fue detectada por inmunoblot.

### **6.9. Purificación de proteínas.**

#### **6.9.1. Purificación de Stag-AceA.**

Dado que la proteína recombinante producida en *E. coli* BL21/pCrGC2 posee un sitio de corte para trombina entre la secuencia codificante de AceA y el Stag, es posible la purificación por

una columna de afinidad que retiene específicamente proteínas que poseen la secuencia Stag y la eventual elución por corte con trombina. Se prepararon extractos de BL21 DE3/pLysS/pCrGC2 salvaje o mutante en buffer Tris-HCl 20 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, Tritón X-100 0.1 %, y se realizó el fraccionamiento subcelular como se indicó mas arriba. El sobrenadante de 100000 x g fue tratado con el Stag Thrombin Purification Kit (Novagen) según las instrucciones del fabricante. AceA fue eluida con trombina biotinilada y ésta fue posteriormente removida de la solución con estreptavidina-agarosa (Novagen). La proteína AceA sin Stag obtenida representaba 40-60 % de la proteína total en la muestra, a juzgar por densitometría de geles teñidos con Coomassie Blue (Gelworks 1D Analysis Software, Nonlinear Dynamics Ltd.).

Esta preparación fue luego incubada con la resina GDP-agarosa (SIGMA) en buffer Tris-HCl 50 mM pH 7.5, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, ATP 1 mM. La incubación se hizo en batch y se probó la unión en distintas condiciones (2h a Tamb, o bien ON a 4 °C). Para la elución se utilizó el mismo buffer de los lavados (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, MgCl<sub>2</sub> 10 mM) suplementado con GDP 5 mM. Alícuotas de las fracciones en los distintos pasos de purificación fueron analizadas por SDS-PAGE y/o inmunoblot.

### 6.9.2. Purificación de AceA-Histag.

Células de *E. coli* BL21(DE3)/pPA fueron resuspendidas en buffer de lisis (Tris-HCl 20 mM pH 8.0, NaCl 0.5 M, PMSF 1 mM, imidazol 10 mM, Tween 20 1 %). El extracto celular se obtuvo como se describió en la sección 5.7. y posteriormente fue incubado a 4 °C durante 1 h para la solubilización de AceA. El extracto fue centrifugado a 100000 x g por 1 h y el sobrenadante obtenido se sembró en una columna Ni-NTA HiTrap chelating de 5 ml (Amersham Pharmacia Biotech) conectada a un equipo de HPLC y preequilibrada en Tris-HCl 20 mM pH 8.0, NaCl 0.5 M, imidazol 10 mM y Tween 20 0.05%. La columna fue lavada con el mismo buffer y luego se realizó elución competitiva con un gradiente de imidazol (10-300 mM). La proteína AceA-Histag eluida, fue concentrada por ultrafiltración y luego sembrada en una columna de exclusión molecular Superdex-200 HR 10/30 (Pharmacia) preequilibrada en Tris-HCl 20 mM pH 8.0, NaCl 0.5 M, Tween 20 0.05 %. La elución de proteínas en cada etapa se siguió por A<sub>280</sub>. La purificación fue evaluada por SDS-PAGE y tinción con Coomassie blue.

## 6.10. Actividad enzimática.

### 6.10.1. Sustratos.

#### 6.10.1.i. Nucleótido azúcares.

Los nt-azúcares radioactivos UDP-[<sup>14</sup>C]Glc (231 Ci/mol), GDP-[<sup>14</sup>C]Man (300 Ci/mol) fueron sintetizados enzimáticamente por Susana Raffo de la Fundación Instituto Leloir, según métodos ya descritos (44, 86)].

#### 6.10.1.ii. Aceptores obtenidos de *X. campestris*.

Para la obtención del sustrato aceptor natural de *X. campestris* (poliprenol-PP-celobiosa), se incubaron células permeabilizadas de la cepa FC2 (como se describe en 6.10.1.ii). Una vez terminada la reacción, las células fueron lavadas con Tris- HCl 70 mM pH 8.2, EDTA 10 mM. Las células se extrajeron tres veces con 150 µl de cloroformo-metanol-agua (1:2:0.3 v/v/v). Este extracto que contiene lípido azúcares intermediarios (poliprenol-PP-celobiosa, entre otros) será referido como extracto 1203. El extracto fue concentrado bajo corriente de aire a 1/10 del volumen inicial y utilizado inmediatamente en la reacción de transferencia de AceA.

La obtención de celobiosa pirofosfato se hizo de acuerdo a García y col. (44). Se realizó una incubación con células permeabilizadas (ver 6.10.2.ii) en presencia de UDP-[<sup>14</sup>C]Glc o UDP-Glc, para favorecer la formación de poliprenol pirofosfato celobiosa. Se extrajo la fracción de glicolípidos (extracto 1203) que fue reducida hasta 1/10 del volumen inicial bajo corriente de nitrógeno a Tamb. Se agregaron 160 µl de fenol 50 % y se incubó a 70 °C durante 30 min. Luego, la mezcla fue enfriada a Tamb y centrifugada a 13000 x g, obteniendo una fase acuosa y otra fenólica. Esta última fue lavada tres veces con 60 µl de agua. Las fases acuosas de cada

lavado fueron juntadas y lavadas tres veces con éter etílico. La muestra obtenida fue utilizada como aceptor en la reacción de AceA.

### 6.10.1.iii. Sustratos comerciales.

Los compuestos comerciales utilizados como aceptor en la reacción catalizada por AceA, *n*-octil- $\beta$ -D-glucopiranosido, *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-celobiosido, *o*-nitrofenil- $\beta$ -D-celobiosido y celobiosa, fueron provistos por SIGMA-Aldrich. Se prepararon soluciones stock 50 mM de estos compuestos y fueron utilizadas en la reacción de transferencia a una concentración final de 5 mM.

### 6.10.1.iv. Sustratos obtenidos por síntesis química.

Los compuestos isopentanol pirofosfato celobiosa y fitanol pirofosfato celobiosa fueron sintetizados químicamente por la Dra. Carla Marino y el Lic. Pablo Barrios de la Cátedra de Química Orgánica, FCEyN. La síntesis de fitanil pirofosfato celobiosa (Fig. 21) fue llevada a cabo en base a un protocolo descrito previamente (110) con modificaciones que serán publicadas oportunamente (Abdian y col., en preparación).

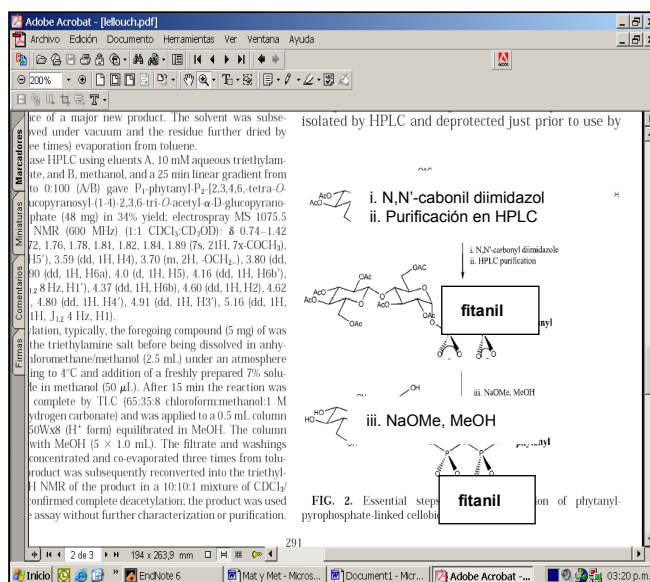


Figura 21. Pasos esenciales en la preparación de fitanil-PP-celobiosa.

Durante la síntesis de este compuesto se obtuvo como intermediario celobiosa-P, que fue aislado y utilizado como aceptor en la reacción catalizada por AceA.

## 6.10.2. Ensayos enzimáticos.

### 6.10.2.i. Incubaciones con células permeabilizadas FC2 para la obtención del sustrato aceptor.

Células permeabilizadas de *X. campestris* FC2 fueron utilizadas para la síntesis *in vitro* de poliprenol pirofosfato celobiosa. Las células fueron permeabilizadas con EDTA como se describió anteriormente (86). Se utilizaron 30  $\mu$ l de células permeabilizadas (0.6-0.8 mg de proteína) que fueron incubadas con  $MgCl_2$  8 mM, Tris-HCl 70 mM pH 8.2, UDP-Glc y GDP-Man marcados radioactivamente o no [UDP-Glc 4 mM, UDP- $^{14}C$ Glc 0.135  $\mu$ Ci (a.e. 231 Ci/mol), GDP-Man 0.14 mM, GDP- $^{14}C$ Man 0.25  $\mu$ Ci (a.e. 300 Ci/mol)]. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 70  $\mu$ l a 20 °C durante 30 min. La reacción se detuvo con el agregado de 0.2 ml de Tris-HCl 70 mM pH 8.2, EDTA 10 mM. Las células fueron recuperadas por centrifugación y lavadas dos veces con el mismo buffer. La obtención del aceptor se describe en la sección 6.10.1.ii.

**6.10.2.ii. Ensayos de actividad manosiltransferasa *in vitro*.**

La mezcla de reacción contenía: 0.4 µg de Stag-AceA purificada o el sobrenadante de 100000 x g de *E. coli* (200 µg de proteína), Tritón X-100 1 %, MgCl<sub>2</sub> 6 mM, 10-15 µl de aceptor extraído de FC2 en el momento y GDP-Man radioactiva o no, según se indique (0.25 µCi ó 5 mM), en un volumen final de 100 µl. Las reacciones con la fracción soluble de *E. coli* se llevaron a cabo durante 45 min a 37 °C, mientras que con Stag-AceA las muestras se incubaron 8 min. La reacción se detuvo adicionando 0.2 ml de cloroformo-metanol (1:1 v/v) y 0.1 ml de agua. Los glicolípidos fueron aislados de la fase orgánica y del precipitado proteico. Los oligosacáridos fueron liberados por hidrólisis ácida suave (en 200 µl de ácido trifluoroacético 0.01 N, 10 min a 100 °C). Las muestras hidrolizadas fueron neutralizadas con 2 µl de NH<sub>4</sub>OH 1 M y luego digeridas con 5 U de fosfatasa alcalina bovina en glicina-NaOH 10 mM pH 9, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, a 37 °C ON. La porción lipídica fue extraída con 500 µl de cloroformo-metanol (2:1 v/v) y las sales fueron removidas con la resina de intercambio iónico mixta TM8. Alícuotas de la fase acuosa remanente fueron contadas en un contador de centelleo líquido y el resto de la muestra fue concentrada hasta 10 µl en Speed Vac y sometida a TLC.

Para los ensayos en los que se probaron celobiosa o sus formas fosforiladas como aceptores solubles, se omitió la presencia del aceptor natural, poliprenol-PP-celobiosa, y la reacción se detuvo agregando 0.2 ml de agua. Las fracciones acuosas fueron digeridas con fosfatasa alcalina y se continuaron procesando como se describe mas arriba. En el caso de utilizar aceptores comerciales, la hidrólisis de las muestras se realizó con HCl 2N, incubando a 70 °C por 2 h. Las muestras fueron neutralizadas, desaladas y sembradas en TLC.

La actividad enzimática de AceA en presencia de isopentanol-PP-celobiosa se realizó en la mezcla de incubación descrita más arriba. Luego de la incubación alícuotas de las muestras fueron directamente sembradas en TLC (sin tratamiento previo).

La importancia de iones metálicos en la reacción catalizada por AceA fue determinada omitiendo la presencia de MgCl<sub>2</sub> en la mezcla de incubación. El efecto de EDTA se evaluó preincubando la enzima con el agente quelante a una concentración de 10 mM durante 2 h a 4 °C.

La actividad de AceA-Histag se determinó en presencia del aceptor sintético fitanil-PP-celobiosa en una mezcla de reacción similar a la descrita anteriormente, con algunas modificaciones: 0.4 µg de AceA, Tritón X-100 o Tween 20 1 %, MgCl<sub>2</sub> 6 mM, fitanil-PP-celobiosa 5 mM, 0.25 µCi GDP-[<sup>14</sup>C]Man, Tris-HCl 20 mM pH 8.0, en un volumen final de 100 µl. Luego de incubar a 37 °C por 10 min, la reacción se detuvo con 0.2 ml de cloroformo-metanol (1:1 v/v) y 0.1 ml de agua.

Los parámetros cinéticos de AceA-Histag fueron determinados utilizando varias concentraciones de un sustrato (1-60 µM GDP-Man, 0.1-1.5 mM fitanil-PP-celobiosa) y manteniendo el otro a una concentración fija. Para la determinación de GDP-Man, la concentración del aceptor se fijó en 1.2 mM. Para la determinación de fitanil-PP-celobiosa, la concentración de GDP-Man se fijó en 90 µM, aproximadamente 2.5 veces el valor de su  $K_m$ , debido a la limitada disponibilidad del sustrato dador radioactivo. Los parámetros cinéticos fueron obtenidos de gráficos de Lineweaver-Burk.

**6.10.2.iii. Ensayo de incorporación de [<sup>14</sup>C]Manosa en células XcH permeabilizadas.**

Células de XcH expresando las formas salvaje o mutadas de AceA fueron permeabilizadas con EDTA. Las mezclas de reacción contenían: 30 µl de células permeabilizadas (0.6-0.8 mg de proteína), MgCl<sub>2</sub> 8 mM, Tris-HCl 70 mM pH 8.2, UDP-Glc 4 mM y GDP-[<sup>14</sup>C]Man 0.25 µCi (a.e. 300 Ci/mol) en un volumen final de 70 µl. Las muestras se incubaron a 20 °C durante 30 min. La reacción se detuvo con el agregado de 0.2 ml de Tris-HCl 70 mM pH 8.2, EDTA 10 mM. Las muestras fueron centrifugadas y las células lavadas en el mismo buffer. Los



glicolípidos fueron extraídos con cloroformo-metanol-agua (1:2:0.3 v/v/v). Los oligosacáridos fueron obtenidos y procesados como se describe en la sección 6.10.2.ii. El análisis de los mismos se hizo por TLC.

#### 6.10.2.iv. Tratamiento con $\alpha$ -manosidasa.

Para el ensayo con  $\alpha$ -manosidasa, el glicolípido producto de la reacción de AceA fue previamente hidrolizado y defosforilado (ver 6.10.2.ii.). La digestión se realizó en buffer citrato 0.1 M pH 4.5 con 0.2 U de  $\alpha$ -manosidasa de haba (SIGMA). La incubación se realizó a 20 °C durante 12 h. La muestra fue desalada y el lípido removido como se indicó anteriormente. El producto de reacción fue analizado por TLC.

### 6.11. Cromatografía en capa delgada (TLC) y detección de oligosacáridos radioactivos.

#### 6.11.1. Análisis de los productos de reacción.

Las muestras de oligosacáridos obtenidas de las distintas incubaciones fueron sembradas junto a estándares apropiados en placas de TLC (silica gel 60, 0.25 mm, SIGMA). Como estándares se utilizaron: una mezcla de maltooligosacáridos (1-7), Glc, Man, celobiosa, maltosa, maltotriosa, maltotetraosa y maltopentaosa; todos en concentración 5 mM. Las cromatografías se desarrollaron dos veces en 1-propanol-nitrometano-agua (5:2:2 v/v). Los estándares y los productos de reacción no radioactivos, fueron revelados aplicando a la placa una solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en etanol al 5 % y calentando a 100 °C por 5 min. Los oligosacáridos radioactivos fueron visualizados con un Phosphoimager (Storm 840, Amersham-Pharmacia) luego de una exposición de 24 h, o detectados por autoradiografía utilizando films Biomax (Kodak) expuestos por 3-4 días.

Los productos de la incubación con isopentanol-PP-celobiosa y GDP-[<sup>14</sup>C]Man fueron sembrados en una placa de TLC que se desarrolló una vez en etanol:amoníaco (7:3 v/v). Los productos de reacción fueron visualizados por autoradiografía.

#### 6.11.2. Comprobación de la estabilidad del aceptor fitanil-PP-celobiosa.

Antes de ser utilizados en la reacción de transferencia, cada preparación de fitanil-PP-celobiosa fue analizada por TLC para controlar la integridad de la molécula. Alícuotas del sustrato se sembraron en placas (silica gel 60 F<sub>254</sub>, 0.2 mm, con base de aluminio, Merck) de 4 x 8 cm, utilizando como solvente propanol:etanol:agua (7:1:2 v/v). El revelado se realizó impregnando la placa con una solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en etanol al 5 % y calentando a 100 °C por 5 min.

### 6.12. Cuantificación y análisis estructural del xantano.

Para determinar la producción de polisacárido, se cultivaron células de *X. campestris* XcH complementadas con el gen de *aceA* silvestre o mutado en 50 ml de medio mínimo con la adición de los antibióticos correspondientes. Muestras de 48 h de cultivo fueron centrifugadas a 5000 x g durante 15 min para recuperar el polisacárido presente en los sobrenadantes. Los polisacáridos fueron precipitados con etanol y resuspendidos en 200  $\mu$ L de agua. La cuantificación de polisacárido se realizó por el método colorimétrico del *meta*-hidroxibifenilo (40).

Para el análisis estructural, XcH complementadas fueron cultivadas en medio mínimo durante 48 h. Los cultivos fueron centrifugados a 100000 x g durante 1 h. Para precipitar el xantano los sobrenadantes fueron adicionados con NaCl 1M y 2 volúmenes de etanol. El precipitado fue recuperado por centrifugación y lavado sucesivamente con etanol 70%, 75%, 80%, 85%, 90% y 95%. Las muestras fueron resuspendidas en agua y sonicadas para reducir la viscosidad. Finalmente fueron liofilizadas y resuspendidas en D<sub>2</sub>O. El análisis espectroscópico de los polisacáridos secretados fue realizado por A. Heyraud del CERMAV-CNRS (Grenoble, Francia). Los espectros RMN <sup>1</sup>H fueron registrados con un espectrómetro Bruker 300-MHz.

### 6.13. Mutagénesis sitio-dirigida.

A fin de clonar *aceA* en el vector de expresión pET29a (Novagen), fue necesario crear un sitio de restricción *SphI* superpuesto al codón de iniciación de *aceA* por mutagénesis sitio dirigida, utilizando el U.S.E Mutagenesis Kit y el Toggle primer de selección *StuI/SspI* (Amersham Pharmacia Biotech). Como primer mutagénico se utilizó el siguiente oligonucleótido: 5'GTTTCTTACTGTGCATGCAAACGGCTCAGGATC'3 (OligoExpress, París, Francia) y a la construcción obtenida se la denominó pDGC2.

Todas las mutantes de AceA en residuos específicos (excepto E287D) fueron obtenidas con el U.S.E Mutagenesis Kit y el Toggle primer de selección *SspI/StuI* (Amersham Pharmacia Biotech) sobre pDGC2, utilizando los oligonucleótidos mutagénicos que figuran en la Tabla 4.

**Tabla 4. Oligonucleótidos mutagénicos**

Secuencia de los primers	Cambio introducido
5'-CATGTCCAGGCCAGAAAGGCGAAAAAGAAGTCGAT-3'	D109A
5'-CGCCGGTGTGAAAAAGCCGCCAGCGGTGCGAGG-3'	H127A
5'-GGAACAGGTCCGGCATCGCTGTAGGCGCACGCCA-3'	S162A
5'-GGAGCTTGAGGCGCGCGTGCACCGCAAAGCGGCCA-3'	K211A
5'-CCCCATCAGCCCGCGCGCTTCGGCATCTGACGGG-3'	L270A
5'-GGCAAAGCCTGCATGCGCGGACAGGCAGCCAAAG-3'	E287A
5'-CCGCCGACATCGCCGCCACCGCCGCAAGGC-3'	E295A
5'-GGCAAAGCCTTGATGCGCGGACAGGCAGCCAAAG-3'	E287Q
5'-AGCCCCGCGACATCGCGTCCACCGCCGCAAGGCC-3'	E295D
5'-CCGCCGACATCGCCTGCACCGCCGCAAGGC-3'	E295Q
5'-GGAGCTTGAGGCGCCGGTGCACCGCAAAGCGGCCA-3'	K211R

La mutante E287D fue obtenida con el Quick Change Site Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) utilizando como templado pCrGC2 y los siguientes primers mutagénicos:

(E287Dfor) 5'-CTTTGGCTGCCTGTCCGCGCATGACGGCTTTGGGG-3'

(E287Drev) 5'-GGCAAAGCCGTCATGCGCGGACAGGCAGCCAAAG-3'

La fidelidad de las reacciones de mutagénesis fue confirmada por secuenciación del marco de lectura abierto completo, realizada en el servicio de secuenciación del Instituto Leloir.

#### 6.14. Modificación química.

Los experimentos de inactivación fueron llevados a cabo a 30 °C con 4 µg de AceA-Histag purificada, PHEA 25 mM y EDAC 0-150 mM en buffer MES 100 mM pH 6.0. Como control de la reacción se incubaron la enzima y EDAC en buffer. Las reacciones se iniciaron por adición de la enzima y fueron detenidas tomando alícuotas de 5 µl a diferentes tiempos y diluyéndolas 1/15 con Tris-acetato 20 mM pH 8.0. Una solución (conteniendo los sustratos, MgCl<sub>2</sub> y Tween 20) fue adicionada a cada muestra de enzima modificada, alcanzando un volumen final de 100 µl. Las muestras fueron luego incubadas a 37 °C durante 30 min para determinar la actividad residual de AceA.

Para los experimentos de protección por los sustratos, la enzima fue preincubada con el sustrato dador o el aceptor a Tamb por 10 min, luego de lo cual se procedió a la modificación con EDAC como se describe más arriba.

#### 6.15. Cristalización.

Para remover agregados, AceA-Histag pura fue filtrada con un filtro de 0,22 µm previo a los ensayos de cristalización. AceA fue cristalizada utilizando el método de la gota colgante (Hanging drop vapor diffusion method). Las condiciones optimizadas para la cristalización de AceA fueron:

- en la gota: 2  $\mu$ l de AceA-Histag 10 mg/ml en Tris-HCl 20 mM pH 8.0, NaCl 150 mM, Tween 20 0.05 %, mezclada con 2  $\mu$ l de buffer del reservorio.
- buffer del reservorio: Imidazol-malato 200 mM pH 7.0, polietilenglicol (PEG) 3.35 K 17 %.

Los cristales crecieron en 3 días de incubación a 16 °C.

Los cristales fueron sometidos a difracción de rayos X en el Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel (Grenoble, Francia) por Gianpiero Garau del laboratorio de Cristalografía Molecular (LCM) a cargo del Dr. Otto Dideberg.

### 6.16. Métodos bioinformáticos.

Las predicciones de estructura secundaria fueron creadas por el servidor Jpred<sup>2</sup> (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/~www-jpred/>). Se utilizó este método debido a que utiliza alineamientos múltiples de secuencias obtenidas por BLAST, luego de la eliminación de secuencias redundantes. La clasificación de GTs CAZY se encuentra disponible en <http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>. Los estudios de threading utilizados en la primer parte del trabajo (para la localización de los residuos posteriormente mutados a Ala) fueron realizados por Anne Imberty del laboratorio de Glicobiología Molecular (CERMAV-CNRS, Grenoble, Francia) utilizando Procyon (168). Para la predicción de dominios transmembrana se utilizó el programa DAS (Dense alignment surface method) que se encuentra disponible en <http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/> (31).

#### 6.16.1. Modelado por homología de la estructura 3D de AceA.

Se obtuvieron predicciones de estructura secundaria y modelos de la estructura 3D a partir de la secuencia aminoacídica de AceA con varios métodos de reconocimiento de estructura y plegamiento (ProfSec, EsysPred 3D, FFAS03, PDB-BLAST, GRDB, 3D-PSSM, FUGUE-2, INUB, Sam-T02). Los resultados fueron evaluados en forma conjunta por el método del 3D-Jury (54) en el MetaServer ([www.bioinfo.pl](http://www.bioinfo.pl)) (15). Las secuencias aminoacídicas de varias GTs de estructura conocida fueron analizadas de manera similar y las estructuras obtenidas fueron comparadas con el método DALI (78).

El modelo de la estructura 3D de AceA fue construido en base a los tipos de plegamiento y alineamientos de secuencia obtenidos en el Metaserver, utilizando el programa Deep View-SwissPdbViewer versión 3.7 (<http://www.expasy.org/spdbv/>) (62) para el alineamiento, y el programa del servidor SWISS-MODEL en modo optimizado (versión 3.5; [www.expasy.ch/swissmod/SWISS-MODEL.html](http://www.expasy.ch/swissmod/SWISS-MODEL.html)) para la construcción automática del modelo. La secuencia de AceA fue modelada utilizando las estructuras de 4 proteínas como plantillas: Glucógeno sintasa de *A. tumefaciens* (PDB 1rzv), Trealosa sintasa OtsA de *E. coli* (PDB 1gz5), UDP-GlcNAc-2- Epimerasa de *E. coli* (PDB 1vgv) y NAcGlcTransferasa MurG de *E. coli* (PDB 1f0k). El modelo obtenido fue sometido a una minimización global de energía utilizando una implementación del programa GROMOS96 43B1 en Swiss-PdbViewer. La calidad del modelo fue evaluada con el programa WhatCheck (79). El potencial electrostático fue calculado con Swiss-Pdb Viewer, asumiendo constantes dieléctricas de 2 y 80 para la proteína y el solvente, respectivamente.



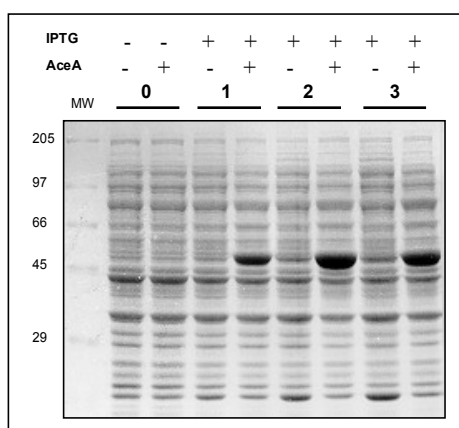
## 7. Resultados

### 7.1. Clonado y expresión heteróloga de AceA.

En estudios anteriores, la actividad de AceA había sido determinada en un sistema de células permeabilizadas de *X. campestris* mutante en el gen *gumH*, complementada con *aceA* (146). Sin embargo, nunca antes se había ensayado la actividad de AceA en un sistema libre de sustrato aceptor endógeno. Por lo tanto con el objeto de medir la actividad enzimática en un sistema libre de células y posteriormente purificar y caracterizar a AceA, se decidió en primer término, sobreexpresar el producto del gen *aceA* en *E. coli*. Con este fin se realizó el subclonado del gen *aceA* en distintos vectores de expresión. Algunas de las construcciones obtenidas fueron utilizadas con diferentes finalidades, como se verá más adelante.

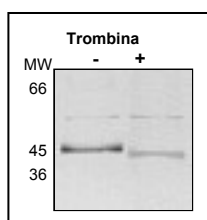
#### 7.1.1. Obtención de Stag-AceA recombinante.

La obtención de pCrGC2 se realizó como se detalla en Materiales y Métodos. Esta construcción codifica para una proteína de fusión de AceA con el péptido Stag (15 aminoácidos) en el extremo N-terminal de AceA y con un sitio de corte para trombina que permite remover el Stag. El peso molecular esperado para la proteína de fusión es de ~45.6 kDa. La construcción fue secuenciada, para confirmar el correcto clonado. Luego se analizó el patrón de proteínas de *E. coli* BL21(DE3)/pCrGC2 antes y después de la inducción con IPTG (Fig. 22).



**Figura 22. Producción de Stag-AceA.** Se cultivaron células de *E. coli* BL21(DE3) conteniendo pET29a (AceA-) o pCrGC2 (AceA+). Los cultivos fueron inducidos con IPTG 1 mM y se tomaron muestras de los mismos antes (0) y a distintos tiempos durante la inducción (1, 2 ó 3 h). Las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE y el gel teñido con Coomassie blue. MW, marcadores de peso molecular.

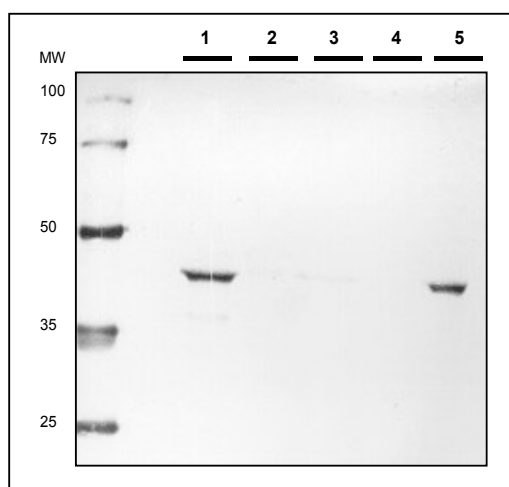
Los extractos celulares inducidos, muestran una banda prominente de aproximadamente 46 kDa que no se observa en los extractos de *E. coli* BL21(DE3)/pET29a. Para confirmar que la proteína de ~46 kDa corresponde a Stag-AceA, el Stag fue clivado por digestión con trombina y la proteína resultante (Fig. 23) mostró un peso molecular de ~44 kDa. La secuencia del N-terminal de la proteína clivada coincidió con la esperada para la proteína de fusión.



**Figura 23. Digestión con Trombina de la fusión Stag-AceA.** Extractos totales de *E. coli* BL21(DE3)/pCrGC2 fueron tratados con Trombina como se describe en Materiales y Métodos. Las proteínas fueron luego separadas por SDS-PAGE y electrotransferidas a membrana de PVDF. AceA fue detectada utilizando un suero policlonal de conejo contra la fusión Stag-AceA.

Se probaron diversas condiciones de inducción para la fusión Stag-AceA. La mayor producción de proteína recombinante se obtuvo induciendo con 0.5 mM IPTG a una  $DO_{600}$  de 0.8, durante 2 h. Sin embargo, una centrifugación diferencial mostró que la mayor parte de AceA se encontraba en los precipitados correspondientes a 2000 x g y 15000 x g, indicando la formación de cuerpos de inclusión. Dada la necesidad de obtener la proteína en forma nativa para los estudios posteriores, se buscaron otras condiciones de inducción. En primer lugar, pCrGC2 fue introducido en *E. coli* BL21(DE3)/pLysS que permite un control más estricto de la expresión

proteica. Por otro lado, la concentración de IPTG fue disminuída a 5  $\mu$ M, manteniendo el resto de las condiciones constantes. Los extractos celulares de *E. coli* BL21(DE3)/pLysS/pCrGC2 fueron nuevamente sometidos a centrifugación diferencial y analizados por inmunoblot (Fig. 24).

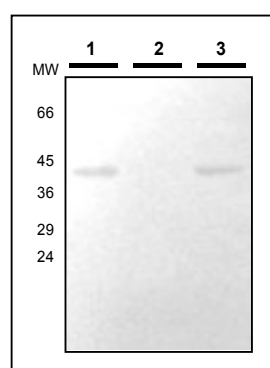


**Figura 24. Localización subcelular de Stag-AceA en *E. coli*.** Extractos de *E. coli* BL21(DE3)/pLysS/pCrGC2 fueron sometidos a centrifugación diferencial. Muestras de cada paso fueron analizadas por inmunoblot utilizando el conjugado proteínaS-fosfatasa alcalina como sonda para la detección de la fusión Stag-AceA. Calle 1, extracto total; 2, precipitado de 2000 x g; 3, precipitado de 5000 x g; 4, precipitado de 100000 x g; 5, sobrenadante de 100000 x g. MW, marcadores de peso molecular.

La mayor parte de Stag-AceA fue detectada en el sobrenadante de 100000 x g, lo que sugiere que la proteína se encuentra en forma soluble en el citosol. La localización subcelular de esta forma de AceA resulta sorprendente, si se tiene en cuenta la localización de su sustrato aceptor y el hecho de que en experimentos posteriores, la proteína siempre se encuentra asociada a la fracción de membranas (ver sección 7.2.).

### 7.1.2. Obtención de AceA-Histag recombinante.

Debido a las dificultades encontradas en la purificación de Stag-AceA (ver 7.3.), se decidió clonar el gen *aceA* en otros vectores de expresión. De las múltiples construcciones obtenidas, se eligió pPA, que codifica para el ORF completo de AceA con el agregado de seis residuos de His en su extremo C-terminal. El clonado fue verificado por secuenciación del ORF entero. El peso molecular esperado para esta forma de AceA es de ~43.8 kDa. En la búsqueda de condiciones óptimas de inducción de *E. coli* BL21(DE3)/pPA, se encontró que agregando IPTG 1 mM a una  $DO_{600}$  de 0.8, e induciendo por 3 horas, se obtenía la máxima producción de proteína recombinante. Pero al examinar la localización subcelular de la fusión AceA-Histag, encontramos que la proteína se encontraba en el precipitado de 100000 x g (Fig. 25).



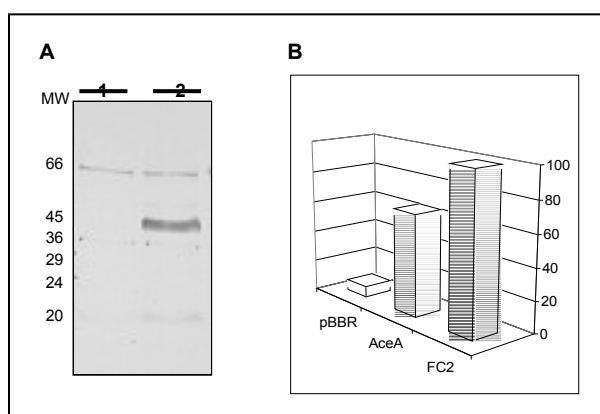
**Figura 25. Localización subcelular de AceA-Histag en *E. coli*.** Extractos de *E. coli* BL21(DE3)/pPA fueron sometidos a centrifugación diferencial. Alícuotas del extracto total (1), el sobrenadante de 100000 x g (2) y el precipitado de 100000 x g (3) fueron analizadas por inmunoblot. Para la detección de la proteína de fusión se utilizó un anticuerpo monoclonal comercial contra el tag de histidinas.

La presencia de AceA en el precipitado de 100000 x g indica que esta forma de AceA se localiza en la fracción de membranas. La identidad de la proteína de fusión fue confirmada por secuenciación del N-terminal.

### 7.1.3. Obtención de pBBR-AceA.

Debido a los problemas que presenta la manipulación genética de *A. xylinum*, causados por la baja frecuencia de transformación que presentan las cepas de *Acetobacter*, los ensayos de

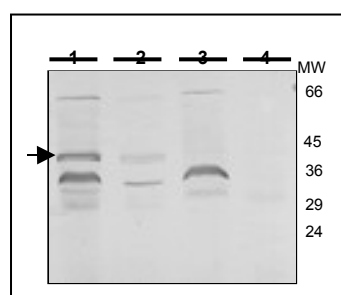
complementación y de localización de la proteína (ver sección 7.2.), fueron hechos en *X. campestris*, explotando la similitud entre las vías de síntesis de los EPSs acetano y xantano (ver sección en Introducción). Para ello fue necesario clonar el gen *aceA* en el plásmido de amplio rango de huéspedes pBBR1 MCS3, generando la construcción pBBR-AceA. La expresión proteica en este vector es constitutiva. El plásmido fue introducido en la cepa XcH y se verificó la presencia de AceA por inmunoblot utilizando un suero policlonal contra AceA (Fig. 26A). La introducción de AceA en XcH restaura la síntesis de xantano, sin embargo la producción del EPS en la cepa complementada sólo llega a un 60 % respecto a la producción de la cepa nativa *X. campestris* FC2 (Fig. 26B).



**Figura 26. Introducción de pBBR-AceA en XcH.** A) Inmunoblots de extractos totales de XcH conteniendo el plásmido pBBR MCS3 (1) o pBBR-AceA (2), donde se observa la presencia de una banda mayoritaria de ~ 43 kDa, que corresponde al PM esperado para AceA a partir de esta construcción. AceA fue detectada con un antisuero policlonal obtenido de conejo contra la proteína recombinante. B) Producción porcentual de xantano de XcH complementada con AceA respecto a la producción de la cepa nativa FC2. Como control negativo se utilizó la cepa XcH complementada con pBBR1 MCS3.

## 7.2. Localización intracelular de AceA.

La expresión de AceA a partir de las construcciones mencionadas en 6.1. y los resultados de la centrifugación diferencial, dejaban dudas respecto a la localización subcelular de AceA *in vivo*. En muchas GTs involucradas en la biosíntesis de polisacáridos, el análisis de sus secuencias reveló la existencia de dominios transmembrana (195). Por lo tanto utilizamos métodos de predicción segmentos transmembrana sobre la secuencia de AceA. De los métodos utilizados, sólo DAS (Dense Alignment Surface method) (31) predice la existencia de una hélice transmembrana en el dominio C-terminal de AceA, más precisamente entre los aminoácidos 298-306. Sin embargo, el segmento presenta un puntaje bajo (1.7), cercano al valor de corte; con lo cual, la validez de la predicción es incierta. Debido a los bajos niveles de expresión de GTs *in vivo* y a la imposibilidad de introducir ADN exógeno en *A. xylinum*, decidimos determinar la localización de AceA en *X. campestris*, como aproximación a la situación real. Para ello, realizamos el fraccionamiento subcelular de XcH/pBBR-AceA y utilizamos un suero policlonal para detectar la proteína por inmunoblot. La Figura 27 muestra que AceA se encuentra en la fracción de membranas en XcH.

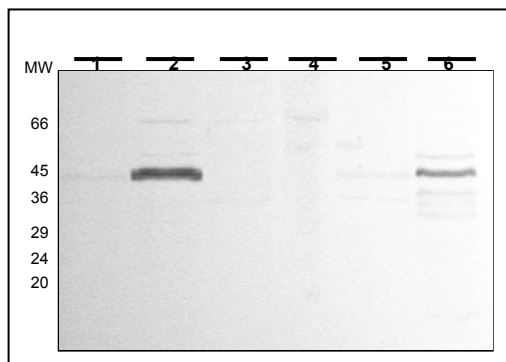


**Figura 27. Localización subcelular de AceA en *X. campestris* XcH.** Extractos de XcH conteniendo la construcción pBBR-AceA o el plásmido pBBR MCS3, fueron sometidos a centrifugación diferencial. Alícuotas de los precipitados de 100000 x g (1: XcH/pBBR-AceA, 3: XcH/pBBR) y los sobrenadantes de 100000 x g (2: XcH/pBBR-AceA, 4: XcH/pBBR) fueron analizadas por inmunoblot con un antisuero policlonal de conejo contra AceA. La flecha indica la posición de AceA.

### 7.2.1. Localización de AceA en una cepa deletada en la región *gum*.

Anteriormente se ha sugerido que las enzimas involucradas en la síntesis de EPSs estarían formando un complejo multiproteico asociado a membrana (109). Para determinar si AceA forma parte de uno de estos complejos y su localización en membrana es mediada por

interacción con alguna otra proteína de la región *gum*, se introdujo AceA en *X. campestris* Xc1231 (22). Esta cepa se caracteriza por su incapacidad de producir xantano, debido a la delección de la región *gum* completa. Encontramos niveles más bajos de AceA en esta cepa, sin embargo, la proteína se encuentra anclada a la membrana (Fig. 28), por lo cual la localización en un ambiente hidrofóbico parece ser una propiedad intrínseca de AceA.

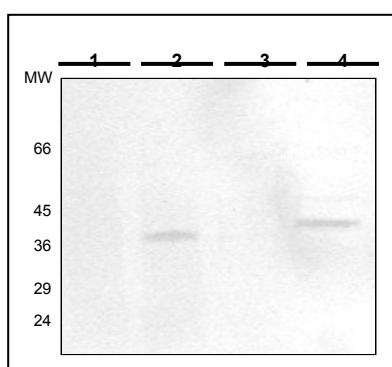


**Figura 28. Localización de AceA en *X. campestris* Xc1231.** Extractos totales de XcH/pBBR-AceA, Xc1231/pBBR1 MCS3 y Xc1231/pBBR-AceA fueron centrifugados a 100000 x g para separar la fracción de membranas (MT) del soluble (SN). Las fracciones fueron analizadas por inmunoblot con un antisuero policlonal contra AceA. 1 y 2: SN y MT de XcH/pBBR-AceA; 3 y 4: SN y MT de Xc1231/pBBR1 MCS3; 5 y 6: SN y MT de Xc1231/pBBR-AceA.

### 7.2.2. Búsqueda del sitio de anclaje a membrana.

Asumiendo entonces, que AceA es una proteína de membrana nos interesó determinar si existe una región definida de la proteína responsable de su localización. Como los sitios de modificación y/o anclaje a membrana se encuentran frecuentemente en los extremos de la proteína, realizamos delecciones en los extremos N- y C-terminal de AceA con la idea de obtener la proteína en forma soluble sin afectar la actividad enzimática. Estas construcciones generan proteínas de fusión con un tag de seis residuos de His en el extremo carboxi-terminal. La región hidrofóbica predicha por el método DAS no fue modificada, debido a su cercanía al sitio activo de AceA, como se verá más adelante. La remoción de los primeros diez aminoácidos (N-AceA), o los últimos treinta (C-AceA), no provocó cambios en la localización de AceA en *E. coli* (Fig. 29).

Estos resultados, sumados al hecho de que AceA carece de segmentos transmembrana, sugieren que el sitio de asociación a membrana probablemente está formado por residuos alejados en la secuencia primaria, pero que están confinados a una misma región en la estructura terciaria de la proteína.



**Figura 29. Localización subcelular de las mutantes por delección de AceA en *E. coli*.** Extractos totales de BL21 (DE3) que expresan C-AceA (*aceA*Δ1092-1196) o N-AceA (*aceA*Δ1-30) fueron sometidos a centrifugación diferencial y analizados por inmunoblot. 1 y 2: fracciones soluble y de membranas de células que expresan C-AceA. 3 y 4: fracciones soluble y de membranas de células que expresan N-AceA. Las mutantes por delección de AceA fueron detectadas con un anticuerpo monoclonal comercial contra el tag de histidinas.

Estos resultados, sumados al hecho de que AceA carece de segmentos transmembrana, sugieren que el sitio de asociación a membrana probablemente está formado por residuos alejados en la secuencia primaria, pero que están confinados a una misma región en la estructura terciaria de la proteína.

### 7.2.3. Estudio del tipo de interacción.

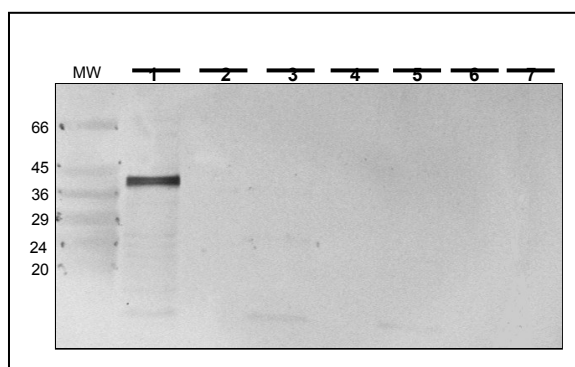


Teniendo en cuenta su rol en la biosíntesis de acetano y la localización diferente de sus sustratos (el nt-azúcar es soluble, pero el aceptor se encuentra anclado a la membrana), es probable que AceA se encuentre asociada a la cara citoplasmática de la membrana interna bacteriana.

La asociación a membrana puede ser mediada por interacciones iónicas con fosfolípidos, por inserción de dominios transmembrana o residuos hidrofóbicos, por grupos hidrofóbicos unidos covalentemente al polipéptido, o por asociación con proteínas integrales de membrana que actúan como andamiaje. Esta última opción parece no ser válida en el caso de AceA, tal como se mostró en los experimentos de localización realizados en la cepa Xc1231. Por otro lado la modificación lipídica de proteínas bacterianas sólo ha sido demostrada para proteínas de la membrana externa y de secreción. Para indagar sobre el tipo de interacción de AceA con la membrana se probaron distintos métodos de solubilización, partiendo de una preparación de membranas totales de XcH complementada con AceA.

#### *Solubilización con proteasa*

Se utilizó una solución de proteinasa K sobre una preparación de membranas totales obtenidas de XcH/pBBR-AceA, probando diferentes proporciones sustrato: proteasa y variando los tiempos de incubación. En todas las condiciones analizadas (ver Materiales y Métodos) se observó que la proteína se degrada totalmente, incluso a concentraciones bajas de proteasa y tiempos cortos de incubación. En la Figura 30 se muestra el análisis por inmunoblot de las digestiones con tres concentraciones de proteasa al tiempo más corto de incubación (10 min).



**Figura 30. Tratamiento de una muestra de membranas de XcH/pBBR-AceA con proteinasaK.**

Una preparación de membranas de XcH/pBBR-AceA, fue dividida en tres alícuotas que fueron incubadas con distintas concentraciones de proteinasa K, variando la relación sustrato:proteasa (calles 2 y 3, 25:1; calles 4 y 5, 5:1; calles 6 y 7, 1:1). Las muestras fueron incubadas 10 min a 37 °C y luego centrifugadas a 100000 x g para separar la fracción soluble de la de membranas. En la calle 1, se sembró una alícuota de la preparación de membranas no tratadas con proteasa. Calles 2, 4 y 6, fracciones solubles después del tratamiento. Calles 3, 5 y 7, fracciones de membranas después del tratamiento. Las muestras fueron analizadas por inmunoblot con un anticuerpo policlonal contra AceA.

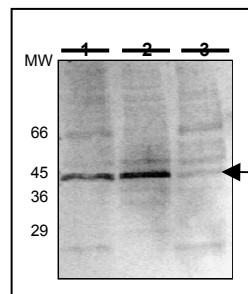
En proteínas con pasos transmembrana, la digestión controlada con proteasas generalmente origina productos intermedios de la región soluble debido a que la región del “stem”, es más vulnerable a la acción de estas enzimas. En el caso de AceA, no se observan productos de digestión parcial en la fracción soluble después del tratamiento; toda la proteína es susceptible a la digestión con proteasa. Por otro lado, tampoco se observan productos intermedios en la fracción de membranas, lo que sugiere que no existen “zonas protegidas” en la proteína, apoyando la observación de que AceA carece de dominios transmembrana. Sin embargo esto último podría deberse a que el antisuero utilizado, no reconoce los fragmentos de AceA embebidos en la membrana. El inmunoblot es la única manera en que podemos evaluar el efecto del tratamiento con proteinasa K, ya que aunque el perfil de proteínas en SDS-PAGE cambia después del tratamiento, es imposible determinar que bandas corresponden a productos de degradación de AceA.

#### *Solubilización con buffer alcalino.*

Este método es uno de los muchos que se utilizan para anular las interacciones electrostáticas de proteínas que se asocian débilmente a la membrana plasmática. Este tipo de interacción es mediada por grupos de aminoácidos básicos en la proteína con los fosfolípidos cargados negativamente de la membrana. En general, la incubación de las membranas con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> durante 30 min es suficiente para la solubilización completa de estas proteínas.

Cuando se incubaron membranas de XcH/pBBR-AceA con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pH 11.4, observamos un patrón proteico diferente en SDS-PAGE antes y después del tratamiento. La detección de AceA

por inmunoblot, muestra sólo un ~5 % de la proteína en forma soluble después del tratamiento (Fig. 31). Este resultado muestra que la interacción de AceA con la membrana no es puramente electrostática.



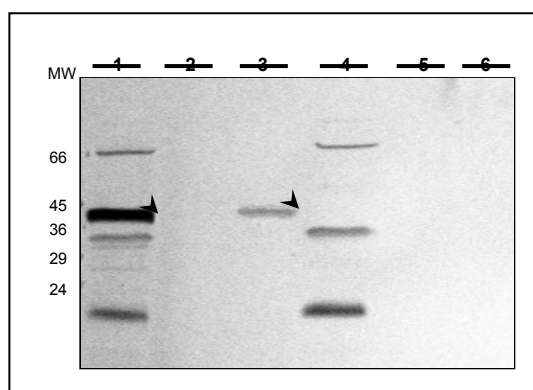
**Figura 31. Disociación de AceA de membranas con buffer alcalino.** Una preparación de membranas totales de XcH/pBBR-AceA fue tratada con buffer alcalino y procesada como se describe en Materiales y Métodos. AceA fue detectada por inmunoblot utilizando un suero policlonal contra la proteína recombinante. Calle 1, alícuota de la preparación de membranas antes del tratamiento; 2 y 3, alícuotas de las fracciones soluble y de membranas después del tratamiento con  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . La posición de AceA se indica con una flecha.

#### *Solubilización con Tritón X-114.*

Se utilizó la partición de fases con Tritón X-114 como medio para distinguir entre proteínas periféricas o integrales de membrana. Esta definición resulta a veces un tanto ambigua, por lo que en esta tesis, llamaremos proteínas integrales de membrana sólo a aquellas que la atraviesan.

La serie de detergentes no iónicos del tipo polioxietilenglicol, forma soluciones homogéneas de micelas en un rango de temperatura limitado por el punto de congelamiento y el punto de turbidez. A temperaturas que superan el punto de turbidez, la mayoría de los detergentes no iónicos forman una suspensión (aumento del tamaño de la micela o agregación micelar). El punto de turbidez del Tritón X-114 es de 22 °C. Por lo tanto al elevar la temperatura por encima de 22 °C es posible obtener dos fases por simple centrifugación: una fase rica en detergente (micelas agregadas) y una fase pobre en detergente (monómeros de detergente). Nos referiremos a éstas como fase detergente y acuosa, respectivamente. Según Hooper y col. (80), la presencia de un solo segmento transmembrana o de un grupo hidrofóbico unido a la proteína, es suficiente para que la proteína particione a la fase detergente.

La Fig. 32 muestra que cuando membranas de XcH/pBBR-AceA son tratadas con Tritón X-114, AceA es detectada en la fase acuosa. Esto indica que AceA carece de segmentos transmembrana y también permite descartar la presencia de modificaciones lipídicas.



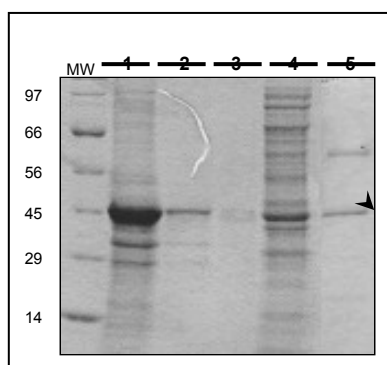
**Figura 32. Disociación de AceA de membranas con Tritón X-114.** Preparaciones de membranas de XcH conteniendo pBBR-AceA o pBBR1 MCS3 (como control) fueron tratadas con Tritón X-114 y analizadas por inmunoblot utilizando un antisuero policlonal contra AceA. Calles 1 y 4, fracciones de membranas obtenidas de XcH/pBBR-AceA y XcH/pBBR, respectivamente. Luego del tratamiento se obtuvieron dos fases: fase detergente de XcH/pBBR-AceA (2) y XcH/pBBR (5); y fase acuosa de XcH/pBBR-AceA (3) y XcH/pBBR (6). La posición de AceA está indicada.

La solubilización parcial con buffer alcalino y el efecto de Tritón X-114, indican que el anclaje de AceA a membranas sería mediado por grupos de residuos hidrofóbicos que penetran la bicapa lipídica, mientras que también parecen estar involucradas interacciones electrostáticas, probablemente medidas por residuos básicos.

Teniendo en cuenta que AceA es una proteína de membrana y conociendo el tipo de interacción con ésta, se procedió a determinar las condiciones óptimas de solubilización para iniciar la purificación de AceA, como se detalla en la sección siguiente.

### 7.3. Solubilización de membranas y purificación de AceA.

A pesar de la ventaja que representa contar con proteína en forma soluble, la fusión Stag-AceA no resultó útil para la purificación. Los primeros intentos de purificación de esta forma de AceA, se realizaron con una resina comercial. La proteína era parcialmente purificada en un solo paso (cromatografía de afinidad) a partir de sobrenadantes de 100000 x g de *E. coli* BL21(DE3)/pLysS/pCrGC2 (Fig. 33).

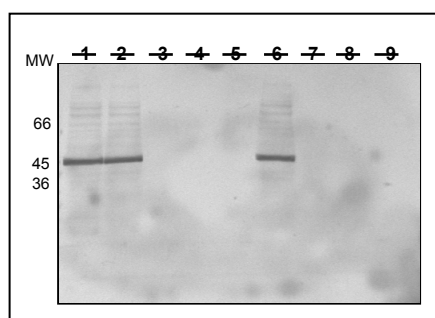


**Figura 33. Purificación parcial de Stag-AceA por cromatografía de afinidad.** Un extracto total de BL21(DE3)/pLysS/pCrGC2 (1) fue sometido a centrifugación diferencial (2 y 3, precipitados de 5000 y 100000 x g). El sobrenadante de 100000 x g (4) fue incubado con la resina proteínaS-agarosa (Novagen). El eluido de la resina (5), contenía a AceA y a una proteína de 60 kDa que fue identificada como la chaperona GroEL. Las muestras fueron analizadas por SDS-PAGE y las proteínas visualizadas por tinción con Coomassie blue. Se indica la posición de AceA.

Aunque este resultó ser un paso útil en la purificación, se había observado que AceA copurificaba con una proteína de ~60 kDa que por microsecuenciación del N-terminal fue identificada como la chaperona GroEL de *E. coli*.

En los intentos por eliminar a la chaperona de la preparación de AceA, se probó la separación en una columna de filtración en gel, Superdex 75-HPLC. Se observó la elución de una proteína de PM ~60 kDa, según se calculó por su tiempo de retención y el de las proteínas estándares con que se calibró la columna. La proteína que eluyó de la columna probablemente sea la chaperona. No se detectó AceA en ninguna de las fracciones analizadas, por lo que asumimos que la proteína quedó unida a la matriz de manera irreversible.

También se probó la purificación de Stag-AceA con otras resinas de afinidad. Dado que la enzima utiliza como sustrato GDP-Man, se ensayó su capacidad de unión al GDP utilizando una resina comercial GDP-agarosa (Sigma). La purificación se hizo en batch y se probó la unión en incubaciones de 2 h u ON. AceA no se unió a la resina bajo ninguna de las condiciones ensayadas (Fig. 34).



**Figura 34. Incubación de Stag-AceA con GDP-agarosa.** El sobrenadante de 100000 x g obtenido de *E. coli* BL21(DE3)/pLysS/pCrGC2 fue incubado con la resina comercial 2 h a Tamb (2-5), o bien ON a 4 °C (6-9). Alícuotas de cada etapa fueron analizadas por inmublot y AceA fue detectada con el conjugado proteína S-fosfatasa alcalina (Novagen). Calle 1: sobrenadante de 100000 x g. Calles 2 y 6: fracciones que permanecen solubles luego de la incubación con la resina. Calles 3 y 7: lavados. Calles 4, 5, 8 y 9: elución.

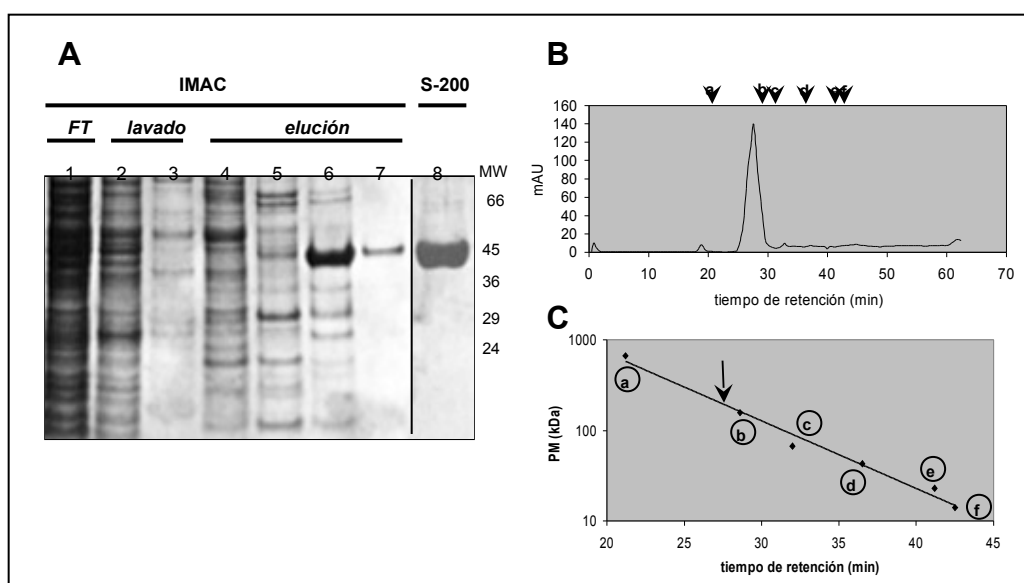
La incapacidad de AceA de unirse a la resina podría deberse a la forma en que el ligando (GDP) está unido a la matriz (a través de los OH de la ribosa). Probablemente esos grupos del sustrato forman interacciones importantes con la enzima y sean necesarios para el reconocimiento del sustrato. De hecho, las estructura 3D de los complejos binarios OtsA/UDP-Glc y Kre2/GDP, confirman la importancia de estas interacciones en la unión del nucleótido (ver Figs. 18 y 19).

Los resultados negativos al tratar de separar a AceA de la chaperona, el alto costo de la resina de afinidad y los bajos rendimientos de proteína obtenidos, nos condujeron a buscar otras alternativas para la purificación de AceA. Se decidió subclonar AceA en otro vector de expresión y así obtuvimos la fusión AceA-Histag (sección 7.1.2), que fue utilizada para la

purificación a homogeneidad de AceA con alto rendimiento. Esta forma de AceA fue sobreexpresada en *E. coli* BL21(DE3), pero los experimentos de localización mostraron que se encontraba en la fracción de membrana (ver Fig. 25).

Conociendo el tipo de interacción de AceA con las membranas en XcH, iniciamos experimentos de disociación a partir de membranas de *E. coli* BL21(DE3)/pPA. Realizamos un screening con diferentes tipos de detergente, utilizándolos a una concentración 10 X c.m.c.. Los rendimientos más altos de proteína soluble fueron logrados con Tween 20 y Tritón X-100. Luego probamos diferentes concentraciones de detergente (0.1 % - 2 %) y encontramos que 1 % resultaba en la concentración óptima para la extracción de AceA con cualquiera de los dos detergentes.

En la mayoría de los experimentos utilizamos Tween 20 para la purificación de AceA, que fue también adicionado a los buffers a una concentración de 0.05 %. El extracto crudo y la disociación de AceA de membranas fueron realizados como se describe en Materiales y Métodos. La muestra fue sembrada en una columna pre-armada (Ni-NTA HiTrap Chelating, Pharmacia) y luego del lavado, se aplicó un gradiente de imidazol (10-500 mM). AceA-Histag eluyó a una concentración de imidazol de 300 mM. Se tomaron alícuotas de cada etapa, que fueron analizadas por SDS-PAGE (Fig. 35A). Las fracciones que contenían AceA fueron concentradas y luego sometidas a una filtración en gel (Superdex S-200, Pharmacia) (Fig. 35A, calle 8 y 35B). El tiempo de retención de AceA fue 27.5 min, que corresponde según nuestra calibración con estándares de proteína (Fig. 35C) a un PM aparente de ~190 kDa.



**Figura 35. Purificación de AceA-Histag.** AceA-Histag fue solubilizada de membranas de *E. coli* BL21(DE3) y purificada en dos pasos (cromatografía de afinidad y filtración en gel), en presencia de Tween 20. **A)** Alícuotas de cada etapa de la purificación fueron analizadas por SDS-PAGE. Calles 1-7, muestras de distintas etapas en la purificación por IMAC; calle 8, una alícuota del pool de S-200. **B)** Perfil de elución de AceA-Histag en S-200. Los tiempos de retención de los estándares utilizados en la calibración de la columna están indicados. **C)** Curva de calibración de S-200. La flecha indica el valor correspondiente a AceA. Los estándares utilizados para la calibración fueron: a) tiroglobulina (669 kDa), b) aldolasa (158 kDa), c) albumina (67 kDa), d) ovoalbumina (43 kDa), e) quimotripsinógeno (23.2 kDa), f) ribonucleasa (13.7 kDa).

Como se mencionó anteriormente, el PM del monómero de AceA-Histag es de 43.8 kDa. La presencia de detergente en la muestra, impide la determinación precisa del PM de la forma nativa de AceA-Histag. La secuencia del N-terminal de la proteína purificada, determinada por espectrometría de masa, fue: MNSKKRGDET, como se espera a partir de su secuencia codificante (GenBank accession number U37258). La proteína purificada fue mantenida a 4 °C y resultó ser estable hasta seis meses, sin mostrar signos de agregación o pérdida de actividad enzimática.

#### 7.4. Caracterización de la actividad enzimática.

A partir de las condiciones empleadas en la medición de actividad en células permeabilizadas (146), desarrollamos un método para ensayar la actividad *in vitro* de AceA. Las primeras mediciones se hicieron utilizando la forma Stag-AceA parcialmente purificada y en mediciones posteriores se utilizó la forma pura AceA-Histag. En los experimentos que se describen a continuación se especificará cual de las dos formas de AceA se utilizó.

#### 7.4.1. Actividad *in vitro* de Stag-AceA.

El análisis de los intermediarios en la biosíntesis de EPS en la mutante XcH/pBBR-AceA (146) parecía indicar que AceA es un  $\alpha$ -ManT que utiliza GDP-Man como dador del residuo azúcar y poliprenol-PP-celobiosa como aceptor. Para confirmar esta suposición, se determinó la actividad de Stag-AceA *in vitro*, incubando un extracto crudo de *E. coli* que contenía AceA con los sustratos predichos. Como el sustrato aceptor es un compuesto que no existe en forma comercial y su síntesis química es compleja, utilizamos un extracto lipídico de *X. campestris* enriquecido en el aceptor (ver Materiales y Métodos). Cabe señalar que el aceptor no fue purificado debido a que se encuentra en pequeñas cantidades y probablemente es inestable debido a la cercanía entre el grupo pirofosfato y la unidad isoprenoide insaturada que conforma la porción lipídica. Anteriormente se había observado que células permeabilizadas de *X. campestris* FC2 incubadas con UDP-[<sup>14</sup>C]Glc como único dador de azúcar, producen principalmente poliprenol-PP-celobiosa.

Extractos celulares de *E. coli* BL21(DE3)/pLysS conteniendo pCrGC2 o pET29a fueron incubadas con GDP-[<sup>14</sup>C]Man en presencia o ausencia del aceptor lipídico frío. Luego se determinó la incorporación de [<sup>14</sup>C]Man en la fase orgánica (Tabla 5).

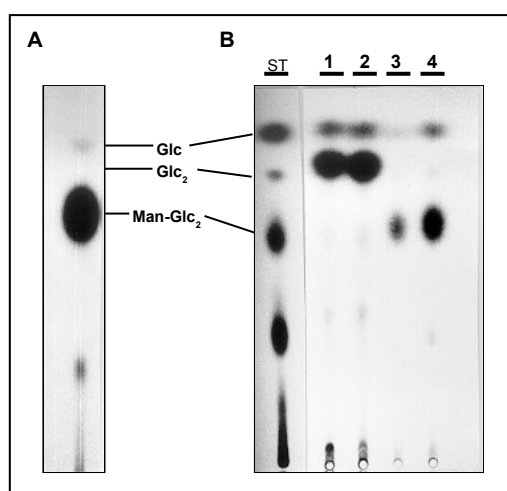
**Tabla 5. Incorporación de [<sup>14</sup>C]Man en extractos orgánicos.**

Cepa de <i>E. coli</i>	Aceptor lipídico	Man (pmol/min x mg de proteína) <sup>a</sup>
BL21(DE3)/pLysS/pET29a	-	≤0.001
BL21(DE3)/pLysS/pCrGC2	-	≤0.001
BL21(DE3)/pLysS/pET29a	+	≤0.001
BL21(DE3)/pLysS/pCrGC2	+	1.1

<sup>a</sup>Extractos celulares de las cepas indicadas fueron incubadas en presencia o ausencia del sustrato aceptor. Los productos glicolipídicos fueron extraídos como se describe en Materiales y Métodos y se midió radiactividad.

No se observó incorporación de marca en las incubaciones hechas con extractos de *E. coli* BL21(DE3)/pLysS/pET29a, lo que indica que no existe una actividad de ManT homóloga a AceA en *E. coli*. Tampoco se detectó incorporación en la fase orgánica de la incubación con extractos de *E. coli* BL21(DE3)/pLysS/pCrGC2 en ausencia del aceptor, por lo que descartamos la presencia de un aceptor endógeno para la reacción catalizada por AceA en *E. coli*. Por el contrario, las incubaciones completas mostraron la incorporación de radiactividad en la fase orgánica.

Luego de la extracción de los productos, los oligosacáridos fueron liberados de la porción lipídica por hidrólisis ácida suave. Esto sugiere que la unión de la porción azúcar al lípido esta dada por un puente pirofosfato (28). Resultados similares se obtuvieron para el auténtico poliprenol-PP-Glc<sub>2</sub>Man producido por *X. campestris* (86). Los oligosacáridos marcados fueron analizados por TLC y autoradiografía. La Figura 36A muestra la detección de un producto mayoritario que migra como el estándar trisacárido. Este resultado confirma que la porción azúcar del producto de AceA es un trisacárido que contiene manosa.

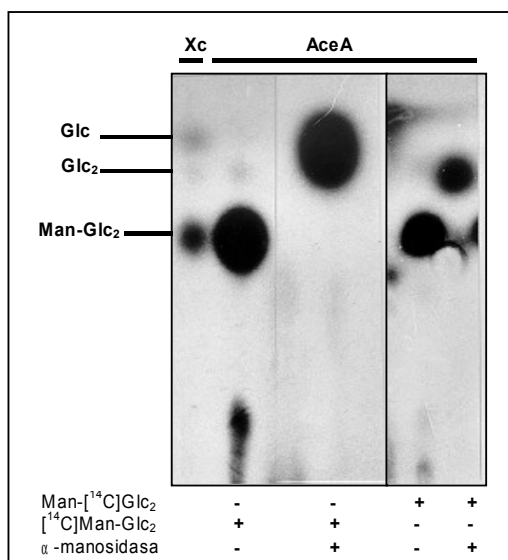


**Figura 36. Análisis por TLC de los productos formados en la reacción *in vitro* de AceA.** **A)** El sobrenadante de 100000 x g obtenido del fraccionamiento de BL21(DE3)/pLysS/pCrGC2, fue incubado en presencia de Glc<sub>2</sub>-PP-Lip frío y GDP-[<sup>14</sup>C]Man. **B)** Los sobrenadantes de 100000 x g de BL21(DE3)/pLysS/pET29a (1 y 2) y BL21(DE3)/pLysS/pCrGC2 (3 y 4), fueron incubados en presencia de [<sup>14</sup>C]Glc<sub>2</sub>-PP-Lip y GDP-Man frío. Los oligosacáridos fueron extraídos y liberados de la porción lipídica (ver Materiales y Métodos). Lípido-oligosacáridos de *X. campestris* fueron utilizados como estándares (ST).

Para confirmar que el aceptor de la reacción es poliprenol-PP-celobiosa, se utilizó UDP-[<sup>14</sup>C]Glc en la incubación con células permeabilizadas de *X. campestris* para la preparación del extracto lipídico. En esta ocasión, el aceptor marcado fue incubado con GDP-Man fría y extractos de *E. coli* BL21(DE3)/pLysS conteniendo pCrGC2 o pET29a. Los oligosacáridos fueron obtenidos por hidrólisis ácida suave y analizados por TLC y autoradiografía (Fig. 36B). En los extractos que no contenían AceA, se observa la presencia de un azúcar que migra como celobiosa, mientras que en presencia de AceA se observa claramente la aparición de un nuevo azúcar marcado que migra como el estándar de trisacárido. Nótese que la conversión de Lip-PP-Glc<sub>2</sub> a Lip-PP-Glc<sub>2</sub>Man es del 100 %, sin embargo la recuperación del producto de la reacción no es completa.

#### 7.4.2. Caracterización del enlace glicosídico sintetizado por AceA.

Debido a la utilización de una preparación de aceptor cruda y a las pequeñas cantidades de producto formado, el análisis químico del producto de la reacción catalizada por AceA se vio impedida. Por lo tanto para confirmar la estereoquímica del enlace formado, utilizamos una  $\alpha$ -manosidasa comercial. El trisacárido obtenido de incubaciones con el dador o el aceptor marcado, fueron tratados con  $\alpha$ -manosidasa de haba (EC 3.2.1.24). Esta enzima reconoce residuos de Man terminales y cliva específicamente enlaces  $\alpha$ . La Fig. 37 muestra que el producto Glc<sub>2</sub>-[<sup>14</sup>C]Man, libera [<sup>14</sup>C]Man; mientras que el producto [<sup>14</sup>C]Glc<sub>2</sub>Man, libera un disacárido que migra como celobiosa. El trisacárido que produce *X. campestris* FC2, también es susceptible a la acción de la  $\alpha$ -manosidasa (86). Estos resultados prueban que el enlace formado por AceA posee la estereoquímica esperada.



**Figura 37. Tratamiento del oligosacárido producto de AceA (Man-Glc<sub>2</sub>) con α-manosidasa.** Los oligosacáridos sintetizados *in vivo* por *X. campestris*, o *in vitro* en presencia de AceA recombinante, fueron incubado con α-manosidasa como se describe en Materiales y Métodos.

Los resultados mostrados en 6.4.1 y 6.4.2 confirman que AceA es una α-ManT.

#### 7.4.3. Utilización de iones divalentes.

Como se mencionó en la introducción, las dos superfamilias de GTs, GT-A y GT-B, se diferencian en la utilización de iones metálicos. Las GTs con plegamiento GT-A presentan un requerimiento absoluto de cationes metálicos para su actividad. Con el fin de determinar si la presencia del ión metálico es esencial para la actividad enzimática, se ensayó la actividad de Stag-AceA en ausencia de Mg<sup>2+</sup>, y se observó que la enzima es activa. El agregado de Mg<sup>2+</sup> 6 mM a la mezcla de reacción, incrementa la actividad basal un 24 % (Tabla 6).

Debido a la probable presencia de trazas de iones metálicos en la preparación enzimática y/o en el extracto que contiene al aceptor, se realizó una preincubación con EDTA 10 mM, y luego se inició la reacción con el agregado del sustrato dador. La adición del agente quelante resultó en una inactivación parcial de la enzima que fue revertida por la adición de Mg<sup>2+</sup> (Tabla 6).

**Tabla 6. Efecto de Mg<sup>2+</sup> y EDTA sobre la actividad enzimática de AceA.**

Aditivo	Actividad enzimática (%) <sup>a</sup>
Ninguno	100
Mg <sup>2+</sup>	124
EDTA	64
EDTA/Mg <sup>2+</sup>	148

<sup>a</sup>Los valores de actividad fueron expresados como porcentaje respecto al control sin aditivos (Ae= 8.7 pmol de producto/min x µg de proteína). Cada valor es la media de dos mediciones independientes.

Estos resultados indican que la presencia de iones metálicos no es esencial para la actividad de AceA, contrario a lo que ocurre con miembros del clan GT-A. Sin embargo, la presencia de Mg<sup>2+</sup> tiene un efecto de aceleración sobre la tasa de reacción. Esto ha sido anteriormente observado en algunos miembros de GT-B, aunque se desconocen las razones.

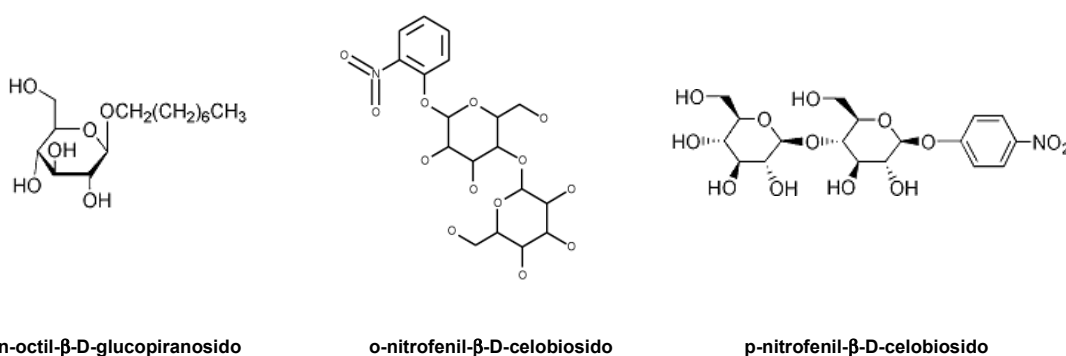
#### 7.4.4. Especificidad por el sustrato aceptor.

El estudio de AceA se vería facilitado si contaríamos con un sustrato aceptor soluble. En busca de un análogo del aceptor natural, se estudiaron los requerimientos de la enzima para su reconocimiento.

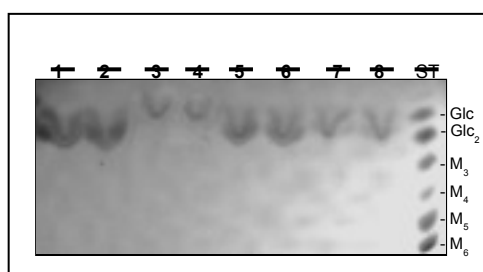
##### *Aceptores comerciales.*

En el estudio de GHs, es frecuente el uso de aceptores sintéticos disponibles en forma comercial, que están constituidos por un mono o di-sacárido unido a grupos aromáticos. Una ventaja adicional que presentan, es que la medición del producto se hace de manera simple y directa, por determinación de los azúcares liberados a través de métodos colorimétricos. Aunque esta forma de medición no es aplicable a GTs, el análisis de estos compuestos por TLC es más sencillo y por lo tanto sería de utilidad en el análisis de los productos de reacción de AceA.

Aunque el sustrato natural de AceA difiere de estos compuestos en estructura, decidimos probar la actividad de AceA en presencia de los mismos, suponiendo que quizás la unión del azúcar a algún otro grupo podría contribuir al reconocimiento por la enzima. La estructura química de los compuestos mencionados y del detergente no iónico N-octil-β-D-glucopiranosido (OG), que también probamos como aceptor de AceA, se muestran en el siguiente esquema:



El procesamiento de las muestras luego de la incubación se realizó como se detalla en Materiales y Métodos. En la Fig. 38 puede verse el resultado de la TLC. No se observa la presencia de trisacárido; en todas las muestras se detecta celobiosa intacta (o glucosa, en el caso de la incubación con OG), lo que indica claramente que la sustitución del poliprenol-PP<sub>i</sub> por grupos inespecíficos impide el reconocimiento. Por lo tanto estos compuestos no son útiles como sustitutos del aceptor natural de AceA.

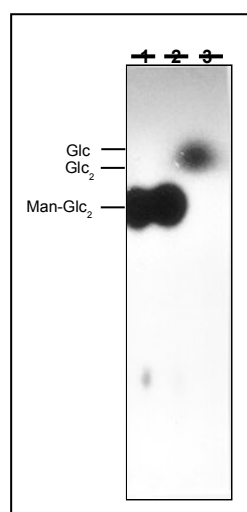


**Figura 38. Compuestos comerciales como sustrato aceptor de AceA.** N-octil-β-D-glucopiranosido (3 y 4), o-nitrofenil-β-D-celobiosido (5 y 6) o p-nitrofenil-β-D-celobiosido (7 y 8) fueron incubados en presencia de GDP-Man 5 mM. Como control de la reacción se realizó la incubación de AceA en presencia del aceptor obtenido de *X. campestris* (no mostrado). En el control negativo se incubó con celobiosa como aceptor (1 y 2). Luego de la incubación las muestras fueron sometidas a hidrólisis ácida fuerte y los productos separados en TLC. ST, estándares. M<sub>3</sub>-M<sub>6</sub>, maltooligosacáridos

##### *Celobiosa como aceptor.*

Examinamos la capacidad de AceA para transferir el residuo de Man a celobiosa libre (sin el ancla lipídica). La incubación de la fracción soluble de *E. coli* conteniendo Stag-AceA en presencia de GDP-[<sup>14</sup>C]Man y celobiosa y el análisis de los productos por TLC, mostró que no hay formación de trisacárido (Fig. 39).





**Figura 39. Celobiosa ( $\text{Glc}_2$ ) como aceptor en la reacción catalizada por AceA.** Se incubaron extractos de *E. coli* conteniendo Stag-AceA en presencia de  $\text{Glc}_2$ -PP-Lip frío y  $\text{GDP-}^{[14}\text{C}]\text{Man}$  (1); de  $\text{Glc}_2$ -PP-Lip frío,  $\text{GDP-}^{[14}\text{C}]\text{Man}$  y celobiosa 1 mM (2); o  $\text{GDP-}^{[14}\text{C}]\text{Man}$  y celobiosa 1 mM (3).

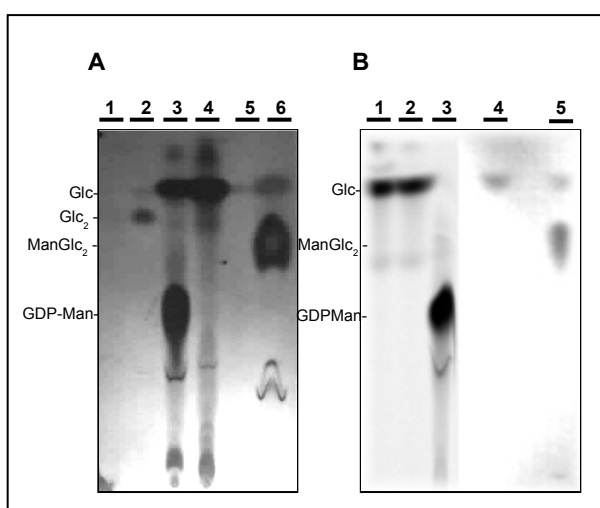
También se determinó la capacidad de celobiosa de bloquear la formación de  $\text{Man-Glc}_2$ -PP-Lip, incubando AceA en presencia de  $\text{GDP-}^{[14}\text{C}]\text{Man}$ , el glicolípido aceptor ( $\text{Glc}_2$ -PP-Lip) y celobiosa. Como se observa en la calle 2 de la Fig. 39, la celobiosa libre no inhibe la formación del producto trisacárido ( $\text{Man-Glc}_2$ -PP-Lip). Sin embargo se observó una disminución del 21 % en la actividad enzimática respecto a la incubación sin la adición de celobiosa.

Estos resultados indican que la porción lipídica y/o el grupo pirofosfato que hace de puente, son necesarios para el reconocimiento del aceptor.

#### *Celobiosa- $P_i$ y celobiosa- $PP_i$ como aceptores.*

Celobiosa- $P_i$  es un intermediario en la síntesis química de un análogo del aceptor, que se describe más adelante (sección 7.4.5). Como queríamos disectar el sustrato aceptor en sus componentes (azúcar, pirofosfato y lípido) para determinar su importancia en el reconocimiento por la enzima y contábamos con el intermediario celobiosa- $P_i$ , decidimos probar si AceA es capaz de transferir Man a celobiosa fosforilada. Por otro lado, la obtención de celobiosa- $PP_i$  a partir de una fracción enriquecida en poliprenol-PP-celobiosa de *X. campestris*, había sido reportado anteriormente.

Ambas formas de celobiosa fosforilada fueron incubadas en presencia de Stag-AceA soluble y  $\text{GDP-}^{[14}\text{C}]\text{Man}$  o  $\text{GDP-Man}$ . Al ser los aceptores solubles, las mezclas de incubación y el procesamiento posterior fueron modificados (ver Materiales y Métodos). Luego de la incubación las muestras fueron defosforiladas y analizadas por TLC. La Fig. 40 muestra que en ninguno de los dos casos hubo formación de trisacáridos.



**Figura 40. Celobiosa fosforilada como aceptor en la reacción catalizada por AceA.** **A)**  $^{[14}\text{C}]\text{celobiosa-PP}_i$  (2) o celobiosa- $PP_i$  (3) fueron incubadas en presencia de AceA y de  $\text{GDP-Man}$  o  $\text{GDP-}^{[14}\text{C}]\text{Man}$ , respectivamente. Las calles 1 y 3 representan controles negativos en los que se omitió la presencia del aceptor. Como control se incubó AceA y  $\text{GDP-}^{[14}\text{C}]\text{Man}$  en presencia (6) o ausencia (5) del aceptor endógeno extraído de *X. campestris*. **B)** Se realizaron incubaciones con AceA, en presencia de  $\text{GDP-}^{[14}\text{C}]\text{Man}$  y celobiosa-P 1 mM (1) u 8  $\mu\text{M}$  (2). En (3) se omitió la presencia de celobiosa-P de la mezcla de incubación. Calles 4 y 5, incubaciones control con AceA y  $\text{GDP-}^{[14}\text{C}]\text{Man}$ , en presencia (5) o ausencia (4) del aceptor endógeno (obtenido de *X. campestris*).

Es interesante notar la presencia de GDP-[<sup>14</sup>C]Man y [<sup>14</sup>C]Man en las incubaciones que no contienen AceA, mientras que en las incubaciones completas sólo se observa [<sup>14</sup>C]Man; las posibles implicancias de esta observación, se tratarán en la discusión.

De estos resultados se desprende que la presencia de la porción lipídica parece ser esencial para la formación del trisacárido en la reacción catalizada por AceA.

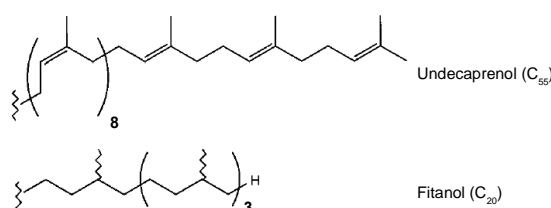
#### 7.4.5. Síntesis química de un aceptor para AceA.

##### *Fitanil-PP-celobiosa*

Durante el desarrollo de esta tesis, el grupo del Dr. R. A. Geremía (CERMAV-CNRS, Grenoble, Francia) inició la síntesis química de sustratos para varias GTs (entre ellas, AceA) en colaboración con un grupo escocés dirigido por S. L. Flitsch (Edinburgh Centre for Protein Technology, University of Edinburgh), que cuenta con vasta experiencia en el tema.

En vista de los resultados obtenidos, la necesidad de un sustrato aceptor para poder caracterizar a AceA se hacía imperiosa. La utilización de fitanil-pirofosfato había resultado exitosa en el reemplazo de dolicol-pirofosfato en la preparación de aceptores sintéticos para la β-1,4-ManT, ALG1 de levaduras (41). Como el fitanil-P puede prepararse en la escala de gramos a partir de un precursor de bajo costo (fitol), la síntesis de un aceptor para AceA se hacía factible. La síntesis de fitanil-PP-celobiosa fue descrita por Lellouch *y col.* (110). Posteriormente el aceptor sintético fue sintetizado por el grupo de la Dra. R. Lederkremer (Dto. de Qca. Orgánica, FCEyN, Buenos Aires) con algunas modificaciones al protocolo original.

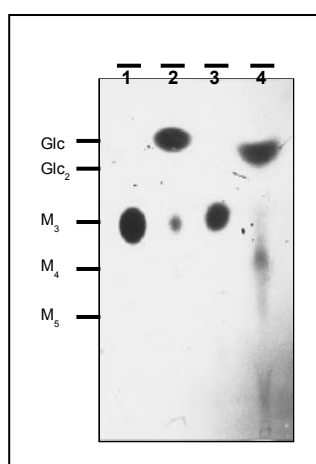
La porción fitanilo del aceptor sintético se asemeja al poliprenol por presentar una cadena carbonada ramificada, pero se diferencia de éste en que la cadena carbonada es más corta (C<sub>20</sub>) y completamente saturada:



El fitanol se asemeja más al dolicol por el hecho de que la primer unidad isoprenoide del dolicol es saturada; mientras que, en el undecaprenol, es insaturada.

La incubación de Stag-AceA soluble en presencia de fitanil-PP-celobiosa y GDP-[<sup>14</sup>C]Man, resultó en la formación de trisacárido (Fig. 41). Paralelamente, se realizó una incubación con el aceptor obtenido de *X. campestris*. Los extractos orgánicos fueron analizados en la forma usual.

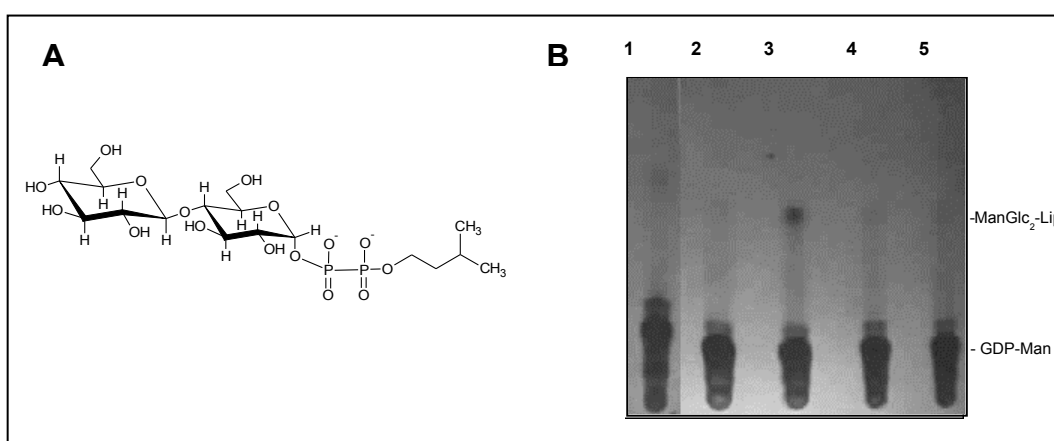
El tratamiento del producto de la reacción con α-manosidasa, provocó la liberación de [<sup>14</sup>C]Man (Fig. 41, calle 4) indicando la formación de un enlace alfa con el residuo Man.



**Figura 41.** TLC de los oligosacáridos liberados de la porción lipídica luego de la reacción con AceA y GDP-[<sup>14</sup>C]Man. Calles 1 y 2, utilizando Glc<sub>2</sub>-PP-poliprenol extraído de *X. campestris*; calles 3 y 4, utilizando Glc<sub>2</sub>-PP-fitanol como aceptor. En las calles 2 y 4 se sembraron los oligosacáridos liberados luego del tratamiento con α-manosidasa. M<sub>3</sub>-M<sub>5</sub>, maltooligosacáridos usados como estándares.

*Isopentanol-PP-celobiosa.*

La síntesis de sustratos aceptores conteniendo distintas porciones lipídicas, sería de gran utilidad para determinar los requerimientos de AceA. Un tiempo antes de la culminación del trabajo experimental, el grupo de la Dra. Lederkremer sintetizó un aceptor de cadena más corta que el fitanol. El compuesto soluble, isopentanol-PP-celobiosa (Fig. 42A) fue ensayado con la forma purificada a homogeneidad de AceA (AceA-Histag). En la incubación con la enzima pura y GDP-[<sup>14</sup>C]Man, no observamos formación de Lip-PP-trisacárido.



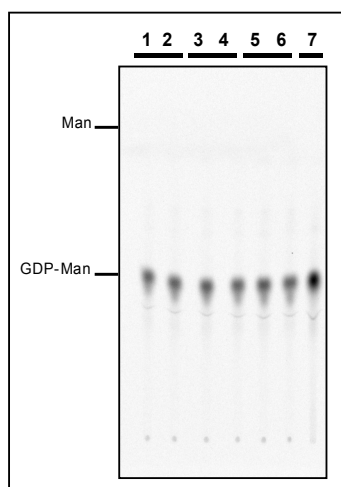
**Figura 42. Isopentanol-PP-celobiosa como aceptor en la reacción catalizada por AceA.** A) Estructura del compuesto obtenido por síntesis química. B) Autoradiografía del análisis por TLC de los productos de reacción. Calle1, GDP-[<sup>14</sup>C]Man. Calles 2 y 3, productos de la incubación con fitanyl-PP-celobiosa. Calles 4 y 5, productos de la incubación con isopentanol-PP-celobiosa. Las calles 2 y 4 son controles negativos de la incubación en ausencia de enzima.

El isopentanol-PP-celobiosa no funciona como aceptor para AceA, lo que sugiere que la porción lipídica debe tener, aparentemente, un largo de cadena mínimo. Es necesario contar con otros sustratos para hacer un análisis más detallado, para poder determinar que otras características del ancla lipídica son esenciales para que ocurra la reacción de transferencia.

**7.4.6. Actividad hidrolítica sobre GDP-Man.**

Varias GTs, muestran actividad hidrolítica sobre sus sustratos dadores. En algunas de éstas se ha dilucidado el mecanismo de reacción y se ha observado que la unión de los sustratos ocurre en forma ordenada. Este conocimiento es de importancia ya que permite entender los eventos que se suceden en la catálisis y además permite hacer aproximaciones certeras en la búsqueda de condiciones para la cristalización de complejos proteína-sustrato.

Con el fin de determinar si AceA es capaz de unir e hidrolizar GDP-Man en ausencia del aceptor, realizamos incubaciones de la enzima con GDP-[<sup>14</sup>C]Man y examinamos los productos por TLC y autoradiografía. Como se ha informado, la tasa de hidrólisis del nt-azúcar suele ser baja, por lo que se realizaron incubaciones a distintos tiempos. En la Fig. 43 se observa el nt-azúcar intacto, indicando que AceA no es capaz de hidrolizar GDP-Man en ausencia del sustrato aceptor.



**Figura 43. Actividad hidrolítica de AceA sobre GDP-Man.** AceA-Histag purificada fue incubada con GDP- $^{14}\text{C}$ Man en ausencia del sustrato aceptor durante 30 min (1 y 2), 2 h (3 y 4) u ON (5 y 6). Calles 1, 3 y 5, incubaciones control sin enzima. Calle 7, estándar de GDP- $^{14}\text{C}$ Man sin incubación.

#### 7.4.7. Determinación preliminar de parámetros cinéticos para la reacción catalizada por AceA.

El método de determinación de actividad que desarrollamos tiene sus limitaciones. El aislamiento del producto de reacción involucra numerosos pasos, que afectan negativamente la reproducibilidad de las mediciones. Esto implica la medición simultánea de las muestras y la realización de cada muestra por triplicado. Por otra parte, la pequeña cantidad de sustrato poliprenol-PP-celobiosa obtenido (picomoles), su inestabilidad química, y la presencia de impurezas son factores que pueden distorsionar los resultados. Además, las pequeñas cantidades de producto formado están por debajo de los métodos comunes de detección, con lo cual se dificulta la realización de estudios cinéticos.

Con la idea de efectuar la caracterización cinética de AceA, se sintetizó el análogo fitanil-PP-celobiosa y la enzima fue purificada a homogeneidad. Con estas dos herramientas se buscó un método de medición directo, que permitiera el procesamiento de un gran número de muestras con alta reproducibilidad. Encontramos un ensayo de fluorescencia desarrollado en un principio para la medición de actividad GTPasa (57) y que ha sido adaptado y utilizado para la caracterización de varias GTs. El método presenta alta sensibilidad y especificidad mediante un sistema de enzimas acopladas, que vinculan el aumento en la concentración de GDP con la disminución en la concentración de NADH. Se observa una disminución de la señal de fluorescencia a la longitud de onda de emisión del NADH. Los espectros de absorción y emisión de NADH fueron analizados en la mezcla de incubación para la medición de actividad de AceA y comprobamos que ninguno de los componentes afecta los espectros característicos de NADH. El sistema fue calibrado con distintas concentraciones de GDP y se detectaron cantidades de GDP en el orden de los nmoles. También se verificó que AceA es capaz de transferir manosa en las condiciones del sistema enzimático acoplado utilizando GDP- $^{14}\text{C}$ Manosa en lugar del dador frío y se analizó el producto de la reacción Lip-PP-trisacárido por TLC. Se probaron múltiples condiciones de incubación, concentraciones de sustrato y tiempos de incubación. Sin embargo, no fue posible utilizar este método para la medición de actividad de AceA, ya que no se observó una disminución significativa en la señal de fluorescencia.

Por lo tanto, se decidió utilizar el método radiactivo para la medición de actividad de AceA y la determinación de parámetros cinéticos. La solución stock de fitanol-PP-celobiosa pudo ser solubilizada hasta una concentración de 5 mM en metanol. La solución del aceptor fue mantenida a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  y su estabilidad constatada por TLC. La adición de metanol o concentraciones crecientes de detergente a la mezcla de incubación para favorecer la solubilización del aceptor, tuvieron un efecto negativo sobre la actividad enzimática. La velocidad de reacción y las  $K_m$  para GDP-Man y fitanil-PP-celobiosa se muestran en la Tabla 7.

Es importante señalar que la  $K_m$  determinada para GDP-Man es una constante aparente, ya que fue determinada a una concentración no saturante de fitanil-PP-celobiosa debido a la insolubilidad del aceptor a concentraciones mayores.

**Tabla 7. Parámetros cinéticos de la reacción catalizada por AceA<sup>a</sup> en presencia de fitanil-PP-celobiosa y GDP-Man.**

Fitanil-PP-celobiosa	GDP-Man	
$K_m$ (mM)	$K_m$ ( $\mu$ M)	$V_{max}$ (pmol de producto $\times$ min <sup>-1</sup> $\times$ $\mu$ g <sup>-1</sup> de proteína) <sup>b</sup>
3.2	35	38

<sup>a</sup>Las mediciones fueron realizadas con AceA-Histag purificada.

<sup>b</sup>Determinada del gráfico obtenido para fitanil-PP-celobiosa.

### 7.5. Predicción de estructura secundaria y localización de residuos conservados en AceA.

#### *Identificación de residuos conservados.*

En un trabajo anterior de nuestro laboratorio (48), se había informado de la existencia de un motivo consenso con la secuencia SXXEGFGLPXXE en  $\alpha$ -ManTs bacterianas, en GTs putativas y en proteínas eucariotas que transfieren residuos distintos de Man. Los alineamientos múltiples de las secuencias que contienen el motivo consenso, no mostraban similitud global entre estas proteínas, por lo que se utilizó un método sensible para la comparación de secuencias proteicas divergentes. Este método, llamado HCA (Hydrophobic cluster análisis) permite detectar elementos de estructura secundaria y había sido utilizado anteriormente con éxito para el agrupamiento de  $\beta$ -GTs en una familia. El método consiste en la representación de la secuencia proteica como una  $\alpha$ -hélice abierta longitudinalmente y duplicada, de manera que cada residuo siga ubicado en su entorno. En los gráficos de HCA, los grupos de forma alargada son indicativos de hebras- $\beta$ ; mientras que los globulares, de hélices- $\alpha$ . La inspección visual de los gráficos permite luego alinear las secuencias según la disposición y la forma de los grupos. La Fig. 44, muestra el alineamiento de AceA y otras  $\alpha$ -ManTs bacterianas por HCA (Tomado de Geremía y col. (48)).

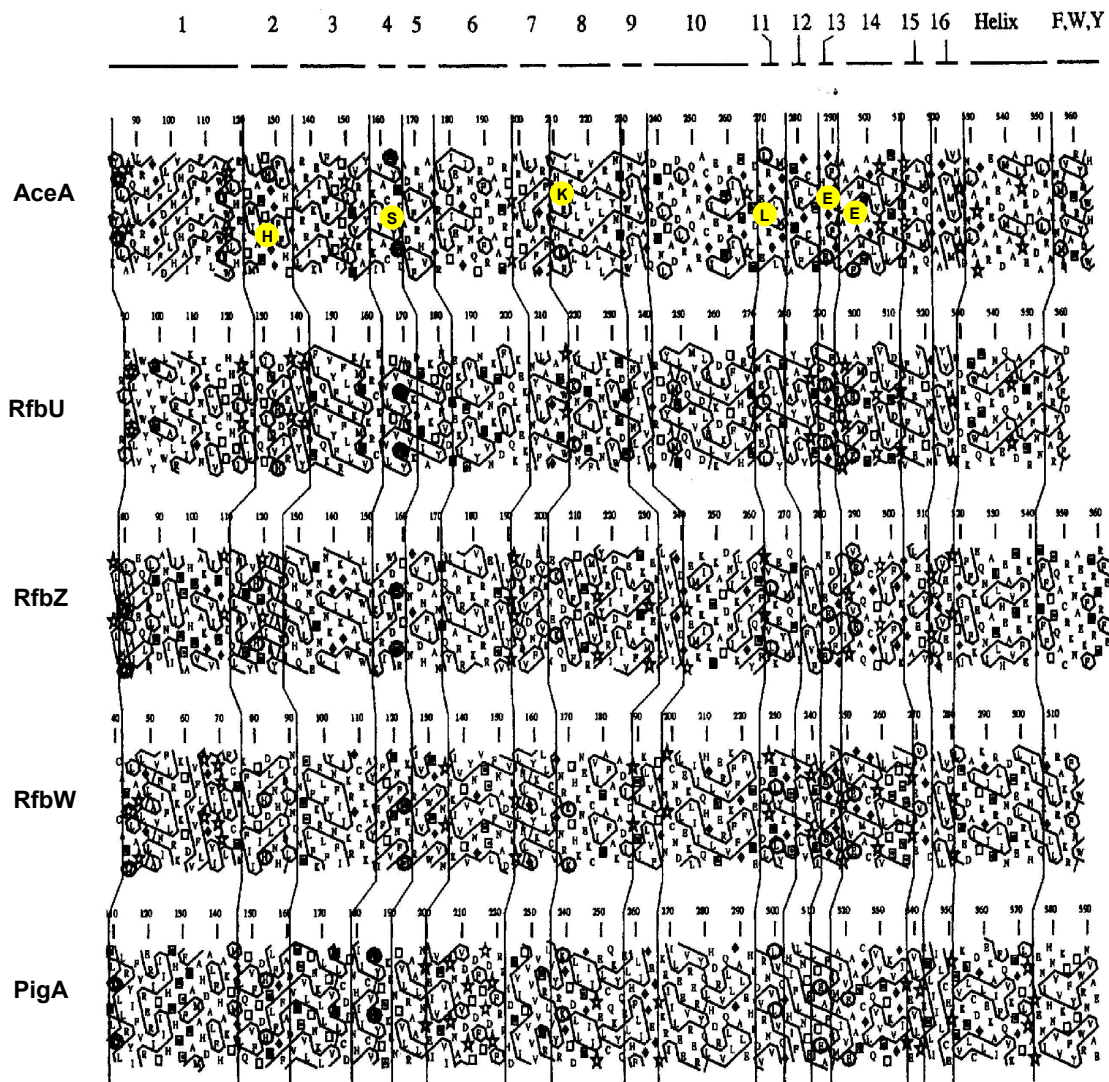


Figura 44. Gráficos de HCA mostrando las regiones conservadas en  $\alpha$ -manosiltransferasas bacterianas y la NAcGlcT PigA eucariota. RfbU, RfbW y RfbZ son  $\alpha$ -ManT involucradas en la biosíntesis del antígeno-O de *S. enterica*. PigA es una N-acetilglucosamiltransferasa que participa en el ensamblado de glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) en eucariotas. Las líneas verticales indican zonas de correspondencia entre las proteínas. Los 16 segmentos conservados están indicados. La región contigua a los segmentos (“Helix”) presenta un patrón HCA indicativo de hélice- $\alpha$ , seguido por un mosaico de residuos aromáticos (FWY). En amarillo se muestran los residuos conservados que se describen en el texto. En los gráficos de HCA se utiliza el código de letras para representar a los aminoácidos, excepto Gly, Pro, Ser y Thr, que son representados por  $\blacklozenge$ ,  $\star$ ,  $\square$ ,  $\square$ , respectivamente.

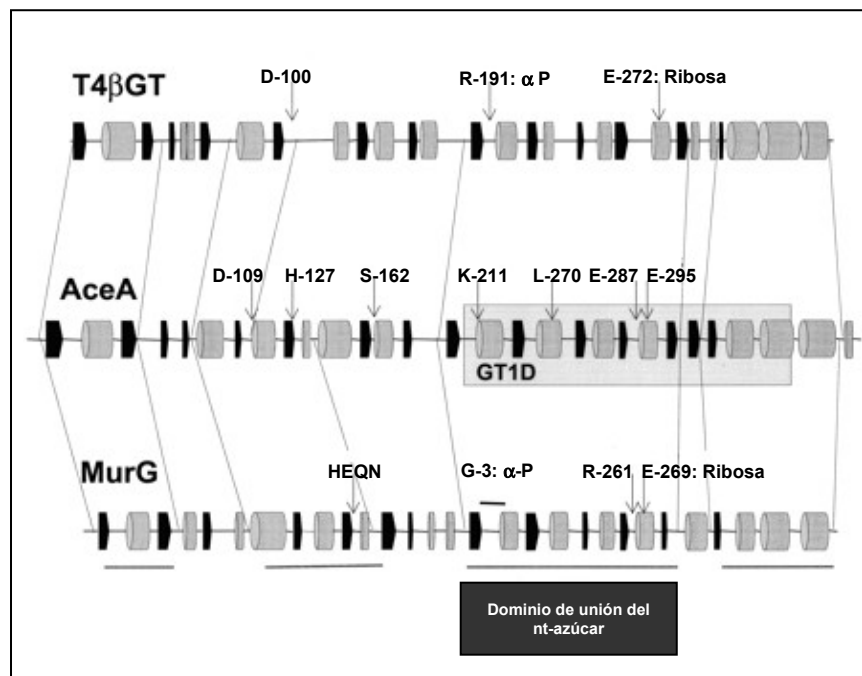
De esta manera se identificaron una serie de residuos conservados en AceA. Los residuos Glu del motivo consenso EX<sub>7</sub>E, en los segmentos 13 y 14; His y Ser en los segmentos 2 y 3, respectivamente. También se observó la presencia de un residuo de Lys conservado en el comienzo del segmento 9 y Leu en el segmento 11. Cabe señalar que el motivo EX<sub>7</sub>E también fue identificado en proteínas eucariotas (PigA, sp37287) que transfieren azúcares distintos a Man.

En base a esta primera identificación de residuos conservados en AceA, se examinaron distintas clasificaciones de GTs que incluyen a AceA y se analizó la presencia de estos residuos en otras GTs. En la familia GT1F de Pfam, se encontró el dominio GT1, que se extiende en una secuencia de 150 aminoácidos (en el C-terminal de AceA) y comprende los residuos conservados K211, L270, E287 y E295, identificados anteriormente. Tres de estos residuos

(excepto L270) están estrictamente conservados en todos los miembros de la familia GT-4 de la clasificación CAZY. En la familia NRD1 definida por Kapitonov y Yu (94) los residuos Glu del motivo EX<sub>7</sub>E están estrictamente conservados. Estos también están conservados en otras GTs importantes que actúan con retención, como la glucógeno sintasa de levaduras y mamíferos, que pertenecen a la familia CAZY GT-3.

#### *Predicción de estructura secundaria.*

Con el fin de examinar la ubicación que podrían tener los residuos conservados en la estructura de AceA, se realizó la predicción de estructura secundaria utilizando el servidor Jpred<sup>2</sup> y AceA como “semilla”. Los resultados más significativos fueron obtenidos con las estructuras de la N-acetil-glucosaminiltransferasa MurG de *E. coli* y con la  $\beta$ -glucosiltransferasa del fago T4. Ambas GTs actúan con inversión de la configuración. La predicción de estructura secundaria de AceA, las estructuras 3D de MurG y BGT y la comparación de sus gráficos de HCA, nos permitieron realizar un alineamiento en base a las estructuras secundarias de estas tres GTs. Como muestra la Fig. 45, AceA también presenta alternancia de hélices- $\alpha$  y hebras- $\beta$ , lo que se conoce como “Rossman fold”.



**Figura 45. Alineamiento estructural de AceA, T4 BGT y MurG.** La predicción de estructura secundaria de AceA y el alineamiento se realizaron como se describe en Materiales y Métodos. Los cilindros representan hélices- $\alpha$  y las flechas hebras- $\beta$ . Las líneas horizontales indican las regiones de estructura secundaria similar (también unidas por líneas verticales). El dominio GT1D (ver texto) se muestra en un cuadro. Las flechas indican la localización de los aminoácidos conservados en AceA y los residuos o zonas equivalentes en T4 BGT y MurG. El cuadro oscuro indica el dominio involucrado en la unión del nt-azúcar dador en T4BGT y MurG.

Los residuos conservados (con excepción de E295) se encuentran cercanos al comienzo de hélices- $\alpha$  o al final de hebras- $\beta$ ; lo que sugiere que estos residuos podrían cumplir un rol funcional. A pesar de que ni MurG, ni BGT poseen un dominio EX<sub>7</sub>E, ambas enzimas poseen un residuo Glu en medio de una hélices- $\alpha$ , en posición equivalente a E295 en AceA. La función de este residuo en MurG y BGT es unir un OH-del anillo de ribosa del nt-azúcar mediante un puente hidrógeno. En la estructura de BGT con UDP, R191 interactúa con el fosfato- $\alpha$  del UDP (131). El alineamiento de estructura secundaria basado en los estudios de threading, mostró que K211 de AceA ocuparía la misma posición que R191. De manera similar, la estructura de MurG con el nt-azúcar (82) muestra contactos entre el fosfato- $\alpha$  del dador y el “loop G3”, que se encuentra en la misma posición que el loop de AceA que contiene a K211.

En BGT, se ha demostrado que D100 actúa como base catalítica (106). El alineamiento muestra que D109 en AceA se encuentra en posición equivalente, aunque éste no es un residuo conservado entre las GTs agrupadas con AceA.

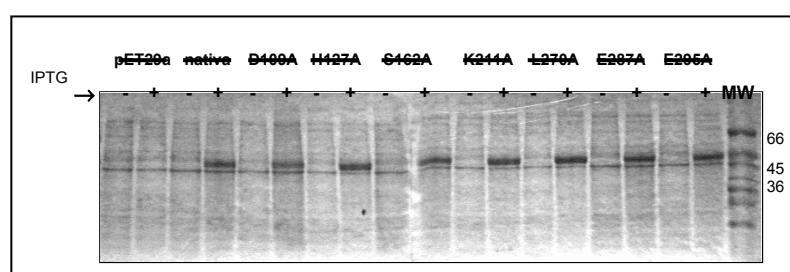
En base a todas estas observaciones, decidimos realizar mutagénesis sitio-dirigida sobre el gen *aceA*, cambiando los residuos D109, H127, S162, K211, L270, E287 y E295; por Ala.

## 7.6. Análisis funcional de las mutantes a alanina de AceA.

### 7.6.1. Caracterización de las mutantes expresadas en *E. coli*.

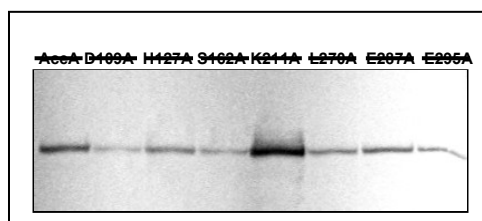
Para realizar estudios bioquímicos y dilucidar la función de los residuos conservados, era necesario sobreexpresar las formas nativa y mutantes de AceA en *E. coli*. Las formas mutadas de AceA fueron expresadas como proteínas de fusión con el péptido Stag en el N-terminal. Las condiciones de expresión de estas proteínas son idénticas a las descritas para la forma nativa (ver sección 6.1.1 y Materiales y Métodos).

Extractos totales de *E. coli* conteniendo las distintas formas de AceA, fueron analizados por SDS-PAGE antes y después de la adición de IPTG (Fig. 46), observándose la aparición de una banda mayoritaria de ~ 46 kDa luego de la inducción.



**Figura 46.** Sobreexpresión de la forma nativa y mutantes a Ala de Stag-AceA en *E. coli* BL21(DE3)/pLysS. Luego de la inducción se prepararon extractos celulares como se describe en Materiales y Métodos. Las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE y visualizadas por tinción con Coomassie blue. MW por marcadores de PM.

Ya habíamos observado que Stag-AceA se comporta como una proteína soluble en *E. coli*. Los cambios a Ala parecen no afectar la localización subcelular de AceA, ya que las formas mutadas también se encuentran en el citosol. Sin embargo, observamos diferentes niveles de proteína en los sobrenadantes de 100000 x g, probablemente debido a diferencias en la estabilidad de las mismas (Fig. 47).



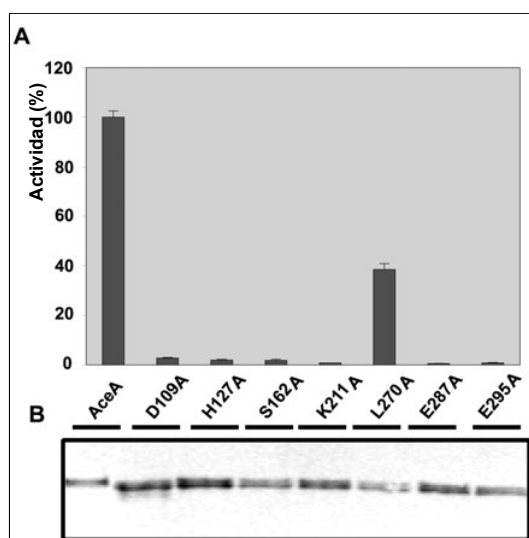
**Figura 47.** Localización subcelular de las mutantes de Stag-AceA en *E. coli*. Los sobrenadantes de 100000 x g (15 µg de proteína) fueron sometidos a SDS-PAGE y luego electrotransferidos a membrana de PVDF. Las distintas formas de AceA fueron detectadas utilizando el conjugado proteínaS-fosfatasa alcalina (Novagen).

Las formas nativa y mutadas de AceA fueron purificadas a partir de los sobrenadantes de 100000 x g. Se realizó cromatografía de afinidad en agarosa-proteínaS (Novagen), que une específicamente el epítopo Stag. Las muestras fueron parcialmente purificadas, ya que contenían AceA y una proteína de ~ 60 kDa que anteriormente habíamos identificado como la chaperona GroEL de *E. coli* (ver sección 7.3). AceA fue cuantificada por densitometría de geles teñidos con Coomassie blue.

El efecto de los cambios a Ala sobre la actividad enzimática de AceA, fue evaluado determinando la capacidad de las formas mutadas de AceA de transferir [<sup>14</sup>C]Man al aceptor natural obtenido de *X. campestris*. Debido a las dificultades que presenta la utilización de este



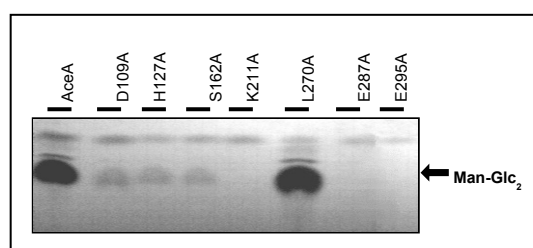
aceptor, utilizamos la misma preparación de aceptor, preparado en el momento, para cada serie de experimentos. De esta manera pudimos determinar  $V_i$  para las formas nativa y mutadas de AceA a una determinada (y desconocida) concentración de sustrato aceptor (Fig. 48).



**Figura 48. Actividad *in vitro* de Stag-AceA y de las formas mutadas a Ala.** La actividad enzimática de las proteínas de fusión, parcialmente purificadas a partir de sobrenadantes de 100000 x g, fue determinada con el método radiactivo (ver Materiales y Métodos). **A)** Actividad relativa de las mutantes respecto a AceA nativa. Los valores representan la media de dos determinaciones. **B)** Normalización de la cantidad de proteína utilizada para el ensayo de actividad *in vitro*.

El reemplazo de D109, H127 o S162 por Ala, resultó en una importante disminución en la  $V_i$  (97-98 % respecto a la forma nativa). La sustitución de los residuos estrictamente conservados del dominio GT1 (K211, E287 y E295), resultó en la pérdida total de actividad enzimática. Por el contrario, la mutante L270A conserva un 40 % de actividad residual.

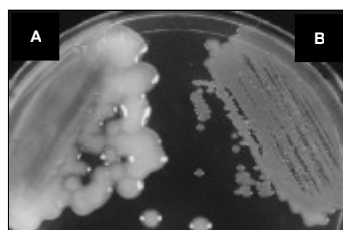
El análisis de los productos de reacción por TLC, confirma que AceA y sus variantes activas D109, H127, S162 y L270 producen el trisacárido esperado (Fig. 49).



**Figura 49. Análisis de los productos de las reacciones *in vitro*.** TLC de los oligosacáridos formados al incubar AceA o sus variantes mutadas a Ala en presencia de GDP-[ $^{14}$ C]Man. Se indica la posición del estándar de trisacárido.

### 7.6.2. Efecto de las mutaciones a Ala sobre la complementación de la cepa XcH.

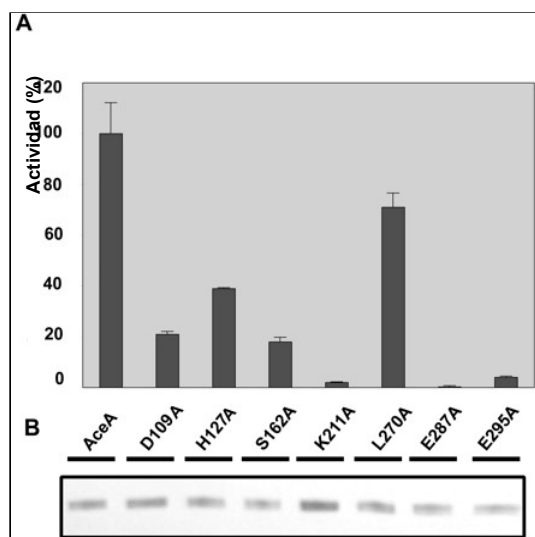
La cepa XcH de *X. campestris* no produce xantano debido a una inserción en la secuencia del gen *gumH*. La cuantificación del xantano acumulado por XcH complementada con AceA, durante un período de 48 h, constituye una herramienta poderosa para la medición de niveles muy bajos de actividad enzimática, que no son detectados con el ensayo de actividad *in vitro*. El fenotipo mucoso, característico de las cepas que producen xantano confiere morfología diferente a las colonias bacterianas en medio sólido (Fig. 50).



**Figura 50. Fenotipo característico de las cepas de *X. campestris*.** **A)** Células productoras de EPS (“mucosas”) **B)** Células no productoras de EPS (“secas”).

El fenotipo mucoso fue restaurado en las cepas XcH complementadas con D109A, H127A, S162A y L270A, mientras que, las colonias de XcH complementadas con K211A, E287A y E295A presentaban bordes rugosos y aspecto “seco”, similar al aspecto que presenta la mutante XcH no complementada.

El xantano producido por XcH complementadas con las distintas formas de AceA fue aislado del medio de cultivo y cuantificado. La cepa XcH complementada con AceA produce un 40 % menos que el xantano producido por la cepa nativa de *X. campestris* FC2 (ver Fig. 26). La cantidad de xantano producida por las formas mutadas, referida como porcentaje de la producida por XcH complementada con AceA nativa (XcH/pBBR-AceA), se muestra en la Figura 51.



La mutante XcH que contiene AceA L270A, acumula 70 % respecto a XcH AceA. Las formas mutadas casi inactivas *in vitro*, D109A, H127A y S162A, acumulan 20-40 % de xantano *in vivo*. Las mutantes XcH complementadas con K211A y E287A, no producen xantano, demostrando que estos residuos son estrictamente necesarios para la actividad enzimática de AceA. Sin embargo, la mutante XcH que expresa AceA E295A produce una cantidad pequeña, pero detectable de xantano (4 %), a pesar del resultado negativo al ensayar su actividad *in vitro*.

### 7.6.3. Análisis del xantano producido por XcH complementada con mutantes de AceA.

El polisacárido producido por la cepa XcH complementada con las formas mutadas de AceA fue sometido a análisis estructural para confirmar que se trata de xantano. El polisacárido fue obtenido del medio de cultivo y lavado exhaustivamente como se indica en Materiales y Métodos. De esta manera se obtuvo un material viscoso, indicando la presencia de un polisacárido de alto peso molecular. Los espectros  $^1\text{H}$  RMN de D109A, H127A, S162A, L270A y E295A, muestra las señales características del xantano, en particular en  $\delta$  1.3, 2.1 y 5.2, que corresponden a los grupos piruvato, acetato y  $\alpha$ -1,3-Man (Fig. 52).

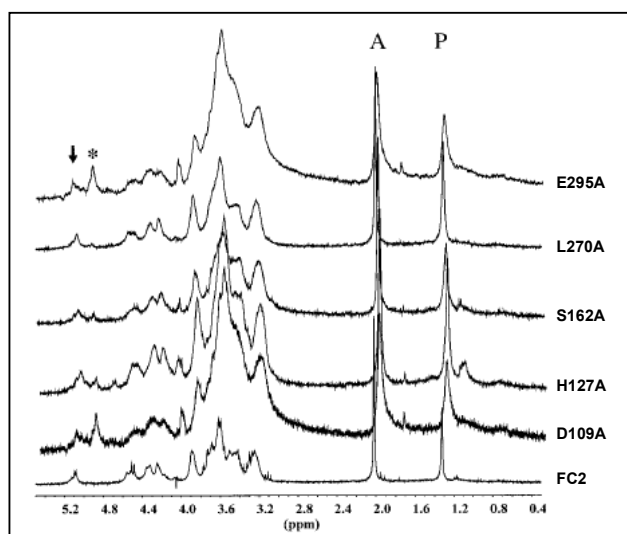


Figura 52. Espectros RMN  $^1\text{H}$  de los EPS producidos por XcH que expresan distintas formas de AceA. Los EPS fueron purificados a partir del medio de cultivo como se describe en Materiales y Métodos. La flecha indica el pico en  $\delta$  5.2, característico de  $\alpha(1-3)\text{Man}$ . P (piruvato), A (acetato).

#### 7.6.4. Incorporación de $[^{14}\text{C}]\text{Man}$ en células permeabilizadas de XcH complementadas con mutantes de AceA.

Con el fin de verificar que la falta de producción de xantano por XcH AceA K211A y E287A no se debe a la utilización de otros sustratos aceptores endógenos, se analizaron los lípido-oligosacáridos en las cepas XcH complementadas. Para esto se prepararon células permeabilizadas que fueron incubadas en presencia de UDP-Glc y GDP- $[^{14}\text{C}]\text{Man}$ . Luego se aisló la fracción de glicolípidos, se los separó de la porción lipídica y los oligosacáridos resultantes fueron analizados por TLC (Fig. 53). Encontramos que el trisacárido  $\text{Glc}_2\text{-}[^{14}\text{C}]\text{Man}$  es producido por todas las cepas, exceptuando a XcH-AceA K211A y XcH-AceA E287A. Estas dos cepas tampoco produjeron otros oligosacáridos marcados, confirmando que la incapacidad de producir xantano se debe a la inactivación de AceA.

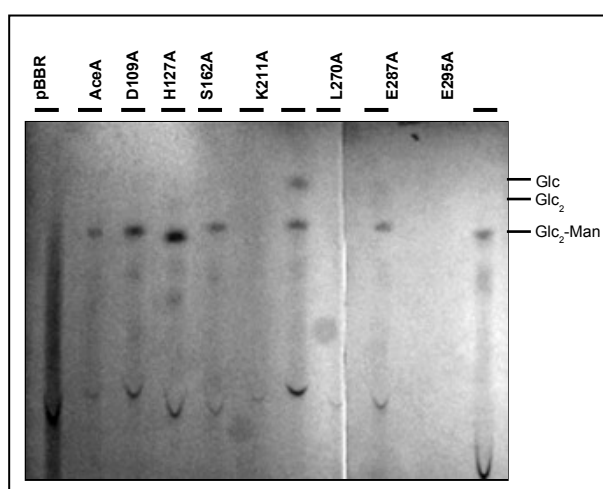
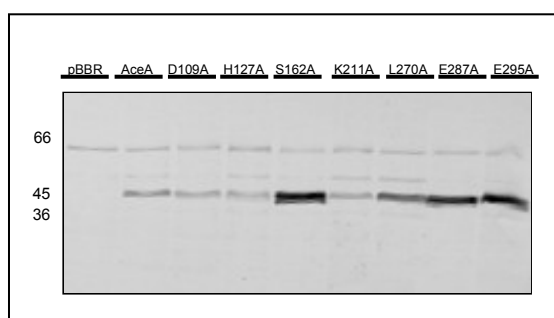


Figura 53. TLC de los productos formados *in vivo* por XcH complementadas con AceA o las formas mutadas a Ala. Células permeabilizadas de la cepa XcH complementadas con distintas formas de AceA (o pBBR, como control) fueron incubadas en presencia de GDP- $[^{14}\text{C}]\text{Man}$ . Los productos fueron liberados de la porción lipídica y los oligosacáridos resultantes se analizaron por TLC y autoradiografía.

#### 7.6.5. Localización de las mutantes de AceA en XcH.

Como las diferencias en la actividad enzimática podían ser causada por la disminución o la falta de AceA en XcH, preparamos extractos crudos de la cepa mutante complementada con las distintas formas de AceA y detectamos por inmunoblot la presencia de AceA en todos los extractos. Sin embargo, la falta de actividad también podía atribuirse a una localización diferente de las mutantes de AceA en XcH. Realizamos el fraccionamiento subcelular a partir de

extractos totales y localizamos a AceA por inmunoblot. Como se observa en la Fig. 54, todas las formas mutadas de AceA se localizan en la fracción de membranas y se encuentran a niveles iguales o mayores que la forma nativa.



**Figura 54. Localización subcelular de formas mutadas de AceA en XcH complementadas.** Extractos de XcH complementadas con AceA nativa o mutantes, fueron sometidos a centrifugación diferencial. Las muestras fueron analizadas por inmunoblot. AceA fue detectada en la fracción de membranas, utilizando un antisuero policlonal contra AceA recombinante.

### 7.7. Sustituciones conservativas de residuos importantes para la actividad enzimática de AceA.

De los resultados presentados en la sección anterior surge que, E287, el primer Glu del motivo EX<sub>7</sub>E, y K211 son aminoácidos esenciales para la actividad enzimática de AceA. Por otro lado la presencia de E295 (segundo residuo Glu del motivo) no es esencial para la actividad, pero por su ubicación (ver Fig. 45) y el grado de conservación podría tener un rol en la unión del nt-azúcar. Para analizar más a fondo la función de K211, E287 y E295 se realizaron cambios conservativos sobre estos residuos por mutagénesis sitio-dirigida. Así se alteró la carga o el tamaño en estas posiciones que parecen ser críticas para la actividad de AceA. El análisis funcional de estas mutantes (K211R, E287D, E287Q, E295D, E295Q) se realizó de manera similar al de las mutantes a Ala. Los resultados obtenidos se describen a continuación.

#### 7.7.1. Actividad *in vitro*.

Estas formas mutadas de AceA fueron expresadas en *E. coli* BL21(DE3)/pLysS como proteínas de fusión con Stag en el N-terminal. Las proteínas se expresan en forma soluble a niveles equivalentes a la forma nativa, tal como se observa en la Figura 25.

La actividad de ManT de cada mutante fue medida con el ensayo de radiactividad. Las proteínas parcialmente purificadas fueron incubadas en presencia de GDP-[<sup>14</sup>C]Man y el extracto lipídico que contiene al sustrato aceptor, obtenido de *X. campestris* FC2. La actividad enzimática de las mutantes fue comparada con la de AceA (Tabla 8).

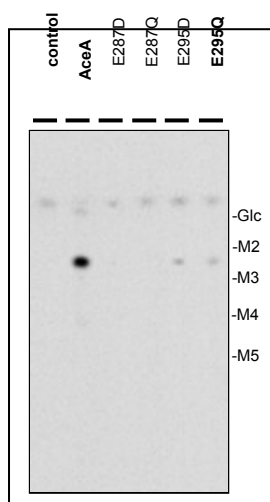
**Tabla 8. Actividad *in vitro* de mutantes de AceA**

Enzima	Actividad (%) <sup>a</sup>
AceA	100
E287D	ND <sup>b</sup>
E287Q	ND
E295D	1.7
E295Q	0.8
K211R	0.7

<sup>a</sup>Valores relativos expresados como porcentaje de la actividad de AceA nativa. Los valores son representativos de tres mediciones independientes.

<sup>b</sup>ND, no detectado.

El reemplazo en K211 y E295 resultó en una disminución importante de la actividad *in vitro* respecto a la forma nativa. Notoriamente, las mutantes E287D y E287Q son completamente inactivas. Para asegurarnos, analizamos los productos de reacción por TLC (Fig. 55). No se observó la presencia de trisacárido en las incubaciones con las formas mutadas de E287, pero sí en las incubaciones con K211R y las mutantes en E295.



**Figura 55. TLC de los oligosacáridos producidos *in vitro* por las mutantes activas de AceA.** Los productos de los ensayos de actividad *in vitro* de las formas nativa y mutantes de AceA fueron procesados como se describe en Materiales y Métodos, separados por TLC y visualizados en Phosphorimager. Como control se incubó AceA nativa en ausencia del sustrato aceptor. Estándares: Glc, glucosa; M2, maltosa; M3, maltotriosa; M4, maltotetraosa; M5, maltopentaosa.

### 7.7.2. Actividad *in vivo*.

Una vez más, utilizamos el ensayo de complementación de la cepa XcH como medio para detectar niveles muy bajos de actividad enzimática, no medibles con el ensayo de actividad *in vitro*. Se introdujeron las formas mutadas de AceA en XcH y se cuantificó el xantano (Tabla 9). Encontramos que las mutantes K211R, E295D y E295Q son capaces de restaurar la síntesis de xantano en XcH, produciendo 18 %, 32 % y 16 %, respectivamente. Muy por el contrario, E287D y E287Q son completamente incapaces de recuperar la síntesis del EPS.

**Tabla 9. Producción de xantano por XcH complementadas con mutantes de AceA.**

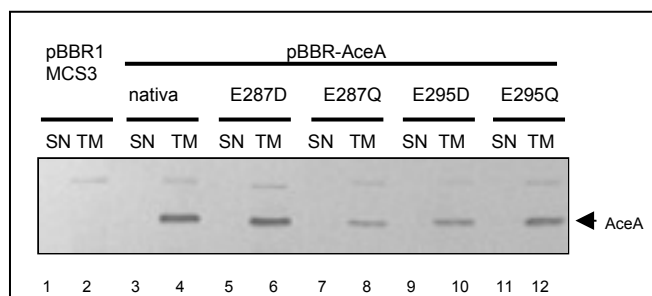
Enzima	Producción de xantano (%) <sup>a</sup>
AceA	100
E287D	ND <sup>b</sup>
E287Q	ND
E295D	32
E295Q	16
K211R	18

<sup>a</sup>Valores relativos expresados como porcentaje del EPS producido por XcH/pBBR-AceA nativa. Los valores son representativos de tres mediciones independientes.

<sup>b</sup>ND, no detectado.

Examinamos la localización de estas formas mutadas de AceA en XcH para asegurarnos que la falta de actividad no se debe a una localización alterada o a diferencias en la expresión o a la estabilidad de las proteínas. Los niveles de expresión de las formas mutadas son comparables a

los de la forma nativa de AceA y el fraccionamiento subcelular muestra que todas las proteínas se encuentran correctamente localizadas en la fracción de membranas (Fig. 56).

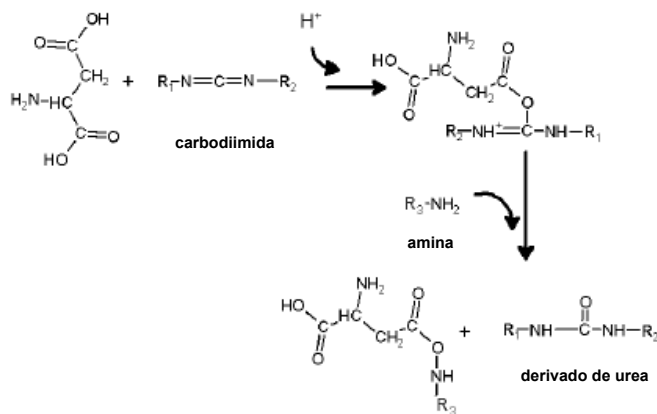


**Figura 56. Localización subcelular de AceA nativa y mutantes en XcH.** Extractos celulares de XcH complementadas con distintas formas de AceA fueron fraccionados por centrifugación. Las proteínas presentes en el sobrenadante (SN) y precipitado (MT) de 100000 x g, fueron analizadas por inmunoblot, utilizando antisuero policlonal contra AceA. Calles 1 y 2, SN y MT de XcH/pBBR1 MCS3 usado como control. Calles 3 y 4, SN y MT de XcH/pBBR-AceA. Calles 5-12, fraccionamiento de XcH que expresan formas mutadas de AceA.

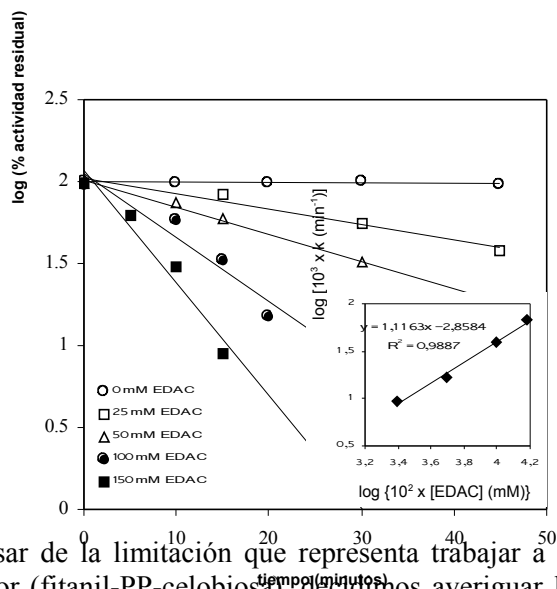
### 7.8. Modificación química de AceA.

En vista de los resultados obtenidos por mutagénesis, decidimos utilizar otra herramienta para examinar la posibilidad de que un grupo carboxilato esté involucrado en la catálisis de AceA. Para ello, utilizamos la forma pura de AceA (AceA-Histag) y EDAC, un agente que modifica específicamente grupos carboxilato de residuos Glu o Asp.

El paso inicial en la reacción entre un grupo carboxilato y una carbodiimida soluble a pH ácido, es la formación de un derivado O-acilurea del grupo carboxilo (97). El grupo carboxilo modificado, luego puede seguir distintas rutas: i) reaccionar con una molécula de agua para regenerar el ácido carboxílico, ii) rearrreglarse para dar el derivado N-acilurea, iii) reaccionar con un nucleófilo vecino o agregado en forma exógena, para formar un ácido carboxílico modificado covalentemente tal como se esquematiza a continuación:

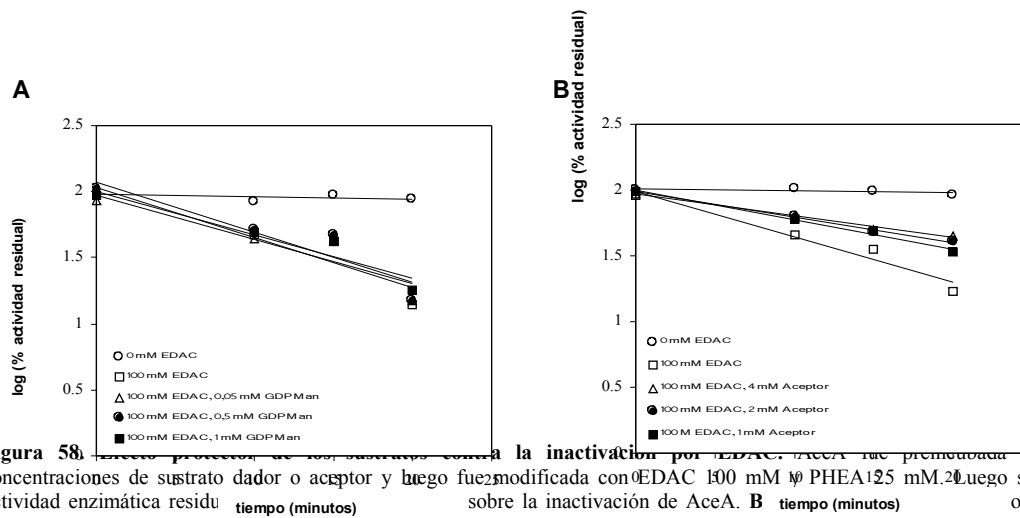


La incubación de AceA-Histag con EDAC sólo, no tuvo efecto sobre la actividad enzimática, mostrando que la inactivación no es debida al entrecruzamiento con algún grupo amino de la misma proteína. En presencia de fenetilamina, que actúa como nucleófilo, AceA fue inactivada. Los gráficos semilogarítmicos de actividad residual vs. tiempo son lineales, mostrando que la inactivación de AceA sigue una cinética de pseudo-primer orden (Fig. 57). Por otra parte la representación logarítmica de las constantes de inactivación vs. la concentración de EDAC, presenta una pendiente con un valor de 1.1 (Fig. 57, inset). El valor de la pendiente sugiere que al menos un residuo ácido ha sido modificado por mol de sitios activos.



**Figura 57. Inactivación de AceA por EDAC.** AceA fue modificada con varias concentraciones de EDAC en presencia de feniletilamina. Alícuotas de la reacción de inactivación fueron tomadas a distintos tiempos, y la actividad residual de AceA fue determinada. Las constantes de pseudo-primer orden (k) fueron obtenidas de las pendientes de las rectas. El gráfico insertado muestra el orden aparente de reacción respecto a la concentración de EDAC.

A pesar de la limitación que representa trabajar a concentraciones subsaturantes del sustrato aceptor (fitanil-PP-celobiosa), decidimos averiguar la localización del carboxilato modificado, estudiando el efecto de los sustratos en la inactivación de AceA. La preincubación de AceA con concentraciones crecientes de GDP-Man previo a la modificación con 100 mM EDAC, muestra que el sustrato dador no protege a AceA de la inactivación por EDAC (Fig. 58A). Por otro lado, el aceptor sintético fitanil-PP-celobiosa, protege parcialmente a AceA de la inactivación, pero no se observa una relación entre la concentración del sustrato y su efecto protector (Fig. 58B).



**Figura 58. Efecto protector de los sustratos contra la inactivación por EDAC.** AceA fue preincubada con varias concentraciones de sustrato dador o aceptor y luego fue modificada con 100 mM EDAC. Luego se midió la actividad enzimática residual sobre la inactivación de AceA. **A** AceA fue preincubada con varias concentraciones de sustrato dador o aceptor y luego fue modificada con 100 mM EDAC. **B** AceA fue preincubada con PHEA a 25 mM. Luego se midió la actividad enzimática residual sobre la inactivación de AceA.

### 7.9. Obtención de cristales de AceA.

Debido a la escasez de conocimiento en la relación estructura-función de GTs cuando se planteó la realización de esta tesis, uno de los objetivos fue la cristalización de AceA para la resolución de su estructura 3D. La producción de AceA recombinante fue optimizada hasta obtener un rendimiento de 25 mg/l de cultivo a partir de la fusión AceA-Histag. La proteína purificada en presencia de Tritón X-100 o Tween 20 fue sometida a un amplio screening para encontrar condiciones de cristalización. Se obtuvieron cristales bidimensionales en forma de largas agujas de AceA-Histag en presencia de Tritón X-100, pero no se logró mejorar la calidad de los

mismos, variando las condiciones en torno a las originales (0.1 M cacodilato de sodio pH6.5, MPEG 2K 26 %).

También se obtuvieron cristales de AceA-Histag purificada con Tween 20. En este caso se obtuvieron cristales con forma cúbica de dimensiones 50 x 150 x 100  $\mu\text{m}$  (Fig. 59).

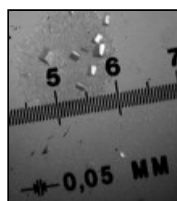


Figura 59. Cristales de AceA-Histag

Las condiciones encontradas (0.2 M imidazol-malato pH 7.0, 17 % PEG 3.35 K) mostraron ser reproducibles, por lo que se entabló una colaboración con el grupo del Dr. Otto Dideberg (Laboratorio de Cristalografía Molecular, IBS, Grenoble, Francia) para el análisis de estos cristales. Los cristales se sometieron a difracción de rayos X en el sincrotrón de Grenoble, Francia, pero sólo difractaron a 10 Å. Para mejorar la calidad de estos cristales, se probó la adición de GDP, GDP-Man y celobiosa a distintas concentraciones en las gotas, pero los cristales obtenidos nunca difractaron a resolución mayor que 10 Å.

#### 7.10. Modelado de la estructura tridimensional de AceA.

Debido a que no fue posible resolver la estructura cristalina de AceA a partir de los datos de difracción durante el curso de esta tesis, se decidió utilizar programas de modelado para predecir la estructura 3D de AceA y evaluar como encaja el modelo con los resultados obtenidos en forma experimental.

Se utilizó una serie de métodos de predicción de estructura y reconocimiento de plegamiento con el método de evaluación del 3D-Jury, para determinar la estructura probable de AceA.

Se encontró similitud significativa con las estructuras 3D de GSA (17), OtsA (53), UDP-GlcNAc-2-Epimerasa (21) y MurG (64), todas relacionadas con T4BGT (190), miembro fundador del clan GT-B. Los alineamientos de secuencia obtenidos en el MetaServer, fueron la base para el alineamiento de secuencias con el programa Swiss-PdbViewer y la construcción del modelo en SWISS-MODEL. AceA fue modelada utilizando como templados las cuatro GTs mencionadas anteriormente. En la Fig. 60 se observa el alineamiento estructural de AceA con sus templados.





Tabla 10. Predicción de plegamiento a partir de secuencia aminoacídica.

**A)** *Templados reconocidos por el 3D-Jury del MetaServer como plegamientos más probables para AceA*

Secuencia proteica	AceA
<b>Primera estructura del “ranking” (MetaServer)<sup>a</sup></b>	
PDB-ID	1rzu
3D-Jury	188.22
Identidad secuencia aác. (%)	16
<b>Segunda estructura del “ranking” (MetaServer)<sup>a</sup></b>	
PDB-ID	1uqu
3D-Jury	156.44

**B)** *Testeo de la predicción del MetaServer, con GTs de estructura conocida y comparación de sus estructuras terciarias por el método DALI*

Secuencia proteica	GSA	OtsA
<b>PDB-ID</b>	1rzu	1uqu
<b>Primera estructura del “ranking” (MetaServer)<sup>a</sup></b>		
PDB-ID	1rzu	1uqu
3D-Jury	327.33	333
<b>Homólogo estructural (DALI)<sup>b</sup></b>		
PDB-ID	1gz5	1rzu
3D-Jury	130	163
Identidad secuencia aác. (%)	14	12
rmsd (Å)	4.7	4.6

<sup>a</sup>Estructuras y puntaje asignado a las mismas según la predicción del 3D-Jury en MetaServer (<http://bioinfo.pl>) para AceA (A) o para las secuencias de las GTs usadas como templado (B). El puntaje del 3D-Jury corresponde al número de C $\alpha$  alineados que presentan un desvío menor o igual 3.5 Å respecto a la estructura del templado. Cuanto más alto el puntaje asignado al modelo, más se acerca éste a la estructura del templado. Los modelos con puntaje  $\geq 40$  son considerados correctos. El puntaje que asigna el 3D-Jury, no utiliza los puntajes adjudicados a los modelos por los servidores que participaron en la construcción de los mismos.

<sup>b</sup>Comparación entre las GTs de estructura conocida y sus homólogos estructurales más cercanos, utilizando el método DALI (78). El coeficiente de regresión lineal entre los puntajes de DALI y 3D-Jury, es 0.86.

A pesar de la baja identidad de secuencia, las estructuras son muy similares, tal como se observa de los valores de desvío medio (rmsd) en Å, obtenidos con el método DALI (Tabla 10B).

Es importante destacar la similitud existente entre los extremos C-terminales (Fig. 60). Claramente AceA pertenece a la misma superfamilia estructural (GT-B) que sus templados.

La Tabla 14 muestra algunos indicadores importantes de la calidad del modelo obtenido. El modelo de AceA presenta valores aceptables para el empaquetamiento, el gráfico de Ramachandran y para la distribución dentro/fuera de residuos hidrofóbicos. El valor de minimización de energía obtenido para AceA (-11.279 kJ/mol) es de magnitud similar a los de las estructuras conocidas de GSA, OtsA, Epimerasa y MurG (-13.887, -15.155, -13.625 y -12.981 kJ/mol, respectivamente).

**Tabla 11. Características estructurales del modelo de AceA analizado con los programas Swiss-PdbViewer y WhatCheck.**

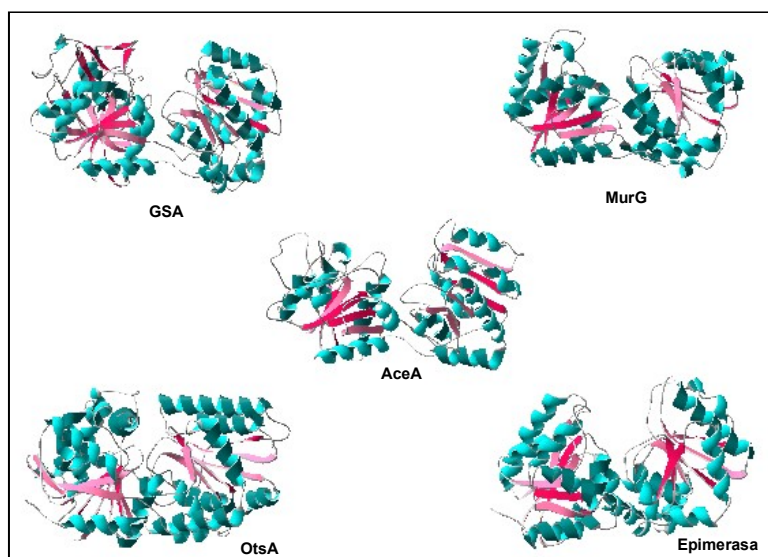
Templados (PDB-ID) <sup>a</sup>	1rzu, 1uqu, 1f6d, 1nlm
Calidad de empaquetamiento <sup>b</sup>	-1.812
Apariencia del gráfico de Ramachandran <sup>b</sup>	-2.757
Distribución dentro/fuera <sup>c</sup>	1.105
Minimización de energía	-11.279

<sup>a</sup>Templados obtenidos por predicción del MetaServer.

<sup>b</sup>valor Z ( $-4 \leq Z \leq 4$ ). Representa el número de desvíos estándar respecto a la media.

<sup>c</sup>valor RMS-Z ( $\cong 1$ ). Es la raíz cuadrada de  $\sum Z^2/n$ , siendo n el número de valores.

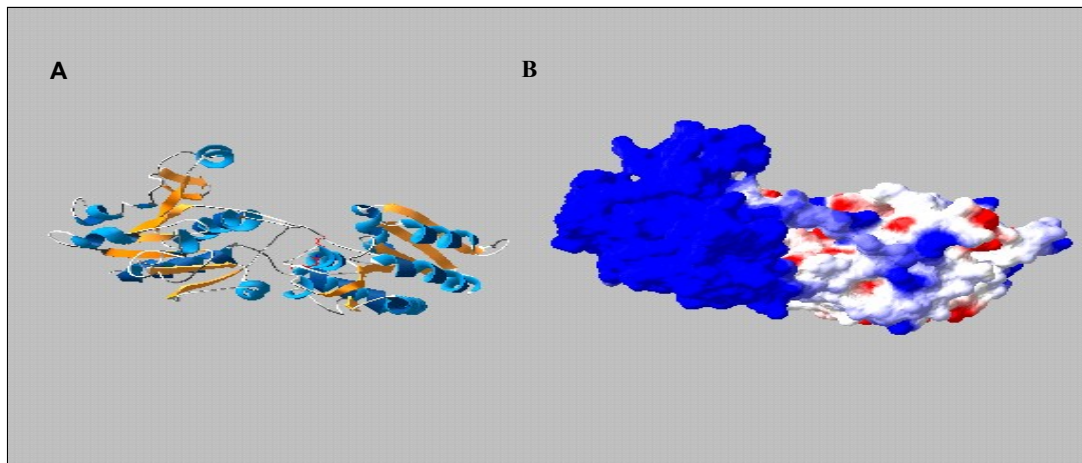
Una representación del modelo estructural de AceA junto a las GTs utilizadas como templados en la construcción del mismo (Fig. 61), muestra claramente el plegamiento típico del clan GT-B.



**Figura 61. Proteínas con plegamiento GT-B utilizadas como templado y modelo estructural de AceA.**

El modelo de AceA (aminoácido 11 al 370) presenta los dominios N- y C-terminales, similares en tamaño y topología, separados por una hendidura profunda. El dominio N-terminal consiste de 6 hebras- $\beta$  paralelas y 7 hélices- $\alpha$ ; mientras que el dominio C-terminal está constituido por 6 hebras- $\beta$  paralelas y 8 hélices- $\alpha$ . El dominio C-terminal hace un quiebre en el residuo 362, y los últimos aminoácidos cruzan hacia el dominio N-terminal en forma de hélice- $\alpha$ , una característica común a todos los miembros del clan GT-B.

La representación en “ribbon” del modelo de AceA y de su potencial electrostático de superficie, permiten ver la hendidura central que aloja al sitio activo y la ubicación de los residuos ácidos del motivo conservado EX<sub>7</sub>E (Fig. 62).

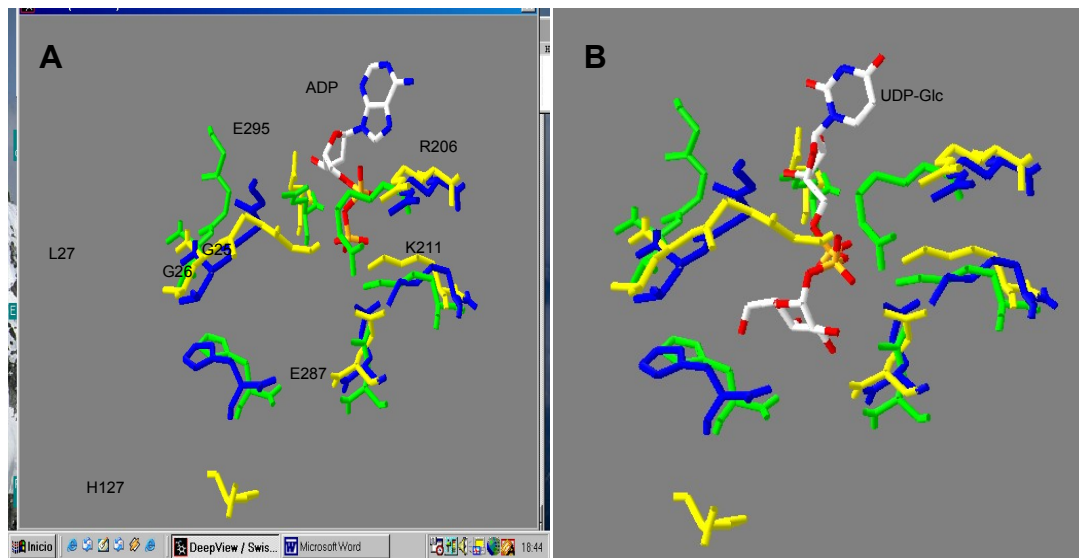


**Figura 62. Modelo de la estructura 3D de AceA.** **A)** Diagrama en “ribbon” de AceA, mostrando los dominios N- y C-terminal y la localización de los residuos Glu (en rojo) del motivo EX<sub>7</sub>E en la hendidura central. **B)** Representación del potencial electrostático de superficie (azul, positivo; rojo, negativo; blanco, hidrofóbico). El área cargada positivamente, comprende casi la totalidad del N-terminal. Nótese que la cavidad que representa la hendidura central, se observa como una cavidad abierta, en un eje perpendicular al plano. Los gráficos fueron realizados con Swiss-PdbViewer.

Resulta interesante la extensa superficie cargada positivamente que comprende a casi todo el N-terminal de la proteína. La zona superior del N-terminal ha sido propuesta en otras GTs de la familia 4 y en MurG como la posible zona de interacción con la bicapa lipídica (36, 64).

La presencia de la hendidura entre los dominios N- y C-terminal, confiere flexibilidad a la proteína. Se han observado diferencias entre las estructuras de GTs solas o en complejo con sustrato, produciéndose una transición hacia una forma más cerrada al unir el nt-azúcar. En el modelo de AceA, que fue obtenido a partir de estructuras de complejos con el sustrato dador, se observa el “cierre del sitio activo”: el loop entre N $\beta$ 1 y N $\alpha$ 1 (Fig. 64) actúa como “techo” de la hendidura que contiene al sitio activo.

La superposición de las estructuras de GSA y OtsA con el modelo de AceA pone en relieve la conservación de la arquitectura y de la función de los residuos conservados en el sitio activo (Fig. 63).



**Figura 63.** Superposición del sitio activo de GSA (azul), OtsA (verde) y el modelo de AceA (amarillo). Para mayor claridad, sólo los aminoácidos de AceA están rotulados. La posición de los aminoácidos es igual en ambas figuras. Las imágenes fueron realizadas con Swiss-PdbViewer. **A)** La estructura de GSA en complejo con ADP fue superpuesta con la estructura del complejo binario de OtsA y el modelo estructural de AceA. **B)** La estructura de OtsA en complejo con UDP-Glc fue superpuesta con la estructura del complejo binario de GSA y el modelo de AceA. PDB-ID: 1rzu (GSA); 1uqu (OtsA).

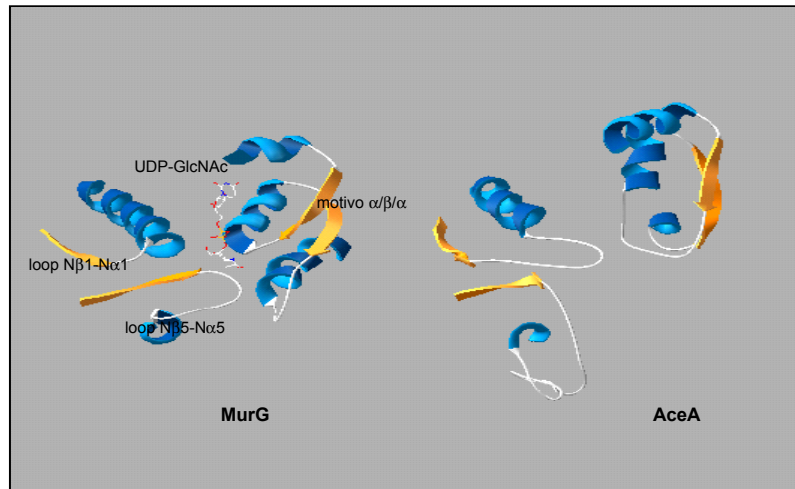
En la estructura de GSA en complejo con ADP (17) se ha observado que R299 (OtsA R262, AceA R206) y K304 (OtsA K267, AceA K211) estabilizan los grupos fosfato del nucleótido. También G18 (OtsA G22, AceA G26), segunda Gly del motivo conservado KXGGL interacciona con el fosfato distal del ADP en GSA. El subsitio de unión de la Glc del dador también está conservado. Los residuos H163 y E376 ocupan la misma posición que los residuos equivalentes en OtsA (H154/D361) y AceA (H127/E287). En OtsA estos residuos interactúan con O<sub>6</sub> y O<sub>3</sub> del residuo de Glc (52).

En OtsA, E369 (AceA E295), el segundo glutamato del motivo EX<sub>7</sub>E, hace contacto con los hidroxilos 2 y 3 de la ribosa. Este residuo es un carboxilato en varias GTs dependientes de nt-azúcares del clan GT-B (197).

El análisis de mutantes de AceA y la comparación con otras GTs por threading (ver sección 6.5) nos permitió asignar con certeza un rol a E295 y K211. Aquellos resultados concuerdan con las estructuras de los complejos binarios que surgieron posteriormente y el modelo de AceA descrito aquí. Aunque la función de los residuos equivalentes a E287, parece ser la unión de O<sub>3</sub> del residuo de Glc según las estructuras de GSA y OtsA, no descartamos su rol como residuo catalítico dado la escasez de datos experimentales en cuanto al mecanismo de reacción para GTs que actúan con retención (ver Discusión). Por otro lado la comparación del modelo de AceA con las estructuras conocidas de GSA y OtsA nos permite descartar la participación de D109, H127 y S162 en la catálisis, así como también localizar otros residuos importantes del sitio activo (G25, G26, R206) que no fueron detectados en nuestro análisis previo y que resultan firmes candidatos a futuros experimentos de mutagénesis y análisis cinético.

Debido a la similitud que presentan los sustratos aceptores de MurG y AceA (poliprenol-PP-azúcar), comparamos el sitio probable de unión (Fig. 64). En MurG, el sitio de unión del aceptor se encuentra en el N-terminal. Este dominio contiene 3 zonas conservadas, dos de las cuales son loops ricos en Gly (probablemente involucrados en la unión del difosfato del Lípido I). La tercera zona es el llamado loop HEQN (entre Nβ5 y Nα5) que se encuentra frente al sitio de unión de la hexosa y ha sido propuesto como parte importante del sitio de unión del aceptor (64). Las estructuras recientes de GtfA y GtfD (pertenecientes a la superfamilia GT-B) en presencia del aceptor, confirman esta observación (134, 136). La Figura 64 muestra dos

regiones del N-terminal de MurG y la región del C-terminal que une al nt-azúcar. Es notable la similitud estructural con las zonas correspondientes del modelo de AceA.



**Figura 64.** Comparación de la estructura de MurG unida a UDP-GlcNAc y el modelo de AceA. Se muestran zonas conservadas en MurG (Gloop 1 = loop Nβ1-Nα1, loop HEQN = Nβ5-Nα5, motivo α/β/α) y las regiones correspondientes en el modelo de AceA. La figura fue realizada con el programa Swiss-PdbViewer.

## 8. Discusión

Sobre la base de trabajos anteriores realizados en nuestro laboratorio para la identificación y el aislamiento de genes involucrados en la biosíntesis del EPS acetano, en esta tesis se informa sobre la caracterización del producto de uno de esos genes, la proteína AceA.

### 8.1. Caracterización bioquímica y funcional de AceA.

Anteriormente, se había sugerido que las GTs relacionadas con la biosíntesis de succinoglicano y xantano, estarían localizadas sobre la cara interna de la membrana plasmática (65, 153). El método de predicción DAS detectó un segmento que atravesaría la membrana entre los aminoácidos 298-306; aunque el puntaje asignado a la predicción es cercano al valor de corte. La existencia de un dominio transmembrana en esa región no ha sido demostrada experimentalmente y los resultados que se describen a continuación no apoyan su existencia.

El estudio de la localización subcelular de AceA en *X. campestris*, mostró que AceA se encuentra en la fracción de membrana. Por otra parte la forma Stag-AceA expresada en *E. coli* fue detectada en la fracción soluble. Esta discrepancia nos condujo a investigar la localización subcelular de AceA en la cepa Xc1231 (mutante por delección de la región *gum* completa) como modo de determinar si el reclutamiento de AceA a la membrana de *X. campestris* era mediado por alguna proteína involucrada en la síntesis de xantano. De hecho, la existencia de complejos multienzimáticos unidos a membrana en la síntesis de polisacáridos había sido propuesta anteriormente (109, 195). Encontramos que en Xc1231, AceA se encuentra en la membrana. Por lo tanto ninguna proteína de la región *gum* es necesaria para el anclaje de AceA a la membrana, más bien parece que esta interacción es una característica intrínseca de la proteína.

Otras propiedades que presenta AceA son, que la proteína sólo es solubilizada completamente de la fracción de membranas mediante el uso de detergentes; y que su pI teórico es elevado (9.4), una característica común a las proteínas asociadas a la membrana. Respecto a esto último, Edman y col. (36) observaron una distribución de carga característica en varias GTs que se localizan en la membrana (incluyendo a AceA), y lo relacionaron a la interacción con la misma. Estas proteínas, muestran una mayor concentración de cargas positivas en el N-terminal (en AceA el pI del N-terminal es 10.4, mientras que el pI del C-terminal es 5.6). Obtuvieron evidencia experimental de la participación del N-terminal de la proteína  $\alpha$ -monoglucosil-diacilglicerol sintasa de *Acholeplasma laidlawii* (aMGS) en la unión a membrana, estudiando la localización *in vivo* de híbridos de los dominios N- y C-terminal con la proteína verde fluorescente. También el N-terminal de la glucuroniltransferasa GelK de *Sphingomonas paucimobilis*, que presenta un pI elevado, fue expresado separadamente del dominio C-terminal y se lo encontró asociado a la fracción de membranas [Videira, 2001 #556]. Otro ejemplo es el de la N-acetilglucosaminiltransferasa MurG de *E. coli*, una proteína de membrana para la cual no se han identificado segmentos transmembrana. Sin embargo en la estructura 3D de MurG se observó la presencia de una zona de residuos hidrofóbicos en el N-terminal, rodeado de residuos básicos, que fue propuesto como el sitio de asociación con la membrana (64).

Resumiendo, las GTs que utilizan sustratos lipídicos dependen, al menos en parte, de interacciones electrostáticas mediadas por aminoácidos básicos con fosfolípidos para su unión a la membrana. En el caso de AceA, encontramos que el tratamiento de la fracción de membranas con buffer alcalino, resultó en una pobre solubilización de la proteína (5%). Contrariamente, la utilización de detergente produjo la solubilización completa de AceA. Esto sugiere que las interacciones electrostáticas con las cargas negativas de la membrana, probablemente tengan importancia en el acercamiento inicial de la proteína a la superficie de la bicapa lipídica, donde se encuentra su sustrato aceptor; pero son las interacciones hidrofóbicas las determinantes en la asociación de AceA con la membrana.

Recientemente se ha demostrado que tanto las interacciones electrostáticas como las hidrofóbicas están involucradas en la unión y activación de aMGS, en un proceso en dos etapas. La enzima se une a la membrana de manera irreversible, y tanto la asociación como la actividad enzimática estarían fuertemente influenciadas por la composición local de la membrana (113).

El modelo de interacción propuesto para alMGS podría visualizarse como el modo de asociación a la membrana de otras GTs. Dado que la composición de la membrana varía entre diferentes organismos, los requerimientos en cuanto a la composición lipídica y molecular probablemente variarán, pero el mecanismo básico podría estar conservado. Este modelo explica satisfactoriamente como estas GTs son capaces de transferir un azúcar soluble a un sustrato aceptor lipídico embebido en la membrana.

Una combinación de sal y detergente fue utilizada para solubilizar a Acea-Histag de la membrana de *E. coli*, como punto de partida para la purificación de la proteína. Encontramos que detergentes no iónicos del tipo polioxietilenglicol (Tritón X-100 y Tween 20) extraen eficientemente a AceA de la fracción de membranas. La enzima fue purificada a homogeneidad en presencia de detergente, en dos pasos: cromatografía de afinidad y filtración en gel. La purificación en ausencia de detergente resultó en una preparación de proteína con fuerte tendencia a precipitar. Tween 20 fue el detergente elegido para la purificación debido a los resultados obtenidos en la filtración en gel. La adición de Tween 20 a los buffers de purificación, resultó en un pico muy simétrico con un tiempo de retención mayor. El PM de AceA, calculado en base a su elución de la filtración en gel, fue 193 kDa. Siendo el PM del monómero de AceA de 44 kDa, la posibilidad de que AceA forme complejos multiméricos no puede descartarse. Por otro lado, como no se conoce el tipo de interacción de AceA con el detergente, no es posible precisar cual es el estado físico de AceA en la muestra purificada.

En estudios previos, la actividad enzimática de AceA fue ensayada en sistemas de células permeabilizadas, en las que el sustrato aceptor de la reacción era producido *in vivo* por una cepa mutante de *X. campestris* que expresaba el gen *aceA* (146). Sin embargo, la actividad enzimática nunca había sido ensayada en un sistema libre de aceptor endógeno. Los resultados presentados aquí muestran por primera vez, la producción de AceA en *E. coli*, y la determinación de su actividad enzimática en un sistema formado por componentes puros.

El producto del gen *aceA* fue sobreexpresado en *E. coli*, a partir de dos construcciones diferentes que generan una fusión con el péptido Stag en el N-terminal o una fusión con seis residuos de His en el extremo C-terminal. Por otra parte, también se generó una construcción para la expresión de AceA en *X. campestris* que permitió realizar ensayos de complementación y determinar la actividad de AceA *in vivo*.

Como el sustrato aceptor de AceA no es un producto comercial y su síntesis química es dificultosa, gran parte de los ensayos de actividad fueron hechos con un extracto de glicolípidos obtenido de células de *X. campestris*, enriquecidos en el aceptor poliprenol-PP-celobiosa.

La medición de actividad enzimática en extractos crudos de *E. coli*, mostró que no existe una actividad manosiltransferasa homóloga en *E. coli*. Tampoco se observó la presencia de aceptores endógenos para AceA.

Los resultados obtenidos en las incubaciones *in vitro* con la proteína recombinante, nos permitieron confirmar que AceA es una  $\alpha$ -manosiltransferasa. Se identificó al aceptor de la reacción como Lip-PP-celobiosa. El análisis del producto de reacción indica que la unión de la porción oligosacáridica al lípido, es a través de un enlace pirofosfato. Por otra parte confirmamos que el enlace formado en la reacción catalizada por AceA tiene configuración alfa.

Como se mencionó anteriormente, las GTs agrupadas en el clan GT-B no presentan un requerimiento estricto de cationes divalentes para la actividad enzimática, lo que las diferencia de las GTs con plegamiento GT-A. El estudio del requerimiento de  $Mg^{2+}$  por AceA, mostró que la presencia de  $Mg^{2+}$  no es esencial para la catálisis, aunque su presencia aumenta la velocidad de reacción.

Las estructuras 3D de las GTs resueltas hasta el momento, muestran que las diferencias en la utilización de iones metálicos entre GT-A y GT-B, se debe a que la unión del nt-azúcar es distinta en estos dos clanes (ver sección 4.2.2.ii). Las GTs pertenecientes a GT-B estabilizan las cargas negativas de los grupos fosfato del nt-azúcar a través de una secuencia que presenta un patrón característico de residuos Gly y Pro. Este motivo adquiere una estructura tipo  $\alpha/\beta/\alpha$  que se ha convertido en una especie de marca para la identificación rápida de miembros del clan



GT-B. En el complejo de MurG con UDP-GlcNAc, se ha observado que la carga negativa del fosfato- $\alpha$  del nt-azúcar es estabilizada por la carga positiva del dipolo que genera la primer hélice- $\alpha$  del motivo estructural  $\alpha/\beta/\alpha$  (82).

Al respecto, cabe señalar que el plegamiento  $\alpha/\beta/\alpha$  (plegamiento tipo Rossmann) fue en principio caracterizado en proteínas que utilizan cofactores con grupos difosfato (por ej., NADH) (155). Las cargas negativas del grupo pirofosfato de estos cofactores, se unen a dominios tipo Rossmann, sin ningún requerimiento de aminoácidos básicos o iones metálicos, ya que utilizan la estabilización provista por el efecto dipolar de la estructura de hélice. El motivo Rossmann, representa una solución al problema de como unir al nt-azúcar. La otra solución, es la que utilizan los miembros del grupo GT-A, que consiste en la coordinación de un ión metálico por las cargas negativas del grupo pirofosfato del nt-azúcar.

Por otra parte, en GTs con plegamiento GT-A la presencia de iones divalentes es necesaria en el mecanismo catalítico, ya que el ión metálico, asiste la partida del grupo saliente, estabilizando la carga generada sobre el fosfato- $\alpha$  (183). Al no conocerse el mecanismo catalítico de las GTs que pertenecen al grupo GT-B, no se puede precisar su requerimiento de iones metálicos. Los resultados que obtuvimos en cuanto a la utilización de  $Mg^{2+}$  de AceA, concuerdan con lo observado en otras GTs con plegamiento GT-B. Los motivos de la aceleración de la tasa de reacción, aún se desconocen.

Respecto a la especificidad por el sustrato aceptor, demostramos que tanto el grupo pirofosfato como la porción lipídica son importantes en el reconocimiento por la enzima. También observamos que el grado de saturación del lípido y el largo de cadena no son factores críticos, ya que la enzima es capaz de utilizar el fitanilo ( $C_{20}$ , saturado) en reemplazo del poliprenol natural ( $C_{55}$ , insaturado). Sin embargo, la incubación en presencia de isoamilo ( $C_5$ , saturado), mostró que el largo de la cadena lipídica se vuelve crítica en un punto. Por lo tanto la porción lipídica del aceptor debe tener un largo de cadena mínimo (entre  $C_5$  y  $C_{20}$ ) para que ocurra la reacción de transferencia.

La utilización de aceptores comerciales, nos permitió corroborar la importancia del grupo pirofosfato, así como también la estereoquímica de la unión azúcar-pirofosfato, ya que AceA no fue capaz de transferir Man a sustratos con configuración anomérica  $\beta$  y sin puente fosfato entre la porción azúcar y el lípido.

La especificidad por el sustrato aceptor de la N-acetil glucosaminiltransferasa MurG ha sido estudiada en detalle (24). Esta enzima asociada a membrana, que participa en la biosíntesis de peptidoglicano utiliza como sustrato al Lípido I, cuya estructura se asemeja al aceptor de AceA. El Lípido I ha sido caracterizado, y se ha demostrado que la porción lipídica es undecaprenol ( $C_{55}$ ). La síntesis y el análisis de análogos del Lípido I, que se diferencian en la estructura o el largo de cadena de la porción lipídica, muestra que *in vitro*, MurG prefiere sustratos con cadenas más cortas que el aceptor natural y, al igual que éste, que contengan un doble enlace cis-alílico. El largo mínimo de la cadena es de 10 carbonos. Basándose en estos resultados y comparando los requerimientos por el aceptor de MurG y la transglicosilasa PBP1b (proteína integral de membrana que actúa en la polimerización del producto de MurG), Chen y col. (24) proponen que las proteínas integrales de membrana que operan en la interfase requieren aceptores con cadenas lipídicas largas, ya que imitan el ambiente de membrana, donde los sustratos se encuentran próximos. Por el contrario, MurG, que también actúa en la interfase, pero carece de dominios transmembrana, puede utilizar sustratos sintéticos con cadenas lipídicas más cortas. Esta predicción sería extensible a todas las GTs que utilizan un sustrato soluble y otro embebido en la membrana. Nuestros resultados apoyan esta teoría, aunque sólo la disponibilidad de nuevos aceptores para AceA nos permitirá hacer un análisis más detallado en cuanto a las características de la porción lipídica.

AceA no mostró actividad hidrolítica sobre GDP-Man. Los intentos por “marcar” a AceA incubándola con GDP- $[^{14}C]$ Man fueron infructuosos (no mostrado). Sumado a esto, también observamos que de las incubaciones en presencia de celobiosa o sus formas fosforiladas, se obtienen cantidades importantes de Man libre (ver Fig. 39 y 40) y que la adición de celobiosa a

la mezcla de incubación, provoca una disminución en la tasa de reacción. Aunque estas son observaciones indirectas, los resultados sugieren que probablemente la unión e hidrólisis del nt-azúcar ocurren una vez que el sustrato aceptor se encuentra en el sitio activo. Los resultados de protección por los sustratos en la modificación química de AceA, también apuntan en esta dirección. Esta hipótesis puede probarse mediante el análisis cinético de la enzima, que podrá realizarse cuando se disponga de un aceptor sintético adecuado. La caracterización cinética de la GT OleD, que participa en la biosíntesis de oleandomicina y pertenece al grupo GT-B, demuestra que la enzima sigue un mecanismo ordenado, con el aceptor uniéndose en primer lugar (148).

El análisis cinético de una enzima depende de la disponibilidad de los sustratos y de un ensayo de medición cuantitativo y reproducible. Ambos aspectos han resultado un obstáculo para la caracterización cinética de AceA. Esta misma situación ocurre con la mayoría de GTs que utilizan aceptores lipídicos, ya que son difíciles de purificar (se encuentran en pequeñas cantidades y son compuestos inestables) y su síntesis química no es sencilla.

Se han desarrollado aceptores sintéticos para algunas GTs y han sido utilizados en la caracterización de la actividad enzimática, en los casos que resultaron ser buenos análogos del sustrato natural (24).

En esta tesis se realizó una determinación preliminar de los parámetros cinéticos para la forma purificada a homogeneidad de AceA, utilizando fitanil-PP-celobiosa en reemplazo del aceptor natural. El compuesto obtenido por síntesis química, presentó solubilidad limitada, por lo que se trabajó con concentraciones subsaturantes de aceptor. De esta manera se obtuvo un valor de  $K_m$  aparente para el sustrato dador. A juzgar por el valor elevado de la  $K_m$  para fitanil-PP-celobiosa (3.2 mM) respecto al de GDP-Man (35  $\mu$ M), el análogo del aceptor natural no es un buen sustrato para AceA. La baja afinidad podría deberse a diferencias en la porción lipídica: el aceptor natural contiene dobles enlaces, contrariamente el fitanol es completamente saturado.

La preferencia de las GTs bacterianas por unidades isoprenoide insaturadas en el aceptor ha sido observada anteriormente (24, 121, 156). Probablemente esto podría relacionarse con la proximidad entre la porción lipídica y el punto de acción de la enzima sobre el sustrato aceptor.

Volviendo al mecanismo de acción de GTs que actúan con retención, la única GT cuya estructura 3D ha sido resuelta y que ha sido caracterizada cinéticamente, es LgtC (plegamiento GT-A). La enzima muestra un mecanismo ordenado, el nt-azúcar se une primero y genera un cambio conformacional que crea el sitio de unión del aceptor (144). Por otra parte, la estructura cristalina de OtsA en complejo con UDP-Glc (52) (hasta el momento es la enzima que más se asemejaría a AceA en cuanto a estructura y mecanismo), no aporta datos respecto al mecanismo. La enzima fue co-cristalizada con ambos sustratos, pero llamativamente sólo se observa densidad electrónica para el nt-azúcar. Estos autores señalan que la proteína presenta una conformación más abierta que en el complejo ternario OtsA/Glc-6-P/UDP obtenido anteriormente, y que no parece haber pre-formación del sitio del aceptor como resultado de la unión de UDP-Glc. Por lo tanto el complejo binario obtenido, podría ser un artefacto (en este caso útil) de la cristalización y no sería una indicación del orden de unión de los sustratos. Nuestras observaciones, sumadas a estos hechos, sólo nos permiten sugerir que en el caso de AceA y OtsA, el orden de unión de los sustratos podría ser inverso al determinado para LgtC en un mecanismo ordenado, aunque tampoco puede descartarse un mecanismo rápido al azar en el cual los dos sustratos deben ser unidos antes de que ocurra la reacción; como el descripto para la glucógeno fosforilasa (33).

En cuanto al evento catalítico (doble desplazamiento o  $S_Ni$ ), nuestros resultados no aportan datos que favorezcan un mecanismo sobre otro. Los intentos por atrapar un intermediario covalente glicosil-enzima utilizando GDP-[ $^{14}$ C]Man y la enzima nativa o mutantes inactivas (no mostrado) fueron infructuosos. Recientemente se ha informado sobre el aislamiento de un intermediario covalente de LgtC (105), apoyando el mecanismo de doble desplazamiento; pero la validez de esos resultados debe ser reforzada con la obtención de otros complejos.

Claramente, la determinación del mecanismo de reacción de GTs que actúan con retención es todavía un aspecto desafiante de la glicobiología.

## 8.2. Caracterización estructural de AceA

Los resultados de la mutagénesis a Ala permitieron examinar la importancia de los aminoácidos seleccionados sobre la actividad enzimática de AceA. Los residuos mutagenizados pueden dividirse en cuatro grupos. En primer lugar las mutaciones K211A y E287A, resultaron en la pérdida completa de actividad enzimática, a juzgar por los resultados de medición de actividad *in vitro* y de complementación *in vivo*. La mutación E295A resultó en un fenotipo levemente diferente: la mutante resultó completamente inactiva *in vitro*, pero fue capaz de restaurar la producción de xantano *in vivo* a un nivel bajo, pero reproducible (~4 % respecto a AceA wt). Las mutantes D109A, H127A y S162A, constituyen un tercer grupo en el que la mutación causa una disminución de 97-98 % de actividad *in vitro*, pero retienen una capacidad significativa de producir xantano *in vivo* (20-40 %). Finalmente, a pesar de que L270 es un aminoácido altamente conservado, la mutante L270A retuvo 40 % de actividad *in vitro* y 71 % de actividad *in vivo*, lo que indica que este residuo no tiene un rol crítico en el mecanismo catalítico.

Teniendo en cuenta la baja actividad *in vitro* de las mutantes D109A, H127A y S162A, se esperaba que la producción de xantano en las cepas XcH complementadas con estas mutantes, mostrara una disminución importante. Sin embargo la cantidad de EPS acumulado fue mucho mayor que el esperado. Este efecto también fue observado en la complementación de *Sinorhizobium meliloti* con mutantes de la glucosiltransferasa ExoM, apenas activas *in vitro* (45). Estos resultados sugieren que el “cuello de botella” para la producción de EPS no es el ensamblado de la unidad repetitiva oligosacáridica, sino que probablemente lo sea la disponibilidad de precursores (NDP-azúcares y/o poliprenol), y/o los procesos de traslocación y polimerización.

Nuestros resultados confirman que los tres residuos estrictamente conservados K211, E287 y E295 son importantes para la actividad de AceA *in vitro* e *in vivo*. La proposición de que los glutamatos del motivo EX<sub>7</sub>E serían los residuos catalíticos en un mecanismo de doble desplazamiento (94), no es sostenido por nuestros resultados ya que E295 no es un residuo esencial para la actividad enzimática de AceA y los estudios de threading mostraron que este residuo estaría involucrado en la unión de la ribosa del nt-azúcar. Por otra parte, aunque ni T4BGT, ni MurG poseen un residuo equivalente a E287 de AceA, la inactivación completa de la mutante E287A sugiere un rol catalítico para este aminoácido. La glucógeno sintasa de músculo humana (HMGS), una GT procesiva perteneciente a la familia GT-3, posee un dominio EX<sub>7</sub>E que fue analizado por mutagénesis sitio-dirigida con resultados idénticos a los obtenidos para AceA (27). En este caso la doble mutante E510A/E518A de HMGS, mantiene intacta su capacidad de translocar y unir glucógeno, indicando que el motivo EX<sub>7</sub>E no es importante en la unión del sustrato aceptor, sino más bien formaría parte del sitio activo de HMGS.

Todos los miembros de la familia GT-4 poseen un residuo Lys conservado, que en AceA es K211. Según la predicción de estructura secundaria este residuo se encuentra en un loop en el inicio del dominio C-terminal. Los resultados de threading ubican a K211 en posición equivalente a T4BGT R191 (131) y al loop G3 de MurG, que interactúan con el fosfato- $\alpha$  del nt-azúcar (64). Estas observaciones junto a la pérdida total de actividad de la mutante K211A, nos llevan a proponer que la función de K211 es unir alguno de los fosfatos de GDP-Man.

El análisis de threading mostró que AceA D109, es el aminoácido equivalente al residuo catalítico D100 de T4BGT. Sin embargo la mutante D109A de AceA conserva actividad residual significativa, por lo que no es un aminoácido directamente involucrado en la catálisis.

Las mutaciones H127A y S162A, resultaron en la inactivación parcial de AceA y la comparación con las estructuras de MurG y T4BGT no nos permite asignarles un rol a estos residuos. Sin embargo, notamos que H127 ocuparía la posición equivalente a MurG H125. Este residuo está estrictamente conservado en todos los homólogos conocidos de MurG y está ubicado en la región del N-terminal propuesta como el sitio de unión del aceptor (64).

La modificación química de AceA demuestra que al menos, un residuo ácido es esencial para la actividad enzimática, reafirmando los resultados anteriores sobre la participación de un residuo ácido en catálisis. Sumado a esto, la introducción de cambios conservativos en la posición 287 (E287Q o E287D) mostraron que la eliminación de la carga negativa o un sutil cambio de tamaño, conservando la carga; anulan completamente la actividad enzimática de AceA. Este resultado aumenta la probabilidad de que E287 esté involucrado directamente en la catálisis de AceA.

Las mutantes E295D y E295Q mostraron actividad residual considerable. En esta última la eliminación de la carga tiene un efecto negativo, pero no anula la actividad. Por lo tanto en la mutante E295Q, el rol de mantener unido al nt-azúcar para la catálisis debe ser realizado por los otros aminoácidos del sitio de unión, aunque con una eficiencia menor.

En un intento por determinar la localización del residuo modificado por EDAC, se investigó el efecto protector de los sustratos contra la inactivación por EDAC. En este tipo de ensayos es esperable que a mayor concentración de sustrato durante la reacción de modificación de la enzima, mayor sea el porcentaje de actividad residual. Observamos que GDP-Man es incapaz de proteger a AceA de la inactivación a cualquiera de las concentraciones analizadas. Este resultado sugiere el nt-azúcar no interacciona con la enzima y concuerda con observaciones anteriores respecto al orden de unión de los sustratos en AceA (ver sección 8.1).

De igual manera, analizamos el efecto del sustrato aceptor en la inactivación de AceA por EDAC, utilizando el aceptor sintético fitanil-PP-celobiosa. Determinamos un efecto de protección parcial, pero sin que exista correlación entre la concentración de aceptor y el efecto de protección. Probablemente el residuo modificado se encuentra en el sitio activo o cerca de él, pero no está involucrado en la unión del sustrato aceptor. Es importante señalar aquí, que el aceptor sintético podría no entablar los contactos adecuados en el sitio activo y además, trabajamos con concentraciones no saturantes por falta de solubilidad del aceptor. Por lo tanto, la protección limitada que ofrece fitanil-PP-celobiosa, podría deberse a una obstrucción parcial al acceso de EDAC hacia el sitio activo.

Purificamos AceA a homogeneidad con alto rendimiento con el fin de cristalizar la proteína y resolver su estructura tridimensional. Aunque no obtuvimos datos adecuados para la resolución de la estructura tridimensional de AceA, podemos decir que no estamos tan lejos de lograrlo, ya que los cristales difractaron los rayos X. Esto representa un punto importante que sugiere que el camino a seguir es mejorar las condiciones encontradas. Es importante tener en cuenta que AceA es una proteína de membrana y que su extracción y purificación requieren la utilización de detergentes. Se probaron varios detergentes comerciales como aditivo en la cristalización, pero se observó que la formación de cristales tridimensionales siempre ocurría en las gotas con detergentes del tipo de los utilizados para la solubilización y purificación (éteres de polioxietileno). La utilización de celobiosa, GDP o GDP-Man como aditivo, no mejoró la calidad de los cristales. Debido a esto y por lo expuesto anteriormente, creemos que la utilización del sustrato aceptor como aditivo en la cristalización permitiría obtener cristales de mejor calidad. Pero para probarlo, necesitamos contar con una cantidad importante del aceptor sintético fitanil-PP-celobiosa, que por el momento resulta una limitante.

Debido a las dificultades encontradas en la obtención de cristales, decidimos realizar el modelado por homología de AceA.

Varios trabajos recientes, informan sobre la utilización de métodos de reconocimiento de plegamiento para asignar estructura 3D a GTs que pertenecen a familias de estructura desconocida (117, 205). Se ha encontrado que la mayoría de ellas adoptarán un plegamiento tipo GT-A o GT-B. Para la familia GT-4, a la cual pertenece AceA, el plegamiento predicho es GT-B. Los estudios de threading realizados al comienzo, cuando aún solo estaban descritas unas pocas estructuras de GTs, mostraron que la estructura de AceA sería similar a la de T4 BGT y MurG, ambas presentan plegamiento GT-B. Al momento de realizar el modelado por homología de AceA, se contaba con un gran número de estructuras de GTs resueltas, lo que nos permitió hacer el modelado con un número mayor de templados. Esto aumenta considerablemente el grado de confianza en el modelo.

Los métodos de predicción de estructura secundaria y reconocimiento de plegamiento, junto con el método de evaluación del 3D-Jury, provistos por el MetaServer, nos permiten proponer similitud estructural entre AceA y las estructuras 3D de las GTs GSA de *A. tumefaciens* (17), OtsA (52) y MurG de *E. coli* (82), y la UDP-GlcNAc 2-epimerasa de *E. coli* (21). Los estadísticos de la calidad del modelo arrojaron valores favorables. A pesar de la baja similitud de secuencia, proponemos que AceA pertenece a la misma superfamilia estructural que las proteínas mencionadas, con plegamiento GT-B.

El modelo de AceA muestra el típico plegamiento de Rossmann para los dominios N- y C-terminal, con una hendidura central que aloja al sitio activo. Los glutamatos del motivo EX<sub>7</sub>E que según nuestros resultados forman parte del sitio activo, están alojados en la hendidura.

Tal como se había observado del cálculo de los pI teóricos para los dos dominios de AceA, el modelo muestra que el N-terminal tiene una extensa superficie cargada positivamente. Teniendo en cuenta que uno de los sustratos de AceA se encuentra anclado en la membrana citoplasmática, es probable que la enzima opere en la interfase por un mecanismo en dos etapas, como se ha descrito para otras GTs que utilizan sustratos lipídicos (113). En el caso de AceA, el N-terminal cargado positivamente, haría un primer contacto con las cargas negativas de la membrana. Luego, la interacción con el sustrato aceptor y la inserción en la membrana, provocarían la activación de la enzima (quizás a través de un cambio de conformación), que ahora estaría habilitada para unir al nt-azúcar soluble. Esta hipótesis tiene algún apoyo en el tipo de interacción de AceA con la membrana y en nuestras observaciones respecto al orden de unión de los sustratos.

La superposición del sitio activo de AceA con los de GSA y OtsA, ambas GTs que catalizan la transferencia del residuo azúcar con retención de la configuración, mostró una conservación sorprendente. Las dos últimas pertenecen a familias distintas que AceA (GT-5 y GT-20, respectivamente) y utilizan sustratos dadores diferentes. Sin embargo la arquitectura del sitio activo es muy similar, lo que refuerza la idea de un origen evolutivo común para estas familias de GTs.

El modelo corrobora las funciones asignadas a los residuos K211 y E295 de AceA. La función de E287 es más controvertida, ya que las estructuras de los complejos GSA/ADP y OtsA/UDP-Glc, muestra que los residuos equivalentes a E287 en esas estructuras, estarían involucrados en la unión del OH-3 del residuo de Glc (modelado en GSA). Contrariamente, el grado de conservación y la pérdida completa de actividad al mutagenizar E287, incluso realizando cambios conservativos (E287D), nos lleva a proponer un rol catalítico para este aminoácido. Debe tenerse en cuenta que una característica de las proteínas GT-B es el movimiento de ciertas regiones de la proteína durante el evento catalítico, pasando de una conformación abierta a una más cerrada. Por lo tanto, la posición de los residuos y las distancia medidas entre átomos probablemente varían en la catálisis. Al respecto, estudios de dinámica molecular podrían ser de gran ayuda. La mutagénesis de los residuos equivalentes a E287 (GSA E376, OtsA D361) y el análisis cinético, serían un complemento interesante a los datos estructurales. Recientemente, se informó sobre el modelado por homología y la mutagénesis de la glucógeno sintasa de *E. coli* (199). Este trabajo demuestra que el residuo E377 (equivalente a GSA 376 y AceA E287) está directamente implicado en la catálisis de esta enzima, lo que concuerda con nuestros resultados. En el modelo de AceA, el residuo D109 (equivalente al residuo catalítico D100 de BGT), se encuentra en una zona alejada del sitio activo. Por otra parte, S162 se encuentra en el fondo de la hendidura, pero a una distancia de 9 Å respecto a E287 (distancia medida entre carbonos  $\alpha$ ). Por lo tanto, descartamos la participación directa de estos residuos en el mecanismo de reacción. La función de H127 a partir del modelo de AceA es controvertida. Por una parte, este aminoácido es el equivalente a GSA H163 y OtsA H154, que son los residuos encargados de unir al OH-6 de la Glc. Pero en la superposición del sitio activo observamos que H127 es el único residuo de AceA que no se corresponde con sus pares, ya que se encuentra a una distancia considerable del átomo al que uniría. Cabe señalar que H127 se encuentra en un loop del dominio N-terminal, que en general presenta un desvío mayor que el C-terminal en la superposición de estructuras. Por lo tanto las diferencias en la ubicación de H127 en AceA, podrían atribuirse a este hecho. Asimismo, H127 fue propuesto como residuo importante para la

unión del aceptor, a partir de los estudios de threading y el alineamiento con MurG. En consecuencia, no podemos predecir con certeza la función de H127 en AceA.

El modelo de AceA nos permitió identificar nuevos residuos en el sitio activo de AceA (G25, G26, G27, R206) que serán objeto de futuros estudios. En relación a esto último, vale la pena señalar la utilidad del modelado por homología como herramienta para la predicción de residuos del sitio activo, la interacción con sustratos y cofactores, entre otras aplicaciones.

El modelo de AceA también fue utilizado para observar zonas del N-terminal, probablemente relacionadas con la unión del sustrato aceptor. La comparación del modelo de AceA con la estructura de MurG, nos permitió observar semejanza en la disposición de elementos estructurales que abarcan una región del N-terminal, que en MurG ha sido propuesta como la zona de unión del Lípido I (64, 82). Esta región es la que corresponde al loop entre N $\beta$ 5 y N $\alpha$ 5. Es una región hipervariable en todas las proteínas con plegamiento GT-B. En AceA el largo del loop es diferente, lo cual se ha observado también en otras GTs. La diferencia en la composición y el largo de este loop estaría reflejando la diversidad de aceptores que utilizan estas enzimas.

Es importante destacar la cercanía entre el loop N $\beta$ 5-N $\alpha$ 5 y las regiones de la proteína que participan en la unión del nt-azúcar. La reciente estructura de GtfD en presencia de ambos sustratos (136), confirma la participación de este loop en la unión del aceptor y también demuestra que existe comunicación cruzada entre los dominios N- y C-terminal, por lo que los determinantes de la especificidad por los sustratos no están aislados en un dominio u otro, como se sugirió en un principio.



## 9. Bibliografía

1. **Aebi, M., J. Gassenhuber, H. Domdey, and S. te Heesen.** 1996. Cloning and characterization of the ALG3 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Glycobiology* **6**:439-44.
2. **Albright, C. F., P. Orlean, and P. W. Robbins.** 1989. A 13-amino acid peptide in three yeast glycosyltransferases may be involved in dolichol recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**:7366-9.
3. **Amemura, A., and J. Cabrera-Crespo.** 1986. Extracellular oligosaccharides and low-Mr polysaccharides containing (1---2)-beta-D-glucosidic linkages from strains of *Xanthomonas*, *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *J Gen Microbiol* **132**:2443-52.
4. **Baird, J. K., V. M. Longyear, and D. C. Ellwood.** 1973. Water insoluble and soluble glucans produced by extracellular glycosyltransferases from *Streptococcus mutans*. *Microbios* **8**:143-50.
5. **Barrère, G. C., C. E. Barber, and M. J. Daniels.** 1986. Molecular cloning of genes involved in the production of the extracellular polysaccharide xantha by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Int J Biol Macromol* **8**:372-374.
6. **Bateman, A., L. Coin, R. Durbin, R. D. Finn, V. Hollich, S. Griffiths-Jones, A. Khanna, M. Marshall, S. Moxon, E. L. Sonnhammer, D. J. Studholme, C. Yeats, and S. R. Eddy.** 2004. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* **32**:D138-41.
7. **Becker, A., F. Katzen, A. Puhler, and L. Ielpi.** 1998. Xanthan gum biosynthesis and application: a biochemical/genetic perspective. *Applied Microbiology and Biotechnology* **50**:145-52.
8. **Becker, A., K. Niehaus, and A. Puhler.** 1995. Low-molecular-weight succinoglycan is predominantly produced by *Rhizobium meliloti* strains carrying a mutated ExoP protein characterized by a periplasmic N-terminal domain and a missing C-terminal domain. *Molecular Microbiology* **16**:191-203.
9. **Boix, E., G. J. Swaminathan, Y. Zhang, R. Natesh, K. Brew, and K. R. Acharya.** 2001. Structure of UDP complex of UDP-galactose:beta-galactoside-alpha -1,3-galactosyltransferase at 1.53-Å resolution reveals a conformational change in the catalytically important C terminus. *J Biol Chem* **276**:48608-14.
10. **Bourne, Y., and B. Henrissat.** 2001. Glycoside hydrolases and glycosyltransferases: families and functional modules. *Curr Opin Struct Biol* **11**:593-600.
11. **Breton, C., and A. Imberty.** 1999. Structure/function studies of glycosyltransferases. *Curr Opin Struct Biol* **9**:563-71.
12. **Breton, C., L. Snajdrova, C. Jeanneau, J. Koea, and A. Imberty.** 2005. Structures and mechanisms of glycosyltransferases superfamily. *Glycobiology*.
13. **Brusca, J. S., and J. D. Radolf.** 1994. Isolation of integral membrane proteins by phase partitioning with Triton X-114. *Methods Enzymol* **228**:182-93.
14. **Buendia, A. M., B. Enenkel, R. Koplín, K. Niehaus, W. Arnold, and A. Puhler.** 1991. The *Rhizobium meliloti* exoZl exoB fragment of megaplasmid 2: ExoB functions as a UDP-glucose 4-epimerase and ExoZ shows homology to NodX of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* strain TOM. *Mol Microbiol* **5**:1519-30.
15. **Bujnicki, J. M., A. Elofsson, D. Fischer, and L. Rychlewski.** 2001. Structure prediction meta server. *Bioinformatics* **17**:750-1.
16. **Burda, P., C. A. Jakob, J. Beinhauer, J. H. Hegemann, and M. Aebi.** 1999. Ordered assembly of the asymmetrically branched lipid-linked oligosaccharide in the endoplasmic reticulum is ensured by the substrate specificity of the individual glycosyltransferases. *Glycobiology* **9**:617-25.
17. **Buschiazzo, A., J. E. Ugalde, M. E. Guerin, W. Shepard, R. A. Ugalde, and P. M. Alzari.** 2004. Crystal structure of glycogen synthase: homologous enzymes catalyze glycogen synthesis and degradation. *Embo J* **23**:3196-205.

18. **Cadmus, M. C., S. P. Rogovin, K. A. Burton, J. E. Pittsley, C. A. Knutson, and A. Jeanes.** 1976. Colonial variation in *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 and characterization of the polysaccharide from a variant strain. *Can J Microbiol* **22**:942-8.
19. **Campbell, J. A., G. J. Davies, V. Bulone, and B. Henrissat.** 1997. A classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J* **326 ( Pt 3)**:929-39.
20. **Campbell, J. A., G. J. Davies, V. V. Bulone, and B. Henrissat.** 1998. A classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J* **329 (Pt 3)**:719.
21. **Campbell, R. E., S. C. Mosimann, M. E. Tanner, and N. C. Strynadka.** 2000. The structure of UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase reveals homology to phosphoglycosyl transferases. *Biochemistry* **39**:14993-5001.
22. **Capage, M. D., DH; Betlach, MR and Vanderslice, RW.** 1987. Recombinant-DNA mediated production of xanthan gum. International patent WO87/05938.
23. **Charnock, S. J., and G. J. Davies.** 1999. Structure of the nucleotide-diphospho-sugar transferase, SpsA from *Bacillus subtilis*, in native and nucleotide-complexed forms. *Biochemistry* **38**:6380-5.
24. **Chen, L., H. Men, S. Ha, X. Y. Ye, L. Brunner, Y. Hu, and S. Walker.** 2002. Intrinsic lipid preferences and kinetic mechanism of *Escherichia coli* MurG. *Biochemistry* **41**:6824-33.
25. **Chiu, C. P., A. G. Watts, L. L. Lairson, M. Gilbert, D. Lim, W. W. Wakarchuk, S. G. Withers, and N. C. Strynadka.** 2004. Structural analysis of the sialyltransferase CstII from *Campylobacter jejuni* in complex with a substrate analog. *Nat Struct Mol Biol* **11**:163-70.
26. **Christenson, J. G., S. K. Gross, and P. W. Robbins.** 1969. Enzymatic synthesis of the antigen carrier lipid. *J Biol Chem* **244**:5436-9.
27. **Cid, E., R. R. Gomis, R. A. Geremia, J. J. Guinovart, and J. C. Ferrer.** 2000. Identification of two essential glutamic acid residues in glycogen synthase. *J Biol Chem* **275**:33614-21.
28. **Couso, R. O., L. Ielpi, R. C. Garcia, and M. A. Dankert.** 1982. Biosynthesis of polysaccharides in *Acetobacter xylinum*. Sequential synthesis of a heptasaccharide diphosphate prenyl. *Eur J Biochem* **123**:617-27.
29. **Couso, R. O., L. Ielpi, R. C. Garcia, and M. A. Dankert.** 1980. Synthesis of mannosyl cellobiose diphosphate prenyl in *Acetobacter xylinum*. *Arch Biochem Biophys* **204**:435-43.
30. **Coutinho, P. M., E. Deleury, G. J. Davies, and B. Henrissat.** 2003. An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases. *J Mol Biol* **328**:307-17.
31. **Cserzo, M., E. Wallin, I. Simon, G. von Heijne, and A. Elofsson.** 1997. Prediction of transmembrane alpha-helices in prokaryotic membrane proteins: the dense alignment surface method. *Protein Eng* **10**:673-6.
32. **Davies, G., and B. Henrissat.** 1995. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* **3**:853-9.
33. **Davies, G., Sinnot, ML and Whitters, SG.** 1997. *Comprehensive Biological Catalysis*, vol. 1. Academic Press, London.
34. **Davies, G. C., SJ and Henrissat, B.** 2001. The enzymatic synthesis of glycosidic bonds: "Glycosynthases" and Glycosyltransferases. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* **13**:105-120.
35. **Davies, G. J.** 2001. Sweet secrets of synthesis. *Nat Struct Biol* **8**:98-100.
36. **Edman, M., S. Berg, P. Storm, M. Wikstrom, S. Vikstrom, A. Ohman, and A. Wieslander.** 2003. Structural features of glycosyltransferases synthesizing major bilayer and nonbilayer-prone membrane lipids in *Acholeplasma laidlawii* and *Streptococcus pneumoniae*. *J Biol Chem* **278**:8420-8.
37. **Edwards, K. J., A. J. Jay, I. J. Colquhoun, V. J. Morris, M. J. Gasson, and A. M. Griffin.** 1999. Generation of a novel polysaccharide by inactivation of the aceP gene



- from the acetan biosynthetic pathway in *Acetobacter xylinum*. *Microbiology* **145** ( Pt 6):1499-506.
38. **Elbein, A. D., Y. T. Pan, I. Pastuszak, and D. Carroll.** 2003. New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology* **13**:17R-27R.
39. **Empadinhas, N., J. D. Marugg, N. Borges, H. Santos, and M. S. da Costa.** 2001. Pathway for the synthesis of mannosylglycerate in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii*. Biochemical and genetic characterization of key enzymes. *J Biol Chem* **276**:43580-8.
40. **Filisetti-Cozzi, T. M., and N. C. Carpita.** 1991. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Anal Biochem* **197**:157-62.
41. **Flitsch, S., Pinches, HL, Taylor, JP and Turner, NJ.** 1992. Chemo-enzymatic synthesis of a lipid-linked core trisaccharide of N-linked glycoproteins. *J. Chem. Soc. Perkin. Trans.* **1**:2087-2093.
42. **Fritz, T. A., J. H. Hurley, L. B. Trinh, J. Shiloach, and L. A. Tabak.** 2004. The beginnings of mucin biosynthesis: the crystal structure of UDP-GalNAc:polypeptide alpha-N-acetylgalactosaminyltransferase-T1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:15307-12.
43. **Gaboriaud, C., V. Bissery, T. Benchetrit, and J. P. Mornon.** 1987. Hydrophobic cluster analysis: an efficient new way to compare and analyse amino acid sequences. *Febs Letters* **224**:149-55.
44. **Garcia, R. C., E. Recondo, and M. Dankert.** 1974. Polysaccharide biosynthesis in *Acetobacter xylinum*. Enzymatic synthesis of lipid diphosphate and monophosphate sugars. *Eur J Biochem* **43**:93-105.
45. **Garinot-Schneider, C., A. C. Lellouch, and R. A. Geremia.** 2000. Identification of essential amino acid residues in the *Sinorhizobium meliloti* glucosyltransferase ExoM. *J Biol Chem* **275**:31407-13.
46. **Gastinel, L. N., C. Bignon, A. K. Misra, O. Hindsgaul, J. H. Shaper, and D. H. Joziase.** 2001. Bovine alpha1,3-galactosyltransferase catalytic domain structure and its relationship with ABO histo-blood group and glycosphingolipid glycosyltransferases. *Embo J* **20**:638-49.
47. **Gastinel, L. N., C. Cambillau, and Y. Bourne.** 1999. Crystal structures of the bovine beta4galactosyltransferase catalytic domain and its complex with uridine diphosphogalactose. *Embo J* **18**:3546-57.
48. **Geremia, R. A., E. A. Petroni, L. Ielpi, and B. Henrissat.** 1996. Towards a classification of glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities: prokaryotic alpha-mannosyltransferases. *Biochem J* **318** ( Pt 1):133-8.
49. **Gerhardt, P.** 1994. *Methods for General and Molecular Bacteriology*, Washington, D.C.
50. **Ghachi, M. E., A. Bouhss, D. Blanot, and D. Mengin-Lecreulx.** 2004. The bacA Gene of *Escherichia coli* Encodes an Undecaprenyl Pyrophosphate Phosphatase Activity. *J. Biol. Chem.* **279**:30106-30113.
51. **Gibbons, B. J., P. J. Roach, and T. D. Hurley.** 2002. Crystal structure of the autocatalytic initiator of glycogen biosynthesis, glycogenin. *J Mol Biol* **319**:463-77.
52. **Gibson, R. P., C. A. Tarling, S. Roberts, S. G. Withers, and G. J. Davies.** 2004. The donor subsite of trehalose-6-phosphate synthase: binary complexes with UDP-glucose and UDP-2-deoxy-2-fluoro-glucose at 2 Å resolution. *J Biol Chem* **279**:1950-5.
53. **Gibson, R. P., J. P. Turkenburg, S. J. Charnock, R. Lloyd, and G. J. Davies.** 2002. Insights into trehalose synthesis provided by the structure of the retaining glucosyltransferase OtsA. *Chem Biol* **9**:1337-46.
54. **Ginalsky, K., Elofsson, A, Fischer, D and Rychlewski, L.** 2003. 3D-Jury: a simple approach to improve protein structure predictions. *Bioinformatics* **19**:1015-1018.
55. **Ginsburg, V.** 1964. SUGAR NUCLEOTIDES AND THE SYNTHESIS OF CARBOHYDRATES. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* **26**:35-88.
56. **Gonzalez, J. E., C. E. Semino, L. X. Wang, L. E. Castellano-Torres, and G. C. Walker.** 1998. Biosynthetic control of molecular weight in the polymerization of the

- octasaccharide subunits of succinoglycan, a symbiotically important exopolysaccharide of *Rhizobium meliloti*. Proc Natl Acad Sci U S A **95**:13477-82.
57. **Gonzalo, P., B. Sontag, D. Guillot, and J. P. Reboud.** 1995. Fluorometric assay of GTPase activity: application to the couple elongation factor eEF-2-ribosome. Anal Biochem **225**:178-80.
58. **Gregoriou, M., M. E. Noble, K. A. Watson, E. F. Garman, T. M. Krulle, C. de la Fuente, G. W. Fleet, N. G. Oikonomakos, and L. N. Johnson.** 1998. The structure of a glycogen phosphorylase glucopyranose spirohydantoin complex at 1.8 Å resolution and 100 K: the role of the water structure and its contribution to binding. Protein Sci **7**:915-27.
59. **Griffin, A. M., V. J. Morris, and M. J. Gasson.** 1996. Genetic analysis of the acetan biosynthetic pathway in *Acetobacter xylinum*: nucleotide sequence analysis of the aceB, aceC, aceD and aceE genes. DNA Seq **6**:275-84.
60. **Griffin, A. M., V. J. Morris, and M. J. Gasson.** 1996. Identification, cloning and sequencing the aceA gene involved in acetan biosynthesis in *Acetobacter xylinum*. FEMS Microbiol Lett **137**:115-21.
61. **Griffitts, J. S., D. L. Huffman, J. L. Whitacre, B. D. Barrows, L. D. Marroquin, R. Muller, J. R. Brown, T. Hennet, J. D. Esko, and R. V. Aroian.** 2003. Resistance to a bacterial toxin is mediated by removal of a conserved glycosylation pathway required for toxin-host interactions. J Biol Chem **278**:45594-602.
62. **Guex, N., and M. C. Peitsch.** 1997. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. Electrophoresis **18**:2714-23.
63. **Ha, S., B. Gross, and S. Walker.** 2001. E. Coli MurG: a paradigm for a superfamily of glycosyltransferases. Curr Drug Targets Infect Disord **1**:201-13.
64. **Ha, S., D. Walker, Y. Shi, and S. Walker.** 2000. The 1.9 Å crystal structure of *Escherichia coli* MurG, a membrane-associated glycosyltransferase involved in peptidoglycan biosynthesis. Protein Sci **9**:1045-52.
65. **Harding, N., Cleary, JM and Ielpi, L.** 1995. Genetics and biochemistry of xanthan gum production by *Xantomonas campestris*. VCH Publishers, Inc., New York, N.Y.
66. **Harding N.E., R. S., Raimondi A., Cleary J.M and Ielpi L.** 1993. Identification, genetic and biochemical analysis of genes involved in synthesis sugar nucleotide precursors of xanthan gum. J. Gen. Microbiol **139**:447-457.
67. **Harding, N. E., J. M. Cleary, D. K. Cabanas, I. G. Rosen, and K. S. Kang.** 1987. Genetic and physical analyses of a cluster of genes essential for xanthan gum biosynthesis in *Xanthomonas campestris*. Journal of Bacteriology **169**:2854-61.
68. **Harding, N. E., Raffo, S., Raimondi, A., Cleary, J.M, Ielpi, L.** 1993. Identification, genetic and biochemical analysis of genes involved in synthesis sugar nucleotide precursors of xanthan gum. J. Gen. Microbiol **139**:447-457.
69. **Haug, A., and B. Larsen.** 1971. Biosynthesis of alginate. II. Polymannuronic acid C-5-epimerase from *Azotobacter vinelandii* (Lipman). Carbohydr Res **17**:297-308.
70. **Hausler, A., and P. W. Robbins.** 1992. Glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae*: cloning and characterization of an alpha-1,2-mannosyltransferase structural gene. Glycobiology **2**:77-84.
71. **Hayashi, T., B. W. Murray, R. Wang, and C. H. Wong.** 1997. A chemoenzymatic synthesis of UDP-(2-deoxy-2-fluoro)-galactose and evaluation of its interaction with galactosyltransferase. Bioorg Med Chem **5**:497-500.
72. **Henrissat, B.** 1990. Weak sequence homologies among chitinases detected by clustering analysis. Protein Seq Data Anal **3**:523-6.
73. **Henrissat, B., and A. Bairoch.** 1993. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. Biochem J **293 ( Pt 3)**:781-8.
74. **Henrissat, B., and A. Bairoch.** 1996. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. Biochem J **316 ( Pt 2)**:695-6.
75. **Henrissat, B., M. Claeyssens, P. Tomme, L. Lemesle, and J. P. Mornon.** 1989. Cellulase families revealed by hydrophobic cluster analysis. Gene **81**:83-95.

76. **Henrissat, B., and G. Davies.** 1997. Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Curr Opin Struct Biol* **7**:637-44.
77. **Hershfield, M. S., and N. G. Nossal.** 1972. Hydrolysis of template and newly synthesized deoxyribonucleic acid by the 3' to 5' exonuclease activity of the T4 deoxyribonucleic acid polymerase. *J Biol Chem* **247**:3393-404.
78. **Holm, L., and C. Sander.** 1993. Protein structure comparison by alignment of distance matrices. *J Mol Biol* **233**:123-38.
79. **Hoof, R. W., G. Vriend, C. Sander, and E. E. Abola.** 1996. Errors in protein structures. *Nature* **381**:272.
80. **Hooper, N. M., and A. Bashir.** 1991. Glycosyl-phosphatidylinositol-anchored membrane proteins can be distinguished from transmembrane polypeptide-anchored proteins by differential solubilization and temperature-induced phase separation in Triton X-114. *Biochem J* **280 ( Pt 3)**:745-51.
81. **Hotte, B., I. Rath-Arnold, A. Puhler, and R. Simon.** 1990. Cloning and analysis of a 35.3-kilobase DNA region involved in exopolysaccharide production by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *J Bacteriol* **172**:2804-7.
82. **Hu, Y., L. Chen, S. Ha, B. Gross, B. Falcone, D. Walker, M. Mokhtarzadeh, and S. Walker.** 2003. Crystal structure of the MurG:UDP-GlcNAc complex reveals common structural principles of a superfamily of glycosyltransferases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:845-9.
83. **Hu, Y., and S. Walker.** 2002. Remarkable structural similarities between diverse glycosyltransferases. *Chem Biol* **9**:1287-96.
84. **Huang, S., Heu Chen Lee, and R. M. Mayers.** 1979. The purification and properties of dextransucrase from *Streptococcus sanguis* ATCC 10558. *Carbohydrate Research* **74**:287-300.
85. **Ielpi, L., R. Couso, and M. Dankert.** 1981. Lipid-linked intermediates in the biosynthesis of xanthan gum. *Febs Letters* **130**:253-6.
86. **Ielpi, L., R. O. Couso, and M. A. Dankert.** 1993. Sequential assembly and polymerization of the polyprenol-linked pentasaccharide repeating unit of the xanthan polysaccharide in *Xanthomonas campestris*. *Journal of Bacteriology* **175**:2490-500.
87. **Ielpi, L., T. Dylan, G. S. Ditta, D. R. Helinski, and S. W. Stanfield.** 1990. The ndvB locus of *Rhizobium meliloti* encodes a 319-kDa protein involved in the production of beta-(1----2)-glucan. *J Biol Chem* **265**:2843-51.
88. **Ishida, T., Y. Sugano, and M. Shoda.** 2002. Novel glycosyltransferase genes involved in the acetan biosynthesis of *Acetobacter xylinum*. *Biochem Biophys Res Commun* **295**:230-5.
89. **Jansson, P. E., L. Kenne, and B. Lindberg.** 1975. Structure of extracellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*. *Carbohydr Res* **45**:275-82.
90. **Josse, J., and A. Kornberg.** 1962. Glucosylation of deoxyribonucleic acid. III. alpha- and beta-Glucosyl transferases from T4-infected *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **237**:1968-76.
91. **Jungmann, J., and S. Munro.** 1998. Multi-protein complexes in the cis Golgi of *Saccharomyces cerevisiae* with alpha-1,6-mannosyltransferase activity. *Embo J* **17**:423-34.
92. **Kadmas, J. L., D. Allaway, R. E. Studholme, J. T. Sullivan, C. W. Ronson, P. S. Poole, and C. R. Raetz.** 1998. Cloning and overexpression of glycosyltransferases that generate the lipopolysaccharide core of *Rhizobium leguminosarum*. *J Biol Chem* **273**:26432-40.
93. **Kakuda, S., T. Shiba, M. Ishiguro, H. Tagawa, S. Oka, Y. Kajihara, T. Kawasaki, S. Wakatsuki, and R. Kato.** 2004. Structural basis for acceptor substrate recognition of a human glucuronyltransferase, GlcAT-P, an enzyme critical in the biosynthesis of the carbohydrate epitope HNK-1. *J Biol Chem* **279**:22693-703.
94. **Kapitonov, D., and R. K. Yu.** 1999. Conserved domains of glycosyltransferases. *Glycobiology* **9**:961-78.

95. **Katzen, F., D. U. Ferreira, C. G. Oddo, M. V. Ielmini, A. Becker, A. Puhler, and L. Ielpi.** 1998. Xanthomonas campestris pv. campestris gum mutants: effects on xanthan biosynthesis and plant virulence. *Journal of Bacteriology* **180**:1607-17.
96. **Kelley, L. A., R. M. MacCallum, and M. J. Sternberg.** 2000. Enhanced genome annotation using structural profiles in the program 3D-PSSM. *J Mol Biol* **299**:499-520.
97. **Khorana, H.** 1953. The chemistry of carbodiimides. *Chem. Rev.* **53**:145-166.
98. **Kido, N., V. I. Torgov, T. Sugiyama, K. Uchiya, H. Sugihara, T. Komatsu, N. Kato, and K. Jann.** 1995. Expression of the O9 polysaccharide of Escherichia coli: sequencing of the E. coli O9 rfb gene cluster, characterization of mannosyl transferases, and evidence for an ATP-binding cassette transport system. *J Bacteriol* **177**:2178-87.
99. **Kikuchi, N., Y. D. Kwon, M. Gotoh, and H. Narimatsu.** 2003. Comparison of glycosyltransferase families using the profile hidden Markov model. *Biochem Biophys Res Commun* **310**:574-9.
100. **Kim, S. C., A. N. Singh, and F. M. Raushel.** 1988. Analysis of the galactosyltransferase reaction by positional isotope exchange and secondary deuterium isotope effects. *Arch Biochem Biophys* **267**:54-9.
101. **Kim, S. C., A. N. Singh, and F. M. Raushel.** 1988. The mechanism of glycogen synthetase as determined by deuterium isotope effects and positional isotope exchange experiments. *J Biol Chem* **263**:10151-4.
102. **Kordulakova, J., M. Gilleron, K. Mikusova, G. Puzo, P. J. Brennan, B. Gicquel, and M. Jackson.** 2002. Definition of the first mannosylation step in phosphatidylinositol mannoside synthesis. PimA is essential for growth of mycobacteria. *J Biol Chem* **277**:31335-44.
103. **Kovach, M. E., P. H. Elzer, D. S. Hill, G. T. Robertson, M. A. Farris, R. M. Roop, 2nd, and K. M. Peterson.** 1995. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**:175-6.
104. **Kremer, L., S. S. Gurcha, P. Bifani, P. G. Hitchen, A. Baulard, H. R. Morris, A. Dell, P. J. Brennan, and G. S. Besra.** 2002. Characterization of a putative alpha-mannosyltransferase involved in phosphatidylinositol trimannoside biosynthesis in Mycobacterium tuberculosis. *Biochem J* **363**:437-47.
105. **Lairson, L. L., C. P. Chiu, H. D. Ly, S. He, W. W. Wakarchuk, N. C. Strynadka, and S. G. Withers.** 2004. Intermediate trapping on a mutant retaining alpha-galactosyltransferase identifies an unexpected aspartate residue. *J Biol Chem* **279**:28339-44.
106. **Lariviere, L., V. Gueguen-Chaignon, and S. Morera.** 2003. Crystal structures of the T4 phage beta-glucosyltransferase and the D100A mutant in complex with UDP-glucose: glucose binding and identification of the catalytic base for a direct displacement mechanism. *J Mol Biol* **330**:1077-86.
107. **Leigh, J. A., and D. L. Coplin.** 1992. Exopolysaccharides in plant-bacterial interactions. *Annual Review of Microbiology* **46**:307-46.
108. **Leigh, J. A., J. W. Reed, J. F. Hanks, A. M. Hirsch, and G. C. Walker.** 1987. Rhizobium meliloti mutants that fail to succinylate their calcofluor-binding exopolysaccharide are defective in nodule invasion. *Cell* **51**:579-87.
109. **Leigh, J. A., and G. C. Walker.** 1994. Exopolysaccharides of Rhizobium: synthesis, regulation and symbiotic function. *Trends Genet* **10**:63-7.
110. **Lellouch, A. C., G. M. Watt, R. A. Geremia, and S. L. Flitsch.** 2000. Phytanylpiphosphate-linked substrate for a bacterial alpha-mannosyltransferase. *Biochem Biophys Res Commun* **272**:290-2.
111. **Lemesle-Varloot, L., B. Henrissat, C. Gaboriaud, V. Bissery, A. Morgat, and J. P. Mornon.** 1990. Hydrophobic cluster analysis: procedures to derive structural and functional information from 2-D-representation of protein sequences. *Biochimie* **72**:555-74.
112. **Lesk, A. M.** 1995. NAD-binding domains of dehydrogenases. *Curr Opin Struct Biol* **5**:775-83.

113. **Li, L., P. Storm, O. P. Karlsson, S. Berg, and A. Wieslander.** 2003. Irreversible binding and activity control of the 1,2-diacylglycerol 3-glucosyltransferase from *Acholeplasma laidlawii* at an anionic lipid bilayer surface. *Biochemistry* **42**:9677-86.
114. **Lin, K., V. L. Rath, S. C. Dai, R. J. Fletterick, and P. K. Hwang.** 1996. A protein phosphorylation switch at the conserved allosteric site in GP. *Science* **273**:1539-42.
115. **Lis, M., and H. K. Kuramitsu.** 2003. The Stress-Responsive *dgk* Gene from *Streptococcus mutans* Encodes a Putative Undecaprenol Kinase Activity. *Infect. Immun.* **71**:1938-1943.
116. **Liu, D., A. M. Haase, L. Lindqvist, A. A. Lindberg, and P. R. Reeves.** 1993. Glycosyl transferases of O-antigen biosynthesis in *Salmonella enterica*: identification and characterization of transferase genes of groups B, C2, and E1. *J Bacteriol* **175**:3408-13.
117. **Liu, J., and A. Mushegian.** 2003. Three monophyletic superfamilies account for the majority of the known glycosyltransferases. *Protein Sci* **12**:1418-31.
118. **Lobsanov, Y. D., P. A. Romero, B. Sleno, B. Yu, P. Yip, A. Herscovics, and P. L. Howell.** 2004. Structure of Kre2p/Mnt1p: a yeast alpha1,2-mannosyltransferase involved in mannoprotein biosynthesis. *J Biol Chem* **279**:17921-31.
119. **Long, S., J. W. Reed, J. Himawan, and G. C. Walker.** 1988. Genetic analysis of a cluster of genes required for synthesis of the calcofluor-binding exopolysaccharide of *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **170**:4239-48.
120. **Ly, H. D., B. Loughed, W. W. Wakarchuk, and S. G. Withers.** 2002. Mechanistic studies of a retaining alpha-galactosyltransferase from *Neisseria meningitidis*. *Biochemistry* **41**:5075-85.
121. **Mankowski, T., W. Sasak, E. Janczura, and T. Chojnacki.** 1977. Specificity of polyprenyl phosphates in the in vitro formation of lipid-linked sugars. *Arch Biochem Biophys* **181**:393-401.
122. **Martin, J. L., L. N. Johnson, and S. G. Withers.** 1990. Comparison of the binding of glucose and glucose 1-phosphate derivatives to T-state glycogen phosphorylase b. *Biochemistry* **29**:10745-57.
123. **Martin-Blanco, E., and A. Garcia-Bellido.** 1996. Mutations in the rotated abdomen locus affect muscle development and reveal an intrinsic asymmetry in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:6048-52.
124. **McCarter, J. D., and S. G. Withers.** 1994. Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. *Curr Opin Struct Biol* **4**:885-92.
125. **McGrath, B. C., and M. J. Osborn.** 1991. Localization of the terminal steps of O-antigen synthesis in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **173**:649-54.
126. **McIntire, F. C., W. H. Peterson, and A. J. Riker.** 1942. A POLYSACCHARIDE PRODUCED BY THE CROWN-GALL ORGANISM. *J. Biol. Chem.* **143**:491-496.
127. **Miller, J.** 1992. A short course in bacterial genetics: a laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria, Cold Spring Harbor, N.Y.
128. **Miller, K. J., R. S. Gore, and A. J. Benesi.** 1988. Phosphoglycerol substituents present on the cyclic beta-1,2-glucans of *Rhizobium meliloti* 1021 are derived from phosphatidylglycerol. *J Bacteriol* **170**:4569-75.
129. **Mitchell, E. P., S. G. Withers, P. Ermert, A. T. Vasella, E. F. Garman, N. G. Oikonomakos, and L. N. Johnson.** 1996. Ternary complex crystal structures of glycogen phosphorylase with the transition state analogue nojirimycin tetrazole and phosphate in the T and R states. *Biochemistry* **35**:7341-55.
130. **Monchois, V., Willemot, RM, Rемаud-Simeon, M, Croux, C, Monsan, P.** 1996. Cloning and sequencing of a gene coding for a novel dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 synthesizing only alpha (1-6) and alpha (1-3) linkages. *Gene* **182**:23-32.
131. **Morera, S., A. Imberty, U. Aschke-Sonnenborn, W. Ruger, and P. S. Freemont.** 1999. T4 phage beta-glucosyltransferase: substrate binding and proposed catalytic mechanism. *J Mol Biol* **292**:717-30.

132. **Morera, S., L. Lariviere, J. Kurzeck, U. Aschke-Sonnenborn, P. S. Freemont, J. Janin, and W. Ruger.** 2001. High resolution crystal structures of T4 phage beta-glucosyltransferase: induced fit and effect of substrate and metal binding. *J Mol Biol* **311**:569-77.
133. **Morrison, D. A.** 1977. Transformation in *Escherichia coli*: cryogenic preservation of competent cells. *J Bacteriol* **132**:349-51.
134. **Mulichak, A. M., H. C. Losey, W. Lu, Z. Wawrzak, C. T. Walsh, and R. M. Garavito.** 2003. Structure of the TDP-epi-vancosaminyltransferase GtfA from the chloroeremomycin biosynthetic pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:9238-43.
135. **Mulichak, A. M., H. C. Losey, C. T. Walsh, and R. M. Garavito.** 2001. Structure of the UDP-glucosyltransferase GtfB that modifies the heptapeptide aglycone in the biosynthesis of vancomycin group antibiotics. *Structure (Camb)* **9**:547-57.
136. **Mulichak, A. M., W. Lu, H. C. Losey, C. T. Walsh, and R. M. Garavito.** 2004. Crystal structure of vancosaminyltransferase GtfD from the vancomycin biosynthetic pathway: interactions with acceptor and nucleotide ligands. *Biochemistry* **43**:5170-80.
137. **Murray, B. W., V. Wittmann, M. D. Burkart, S. C. Hung, and C. H. Wong.** 1997. Mechanism of human alpha-1,3-fucosyltransferase V: glycosidic cleavage occurs prior to nucleophilic attack. *Biochemistry* **36**:823-31.
138. **O'Reilly, M., K. A. Watson, R. Schinzel, D. Palm, and L. N. Johnson.** 1997. Oligosaccharide substrate binding in *Escherichia coli* maltodextrin phosphorylase. *Nat Struct Biol* **4**:405-12.
139. **Osborn, M. J., and R. Y. Tze-Yuen.** 1968. Biosynthesis of bacterial lipopolysaccharide. VII. Enzymatic formation of the first intermediate in biosynthesis of the O-antigen of *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem* **243**:5145-52.
140. **Patenaude, S. I., N. O. Seto, S. N. Borisova, A. Szpacenko, S. L. Marcus, M. M. Palcic, and S. V. Evans.** 2002. The structural basis for specificity in human ABO(H) blood group biosynthesis. *Nat Struct Biol* **9**:685-90.
141. **Paulsen, I. T., A. M. Beness, and M. H. Saier.** 1997. Computer-based analyses of the protein constituents of transport systems catalysing export of complex carbohydrates in bacteria. *Microbiology (Reading, England)* **143 ( Pt 8)**:2685-99.
142. **Pedersen, L. C., J. Dong, F. Taniguchi, H. Kitagawa, J. M. Krahn, L. G. Pedersen, K. Sugahara, and M. Negishi.** 2003. Crystal structure of an alpha 1,4-N-acetylhexosaminyltransferase (EXTL2), a member of the exostosin gene family involved in heparan sulfate biosynthesis. *J Biol Chem* **278**:14420-8.
143. **Pedersen, L. C., K. Tsuchida, H. Kitagawa, K. Sugahara, T. A. Darden, and M. Negishi.** 2000. Heparan/chondroitin sulfate biosynthesis. Structure and mechanism of human glucuronyltransferase I. *J Biol Chem* **275**:34580-5.
144. **Persson, K., H. D. Ly, M. Dieckelmann, W. W. Wakarchuk, S. G. Withers, and N. C. Strynadka.** 2001. Crystal structure of the retaining galactosyltransferase LgtC from *Neisseria meningitidis* in complex with donor and acceptor sugar analogs. *Nat Struct Biol* **8**:166-75.
145. **Petroni, E. A., S. N. Bocca, and L. Ielpi.** 1996. Sequence-specific DNA modification in *Acetobacter xylinum*. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **42**:759-67.
146. **Petroni, E. A., and L. Ielpi.** 1996. Isolation and nucleotide sequence of the GDP-mannose:cellobiosyl-diphosphopolyprenol alpha-mannosyltransferase gene from *Acetobacter xylinum*. *J Bacteriol* **178**:4814-21.
147. **Qiao, L., Murray, BW, Shimazaki, M, Schultz, J and Wong, CH.** 1996. Synergistic inhibition of human alpha-1,3-fucosyltransferase V. *Journal of the American Chemical Society* **118**:7653-7662.
148. **Quiros, L. M., R. J. Carbajo, A. F. Brana, and J. A. Salas.** 2000. Glycosylation of macrolide antibiotics. Purification and kinetic studies of a macrolide glycosyltransferase from *Streptomyces antibioticus*. *J Biol Chem* **275**:11713-20.
149. **Ramsey, D. M., and D. J. Wozniak.** 2005. Understanding the control of *Pseudomonas aeruginosa* alginate synthesis and the prospects for management of chronic infections in cystic fibrosis. *Mol Microbiol* **56**:309-22.

150. **Rath, V. L., M. Ammirati, D. E. Danley, J. L. Ekstrom, E. M. Gibbs, T. R. Hynes, A. M. Mathiowetz, R. K. McPherson, T. V. Olson, J. L. Treadway, and D. J. Hoover.** 2000. Human liver glycogen phosphorylase inhibitors bind at a new allosteric site. *Chem Biol* **7**:677-82.
151. **Reeves, P. R., M. Hobbs, M. A. Valvano, M. Skurnik, C. Whitfield, D. Coplin, N. Kido, J. Klena, D. Maskell, C. R. Raetz, and P. D. Rick.** 1996. Bacterial polysaccharide synthesis and gene nomenclature. *Trends in Microbiology* **4**:495-503.
152. **Reuber, T. L., and G. C. Walker.** 1993. The acetyl substituent of succinoglycan is not necessary for alfalfa nodule invasion by *Rhizobium meliloti* Rm1021. *J Bacteriol* **175**:3653-5.
153. **Reuber, T. L., and G. C. Walker.** 1993. Biosynthesis of succinoglycan, a symbiotically important exopolysaccharide of *Rhizobium meliloti*. *Cell* **74**:269-80.
154. **Ross, P., R. Mayer, and M. Benziman.** 1991. Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiol Rev* **55**:35-58.
155. **Rossmann, M. G., D. Moras, and K. W. Olsen.** 1974. Chemical and biological evolution of nucleotide-binding protein. *Nature* **250**:194-9.
156. **Rush, J. S., P. D. Rick, and C. J. Waechter.** 1997. Polyisoprenyl phosphate specificity of UDP-GlcNAc:undecaprenyl phosphate N-acetylglucosaminyl 1-P transferase from *E. coli*. *Glycobiology* **7**:315-22.
157. **Sambrook, J., Fritsch, EF and Maniatis, T.** 1989. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed. ed, Cold Spring Harbor, N.Y.
158. **Sandermann, H., Jr., and J. L. Strominger.** 1972. Purification and Properties of C55-Isoprenoid Alcohol Phosphokinase from *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* **247**:5123-5131.
159. **Saxena, I. M., R. M. Brown, Jr., M. Fevre, R. A. Geremia, and B. Henrissat.** 1995. Multidomain architecture of beta-glycosyl transferases: implications for mechanism of action. *J Bacteriol* **177**:1419-24.
160. **Sears, P., and C. H. Wong.** 2001. Toward automated synthesis of oligosaccharides and glycoproteins. *Science* **291**:2344-50.
161. **Semino, C. E., and M. A. Dankert.** 1993. In vitro biosynthesis of acetan using electroporated *Acetobacter xylinum* cells as enzyme preparations. *J Gen Microbiol* **139**:2745-56.
162. **Seto, N. O., C. A. Compston, S. V. Evans, D. R. Bundle, S. A. Narang, and M. M. Palcic.** 1999. Donor substrate specificity of recombinant human blood group A, B and hybrid A/B glycosyltransferases expressed in *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* **259**:770-5.
163. **Simon, R.** 1984. High frequency mobilization of gram-negative bacterial replicons by the in vitro constructed Tn5-Mob transposon. *Mol Gen Genet* **196**:413-20.
164. **Simon, R., Priefer, U and Puhler, A.** 1984. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Bio/Technology* **1**:784-791.
165. **Singer, M. A., and S. Lindquist.** 1998. Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the Yin and Yang of trehalose. *Trends Biotechnol* **16**:460-8.
166. **Singh, A. N., L. S. Hester, and F. M. Raushel.** 1987. Examination of the mechanism of sucrose synthetase by positional isotope exchange. *J Biol Chem* **262**:2554-7.
167. **Sinnott, M.** 1990. Catalytic Mechanism of Enzymic Glycosyl Transfer. *Chemical Reviews* **90**:1171-1202.
168. **Sipl, M. J., and H. Flockner.** 1996. Threading thrills and threats. *Structure* **4**:15-9.
169. **Sommer, U., H. Liu, and T. L. Doering.** 2003. An alpha-1,3-mannosyltransferase of *Cryptococcus neoformans*. *J Biol Chem* **278**:47724-30.
170. **Spiro, R. G.** 2002. Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology* **12**:43R-56R.
171. **Stragier, P., and R. Losick.** 1996. Molecular genetics of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Annu Rev Genet* **30**:297-41.

172. **Strahl-Bolsinger, S., T. Immervoll, R. Deutzmann, and W. Tanner.** 1993. PMT1, the gene for a key enzyme of protein O-glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:8164-8.
173. **Sutherland, I. W.** 1985. Biosynthesis and composition of gram-negative bacterial extracellular and wall polysaccharides. *Annual Review of Microbiology* **39**:243-70.
174. **Sutherland, I. W.** 1982. Biosynthesis of microbial exopolysaccharides. *Advances in Microbial Physiology* **23**:79-150.
175. **Sutherland, I. W.** 1998. Novel and established applications of microbial polysaccharides. *Trends in Biotechnology* **16**:41-6.
176. **Takayama, S., S. J. Chung, Y. Igarashi, Y. Ichikawa, A. Sepp, R. I. Lechler, J. Wu, T. Hayashi, G. Siuzdak, and C. H. Wong.** 1999. Selective inhibition of beta-1,4- and alpha-1,3-galactosyltransferases: donor sugar-nucleotide based approach. *Bioorg Med Chem* **7**:401-9.
177. **Tarbouriech, N., S. J. Charnock, and G. J. Davies.** 2001. Three-dimensional structures of the Mn and Mg dTDP complexes of the family GT-2 glycosyltransferase SpsA: a comparison with related NDP-sugar glycosyltransferases. *J Mol Biol* **314**:655-61.
178. **Thorne, L., L. Tansey, and T. J. Pollock.** 1987. Clustering of mutations blocking synthesis of zanthan gum by *Xanthomonas campestris*. *J Bacteriol* **169**:3593-3600.
179. **Tomita, S., N. Inoue, Y. Maeda, K. Ohishi, J. Takeda, and T. Kinoshita.** 1998. A homologue of *Saccharomyces cerevisiae* Dpmlp is not sufficient for synthesis of dolichol-phosphate-mannose in mammalian cells. *J Biol Chem* **273**:9249-54.
180. **Troy, F. A., 2nd.** 1992. Polysialylation: from bacteria to brains. *Glycobiology* **2**:5-23.
181. **Troy, F. A., F. E. Frerman, and E. C. Heath.** 1971. The biosynthesis of capsular polysaccharide in *Aerobacter aerogenes*. *J Biol Chem* **246**:118-33.
182. **Uitdehaag, J. C., R. Mosi, K. H. Kalk, B. A. van der Veen, L. Dijkhuizen, S. G. Withers, and B. W. Dijkstra.** 1999. X-ray structures along the reaction pathway of cyclodextrin glycosyltransferase elucidate catalysis in the alpha-amylase family. *Nat Struct Biol* **6**:432-6.
183. **Unligil, U. M., and J. M. Rini.** 2000. Glycosyltransferase structure and mechanism. *Curr Opin Struct Biol* **10**:510-7.
184. **Unligil, U. M., S. Zhou, S. Yuwaraj, M. Sarkar, H. Schachter, and J. M. Rini.** 2000. X-ray crystal structure of rabbit N-acetylglucosaminyltransferase I: catalytic mechanism and a new protein superfamily. *Embo J* **19**:5269-80.
185. **Valla, S., D. H. Coucheron, and J. Kjosbakken.** 1987. The plasmids of *Acetobacter xylinum* and their interaction with the host chromosome. *Mol Gen Genet* **208**:76-83.
186. **Valtersson, C., G. van Duyn, A. J. Verkleij, T. Chojnacki, B. de Kruijff, and G. Dallner.** 1985. The influence of dolichol, dolichol esters, and dolichyl phosphate on phospholipid polymorphism and fluidity in model membranes. *J Biol Chem* **260**:2742-51.
187. **van Kranenburg, R., I. C. Boels, M. Kleerebezem, and W. M. de Vos.** 1999. Genetics and engineering of microbial exopolysaccharides for food: approaches for the production of existing and novel polysaccharides. *Curr Opin Biotechnol* **10**:498-504.
188. **Vieira, J., and J. Messing.** 1982. The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* **19**:259-68.
189. **Vocadlo, D. J., G. J. Davies, R. Laine, and S. G. Withers.** 2001. Catalysis by hen egg-white lysozyme proceeds via a covalent intermediate. *Nature* **412**:835-8.
190. **Vrielink, A., W. Ruger, H. P. Driessen, and P. S. Freemont.** 1994. Crystal structure of the DNA modifying enzyme beta-glycosyltransferase in the presence and absence of the substrate uridine diphosphoglucose. *Embo J* **13**:3413-22.
191. **Watts, A. G., I. Damager, M. L. Amaya, A. Buschiazzo, P. Alzari, A. C. Frasch, and S. G. Withers.** 2003. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase operates through a covalent sialyl-enzyme intermediate: tyrosine is the catalytic nucleophile. *J Am Chem Soc* **125**:7532-3.



192. **Weiner, I. M., T. Higuchi, L. Rothfield, M. Saltmarsh-Andrew, M. J. Osborn, and B. L. Horecker.** 1965. Biosynthesis of bacterial lipopolysaccharide. V. Lipid-linked intermediates in the biosynthesis of the O-antigen groups of *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **54**:228-35.
193. **Whitfield, C.** 1988. Bacterial extracellular polysaccharides. *Canadian Journal of Microbiology* **34**:415-20.
194. **Whitfield, C., and A. Paiment.** 2003. Biosynthesis and assembly of Group 1 capsular polysaccharides in *Escherichia coli* and related extracellular polysaccharides in other bacteria. *Carbohydrate Research* **338**:2491-502.
195. **Whitfield, C., and M. A. Valvano.** 1993. Biosynthesis and expression of cell-surface polysaccharides in gram-negative bacteria. *Advances in Microbial Physiology* **35**:135-246.
196. **Wiggins, C. A., and S. Munro.** 1998. Activity of the yeast MNN1 alpha-1,3-mannosyltransferase requires a motif conserved in many other families of glycosyltransferases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:7945-50.
197. **Wrabl, J. O., and N. V. Grishin.** 2001. Homology between O-linked GlcNAc transferases and proteins of the glycogen phosphorylase superfamily. *J Mol Biol* **314**:365-74.
198. **Wright, A., M. Dankert, and P. W. Robbins.** 1965. Evidence for an intermediate stage in the biosynthesis of the *Salmonella* O-antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* **54**:235-41.
199. **Yep, A., M. A. Ballicora, M. N. Sivak, and J. Preiss.** 2004. Identification and characterization of a critical region in the glycogen synthase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **279**:8359-67.
200. **Yip, C. L., S. K. Welch, F. Klebl, T. Gilbert, P. Seidel, F. J. Grant, P. J. O'Hara, and V. L. MacKay.** 1994. Cloning and analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* MNN9 and MNN1 genes required for complex glycosylation of secreted proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:2723-7.
201. **Yoko-o, T., K. Tsukahara, T. Watanabe, N. Hata-Sugi, K. Yoshimatsu, T. Nagasu, and Y. Jigami.** 2001. *Schizosaccharomyces pombe* och1(+) encodes alpha-1,6-mannosyltransferase that is involved in outer chain elongation of N-linked oligosaccharides. *FEBS Lett* **489**:75-80.
202. **Zechel, D. L., and S. G. Withers.** 2000. Glycosidase mechanisms: anatomy of a finely tuned catalyst. *Acc Chem Res* **33**:11-8.
203. **Zevenhuizen, L. P. T. M., and A. R. W. van Neerven.** 1983. (1-->2)-[beta]-glucan and acidic oligosaccharides produced by *Rhizobium meliloti*. *Carbohydrate Research* **118**:127-134.
204. **Zhang, Y., P. G. Wang, and K. Brew.** 2001. Specificity and mechanism of metal ion activation in UDP-galactose:beta -galactoside-alpha -1,3-galactosyltransferase. *J Biol Chem* **276**:11567-74.
205. **Zhang, Z., S. Kochhar, and M. Grigorov.** 2003. Exploring the sequence-structure protein landscape in the glycosyltransferase family. *Protein Sci* **12**:2291-302.
206. **Zhou, G. P., and F. A. Troy, 2nd.** 2003. Characterization by NMR and molecular modeling of the binding of polyisoprenols and polyisoprenyl recognition sequence peptides: 3D structure of the complexes reveals sites of specific interactions. *Glycobiology* **13**:51-71.
207. **Zorreguieta, A., R. A. Geremia, S. Cavaignac, G. A. Cangelosi, E. W. Nester, and R. A. Ugalde.** 1988. Identification of the product of an *Agrobacterium tumefaciens* chromosomal virulence gene. *Mol Plant Microbe Interact* **1**:121-7.