

Tesis Doctoral

Caracterización bioquímica y estructural de glicosiltransferasas bacterianas

Salinas, Silvina R.

2013-06-19

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Salinas, Silvina R.. (2013-06-19). Caracterización bioquímica y estructural de glicosiltransferasas bacterianas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Salinas, Silvina R.. "Caracterización bioquímica y estructural de glicosiltransferasas bacterianas". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2013-06-19.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

Caracterización bioquímica y estructural de glicosiltransferasas bacterianas

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el
área de Química Biológica.

Lic. Silvina R. Salinas

Director de Tesis: Dr. Luis Ielpi

Consejero de estudios: Dr. Luis Ielpi

Lugar de trabajo: Fundación Instituto Leloir

Buenos Aires, 2013

Caracterización bioquímica y estructural de glicosiltransferasas bacterianas

1. Resumen

Los polisacáridos juegan un papel esencial en el metabolismo celular y en el funcionamiento de los organismos. Son sintetizados empleando enzimas glicosiltransferasas (GTs), cuyas propiedades determinan el tamaño y la estructura del producto final. Muchas GTs están localizadas en membranas celulares, dificultando su purificación y caracterización. En este trabajo de Tesis se estudian bioquímicamente y biofísicamente dos GTs que participan en la síntesis del polisacárido xantano producido por *Xanthomonas campestris*.

La primer GT es GumI, de la cual sólo había escasos antecedentes genéticos. En esta Tesis se presenta la primera caracterización bioquímica y funcional de GumI, demostrando su actividad glicosiltransferasa previamente propuesta. Se realizaron ensayos de complementación funcional, demostrando su actividad manosiltransferasa *in vivo*. Además, se demostró que GumI está unida a la membrana, y que la interacción está mediada por interacciones hidrofóbicas y electrostáticas. GumI fue purificada y su actividad fue estudiada *in vitro*, obteniéndose los parámetros óptimos de reacción. GumI dio origen a una nueva familia, GT-94, en la clasificación Carbohydrate Active EnZymes. Finalmente, mediante ensayos de cristalización se obtuvieron agujas bidimensionales que al presente no fueron aptas para resolver la estructura de GumI por cristalografía de rayos-X.

La segunda GT es GumK, cuya estructura cristalina se resolvió en el laboratorio y, como GumI, es una GT monotópica de membrana. Se profundizó sobre las bases moleculares de la unión a sus sustratos y a la membrana. Se realizaron diferentes mutaciones sobre la zona propuesta de unión a la membrana, demostrando la complejidad de dicha interacción. Además, se realizaron estudios por simulación computacional con el fin de obtener la estructura del complejo GumK/UDP-GlcA. El modelo obtenido explicaría la especificidad por este sustrato. Estudios realizados en este trabajo mediante diversas técnicas -tales como proteólisis limitada, fluorescencia, dicroísmo circular, calorimetría isotérmica de titulación, resonancia magnética nuclear y dispersión de rayos-X a bajo ángulo- sugieren fuertemente la presencia de cambios conformacionales disparados por la unión de UDP-GlcA.

Palabras claves: glicosiltransferasas, xantano, GumK, GumI, *Xanthomonas campestris*, cambios conformacionales, proteínas de membrana.

Biochemical and structural characterization of bacterial glycosyltransferases

2. Abstract

Polysaccharides, which play a crucial role in cellular metabolism and in the performance of organisms, are synthesized by glycosyltransferase (GT) enzymes, whose properties determine the size and structure of the final product. Many GTs are localized in cellular membranes, difficulting their purification and characterization. In this Thesis, two GTs (GumI and GumK) which participate in the synthesis of the polysaccharide xanthan produced by *Xanthomonas campestris* were studied biochemically and biophysically.

The genetic background data on GumI is limited. This Thesis reports the first functional and biochemical characterization of GumI, demonstrating its previously proposed glycosyltransferase activity. Functional complementation demonstrated its *in vivo* mannosyltransferase activity. Results also show that GumI is a membrane-associated protein, and that the interaction is mediated by hydrophobic and electrostatic forces. GumI was purified and its activity was studied *in vitro*, obtaining optimal reaction parameters. Finally, crystallization experiments allowed obtaining bidimensional needles, which were not suitable to resolve GumI structure by X-ray crystallography.

GumK, whose structure was resolved in the laboratory, is a monotopic GT, like GumI. This Thesis deepened on the molecular basis of the binding to its substrate and the membrane. Mutagenesis of residues of the region proposed for membrane binding was performed, resulting in no-soluble protein and thus demonstrating the complexity of membrane interaction. Moreover, computational simulation studies were carried out with the aim to obtain a model of the GumK/UDP-GlcA structure. The model obtained may explain the GumK specificity for this substrate. Studies performed by various techniques, such as fluorescence, circular dichroism, isothermal titration calorimetry, nuclear magnetic resonance, and small-angle X-ray scattering, strongly suggest the presence of conformational changes in GumK triggered by the UDP-GlcA binding.

Keywords: glycosyltransferases, xanthan, GumK, GumI, *Xanthomonas campestris*, conformational changes, membrane proteins.

Agradecimientos

A **Luis Ielpi**, mi director de Tesis, por darme la oportunidad de crear en libertad y confiar en mis decisiones.

A la **FIL**, por hacer un poco más fácil las tareas burocráticas y ofrecer todo el equipamiento necesario para trabajar. Principalmente agradezco a biblioteca, mantenimiento y limpieza, que siempre han sido tan atentos y expeditivos con todo.

A compañeros de otros **laboratorios**, por compartir amarguras y también buenos momentos, por tirar ideas, ceder turnos, y más. Gracias a todos.

A todos los que pasaron por el HPLC y que tuve la oportunidad de compartir MUUUUCHO tiempo: **Gastón Mayol**, **Mariangeles González** y **Soledad Malori**. Especialmente para Sole, que ya me conoció en el “último tiempo” de la tesis, con todo lo que eso implica.

A **Marcelo Marti**, **Ariel Petruk** y **Diego Gauto**. Me enseñaron un montón, siempre con buena onda y principalmente con mucha seriedad para el trabajo. Sin duda fue la etapa más científicamente gratificante del doctorado. Gracias!

Al 207...se necesitan varios párrafos. Empecemos:

A los ex 207 más antiguos: **Patri**, **Maxi** y **Mati**, por ayudarme en mis comienzos en el lab y procurar siempre un ambiente ameno. Especialmente a Patri, por enseñarme tanto y siempre estar dispuesta a ayudarme. Mil gracias!

A los ex 207 más nuevos: **Carmen** y **Maru**, cuántos lindos momentos en el lab. Nunca se los dije, pero con ustedes empecé a ver más allá, existe otro mundo y otra forma de trabajar. Gracias!

A los actuales 207, los cuales dejo con mucha tristeza. Si todos pudieran trabajar en un ambiente como lo hicimos nosotros, sin duda todos amarían ir a trabajar. **Estela**, con el tiempo nos fuimos conociendo y generando una relación amena; agradezco tu ayuda y apoyo cotidiano. **Nico**, espero de corazón haberte ayudado y enseñado algo; gracias por tu buena onda de siempre. **Isa** y **Meli**, ¿qué se puede decir? Gracias (es poco, y no alcanza) por aguantarme y apoyarme siempre.

Al **207** (y **allegados**), fuera del lab207 (Carmen, Maru, Nico, Isa, Meli, George, Javi, Hernán, Pablo y por qué no Fedé!): uff! Sí, UFFF!!! Cuántos lindos momentos! Los más divertidos, los brindis, las comidas, las charlas, las risas, los secretos, las frases célebres, los papelones, y más... En conclusión, gracias por compartir la amistad de la forma más linda en el camino de la vida!!!

Al resto de mis amigos, por ser mis hermanos, qué, sin entender nada de lo que estuve haciendo este tiempo, me apoyaron y soportaron igual: **Carito**, infinitas gracias. Creo que debés ser de las únicas personas en este mundo que JAMÁS me juzgó. **Marcia** y **Esteban**, cuántos momentos compartidos, siempre en todo momento gracias por estar, y por dejarme compartir a esos dos hijos hermosos que tienen!. A aquél que me llamaba la “**bio-bio**”; dónde estés, gracias (esperáme con un asadito a leña). A **Gime**, por hacerme reír tanto con su pensamiento lateral hiper-desarrollado. A **Ger** y **Ro**, porque en el último tiempo se han convertido en hermanos en este camino de la vida (nos vemos en Córdoba eh!). A **Ro**, **Laurita**, **Ale**, **Vicky**, el resto del clan Waasman, y a los que seguro me estoy olvidando, por los lindos momentos compartidos.

A mi **familia** política, por aceptarme y por dejarme agrandar mi familia. Gracias.

A todos mis **abus** que no están, seres increíbles que vinieron a enseñar con el ejemplo lo que significa luchar.

A mi **hermano**, por ser mi amigo. Todo va a estar bien hermano mío, dejo esto como registro.

A mi **mamá**, a mi **papá** y a mi **abu**. Otro gran UFFF! Gracias por estar ahí, en todo momento, en todos lados. Gracias por enseñarme todo. Ninguna Universidad ni ningún título iguala lo aprendido en mi familia, y eso es lo único que importa. Gracias.

A **Pablo**: “le falta de acá, le sobra de allá, retocándolo, pero siempre juntos”. Es así nuestra historia, complementándonos, aguantándonos, ayudándonos, en fin, todo. Gracias en particular por aguantar mis frustraciones, por dejarme ser libre, por apuntalarme y apoyarme en pos de mi felicidad. Sin duda, esto sin vos no hubiese sido posible. Vamos por más gordi!

“Lo que no me mata, me hace más fuerte.”

(Friedrich W. Nietzsche)

“I weep for the future of science. Now if you'll excuse me, the latest issue of Batman is out.”

(Sheldon Cooper)

1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	2
3. ABREVIATURAS	9
4. INTRODUCCIÓN	11
4.1. RELEVANCIA DE GLICOSILTRANSFERASAS	11
4.2. CLASIFICACIÓN	11
4.2.i. <i>Estereoquímica e identidad de secuencia</i>	11
4.2.ii. <i>Mecanismos catalíticos</i>	12
4.2.iii. <i>Plegamientos</i>	12
4.3. SUPERFAMILIAS ESTRUCTURALES	13
4.3.i. <i>Superfamilia GT-A</i>	13
4.3.iii. <i>GT-C y GT-D</i>	17
4.4. APLICACIONES DE GLICOSILTRANSFERASAS.....	18
4.5. SÍNTESIS DEL POLISACÁRIDO XANTANO: GUMK Y GUMI	19
4.5.i. <i>Síntesis</i>	19
4.5.ii. <i>Antecedentes</i>	20
4.5.iii. <i>Caracterización de GumK</i>	21
4.6. PROTEÍNAS DE MEMBRANA	23
5. OBJETIVOS	25
5.1. OBJETIVOS GENERALES	25
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
6. MATERIALES Y MÉTODOS	26
6.1. MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS GENERALES	26
6.2. CEPAS Y PLÁSMIDOS	26
6.3. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO.....	27
6.4. SDS-PAGE E INMUNODETECCIÓN	28
6.5. CONSTRUCCIONES DE PLÁSMIDOS Y MUTAGÉNESIS.....	28
6.6. EXPRESIÓN Y EXTRACCIÓN CON DETERGENTES DE GUMI	30
6.7. PURIFICACIÓN DE GUMI	31
6.7.i. <i>Purificación GumI-His₆ (C-terminal)</i>	31
6.7.ii. <i>Extra-purificación</i>	31
6.7.iii. <i>Purificación GumI-His₆ (C-terminal) con n-dodecil-β-D-maltósido (DDM)</i>	32
6.7.iv. <i>Purificación GumI-His₆ (N-terminal)</i>	32
6.8. DISPERSIÓN DE LUZ ESTÁTICA (SLS)	32
6.9. ESPECTROMETRÍA DE MASA MALDI-TOF.....	32
6.10. PREPARACIÓN DE CÉLULAS PERMEABILIZADAS	32
6.11. PREPARACIÓN DE SUSTRATO.....	33
6.12. ENSAYOS DE ACTIVIDAD <i>IN VITRO</i>	33
6.13. CROMATOGRAFÍAS EN PAPEL Y EN CAPA DELGADA (CP Y TLC)	34
6.14. COMPLEMENTACIÓN FUNCIONAL <i>IN VIVO</i> (MEDICIÓN DE XANTANO)	35
6.15. FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR	35
6.16. HIDRÓLISIS DE NUCLEÓTIDOS AZÚCARES SIN ACEPTOR.....	35
6.16.i. <i>Hidrólisis de GDP-Man por GumI</i>	35
6.16.ii. <i>Hidrólisis de UDP-GlcA por GumK</i>	36
6.17. <i>Reacción en tándem de GumK y GumI</i>	36
6.18. EXTRACCIÓN CON CARBONATO Y TRITÓN X-114	36
6.19. TRATAMIENTO CON B-MANOSIDASA	37
6.20. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS.....	37
6.21. CRISTALOGÉNESIS	37
6.22. <i>SOAKINGS</i> CON LÍPIDOS	39
6.23. AGREGACIÓN POR PRESENCIA DE SUSTRATO: ABSORBANCIA A 350 NM	39
6.24. MODIFICACIÓN DEL PROTOCOLO ESTÁNDAR DE PURIFICACIÓN DE GUMK	39
6.25. <i>CROSS-LINKING</i> <i>IN VITRO</i>	39

6.26. SIMULACIÓN COMPUTACIONAL	40
6.26.i. <i>Dinámica Molecular</i>	40
6.26.ii. <i>Construcción de ligandos in silico</i>	41
6.27. DISPERSIÓN DE LUZ A BAJO ÁNGULO (SAXs)	42
6.28. PROTEÓLISIS LIMITADA	42
6.29. FLUORESCENCIA	43
6.29.i. <i>Espectros en presencia de sustratos</i>	43
6.29.ii. <i>Espectros en función de la temperatura</i>	43
6.30. DICROÍSMO CIRCULAR (CD)	43
6.30.i. <i>Espectros en presencia de sustratos</i>	43
6.30.ii. <i>Espectros en función de la temperatura</i>	44
6.31. DISPERSIÓN DE LUZ DINÁMICA (DLS)	44
6.32. CALORIMETRÍA ISOTÉRMICA DE TITULACIÓN (ITC)	44
6.33. RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)	45
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN – GumI	46
RESULTADOS	46
7.1. <i>Complementación funcional in vivo</i>	46
7.2. <i>Localización subcelular de GumI en Xc</i>	47
7.3. <i>Expresión heteróloga del marco abierto de lectura propuesto para gumI</i>	49
7.4. <i>Purificación de GumI</i>	50
7.5. <i>Caracterización de la proteína GumI-His₆ purificada</i>	51
7.6. <i>Actividad de GumI-His₆</i>	51
7.7. <i>Caracterización del producto</i>	53
7.8. <i>Especificidad de sustrato</i>	54
7.9. <i>Reacción en tándem GumK y GumI</i>	55
7.10. <i>Estudios estructurales: cristalogénesis</i>	56
7.11. <i>Identidad de secuencia</i>	60
7.12. <i>Modelado por homología</i>	62
DISCUSIÓN	64
7.13. <i>GumI es una β-manosiltransferasa</i>	64
7.14. <i>GumI es una proteína integral monotópica de membrana</i>	65
7.15. <i>Caracterización bioquímica de la actividad de GumI</i>	66
7.16. <i>Hacia la síntesis quimio-enzimática de polisacáridos</i>	68
7.17. <i>Cristalización de GumI</i>	68
7.18. <i>Homólogos de GumI</i>	69
7.18. <i>Modelo de la estructura de GumI</i>	70
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN – GumK	71
RESULTADOS	71
8.1. <i>Asociación de GumK a la membrana. Mutantes puntuales</i>	71
8.2. <i>Localización subcelular de las mutantes puntuales en X. campestris</i>	72
8.3. <i>Complementación funcional in vivo</i>	72
8.4. <i>Actividad de las proteínas mutantes puntuales in vitro</i>	73
8.5. <i>Asociación de GumK a la membrana. Mutantes por delección</i>	74
8.6. <i>Expresión y localización subcelular de mutantes por delección de GumK en X. campestris</i>	75
8.7. <i>Complementación in vivo y actividad in vitro</i>	75
8.8. <i>Dinámica de GumK. Simulación computacional</i>	76
8.9. <i>Construcción in silico del complejo GumK/UDP-GlcA</i>	79
8.10. <i>Dinámica Molecular con ligandos</i>	80
8.11. <i>Agregación por interacción con el sustrato</i>	83
8.12. <i>Proteólisis limitada</i>	84
8.13. <i>Estudios biofísicos de GumK en presencia de ligandos</i>	86
8.14. <i>Estabilidad Térmica</i>	90
8.15. <i>Calorimetría de titulación isotérmica (ITC)</i>	93
8.16. <i>Dispersión de rayos-X de bajo ángulo (SAXs)</i>	94
8.17. <i>Resonancia Magnética Nuclear (RMN)</i>	94

8.18. Unión al sustrato aceptor	95
8.19. Construcción del complejo ternario.	95
8.20. Dinámica Molecular del complejo ternario.....	97
DISCUSIÓN	99
8.21. Interacción de GumK con la membrana.....	99
8.22. Modelo de la localización de UDP-GlcA en GumK.....	101
8.23. La unión de UDP-GlcA dispara un cambio conformacional en GumK	102
8.24. Modelo del complejo ternario.....	108
9. CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS.....	109
10. BIBLIOGRAFÍA.....	112

3. Abreviaturas

Å	Amstrong
A ₂₈₀	Absorbancia a 280 nm
ADP	Adenina difosfato
<i>buffer</i>	Solución tampón
C ₃₅	Cadena carbonada de 35 átomos de carbono
C ₅₅	Cadena carbonada de 55 átomos de carbono
C-terminal	Extremo carboxilo terminal
CAZy	<i>Carbohydrate active enzymes</i>
CD	(<i>Circular dichroism</i>) Dicroísmo circular
Ci	Curie
CMC	Concentración micelar crítica
CP	Cromatografía en papel
Da	Dalton
DM	Dinámica molecular
DO ₆₀₀	Densidad óptica a 600 nm
dpm	Desintegraciones por minuto
EDTA	Ácido etilendiamino tetraacético
G+C	Guanina + Citosina
GalA	Ácido galacturónico
GDP	Guanosina difosfato
Glc ₂ -Man	Man- α -1,3-Glc- β -1,4-Glc- (=trisacárido)
Glc ₂ -Man-GlcA	GlcA- β -1,2-Man- α -1,3-Glc- β -1,4-Glc- (=tetrasacárido)
Glc ₂ -Man-GlcA-Man	Man- β -1,4-GlcA- β -1,2-Man- α -1,3-Glc- β -1,4-Glc- (=pentasacárido)
Glc	Glucosa
GlcA	Ácido glucurónico
GlcNAc	N-acetil glucosamina
GT/s	Glicosiltransferasa/s
HPLC	(<i>High performance liquid chromatography</i>) Cromatografía líquida de alta eficacia
IMAC	(<i>Immobilized metal affinity chromatography</i>) Cromatografía de afinidad por cationes divalentes
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
ITC	(<i>Isothermal titration calorimetry</i>) Calorimetría isotérmica de titulación

Lip	Lípido
Man	Manosa
N-terminal	Extremo amino terminal
PAGE	(<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i>) Electroforesis en gel de poliacrilamida
PCR	(<i>Polymerase chain reaction</i>) Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol
PP	Pirofosfato
RMN	Resonancia magnética nuclear
RMSD	(<i>Root-Mean-Square Deviation</i>) raíz cuadrada de la desviación cuadrática media
RMSF	(<i>Root-Mean-Square Fluctuation</i>) raíz cuadrada de la fluctuación cuadrática media
SDS	(Sodium dodecil sulphate) Dodecil sulfato de sodio
TLC	(<i>Thin layer chromatography</i>) Cromatografía en capa delgada
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
UDP	Uridina difosfato
UDP-GalA (UGB)	Uridina difosfato ácido galacturónico
UDP-Glc (UPG)	Uridina difosfato glucosa
UDP-GlcA (UGA)	Uridina difosfato ácido glucurónico

4. Introducción

4.1. Relevancia de glicosiltransferasas

El objetivo general de este trabajo es profundizar en el conocimiento de las enzimas más abundantes en la Tierra: las glicosiltransferasas (GTs). Estas enzimas y sus productos poseen funciones de regulación, estructurales o de señalización en todos los sistemas biológicos [1-4].

Las GTs catalizan reacciones de transferencia de un residuo de azúcar desde una molécula dadora activada hacia una molécula aceptora específica, formando un enlace glicosídico. En general, el sustrato dador es un nucleótido azúcar, y el aceptor es más variable, pudiendo ser un azúcar, un lípido o una proteína, entre otras especies. En la actualidad se proponen más de 87.000 genes que codificarían GTs. Sin embargo, sólo se dispone de información bioquímica y estructural de unas pocas decenas y más del 90 % son marcos abiertos de lectura no caracterizados. Profundizar en la caracterización bioquímica y estructural de GTs permite el entendimiento de procesos normales y patológicos. A su vez, el conocimiento generado podría derivar en aplicaciones biotecnológicas, como la modificación de la estructura de los sacáridos obtenidos mediante GTs, ampliando sus aplicaciones tanto en procesos industriales como medicinales [5]. Como ejemplos de productos glicosídicos utilizados como drogas en diferentes tratamientos se pueden nombrar a antraciclinas, anguciclinas, aminoglicósidos, macrólidos, polienos, flavonoides y antraquinonas, entre otros [6].

4.2. Clasificación

Las GTs se pueden clasificar considerando tres criterios: identidad de secuencia, mecanismo de acción y tipo de plegamiento.

4.2.i. Estereoquímica e identidad de secuencia

Las GTs se clasifican primariamente según el azúcar que transfieren, y la estereoquímica del producto catalizado. Así, se denominan “de retención” las enzimas que mantienen la configuración del carbono anomérico del dador y “de inversión” las que lo invierten [7, 8]. Una característica interesante de las GTs es que presentan muy baja identidad de secuencia. Sin embargo, basándose en análisis de secuencias, que incluyen *gapped* BLAST, HMMER y modelos ocultos de Markov, se creó la base de datos CAZy (*Carbohydrate-Active Enzymes*, <http://www.cazy.org/>) [9-11]. Esta base de

datos agrupa a las GTs en familias. Aquellas GTs que no pudieron ser caracterizadas ni poseen suficiente homología como para pertenecer a alguna familia existente fueron agrupadas bajo el nombre de GT0. La caracterización bioquímica de una proteína perteneciente a GT0 puede ser la semilla de una nueva familia, nucleando otras proteínas no caracterizadas. Frente a la creación de nuevas familias, la base de datos completa es corregida manualmente y los genomas disponibles son analizados en pos de mantener actualizada la base de datos. Al momento de escribir esta tesis existen 94 familias de GTs y GT0 contiene aproximadamente 2.000 secuencias de GTs.

4.2.ii. Mecanismos catalíticos

Los mecanismos catalíticos de las GTs de inversión están generalmente de acuerdo con un desplazamiento S_N2 (Figura 4.1). En cambio, los mecanismos de retención suelen ser más controversiales, encontrándose particularidades en cada enzima [12, 13]. Se han encontrado ejemplos con mecanismos de doble desplazamiento [14, 15] o con mecanismos del tipo S_Ni . En líneas generales, los mecanismos están descritos en la Figura 4.1.

La complejidad en la caracterización de los mecanismos se ve aumentada debido a que todas las superfamilias estructurales (apartado 4.2.iii) presentan miembros que catalizan reacciones tanto de retención como de inversión.

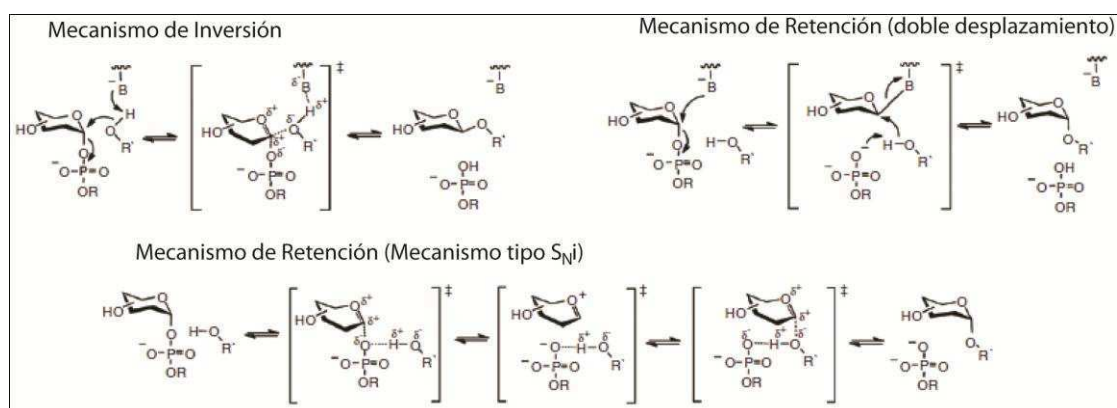


Figura 4.1. Mecanismos de reacción de GTs que llevan a la inversión o retención del estero-centro anomérico luego de la transferencia. Modificado de Chang y col. [12]

4.2.iii. Plegamientos

A pesar de la baja identidad de secuencia, se predice que la mayoría de las GTs dependientes de nucleótidos-azúcares (llamadas GTs de Leloir) poseen uno de los dos

plegamientos principales de GTs: GT-A y GT-B [16, 17]. Se espera que todas las enzimas agrupadas dentro de una misma familia CAZy pertenezcan a la misma superfamilia estructural. De esta manera, las GTs presentan una gran similitud estructural.

Como se mencionó anteriormente, tanto el plegamiento GT-A como el GT-B presentan miembros que catalizan reacciones de retención y de inversión. Recientemente se corroboró la existencia de una tercer superfamilia, denominada GT-C [18, 19]. Esta última superfamilia comprende a las GTs que utilizan un lípido-fosfato-azúcar como sustrato dador.

En la siguiente sección se detallan las características más relevantes de las superfamilias y se describen algunas proteínas a modo de ejemplo.

4.3. Superfamilias estructurales

4.3.i. Superfamilia GT-A

La superfamilia estructural GT-A se caracteriza por presentar un dominio con plegamiento tipo Rossmann ($\alpha/\beta/\alpha$). Bioquímicamente, se ha visto que los miembros de esta superfamilia en general necesitan la presencia de cationes divalentes para su actividad. Esta característica se ha demostrado a nivel estructural, dado que las estructuras resueltas presentan metales coordinados. La coordinación de metales es dada mediante la presencia del motivo DXD (o sus equivalentes EXE, etc.), conservado en esta superfamilia. En general, el proceso de coordinación del metal produce cambios conformacionales en el bucle flexible número 3 de cada GT. En algunos casos, los cambios conformacionales producidos dan lugar a la formación del sitio de unión del sustrato aceptor [20].

4.3.i.a. Representante GT-A: β 1,4-galactosiltransferasa (β 4Gal-T) (GT7-inversión) [21]

La familia de β 4Gal-T posee al menos siete miembros (Gal-T1 a Gal-T7). Todas las enzimas utilizan como dador del grupo azúcar al UDP- α -D-Gal, pero generan distintos tipos de enlaces (β 1-4-, β 1-3-, β 1-6-, α 1-3-, y α 1-4-). En particular, β 4Gal-T1 junto a la α -lactalbúmina forman el complejo lactosa sintasa, transfiriendo un residuo de galactosa a la glucosa para formar la lactosa secretada en la leche. En cuanto a su topología, esta enzima se encuentra anclada en la membrana del aparato de Golgi mediante un segmento transmembrana (TM) en el N-terminal; además, posee una porción

citoplásmica y un gran dominio catalítico en el C-terminal, orientado hacia el lumen del aparato de Golgi. Este dominio catalítico pertenece a la superfamilia GT-A. β 4Gal-T1 tiene dos bucles flexibles, uno largo y uno corto, los cuales existen en la conformación unida al sustrato (conformación cerrada) o sin unir, respectivamente. El bucle flexible largo contiene residuos esenciales en la conformación cerrada para la unión del ión metálico, el nucleótido azúcar y el sustrato aceptor. Este bucle se encuentra alejado del sitio activo en la apo-enzima, aunque no pudo ser trazado completamente por cristalografía de rayos-X debido a su flexibilidad. Sin embargo, en la enzima unida al sustrato, este bucle se cierra sobre este último. En presencia de cationes este bucle se encuentra más estabilizado que en la apo-enzima. La unión del ión metálico prepara la región para el cambio conformacional del bucle y para la participación del catión en la catálisis. Los residuos que participan en la unión de cationes divalentes son el Asp254 del motivo DXD y la Met344. Una mutación del Asp254 inhibe completamente la actividad. En cambio, una mutación en Met344 cambia la especificidad hacia los cationes divalentes.

La unión del nucleótido azúcar se da en la conformación aún abierta. Los átomos de oxígeno del α -fosfato y β -fosfato del nucleótido-azúcar reemplazan dos moléculas de agua unidas al metal, y una cadena lateral de His cambia su torsión para coordinar el catión en reemplazo de la molécula de agua. Luego, el Trp314 del bucle pequeño se mueve hacia el bolsillo y mantiene al sustrato UDP-Gal interactuando con el azúcar Gal. El bucle largo entonces sufre un cambio conformacional, cambiando su región bisagra C-terminal hacia una estructura en hélice. De esta forma, cubre al nucleótido azúcar para que no se “escape” y además, crea el sitio de unión del sustrato aceptor (Figura 4.2).

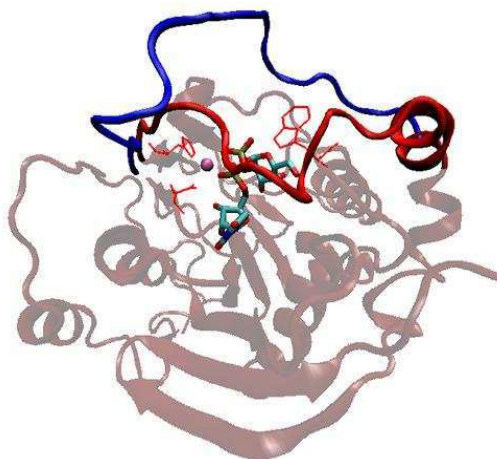


Figura 4.2. Conformación abierta y cerrada de β 4Gal-T. En la forma apo, el bucle flexible se encuentra en conformación abierta (azul). En el complejo con UDP-Gal y Mn^{2+} el bucle se encuentra en conformación cerrada (rojo) cubriendo el nucleótido azúcar. El ion Mn^{2+} se encuentra representado como una esfera violeta, y los residuos Met344, Asp254 y Trp314 como líneas rojas. Se puede observar el plegamiento típico GT-A.

4.3.ii. Superfamilia GT-B

Los miembros de la superfamilia GT-B poseen dos dominios Rossmann enfrentados y unidos por una región “bisagra”. La hendidura formada entre los dominios define al sitio activo. Al contrario de las GT-A, este grupo no necesita de cationes divalentes para su actividad. Además, las GT-B han demostrado también presentar cambios conformacionales en presencia de los nucleótidos azúcares. Este movimiento tendría como objetivo acercar ambos sustratos, ya que cada uno se une en diferentes dominios (aceptor en N-terminal y dador en C-terminal). Recientemente se descubrió que los cambios conformacionales también son disparados por la unión del aceptor y que pueden involucrar, además de movimientos inter-dominios, cambios en la estructura secundaria de las regiones participantes (Guerin ME, comunicación personal).

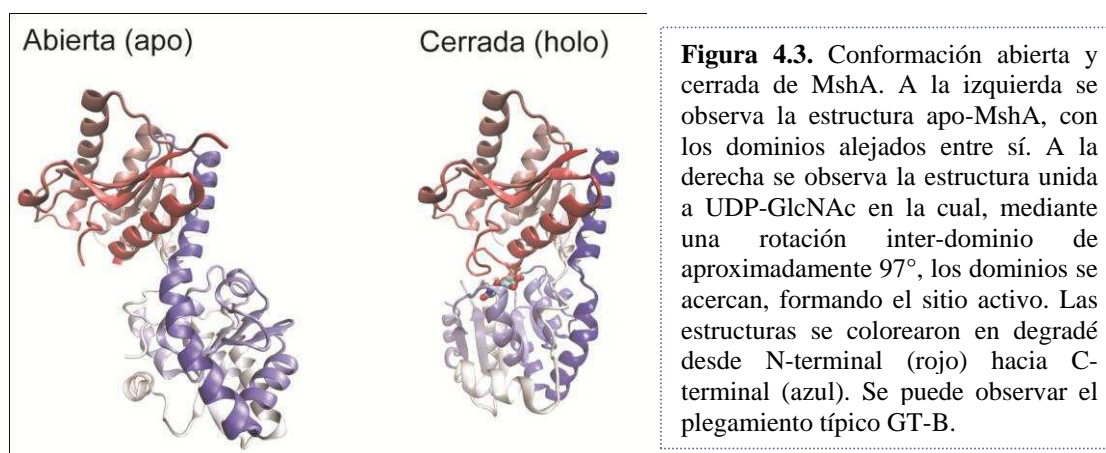
A continuación, se detallan dos ejemplos de enzimas GT-B peculiares e interesantes, que son las proteínas MshA y NST.

4.3.ii.a. MshA (GT4, retención) [22]

MshA es una N-acetil-glucosaminotransferasa de *Corynebacterium glutamicum*. MshA transfiere N-acetilglucosamina desde UDP-N-acetilglucosamina hacia 1-mio-inositol-fosfato, participando en la síntesis de micotiol. En esta proteína se genera un gran cambio conformacional ante la presencia del sustrato dador. Este cambio fue encontrado mediante cristalografía de rayos-X y se trata de una rotación, sobre la región bisagra, de 97° del dominio N-terminal respecto al C-terminal (Figura 4.3), sin alterarse

la estructura secundaria individual de cada dominio. El cambio conformacional genera el sitio de unión del sustrato aceptor.

El modelo del complejo MshA/UDP-GlcNAc es consistente con un mecanismo S_Ni en el cual el ataque nucleofílico del hidroxilo del 1-mio-inositol-fosfato y la salida del UDP ocurren en la misma cara.



4.3.ii.b. NST (GT52, inversión) [23]

Por otro lado encontramos a NST, una lipo-oligosacárido sialiltransferasa de *Neisseria meningitidis* serotipo L1. NST cataliza la creación de oligosacáridos con uniones 2,3 o 2,6 utilizando como dador a CMP-ácido siálico (CMP-Neu5Ac) y como aceptor a azúcares conteniendo galactosa.

NST es una proteína anclada a la membrana, cuya estructura fue resuelta a $1,95 \text{ \AA}$. Esta proteína adopta un plegamiento GT-B, pero posee un “trueque” entre cadenas de 130 residuos del dominio N-terminal, para formar un homodímero funcional (Figura 4.4). Además, en la estructura se observa una cavidad hidrofóbica en forma de túnel entre la hélice $N\alpha 4$ y el bucle Leu108-Thr121, justo en la región del trueque de dominios. Dado que uno de sus sustratos es un lípido-diglicérido, se postula que las cadenas de ácidos grasos del mismo (cadenas de entre 18 a 22 átomos de carbono) se insertarían en las dos subunidades, estabilizando la dimerización.

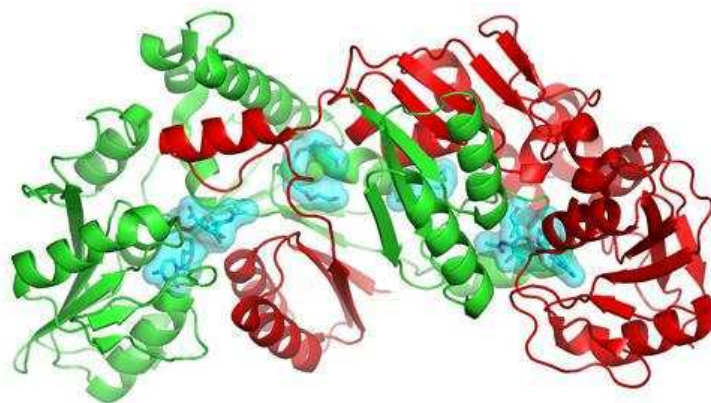


Figura 4.4. Intercambio entre cadenas en NST. Cada cadena se muestra con diferente color (rojo y verde). Se muestran las moléculas del análogo del dador CMP-3F_(axial)-Neu5A y las moléculas de detergente Tritón X-100 encontradas en la estructura, que definirían el sitio de unión al aceptor, estabilizando la dimerización.

4.3.iii. *GT-C* y *GT-D*

Cabe destacar que hasta el momento se han propuesto, mediante análisis de secuencias multivariado y búsquedas iteradas en BLAST y con modelos ocultos de Markov, dos superfamilias estructurales más: *GT-C* y *GT-D* [24]. Sin embargo, ninguna de ellas sería dependiente de nucleótidos azúcares.

Las *GT-D* serían exclusivas del reino eucariota y aún no han sido descritas ni caracterizadas. Las *GT-C* son dependientes de lípido-fosfato-azúcar y poseen varios pasos transmembrana. Las *GT-C* estudiadas hasta el momento poseen actividad oligosacariltransferasa (OST). En eucariotas, la subunidad llamada STT3 del complejo proteico OST es la encargada del proceso de N-glicosilación. En procariontes, OST está compuesta por una sola subunidad, homóloga a la STT3 eucariota. Recientemente, la proteína oligosacariltransferasa PglB completa de *Campilobacter lari* fue caracterizada funcional y estructuralmente.

4.3.iii.a. *PglB* de *C. lari*. (*GT66*, inversión) [19]

Dado que esta proteína y sus homólogos poseen 13 segmentos transmembrana, previamente se caracterizaron estructuralmente los dominios solubles de dos homólogos: PglB de *C. jejuni* y AlgB de *Pyrococcus furiosus* [25, 26]. Sin embargo, estos homólogos fueron catalíticamente inactivos.

Al obtener la estructura completa de la PglB de *C. lari* se observa que el dominio transmembrana es indispensable tanto para la unión de los sustratos como para la catálisis, explicando la inactividad del dominio soluble *per se*. El dominio periplásmico, al igual que las estructuras homólogas resueltas previamente, posee un plegamiento del

tipo α/β (Figura 4.5.A). Se observa que PglB posee dos cavidades por encima de la membrana y en lados opuestos: una cavidad para la unión de las proteínas aceptoras y la otra para la unión del dador lípido-oligosacárido. Estos sitios están conectados, permitiendo que la asparagina aceptora se acerque al sitio activo (Figura 4.5.B). La resolución de dicha estructura ha sido un hito en la clasificación de superfamilias, debido que antes se creía que el sitio catalítico de estas enzimas estaba dado por la región soluble solamente.

Aún se requieren muchos esfuerzos de caracterización bioquímica y estructural debido a la complejidad de purificar y cristalizar proteínas con varios pasos transmembrana.

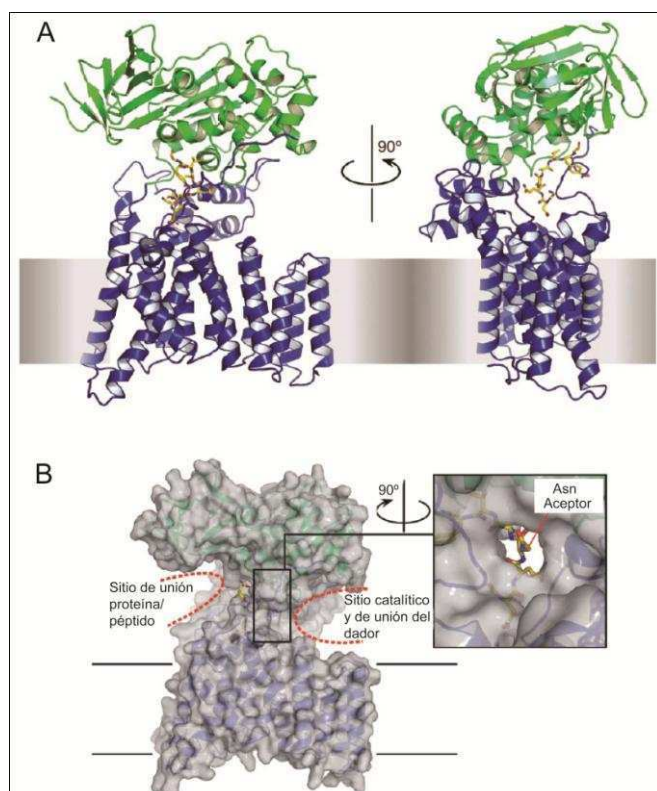


Figura 4.5. PglB, único representante GT-C. (A) Se muestra la estructura de PglB en diagrama de cintas, con los segmentos transmembrana y periplásmico en azul y verde respectivamente. El péptido aceptor se representa como bastón en amarillo. La presunta ubicación de la membrana se representa como una barra gris. (B) Ídem representación (A) más la superficie en gris semitransparente. Se muestran las cavidades localizadas en lados opuestos. El residuo aceptor Asn se localiza en el túnel, que conecta ambos sitios. Adaptado de [19].

4.4. Aplicaciones de glicosiltransferasas

Se han realizado varias aproximaciones con el fin de obtener productos farmacéuticos novedosos. Un ejemplo es la evolución al azar de la enzima oleandomicina-GT (OleD). Mediante mutagénesis se obtuvieron enzimas con actividad transferasa sobre novobiocina (aceptor no natural, con propiedades antibióticas) con una alta eficiencia catalítica [27]. Por otro lado, Zhang y col. se valieron de la promiscuidad de sustrato y

reversibilidad en la reacción de cuatro GTs, logrando más de 70 variantes del antibiótico vancomicina y del antitumoral calicheamicina mediante la combinación de sustratos, productos y GTs [28]. Estos resultados nos demuestran el amplio panorama biotecnológico que abriría la caracterización bioquímica de GTs. Cabe destacar que estas aproximaciones se realizaron sin conocimiento estructural, y en muchos casos sin conocer la reacción catalizada naturalmente por las enzimas.

El conocimiento estructural permitiría la aplicación de técnicas tales como el intercambio de dominios (*domain swapping*). Una muestra clara es el trabajo de Park y col. en el cual, explotando las características diferenciales de los dos dominios en la superfamilia GT-B (apartado 4.3.ii), se realizaron quimeras entre los dominios N- y C-terminal de las enzimas kanamicina-GT (kanF) y vancomicina-GT (gtfE) [29]. La quimera activa obtenida utiliza el aceptor de kanF y el dador de gtfE, posee una notoria promiscuidad con respecto al dador y el resultado de la reacción es un producto novedoso.

Otros ejemplos de ingeniería de GTs incluyen mutaciones puntuales que mejoran la eficiencia catalítica, o cambian y amplían la especificidad de sustrato [12].

Con el fin de generar conocimientos que aporten a la enzimología en general, y a las GTs en particular, en este trabajo se han estudiado dos GTs que participan en la síntesis de un polímero bacteriano de interés industrial. En el apartado siguiente se introduce el sistema estudiado.

4.5. Síntesis del polisacárido xantano: GumK y GumI

4.5.i. Síntesis

El xantano es un polisacárido bacteriano producido por la bacteria fitopatógena *Xanthomonas campestris* (Xc), el cual participa en la interacción con la planta y contribuye a la supervivencia epifita de la bacteria [30]. Debido a sus propiedades reológicas únicas, el xantano es de gran interés industrial, sirviendo como emulsificante, viscosificante, gelificante, entre otras aplicaciones [31]. El polímero es formado a partir de unidades repetitivas pentasacáridicas Glc- β -1,4-Glc- α -1,3-Man- β -1,2-GlcA- β -1,4-Man (Figura 4.6.A), con un peso molecular final de aproximadamente 2×10^6 Da. Estos monómeros son sintetizados sobre un lípido poli-isoprenol fosfato (lip-P), inmerso en la membrana interna de la bacteria, formando un lip-PP-pentasacárido.

Las GTs que participan de la síntesis de la unidad repetitiva son cinco y trabajan de forma secuencial (GumD, GumM, GumH, GumK y GumI) y altamente concertada, empleando nucleótidos azúcares del citoplasma como sustratos dadores. Al comenzarse el estudio de las GTs del sistema no se conocía su localización subcelular ni si formaban o no complejos proteicos dentro del sistema. Estas características hacen al sistema fuertemente atractivo, ya que las respuestas a nuestros interrogantes no sólo aportan al conocimiento sobre las GTs, sino también al conocimiento de proteínas que actúan en la interfase citoplasma-membrana. Las últimas dos enzimas de la ruta biosintética del xantano, GumK y GumI respectivamente, son las estudiadas en esta tesis.

Además de las GTs, el sistema posee otras siete proteínas: encargadas de la decoración de las unidades repetitivas, flipasa, polimerasa, co-polimerasa y proteínas de secreción (Figura 4.6.B) [32]. Todas las proteínas necesarias para la síntesis se encuentran codificadas en un mismo operón, denominado *gum*.

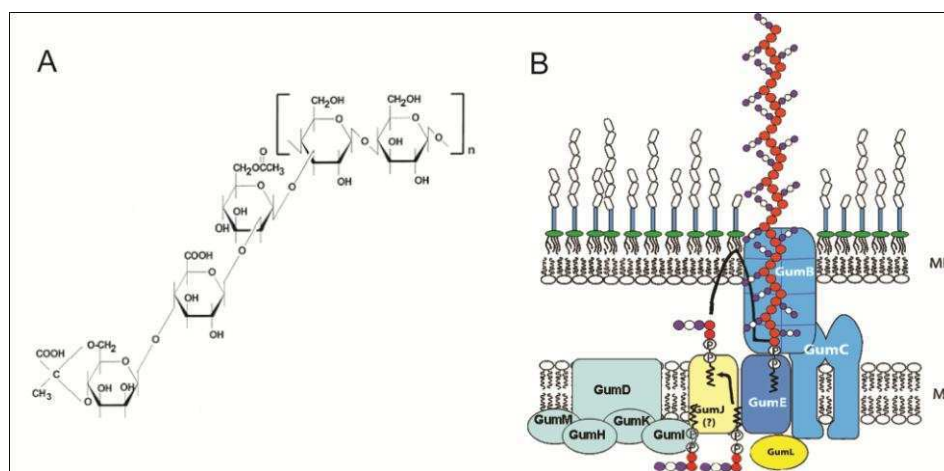


Figura 4.6. Síntesis de xantano. (A) Diagrama de la unidad repetitiva completa. (B) Esquema de la maquinaria biosintética del xantano, donde se muestran las glicosiltransferasas (GumDMHKI), la putativa flipasa GumJ, la polimerasa y copolimerasa GumE y GumC, y la putativa proteína que exporta el xantano, GumB. MI y ME: membrana interna y externa, respectivamente. Esquemas adaptados de [33] y [34].

4.5.ii. Antecedentes

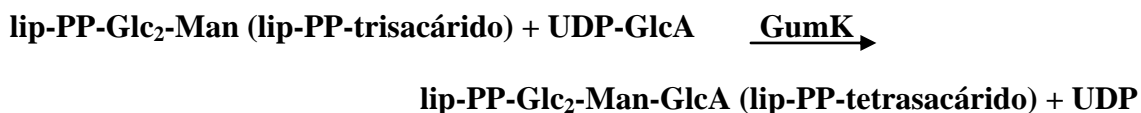
Antecedentes del laboratorio con mutantes de *Xc* para los genes *gumI* y *gumK* permitieron asignarle a sus productos proteicos la función glicosiltransferasa [33]. Los ensayos consistieron en la incubación de células permeabilizadas de *Xc* mutantes con nucleótidos azúcares marcados radiactivamente. Los productos de dichas reacciones fueron analizados y se observó que en la cepa *XcK* (*Xc gumK*) el producto mayoritario

corresponde al lip-PP-trisacárido, y en la cepa XcI (*Xc gumI*), el producto encontrado fue lip-PP-tetrasacárido. De este modo se propuso que GumK sería una glucuronosiltransferasa y GumI una manosiltransferasa. Sin embargo, hasta el comienzo de este trabajo, GumI no había sido caracterizada.

La caracterización de GumK a nivel bioquímico y estructural fue realizada en el laboratorio [35-37], lo cual nos permitió confirmar su actividad y conocer su estructura tridimensional.

4.5.iii. Caracterización de GumK

GumK es una β -glucuronosiltransferasa asociada a membrana con una masa de ~44 kDa [38], que cataliza la adición de un residuo de ácido glucurónico (GlcA) desde UDP-GlcA a un lípido-pirofosfato-trisacárido, según:



Cabe destacar que la caracterización funcional de GumK permitió la creación de la familia CAZy GT70. La familia GT70 contiene, al momento de escritura de esta tesis, 33 secuencias de GTs bacterianas, de las cuales sólo GumK se encuentra caracterizada bioquímica y estructuralmente.

La estructura experimental obtenida a 1,9 Å (código pdb 2HY7) mostró que GumK pertenece a la superfamilia GT-B, conteniendo dos dominios entre los cuales se forma la hendidura del sitio activo. El dominio N-terminal está formado por los residuos 13-201 y 362-380 y está compuesto por 10 α -hélices envolviendo un núcleo de ocho láminas- β . El dominio C-terminal está formado por los residuos 210-361, y consiste en seis α -hélices rodeando un núcleo de seis láminas- β . La región bisagra que une los dos dominios está compuesta por los residuos 202-208 (Figura 4.7.A).

En el sitio activo, se pudo ubicar experimentalmente la posición de la porción UDP del sustrato dador (código pdb 2Q6V). La estructura del complejo GumK/UDP se obtuvo mediante la técnica de “remojo” (*soaking*) de cristales, tanto con el sustrato dador del residuo de azúcar UDP-GlcA como con UDP (Figura 4.7.A). La estructura del complejo no presenta diferencias con respecto a la apo-enzima. La porción GlcA del sustrato no pudo observarse en las estructuras analizadas, probablemente debido a la flexibilidad del azúcar y/o a la hidrólisis del UDP-GlcA.

El motivo de unión a UDP está localizado en una región de carga positiva en la cara C-terminal de la hendidura, y está definido por $\text{Ca}3$, $\text{C}\beta4$ y $\text{Ca}4$ y las uniones entre ellos. Además se propuso, mediante el análisis de los residuos en el sitio activo y mutantes puntuales en residuos ácidos, al aspartato 157 como aminoácido catalítico. La mutante GumK/D157A (código pdb 3CUY y 3CV3) carece de actividad catalítica, pero mantiene la estructura y la capacidad de cristalizar con UDP. A pesar de que la mutante no hidroliza el UDP-GlcA, tampoco se pudo resolver la posición del GlcA mediante los ensayos de *soaking* con cristales GumK/D157A.

En cuanto a la unión del sustrato aceptor, aún no se tienen datos certeros sobre la posición del sustrato aceptor en la enzima, dado que carecemos de una fuente comercial del sustrato aceptor y su purificación a partir de la bacteria salvaje en cantidades prácticas es extremadamente dificultosa. Sin embargo, algunas características estructurales de la enzima nos permiten suponer la posición que ocuparía el lípido-PP-trisacárido. En el dominio N-terminal se encuentra una concentración de aminoácidos básicos e hidrofóbicos, obteniéndose un pI teórico para dicho dominio de 9,97. Estos residuos podrían participar tanto en la unión al glicolípido aceptor como en la interacción con la membrana. Estos residuos se encuentran principalmente ubicados en las hélices $\text{N}\alpha2$ y $\text{N}\alpha4$, y en el bucle 8 (*loop8*) que vincula la $\text{N}\alpha4$ con $\text{N}\beta4$ (Figura 4.7.B).

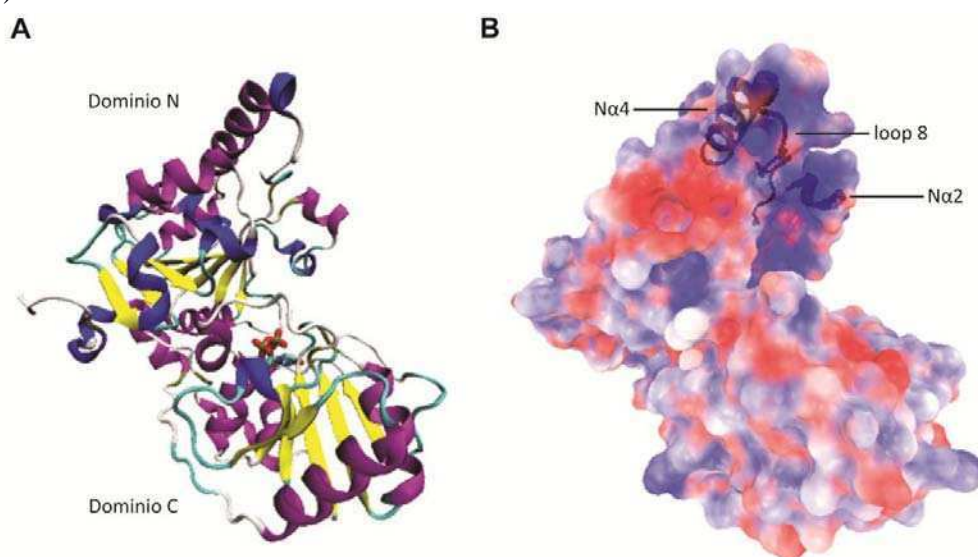


Figura 4.7. Estructura de GumK. **(A)** Diagrama de cintas de la estructura de GumK, con los dominios de la superfamilia GT-B claramente definidos (N y C). El UDP se encuentra localizado en la hendidura, interactuando principalmente con el dominio C. **(B)** Representación de la superficie electrostática (semitransparente). Se identifican las regiones propuestas como responsables de la unión a la membrana $\text{N}\alpha2$, $\text{N}\alpha4$ y *loop8*. Rojo y azul: negativo y positivo, respectivamente.

4.6. Proteínas de membrana

Muchos son los procesos celulares que involucran enzimas que, simultáneamente, puedan estar en el ambiente hidrofóbico de las membranas y en el hidrofílico del citoplasma. En este sentido, la naturaleza se ha encargado de generar diversos mecanismos para llevar a cabo las reacciones enzimáticas. Como ejemplo se puede nombrar a las metaloproteasas integrales de membrana [39]. Estas enzimas unen los péptidos sustratos mediante difusión lateral en la membrana. Frente a la necesidad de agua para el proceso hidrolítico, estas enzimas poseen una cavidad interna hidrofílica, permitiendo la captura de agua desde el citoplasma y la consiguiente catálisis.

GumK y GumI (descrita en esta tesis), junto a otras GTs, pertenecen al grupo de las enzimas que requieren la interfase membrana-citoplasma para su actividad. Como se describió en el apartado anterior, GumK se uniría a la membrana y/o a su sustrato aceptor mediante un parche de aminoácidos básicos e hidrofóbicos. Este tipo de parche se ha observado en otras GTs que se asocian a la membrana [40-42], siendo el mismo suficiente para la interacción. Según la clasificación de proteínas de Blobel, este tipo de proteínas se denominan integrales monotópicas de membrana, es decir que se unen e insertan en la bicapa mediante interacciones electrostáticas e hidrofóbicas, pero no la atraviesan [43].

Como ejemplo bien estudiado se puede nombrar a PimA, una manosiltransferasa monotópica (GT-B) de *Mycobacterium smegmatis* involucrada en la síntesis de fosfatidil-inositol [41, 44, 45]. PimA posee una hélice anfipática, equivalente estructuralmente a N α 2 de GumK. Se observó que la enzima tiene la capacidad de unir micelas o liposomas, y que dichas interacciones incrementan la actividad de la enzima. En este sentido, en mutantes en la hélice N α 2 de PimA no se observó unión a fosfolípidos.

El ejemplo de PimA, si bien es claro, es uno de los pocos estudios disponibles. La complejidad de obtener proteínas monotópicas en cantidad, calidad y de forma estable es una limitante. En la mayoría de los casos, el uso de detergente es necesario tanto para la extracción como para la purificación de la proteína, dificultando muchos estudios biofísicos.

En este trabajo de tesis se profundiza la caracterización de GumK, estudiando su interacción con la membrana y con el sustrato dador. Se inicia, además, la caracterización de GumI, mediante el análisis bioquímico de su actividad glicosiltransferasa.

5. Objetivos

5.1. Objetivos generales

Los objetivos planteados para esta tesis se basan en profundizar acerca de las bases moleculares que determinan la actividad glicosiltransferasa, mediante estudios bioquímicos y estructurales. Se plantea comprender la relación entre la asociación a la membrana y la actividad enzimática, aspecto fundamental para muchas otras actividades enzimáticas. Estos estudios posiblemente tendrán un impacto inmediato en la bioquímica de proteínas y glicobiología en general.

5.2. Objetivos específicos

1. Caracterizar el producto del gen *gumI* de *X. campestris*
 - a. Estudios funcionales *in vivo*, mediante complementación *en trans*.
 - b. Localización subcelular de la proteína GumI
2. Expresar y purificar GumI recombinante.
 - a. Caracterización de actividad *in vitro*
 - b. Ensayos biofísicos-estructurales
3. Estudiar la interacción de GumK con la membrana bacteriana y con su sustrato aceptor.
 - a. Mutagénesis sitio-dirigida
 - b. Localización subcelular y actividad *in vivo* e *in vitro*
4. Estudiar la interacción de GumK con su sustrato dador.
 - a. Ensayos biofísicos/bioquímicos de afinidad y especificidad

6. Materiales y métodos

6.1. Materiales y procedimientos generales

Los nucleótidos azúcares fríos fueron adquiridos de Sigma. Los nucleótidos azúcares marcados radiactivamente fueron preparados por Susana Raffo de la Fundación Instituto Leloir.

Con el fin de analizar las proteínas y los extractos celulares, los mismos fueron resuspendidos en *buffer* desnaturalizante (Tris-HCl 100 mM, Urea 10 M, SDS 2 %, pH 8,2), tratados 10 min a 100 °C y luego separados en geles SDS-PAGE 10 %, seguido por tinción con *Coomassie blue* o inmunodetección. La concentración de proteínas fue determinada por el método de Bradford [46].

6.2. Cepas y plásmidos

Las cepas bacterianas y los plásmidos utilizados en este trabajo se describen en la Tabla 6.1.

Tabla 6.1. Cepas bacterianas y plásmidos utilizados

Cepa	Características relevantes	Origen / referencia
<i>Escherichia coli</i>		
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacIqZΔM15 Tn10</i> (Tetr)]	Stratagene
DH5α	F ⁻ Φ80 <i>lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)</i> U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rK ⁻ , mK ⁺) <i>phoA supE44 λ-thi-1 gyrA96 relA1</i>	Invitrogen
BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT gal dem lon hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])</i>	Novagen
<i>Xanthomonas campestris</i>		
XcFC2	Mutante estable Rif ^R derivada de NRRL B-1459	[47]
XcK	XcFC2 portando el plasmido pGum36-18S integrado en el genoma	[48]
XcI	XcFC2 Δ(<i>gumI-lacZ-aacC1</i>) sitio de inserción: StuI [10097]	[48]
Xc1231	Rif ^R Δ <i>gum</i>	[49]
Plásmidos		
pET22b	<i>His-tag</i> en el C-terminal, Ap ^r	Novagen
pET28a	<i>His-tag</i> en el N-terminal, Km ^r	Novagen
pBBRprom	Derivado de pBBR1MCS-5 con promotor <i>gum</i> en el 5' del MCS Gm ^r	[34]
pBBAD22K	Derivado pBBR1MCS-4 con promotor BAD en el 5' del MCS, Km ^r	[50]
pETHisKC	Clonado NdeI-XhoI <i>gumK</i> en pET22b, <i>His-tag</i> en C-terminal	[38]
pBHisKC	Subclonado en pBBRprom NdeI/BamHI <i>gumK</i> , <i>His-tag</i> en C-	Esta Tesis

	terminal, amplificado de pETHisKC	
pETHisIC	Clonado NdeI-XhoI <i>gumI</i> en pET22b, <i>His-tag</i> en C-terminal	[51]
pETHisIN	Clonado NdeI-EcoRI <i>gumI</i> en pET28a, <i>His-tag</i> en N-terminal	[51]
pBGI	Subclonado en pBBRprom NcoI/HindIII <i>gumI</i> , <i>His-tag</i> en C-terminal, amplificado de pETHisIC	Esta Tesis
pETKB1	Producto de la mutagénesis de pETHisKC, cuyo producto proteico es GumK R55N/R58N/K60Q	Esta Tesis
pETKB3	Producto de la mutagénesis de pETHisKC, cuyo producto proteico es GumK R86N	Esta Tesis
pETKH1	Producto de la mutagénesis de pETHisKC, cuyo producto proteico es GumK L56S/M59S	Esta Tesis
pETKH2	Producto de la mutagénesis de pETHisKC, cuyo producto proteico es GumK L99S/V106S	Esta Tesis
pBKB1	Subclonado de pETKB1 en pBBRprom	Esta Tesis
pBKB3	Subclonado de pETKB3 en pBBRprom	Esta Tesis
pBKH1	Subclonado de pETKH1 en pBBRprom	Esta Tesis
pBKH2	Subclonado de pETKH2 en pBBRprom	Esta Tesis
pBKNa2	Clonado en pBBRprom, cuyo producto proteico es GumK Δ 55-60	Esta Tesis
pBKNa4	Clonado en pBBRprom, cuyo producto proteico es GumK Δ 97-112	Esta Tesis
pBKNa4N	Clonado en pBBRprom, cuyo producto proteico es GumK Δ 97-104	Esta Tesis
pBKNa4C	Clonado en pBBRprom, cuyo producto proteico es GumK Δ 105-112	Esta Tesis
pBKLoop	Clonado en pBBRprom, cuyo producto proteico es GumK Δ 85-96	Esta Tesis
pBKLoopN	Clonado en pBBRprom, cuyo producto proteico es GumK Δ 85-90	Esta Tesis
pBKLoopC	Clonado en pBBRprom, cuyo producto proteico es GumK Δ 91-96	Esta Tesis

6.3. Medios y condiciones de cultivo

Para los clonados se utilizó la cepa *Escherichia coli* DH5 α o XL1-blue. Para la sobre-expresión de proteínas se utilizó *E. coli* BL21(DE3). Las células de *E. coli* fueron cultivadas en medio Luria-Bertani (LB) [52] a 37 °C (a menos que se indique de otra forma) con agitación a 200 rpm. Las células *X. campestris* se cultivaron en medio YM (5 g/l triptona, 3g/l extracto de levadura, 3 g/l extracto de malta, 10 g/l glucosa) o en medio XOL modificado (10 g/l K₂HPO₄, 0,2 g/l KH₂PO₄, 1 g/l (NH₄)₂SO₄, 0,001 g/l MnCl₂, 0,1 g/l MgCl₂, 1,25 g/l triptona, 1,25 g/l extracto de levadura, 0,05 g/l, 40 g/l glucosa, pH 7.5) a 28 °C con agitación a 200 rpm. Los antibióticos fueron utilizados en las siguientes concentraciones (mg/l): para *E. coli*, ampicilina, 200; kanamicina, 30; gentamicina, 15; para *X. campestris*, kanamicina, 50; gentamicina, 30; tetraciclina, 10. Para los diferentes ensayos de expresión, isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido -IPTG-

(GBT) o L(+)-arabinosa (Calbiochem) se adicionaron a las placas o medios de cultivo a las concentraciones indicadas.

6.4. SDS-PAGE e inmunodetección

Para el análisis de proteínas se utilizó en todos los casos un sistema de geles desnaturizantes discontinuo (SDS-PAGE) empleando un gel de apilamiento y separación con poliacrilamida al 5 % y 10 % respectivamente. Para tinción con *Coomassie blue* se incubó el gel 20 minutos en una solución de *Coomassie brilliant blue* R250 0,1 %, metanol 50 % y ácido acético 10 %. Los geles fueron desteñidos en una solución metanol 10 %, ácido acético 7 %, cambiando la solución cada una hora, hasta que las bandas proteicas se observaron nítidamente.

Para la inmunodetección, los geles fueron transferidos a membranas de fluoruro de polivinilideno -PVDF- (GE Healthcare) utilizando un sistema semi-seco de transferencia con *buffer* CAPS 10 mM, metanol 10 %, pH 11,0. Los geles fueron transferidos a una corriente constante de 130 mA por 1 h. Los marcadores de masa molecular fueron teñidos con una solución Rojo Ponceau S 0,2 % y ácido acético 10 %, y desteñidos con varios lavados con H₂O MQ. Como anticuerpo primario se utilizó IgG de cabra monoclonal anti-His-tag (Sigma) o anticuerpo policlonal anti-GumK (preparado según [35]). Como anticuerpo secundario se utilizó anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a fosfatasa alcalina o a peroxidasa (Sigma). Como sustrato de la fosfatasa alcalina se utilizó BCIP/NBT (Promega) y como sustrato de peroxidasa se utilizó el sistema ECL-Plus (GE Healthcare). El revelado se realizó según las indicaciones de los proveedores.

6.5. Construcciones de plásmidos y mutagénesis

Para los clonados realizados las secuencias de interés fueron amplificadas mediante PCR. Los oligonucleótidos utilizados (IDT) se detallan en la Tabla 6.2. Los sitios de restricción están subrayados. Las enzimas de restricción utilizadas y la T4 DNA ligasa fueron adquiridas en NEB. Las digestiones y ligaciones fueron realizadas según indicaciones del proveedor. La recuperación de plásmidos a partir de cultivos de bacterias y los geles de agarosa para el análisis de ADN fueron realizados por los métodos preestablecidos [52].

	GCATCC-3'	
RH1	5'-GCAGGCGCATATCTCCCTTCGAGCGGGAGCTTCT GCTGTATCGCAACG-3'	L56S;M59S (H1)
FH1	5'-CGTTGCGATACAGCAGAAGCTCCCGCTCGAAGG GAGATATGCGCCTGC-3'	
RH2	5'-GGCATAACCAGCGGAACGAGGCGTCTTCCGTAGG ACGTGACCAGCTCCGGCG-3'	L99S;V102T;M106S (H2)
FH2	5'-CGCCGGAGCTGGTCACGTCTACGGAAGACGCC TCGTTCCGCTGGTATGCC-3'	
FNalfa2	5'-CGATACAGCGGAGATATGCGCCTGCCGCTG-3'	Δ R55-K60 (N α 2)
RNalfa2	5'-GCATATCTCCGCTGTATCGCAACGAAAAAAAAAC- 3'	
Floop	5'-CTGTTACCTGAGCTGGCTACGTCCTGTGGAAG-3'	Δ W85-R96 (loop)
Rloop	5'-GTAGCCAGCTCAGGTAACAGTCCACACCGTTG-3'	
Floop-N	5'-CTGTTACCTGCCATTCAATACACGCCGGAGC-3'	Δ W85-H90 (loop-N)
Rloop-N	5'-GTATTGAATGGCAGGTAACAGTCCACACCGTTG- 3'	
Floop-C	5'-GACGGTGCATAGCTGGCTACGTCCTGTGGAAG-3'	Δ P91-R96 (loop-C)
Rloop-C	5'-GTAGCCAGCTATGCACCGTCGTGCGCCACAG-3'	
FNalfa4	5'-TACACGCCGGCATCCGCCAAAGCAGTTGCTG-3'	Δ S97-A112 (N α 4)
RNalfa4	5'-TTGGCGGATGCCGGCGTGTATTGAATGGATG-3'	
FNalfa4-N	5'-TACACGCCGGGCCATGTTCCGCTGGTATGCC-3'	Δ S97-D104 (N α 4-N)
RNalfa4-N	5'-GGAACATGGCCCGCGTGTATTGAATGGATG-3'	
FNalfa4-C	5'-TGTGGAAGACCATCCGCCAAAGCAGTTGCTG-3'	Δ A105-A112 (N α 4- C)
RNalfa4-C	5'-TTGGCGGATGGTCTTCCACAGGACGTAGCC-3'	

6.6. Expresión y extracción con detergentes de GumI

Células de *E. coli* fueron cultivadas a 37 °C hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0,5 – 0,8. Luego, los cultivos de BL21(DE3)/pETHisIC fueron transferidos a 20 °C e inducidos con 0,5 mM de IPTG durante 18 h. Los cultivos de BL21(DE3)/pETHisIN fueron transferidos a 28 °C e inducidos con 0,5 de mM IPTG durante 6 h. Las células fueron cosechadas y resuspendidas en solución de lisis [Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 0,5 M, glicerol 20 %, imidazol 3 mM y Tritón X-100 2 % ó n-dodecil- β -D-maltósido (DDM) 15 mM]. Las células se lisaron mediante tres pasajes por French Press a 20,000 psi. La concentración de proteína se ajustó a 10 mg/ml con el *buffer* de resuspensión. El extracto se incubó 1 h a 4 °C con el fin de solubilizar las proteínas de membrana. El lisado se centrifugó a 12,000 x g con el fin de precipitar las células sin romper, restos

celulares y cuerpos de inclusión. El sobrenadante se ultracentrifugó a 100,000 x g, con el fin de separar las membranas de la fracción soluble.

6.7. Purificación de GumI

A continuación se detalla el protocolo definitivo para la purificación de GumI. Cabe aclarar que no se detallan aquí las pruebas realizadas previas a la estandarización. Sin embargo, todas las pruebas incluyeron modificaciones en los componentes de las soluciones (pH, fuerza iónica, detergente).

Las cromatografías fueron monitoreadas por absorbancia a 280 nm. Las fracciones colectadas fueron analizadas por SDS-PAGE, seguido por *Coomassie blue* o inmunodetección.

6.7.i. Purificación GumI-His₆ (C-terminal)

Las proteínas solubles en detergente preparadas como se indica en el apartado anterior fueron inyectadas en una columna de afinidad por cationes divalentes (IMAC - GE) utilizando un equipo de HPLC. La columna se encontraba equilibrada en *buffer A*: Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,5 M, Tritón X-100 0,05 %, Glicerol 20 %, pH 8,0. La columna fue lavada con *buffer A*, hasta alcanzar la línea de base. Luego, las proteínas fueron eluidas con un gradiente continuo de imidazol 0 - 350 mM en *buffer A* en 12 vol de columna, a 1 ml/min. Las fracciones conteniendo GumI fueron concentradas por ultrafiltración (10,000 MWCO Amicon Ultra, Millipore) a 3-5 mg/ml, y luego fueron inyectadas en una columna de exclusión molecular Superdex 200 (S200 – GE Healthcare) equilibrada en *buffer B*: Tris-HCl 20 mM, NaCl 0,15 M, Tritón X-100 0,05%, glicerol 20 %, pH 8,0. Finalmente, la proteína fue concentrada y utilizada para las mediciones de actividad y para la cristalización.

6.7.ii. Extra-purificación

Para ensayos posteriores de cristalogénesis se adicionó un paso de purificación por intercambio iónico. Para ello, la proteína purificada fue diluida a la mitad en *buffer A* sin NaCl e inyectada en una columna de intercambio catiónico MonoQ (GE Healthcare) pre-equilibrada con en *buffer C*: Tris-HCl 20 mM, NaCl 0,05 M, Glicerol 20 %, Tritón X-100 0.05%, pH 8,0. La elución se realizó en 10 vol de columna con un gradiente con *buffer* de NaCl hasta 0,5 M, a 0,5 ml/min. El pico mayoritario conteniendo GumI fue concentrado y utilizado en los ensayos de cristalogénesis.

6.7.iii. Purificación GumI-His₆ (C-terminal) con *n*-dodecil- β -D-maltósido (DDM)

Dado que el detergente puede ser un determinante para la cristalogénesis, también se purificó GumI utilizando el detergente DDM. Para ello, GumI fue extraída con dicho detergente como se indica en el apartado anterior, y purificada bajo el mismo protocolo de IMAC y S200, pero con el siguiente *buffer*: Tris-HCl 20 mM, NaCl 0,05 M, Glicerol 20 %, DDM 0,25 mM. La proteína fue concentrada y utilizada en ensayos de cristalogénesis.

6.7.iv. Purificación GumI-His₆ (N-terminal)

La purificación se llevó a cabo mediante IMAC y S200, tal como se describe en el apartado 6.7.i. Luego de la cromatografía S200, el análisis por SDS-PAGE mostró una proteólisis estable, por lo que la proteína fue nuevamente sometida a IMAC, eluyendo en este caso en el *flowthrough*. Esta fracción, que contuvo a GumI sin su N-terminal, fue establemente concentrada y utilizada en ensayos de cristalogénesis.

6.8. Dispersión de luz estática (SLS)

Para corroborar la monodispersidad de la solución de la proteína purificada, la misma fue analizada en un instrumento de dispersión de luz estática (Precision Detectors PD2010) conectado a un equipo HPLC (LKB 2248) y a un detector UV (Waters 486). En general, 250-500 μ g (en 200-450 μ l) fueron inyectados en una columna S200, acoplada a los instrumentos descriptos. Los datos fueron grabados y analizados con el programa Discovery32 (Precision Detectors).

6.9. Espectrometría de masa MALDI-TOF

GumI purificada se acidificó mediante la adición de ácido trifluoroacético 0,1 %. Luego, se colocó una gota en placas para MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization- Time Of Flight*) con un volumen equivalente de una solución de ácido sinapínico (ácido sinapínico 6 mg/ml, ácido trifluoroacético 0,1 %, acetonitrilo 70 %). La gota fue secada y analizada en un equipo Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA.

6.10. Preparación de células permeabilizadas

Células de XcFC2, XcK, XcI y de estas cepas conteniendo los plásmidos indicados fueron crecidas en medio YM hasta fase exponencial. Las células fueron cosechadas y lavadas 2 veces con 1 volumen *buffer* Tris-EDTA 10 mM, pH 8,0. Finalmente se

resuspendieron en 1/3 vol con el *buffer* indicado y se sometieron a 3 ciclos de congelamiento en N₂ líquido y posterior descongelamiento en H₂O [53]. Finalizados los tres ciclos, se incubaron las muestras con 30 mM MgCl₂ y punta de espátula de DNase I (Sigma), por 10 min a 10 °C. Luego fueron centrifugadas, resuspendidas en 1/100 volumen y reservadas a -20 °C hasta su uso.

6.11. Preparación de sustrato

Para preparar el sustrato de GumI, 200 µl de células permeabilizadas XcI fueron incubadas con UDP-Glc 3 mM, GDP-Man 1,5 mM y UDP-GlcA 1,5 mM (o 0,15 µCi de UDP-[¹⁴C]GlcA en caso de preparar sustrato marcado), c.s.p 350 µl de *buffer* TM (Tris-HCl 20 mM, MgCl₂ 24 mM, pH 8.2).

Para preparar el sustrato de GumK, se prosiguió como se indica en el párrafo anterior, utilizando células permeabilizadas de XcK y, en el caso de preparar sustrato marcado, se utilizó 0,15 µCi de GDP-[¹⁴C]Man.

Las mezclas se incubaron a 20 °C por 30 min. Luego se lavó 3 veces con 1 ml de H₂O MQ, y el precipitado de células fue extraído 3 veces con 150 µl de cloroformo/metanol/agua (1:2:0,3). Las fracciones orgánicas fueron concentradas bajo corriente de nitrógeno, solubilizadas en 0,01 % de Tritón X-100 y utilizadas para las reacciones de actividad *in vitro*.

Para los ensayos de especificidad, el sustrato obtenido fue hidrolizado (según apartado 6.13) y el producto [¹⁴C]GlcA-Man-Glc₂ fue utilizado como aceptor de la reacción de GumI.

La concentración de glicolípidos fue estimada en base a incubaciones paralelas empleando UDP-[¹⁴C]GlcA o GDP-[¹⁴C]Man de baja radiactividad específica (0,44 mCi/mol).

Para medir la actividad *in vitro* de las células XcK complementadas con el plásmido conteniendo las mutaciones de GumK, se siguió el mismo protocolo indicado en el primer párrafo de este apartado, utilizando UDP-[¹⁴C]GlcA.

6.12. Ensayos de actividad *in vitro*

Para GumI, las mezclas de reacción estándar se prepararon con: 10 µl de sustrato endógeno concentrado, Tris-HCl 50 mM pH 8,0, MgCl₂ 5 mM, Tritón X-100 2 %, 33

GDP-[¹⁴C]Man 0,15 µCi y GumI-His₆ 0,2 µg, en un volumen final de 100 µl. Salvo las excepciones indicadas en el texto, las reacciones se llevaron a cabo por 2 minutos a 25 °C. Las reacciones fueron detenidas mediante la adición de 200 µl de cloroformo/metanol (1:1) y 120 µl de H₂O. La fase orgánica obtenida luego de centrifugar 5 minutos a 4.000 x g se reservó y la interfase fue lavada 2 veces con 150 µl de cloroformo/metanol/agua (1:2:0,3). Alícuotas de la fracción orgánica total obtenida fueron contadas en un contador de centelleo, o bien preparadas para cromatografía (ver apartado 6.13).

Para analizar los efectos del tiempo, temperatura, pH, iones metálicos y detergentes, todos los parámetros se mantuvieron constantes excepto el parámetro bajo estudio. Los valores de concentración micelar crítica (CMC) para el Tritón X-100 (0,25 mM) y el DDM (180 µM) fueron tomados de le Maire *et al.* [54].

La especificidad con respecto al dador fue ensayada con 1 mM de ADP-Man o GDP-Glc en la reacción estándar descrita en este apartado.

6.13. Cromatografías en papel y en capa delgada (CP y TLC)

Los motivos oligosacarídicos fueron liberados del difosfato y poliisoprenol por hidrólisis ácida. Brevemente, las muestras orgánicas fueron concentradas por corriente de N₂ hasta 10-20 µl. Luego, se agregó 200 µl de HCl 0,01 N, pH 1,5 y se incubó a 100 °C por 10 minutos. Las muestras fueron secadas y resuspendidas en 100 µl de H₂O: este último procedimiento fue repetido 3 veces.

Para cromatografía en papel, las muestras fueron sembradas en papel Whatmann 1 (Maidstone, U.K.), y desarrolladas en una cuba saturada con solvente isopropanol/ácido acético/agua (24:7:9).

Para las cromatografías en capa delgada, las muestras fueron hidrolizadas con HCl como se indicó anteriormente. Luego las muestras se deslipidificaron con 600 µl de cloroformo/metanol (2:1). El sobrenadante acuoso fue incubado con 500 µl de piridina 1 min a 100 °C, y secado con corriente de N₂. Luego de tres lavados con 150 µl de H₂O, las muestras fueron sembradas en placas de TLC de sílica (Merck). La cromatografía fue desarrollada en solvente 1-propanol/nitrometano/agua (5:2:2).

Las cromatografías TLC y CP fueron visualizadas con el software ImageQuant y el scanner Storm 840 (Molecular Dynamics). Alternativamente, las cromatografías CP

fueron analizadas directamente cortando cada carril de papel de a 1 cm, y analizando cada fracción en contador de centelleo.

6.14. Complementación funcional *in vivo* (medición de xantano)

Las bacterias complementadas fueron cultivadas en placas YM, suplementado o no con el antibiótico correspondiente con el fin de observar el fenotipo obtenido. Para la cuantificación de la producción del exopolisacárido, las cepas mutantes complementadas fueron cultivadas en medio XOL modificado por 5 días, hasta fase estacionaria. Los sobrenadantes de los cultivos fueron analizados en su contenido de xantano mediante el método del cloruro de cetilpiridinio (CPC) [55]. Brevemente, 20 μ l del sobrenadante fueron suspendidos en 3 ml de H₂O. Se agregaron 3 ml de una solución de CPC 0,036 % p/v y Na₂SO₄ 0,2 % p/v. Las mezclas fueron incubadas 1 h a 37 °C, y luego centrifugadas 20 min a 5.000 x g, con el fin de precipitar los complejos CPC/xantano. A cada sobrenadante se le midió absorbancia a 260 nm y se infirió la cantidad de xantano mediante la curva de calibración realizada con xantano comercial (Kelco).

6.15. Fraccionamiento subcelular

Para la localización subcelular, tanto en *E. coli* como en *Xc*, las células correspondientes fueron cosechadas y resuspendidas en *buffer* Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ 5 mM. Las células se lisaron mediante tres pasajes por French Press a 20.000 psi. El lisado se centrifugó a 5.000 x g con el fin de precipitar las células sin romper y los restos celulares. El sobrenadante fue nuevamente centrifugado a 12.000 x g para aislar cuerpos de inclusión. Finalmente, el sobrenadante se ultracentrifugó a 100.000 x g, con el fin de separar las membranas de la fracción soluble. Las muestras fueron analizadas por SDS-PAGE e inmunodetección.

6.16. Hidrólisis de nucleótidos azúcares sin aceptor

6.16.i. Hidrólisis de GDP-Man por GumI

Se incubó GumI-His₆ 25 μ M con GDP-[¹⁴C]Man 200 μ M (5 mCi/mmol), en *buffer* de purificación de GumK (ver apartado), a 20 °C. Se tomaron alícuotas en los tiempos indicados en resultados.

6.16.ii. Hidrólisis de UDP-GlcA por GumK

Se incubó GumK (o GumK/D157A) 70 μ M con UDP-[14 C]GlcA 105 μ M (6 mCi/mmol), en *buffer* de purificación de GumK (ver apartado), a 20 °C. Se tomaron alícuotas en los tiempos indicados en resultados.

En ambos ensayos, las reacciones fueron frenadas con 1 vol de etanol absoluto. Luego de centrifugar 3 min a 5.000 x g, la fracción acuosa se sembró directamente en placa de TLC (ver apartado).

6.17. Reacción en tándem de GumK y GumI

Para la preparación de la unidad repetitiva completa a partir del lip-PP-trisacárido, se incubó este aceptor con 6 μ g de GumK y 1 μ g de GumI-His₆ purificadas, con UDP-GlcA 1 mM y GDP-Man 5 mM, MgCl₂ 6,25 mM, Tritón X-100 0,5 %, Tris-HCl 20 mM pH 8,0, a 25 °C durante 1 hora en un volumen final de 100 μ l. En las incubaciones se utilizó UDP-[14 C]GlcA ó GDP-[14 C]Man, manteniendo las concentraciones mencionadas, con una actividad específica de 3,2 mCi/mmol y 0,3 mCi/mmol, respectivamente. Las reacciones fueron frenadas como se indicó anteriormente en el apartado 6.12. Los productos fueron analizados por CP.

6.18. Extracción con carbonato y Tritón X-114

Las membranas de XcI/pBGI y Xc1231/pBGI fueron obtenidas como se indicó anteriormente. Se resuspendieron en *buffer* Na₂CO₃ 100 mM, pH 11,4 a una concentración final de proteína 1,5 mg/ml, y se incubaron con agitación durante 60 min a 4 °C. Luego se ultracentrifugó a 100.000 x g por 60 min a 4 °C. El sobrenadante fue removido y el precipitado fue lavado con *buffer* fosfato salino (PBS). El sobrenadante junto a los lavados fueron combinados y el pH fue ajustado con 0,1 volumen de Tris-HCl 1 M pH 7,0. Las proteínas fueron recuperadas mediante precipitación con 10 volúmenes de acetona a -20 °C por 60 min. Las muestras fueron sometidas a SDS-PAGE e inmunodetección.

Para la partición de fase con Tritón X-114 se utilizó el protocolo de Brusca y Randolf para identificar proteínas integrales de membrana [56]. Para ello, las membranas fueron incubadas con Tritón X-114 2 % en PBS en una relación proteína:detergente de 1:10, por 2 h a 4 °C. La fracción insoluble fue removida por centrifugación a 13.000 x g, 10 min a 4 °C. El sobrenadante fue incubado a 37 °C por 10 min para inducir la separación

de fases. Las fases acuosa y detergente fueron separadas por centrifugación a 13.000 x g por 10 min. La fase acuosa, fue lavada con la solución del detergente. La fase detergente, fue lavada con PBS. Cada fase fue precipitada con 10 vol de acetona, como se indicó anteriormente. Las muestras fueron sometidas a SDS-PAGE seguida por inmunodetección.

6.19. Tratamiento con β -manosidasa

La mezcla de reacción enzimática contenía citrato de sodio 50 mM, pH 4,4, 11 nCi de [14 C]Man-oligosacáridos producidos por XcFC2 (ver apartado) o por GumI-His₆ y 0,2 U de β -manosidasa de *Helix Pomatia* (Sigma), en un volumen final de 65 μ l. Las incubaciones se llevaron a cabo durante 16 h a 25°C y fueron frenadas mediante la adición de 1 vol de etanol. Alícuotas fueron analizadas por CP.

6.20. Análisis bioinformáticos

El análisis básico de secuencia de aminoácidos fue realizado mediante programas de dominio público del portal Expasy (<http://expasy.org/>). Para analizar la estructura primaria, se utilizó el programa PROTPARAM [57]. Las búsquedas de similitudes de secuencia fueron realizadas con dos iteraciones de PSI-BLAST [58], fijando como umbral de “*expected value*” (E) un valor de 1×10^{-5} . Las predicciones de regiones transmembranas y de orientación proteica fueron realizadas con los siguientes programas: HMMTOP [59], DAS [60], SOSUI [61], TMHMM [62] y AmphipaseK [63]. El análisis de la orientación de GumK en un modelo de membrana fue realizado por la base de datos *Orientation of Proteins in Membranes* (OPM) [64, 65]. El modelado por homología de GumI fue realizado por el servidor automático SWISS-MODEL [66].

6.21. Cristalogénesis

Para la cristalogénesis de GumI, la proteína purificada en diferentes concentraciones, entre 2 y 25 mg/ml, fue mezclada en proporción 1:1 con soluciones comerciales de cristalización (Hampton – Jena Biosciences). El método utilizado fue difusión de vapor, en las versiones gota colgante y gota sentada. La mayoría de los ensayos se realizaron manualmente, y en algunos casos también se utilizó un robot dispensador de líquidos.

Se probaron más de 300 soluciones, varias concentraciones de proteína, a 4 °C y a 18 °C. Además, se ensayaron aditivos (Tabla 6.3) en condiciones selectas.

Tabla 6.3. Aditivos ensayados

Compuesto	Concentración final	Compuesto	Concentración final
Fenol	10 mM	LiCl	100 mM
1-propanol	4 % v/v	MgCl ₂	10 mM
Acetonitrilo	4 % v/v	Tartrato de Na+ K+	100 mM
Metanol	3 % v/v	CaCl ₂	10 mM
Etanol	3 % v/v	NaCl	200 mM
DMSO	3 % v/v	(NH ₄) ₂ SO ₄	100 mM
MPD	3 % v/v	NiCl ₂	10 mM
Acetona	4 % v/v	KCl	100 mM
Etilenglicol	3 % v/v	CsCl ₂	100 mM
DDM	0,5 % v/v	Citrato de Na+	100 mM
LDAO	0,2 % v/v	MnCl ₂	10 mM
OG	0,5 % v/v	CoCl	10 mM
PEG 400	5 % v/v	Cloruro de guanidinio	100 mM
PEG 600	5 % v/v	ZnCl ₂	10 mM
PEG 1000	2 % v/v	UREA	10 mM
PEG 1500	3 % v/v	EDTA	10 mM
PEG 3350	1 % v/v	Glicina	100 mM
PEG 6000	3 % v/v	Glicerol	3 % v/v
PEG 20000	1 % v/v	Glucosa	3 % p/v
PEG MME 550	3 % v/v	GDP	2 y 1 mM
PEG MME 2000	3 % v/v	GDP-Man	100, 10, 2, 0.2 mM
PEG MME 5000	3 % v/v		

Los cristales de GumK fueron obtenidos como se indica en Barreras *et al* [36].

6.22. *Soakings* con lípidos

Cristales maduros de GumK fueron incubados en 30 μ l de *buffer* de cristalización suplementado con 20 mM de los lípidos heptaprenil monofosfato (*C₃₅-heptaprenil-P*), decaprenil monofosfato (*C₅₅-prenil-P*) (Department of Lipid Biochemistry, Polish Academy of Sciences) o fitanil pirofosfato celobiosa (*fitanil-PP-celobiosa*) (Dpto. Qca. Orgánica, FCEN, UBA). Los tiempos de incubación ensayados fueron 2, 3, 5 y 20 h. Los cristales fueron montados y crio-conservados hasta su medición en el sincrotrón LNLS Campinas, Sao Pablo, Brasil.

6.23. Agregación por presencia de sustrato: absorbancia a 350 nm

GumK fue purificada por el método estandarizado por Barreras [35]. La agregación de GumK 2, 5 y 10 μ M sola o con sustratos (en relación molar 1,5, 4,5 y 7,5) fue monitoreada en el tiempo mediante la absorbancia a 350 nm, en un espectrofotómetro Jasco a temperatura ambiente.

6.24. Modificación del protocolo estándar de purificación de GumK

Para evitar la agregación que impide los ensayos de interacción con sustrato, el protocolo de purificación por cromatografía de exclusión molecular fue modificado cambiando el *buffer* a fosfato 25 mM pH 8,0, NaCl 0,4M, glicerol 10 %, Tritón X-100 0,05%. Esta modificación en la preparación de GumK fue utilizada para la mayoría de los ensayos biofísicos. El mismo método fue utilizado para la purificación de la mutante D157A.

6.25. *Cross-linking* in vitro

GumK purificada, aproximadamente a 20 μ M, fue incubada con UDP-GlcA en proporciones molares 10x y 50x. Las mezclas se incubaron con ditiobis[succinimidil propionato] -DSP- (0, 0,1 y 0,5 mM) a 20 °C o en hielo. Se tomaron alícuotas a 2 y 10 min. Luego de mezclarse con *buffer* desnaturante, las muestras fueron sometidas a SDS-PAGE seguida por tinción con *Coomassie blue*. Para analizar la reversibilidad del entrecruzamiento, se agregó ditioneitol (DTT) 2 mM.

6.26. Simulación computacional

6.26.i. Dinámica Molecular

Debido al tamaño de las proteínas y a la ausencia de una redistribución electrónica en la etapa del proceso abordado por esta metodología, se utilizaron modelos de mecánica clásica (mecánica molecular) para estudiar dichos sistemas mediante simulación computacional. En estos métodos, se define la expresión de la energía potencial en función de las posiciones de los átomos, siendo representados por esferas con cargas puntuales. El campo de fuerza utilizado es el que considera cómo interaccionarán los átomos/esferas entre sí. Por ejemplo, en un campo de fuerza “*all-atom*” las interacciones entre los átomos pueden separarse en dos grupos, las de unión y las de no unión. En las interacciones de unión están involucrados los enlaces, ángulos de tres miembros y ángulos diedros; mientras que las de no unión están conformadas por las interacciones electrostáticas basadas en la ley de Coulomb y un potencial de Lennard-Jones entre átomos que se encuentran a más de 3 enlaces covalentes. En este trabajo se utilizó el campo de fuerza AMBER99 [67] para la parte proteica y nucleotídica, y GLYCAM06 [68] para la región glicosídica de las moléculas estudiadas.

Los modelos de partida para las simulaciones se prepararon a partir de las estructuras experimentales de GumK depositadas en la base de datos PDB (*Protein Data Bank*) (códigos 2Q6V y 2HY7). Las estructuras fueron preparadas para las simulaciones (solvatadas y protonadas) con la herramienta *tleap* del paquete AMBER. La solvatación se realizó con un modelo simple de agua explícita con el potencial TIP3P [69], en forma de un octaedro regular, de forma tal que entre los extremos de la caja y la superficie de la proteína exista aprox. 6 Å. Cada sistema fue sometido a una optimización de 1.000 pasos realizado con el método de gradiente conjugado. La estructura optimizada fue sujeta a una simulación de DM de 120 ps a volumen constante, donde la temperatura fue lentamente incrementada hasta llegar a 300 K. El calentamiento fue seguido por 80 ps de DM en los cuales se mantuvo constante la temperatura y se ajustó la presión de los sistemas a fin de equilibrar su densidad. Dependiendo del sistema y del tipo de estudio, las simulaciones fueron extendidas hasta 50 ns, realizándose las mismas con las condiciones de cantidad de materia, presión y temperatura constantes (NPT), sin ningún tipo de restricción sobre los átomos del sistema, siendo $T = 300$ K y 2 ps el tiempo de integración del algoritmo de Verlet (paso de simulación).

Para la visualización de las trayectorias obtenidas y la preparación de las imágenes se utilizó el programa Visual Molecular Dynamics (VMD) [70]. El cálculo de la raíz cuadrada de la desviación cuadrática media (RMSD, de sus siglas en inglés) de la cadena principal (Ca, C, N, O) se realizó mediante VMD, según la ecuación 6.1, donde δ es la distancia entre los N átomos equivalentes seleccionados.

$$(ec. 6.1) \quad \text{RMSD} = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \delta_i^2}$$

El cálculo de la raíz de grado 2 de la fluctuación cuadrática media (RMSF, de sus siglas en inglés) se realizó mediante el módulo *ptraj* de AMBER, según la ecuación 6.2, donde T es el tiempo tomado en cuenta para el promedio, y \tilde{x}_i es la posición de referencia de la partícula *i*.

$$(ec. 6.2) \quad \text{RMSF} = \sqrt{\frac{1}{T} \sum_{t_j=1}^T (x_i(t_j) - \tilde{x}_i)^2}$$

6.26.ii. Construcción de ligandos *in silico*

El *docking*, brevemente, es un método que permite predecir la orientación de una molécula respecto a la otra en un complejo. Los resultados obtenidos del *docking* son muy dependientes de las estructuras iniciales utilizadas así como la libertad conformacional que se le permite a las moléculas interactuantes. Los *dockings* fueron realizados con el paquete de herramientas Autodock [71]. Los resultados de *docking* fueron visualizados en VMD.

Mientras que las cargas puntuales de los residuos proteicos ya se encuentran parametrizadas en el campo de fuerza utilizado, las correspondientes a las moléculas UDP-GlcA, UDP-Glc y UDP-GalA se encuentran ausentes en todos los campos de fuerza. Para la parametrización de dichos ligandos, se realizó en primer lugar una optimización de la geometría utilizando métodos de estructura electrónica (Hartree-Fock) con el programa Gaussian 03. Luego de obtener la estructura con las distancias y ángulos optimizados, se calcularon los parámetros de carga puntuales utilizando el método RESP [72]. Como control de la parametrización se realizaron 3-5 ns de DMs de cada ligando solvatado en una caja octaédrica de agua con el modelo

TIP3P. Luego se realizó DM de los complejos formados como se indica en 6.26.i. Para la estimación del cambio de energía libre dado por la unión de los ligandos ensayados se utilizó el módulo MM-GBSA del paquete AMBER. Esta metodología posee una gran correlación con datos experimentales al analizar la energía libre de unión entre diferentes moléculas con una dada proteína, o entre un ligando en interacción con una proteína en diferentes conformaciones. La localización de moléculas de agua con mayor ocupancia que el promedio en el solvente (sitios de agua) en las DMs fue analizada por la aplicación *gapecluster*, diseñada por Gauto D. y Petruk A (FCEyN – UBA). La misma analiza la trayectoria de las moléculas de agua sobre la superficie proteica a partir de una simulación de DM. El *bias-docking* fue realizado mediante un algoritmo de *docking* modificado por Gauto D., por el cual se adicionan pozos de energía en la superficie potencial de los átomos seleccionados, y luego se utiliza el Autodock [73].

6.27. Dispersión de luz a bajo ángulo (SAXs)

GumK en diferentes concentraciones entre 1 y 8 mg/ml fue medida en la línea X9 de dispersión de rayos X (BNL-NSLS, New York, EEUU) en presencia y ausencia de sustrato UDP-GlcA o UDP, en relación molar 5x y 10x. Las mezclas fueron centrifugadas 10 min a 4 °C, y mantenidas en la celda a 10 °C. Se realizaron 4 exposiciones individuales, de 120 s cada una. El análisis de los datos fue realizado por el responsable de la línea X9, Dr. Lin Yang.

6.28. Proteólisis limitada

GumK 80 μ M fue incubada en *buffer* de purificación de GumK, manteniendo una relación en masa 1:200 con tripsina (Sigma), en ausencia de sustrato o en presencia de 1 mM de: UDP, UDP-GlcA, UDP-Glc o UDP-GalA, a 20 °C. Bajo las mismas condiciones se realizó la proteólisis con tripsina de GumK/D157A en ausencia y presencia de UDP o UDP-GlcA.

Para la proteólisis con α -quimiotripsina (Sigma), GumK y GumK/D157A fueron incubadas en *buffer* de purificación de GumK, manteniendo una relación en masa 1:150 con la proteasa, en ausencia de sustrato o en presencia de 1 mM de UDP o UDP-GlcA, y CaCl₂ 10 mM, a 20°C.

En todos los casos, alícuotas fueron tomadas a diferentes tiempos e incubadas con 1 volumen de *buffer* desnaturizante suplementado con PMSF 2 mM. Luego fueron

incubadas 10 min a 100 °C y reservadas a -80 °C hasta su uso. Las muestras obtenidas fueron analizadas por SDS-PAGE seguido por tinción con *Coomassie blue*. Para la secuenciación N-terminal de los fragmentos de interés, las digestiones fueron separadas por SDS-PAGE y luego transferidas a membrana de PVDF como se indica en el apartado inmunodetección. Las bandas transferidas fueron teñidas con Rojo Ponceau S y secuenciadas por el método de degradación de Edman en un secuenciador modelo 477 (Applied Biosystems), en el servicio de LANAIS (FFyB, UBA).

6.29. Fluorescencia

En todos los casos se utilizó un fluorímetro Jasco FP 6500 (Jasco, Japón).

6.29.i. Espectros en presencia de sustratos

GumK 80 µM fue sometida a espectros de emisión intrínseca de triptófanos. Cada muestra fue excitada a 295 nm y 229 nm y el promedio de cuatro espectros de emisión fue registrado entre 300-450 nm y 270-330 nm, respectivamente. Se registraron también los espectros en presencia de concentraciones crecientes de ligando. Los espectros fueron medidos a 20 °C, a menos que se indique lo contrario. La temperatura se mantuvo en un rango de ± 0.1 °C, utilizando un dispositivo *peltier*. Los datos registrados fueron exportados y analizados con GraphPad Prism 4.

6.29.ii. Espectros en función de la temperatura

Los espectros de GumK 80 µM en ausencia y en presencia de UDP-GlcA 120 µM fueron registrados con una rampa de 1 °C/min. Los datos registrados fueron exportados y analizados con GraphPad Prism 4. Los espectros resultantes provienen de un promedio de 4 mediciones.

6.30. Dicroísmo circular (CD)

Las mediciones de CD fueron realizadas en un espectropolarímetro Jasco J-815 (Jasco, Japón) empleando una velocidad de escaneo de 100 nm/min, un ancho de banda de 1 nm, y una respuesta promedio de cuatro segundos.

6.30.i. Espectros en presencia de sustratos

Los espectros de CD en el UV cercano fueron obtenidos utilizando las muestras descritas en el apartado 6.29.i en una cubeta de cuarzo con un paso óptico de 0.1 cm. Los espectros fueron medidos a 20 °C, a menos que se indique lo contrario. La

temperatura se mantuvo en un rango de $\pm 0,1$ °C, utilizando un dispositivo *peltier*. Los espectros resultantes provienen de un promedio de seis mediciones.

6.30.ii. Espectros en función de la temperatura

Los espectros en el UV lejano fueron analizados en el rango de 15 °C a 60 °C, con una rampa de 1 °C/min, utilizando una concentración de proteína de 10 μ M. El sustrato fue agregado en una concentración de 15 μ M. Los datos registrados fueron exportados y analizados con GraphPad Prism 4. Los espectros resultantes provienen de un promedio de seis mediciones. Los espectros en el UV cercano fueron obtenidos de la misma forma, utilizando una concentración de proteína de 80 μ M y de sustrato 120 μ M.

6.31. Dispersión de luz dinámica (DLS)

Se evaluó el diámetro hidrodinámico de GumK en función de la temperatura en un aparato de dispersión de luz dinámico Zetasizer Nano Series Zen 1600 (Malvern Instruments Ltd. Worcestershire, UK). Se utilizó una celda de cuarzo de 1 cm de paso de luz y una concentración de proteína de aproximadamente 80 μ M. La temperatura se aumentó con una pendiente de 2 °C/min. El sustrato fue agregado en una concentración de 120 μ M. Los resultados fueron exportados y analizados (normalizados) con GraphPad Prism 4.

6.32. Calorimetría isotérmica de titulación (ITC)

GumK 80 - 160 μ M fue dializada extensivamente contra el *buffer* de purificación (apartado 6.24). Este *buffer* fue utilizado para preparar las soluciones de UDP-GlcA para evitar las diferencias de composición de las soluciones. GumK a una concentración de 80 μ M fue titulada con una solución 3 mM de UDP-GlcA en un microcalorímetro VP-ITC (Microcal). Se realizaron, además, ensayos con mayor cantidad de proteína, escalando en forma directamente proporcional la concentración de ligando utilizado. Las condiciones de las titulaciones fueron: una primera inyección de 2 μ l, seguida por 39 inyecciones de 6 μ l, con una duración de 12 s y una distancia temporal de 180 s entre inyecciones, con una agitación de 250 rpm, a 20 °C. Siguiendo el mismo procedimiento se realizaron titulaciones controles que incluyeron los siguientes sistemas celda/jeringa: proteína/*buffer*, *buffer*/ligando, *buffer* (5x detergente)/ligando. Los datos fueron analizados con el programa Origin MicroCal.

Las mismas condiciones fueron ensayadas utilizando GumK/D157A.

6.33. Resonancia magnética nuclear (RMN)

GumK 350 - 450 μ M con dioxano 0,4 % (como estándar interno) fue medida en un equipo Bruker a una frecuencia de 600.3 MHz, a 20 °C. Se utilizó la técnica de gradiente de campo pulsado (PFG) ejecutando la secuencia PGSLED [74]. La longitud de los pulsos y retardos en la secuencia se mantuvieron constantes y se colectaron 20 espectros variando la fuerza del gradiente de difusión de 5 % a 95 % del valor máximo. Los espectros del dioxano se adquirieron con 16.000 puntos complejos y los de la proteína con 4.000. Los ligandos fueron mezclados con GumK en una relación molar de 1,5x. Los resultados fueron analizados por la Dra. Mariana Gallo (servicio de RMN, Fundación Instituto Leloir).

7. Resultados y Discusión – GumI

Resultados

7.1. Complementación funcional *in vivo*

La función del gen *gumI* fue previamente inferida mediante el análisis de los productos intermediarios en la cepa *Xc* mutante *gumI*, XcI [33]. En esta cepa se encontró principalmente como glicolípido intermediario al lípido-pirofosfato-tetrasacárido, lip-PP-Glc₂-Man-GlcA, indicando una síntesis incompleta de la unidad repetitiva. Según dichos resultados, GumI sería una manosiltransferasa no-procesiva que utilizaría GDP-Man como dador y lípido-pirofosfato-tetrasacárido como aceptor. Para comprobar la función del marco de lectura abierto *gumI in vivo*, el mismo fue clonado en un vector de amplio rango de hospedador inducible por arabinosa, pBBAD22K [50], bajo la dirección del promotor pBAD. El plásmido obtenido pBGI fue introducido en las cepas XcFC2 (salvaje) y XcI.

Las cepas de *Xc* productoras de xantano lucen peculiarmente mucosas en medio sólido, debido al exopolisacárido secretado. Como se muestra en la Figura 7.1.A, XcI (ii) presenta un fenotipo seco comparada con la cepa salvaje XcFC2 (i). Ésto permite observar cualitativamente en placas de Petri la complementación funcional del gen en *trans*, obteniendo en la cepa XcI/pBGI (iv) un fenotipo mucoso similar al control positivo XcFC2. El vector vacío pBBAD22K no tuvo efecto sobre XcI (iii).

El análisis de los glicolípidos intermediarios producidos por XcI/pBGI mediante cromatografía en papel (CP, Figura 7.1.B) mostró que la cepa produce un lípido intermediario similar a la unidad repetitiva completa lípido-pirofosfato-pentasacárido (lip-PP-Glc₂-Man-GlcA-Man) obtenida en XcFC2.

Para cuantificar el nivel de la complementación funcional, se analizó la producción de polisacárido *in vivo* en medio líquido, comparándose la producción de xantano de la cepa XcI/pBGI con la de la cepa salvaje XcFC2, en función de la concentración del inductor arabinosa (Figura 7.1.C). En este caso, se observó que la expresión de la proteína GumI en la cepa XcI restaura la producción de xantano a niveles salvajes, es decir que restituye la actividad manosiltransferasa. Paralelamente se estudió la expresión de la proteína en función de la concentración de arabinosa. Como se observa en la Figura 7.1.D, la cantidad de proteína expresada no varía en presencia de diferentes

concentraciones de inductor y tampoco es reprimida por la presencia de glucosa en el medio de cultivo.

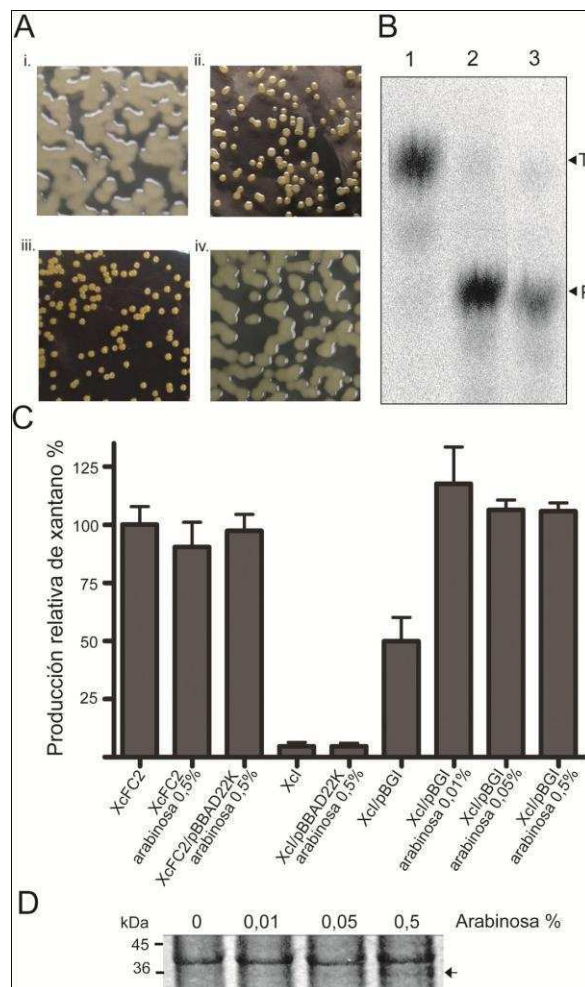


Figura 7.1. Complementación funcional de la mutante XcI por el gen *gumI*. **(A)** Rescate del fenotipo mucoso en medio sólido. i. XcFC2 (salvaje), ii. XcI, iii. XcI/pBBAD22K, iv. XcI/pBGI suplementada con 0.05% de arabinosa. **(B)** Restauración de la síntesis de la unidad repetitiva lip-PP-Glc₂-Man-GlcA-Man. Los oligosacáridos de los glicolípidos producidos luego de la incubación de células permeabilizadas de XcI (carril 1), XcI/pBGI (carril 2), y XcFC2 (carril 3) con UDP-Glc, GDP-Man y UDP-[¹⁴C]GlcA fueron liberados y analizados por CP. Se indica en la figura la migración de los estándares Glc₂-Man-[¹⁴C]GlcA (T) y Glc₂-Man-[¹⁴C]GlcA-Man (P). **(C)** Restauración de la producción de polisacárido. El polímero producido *in vivo* por las cepas de *X. campestris* indicadas fueron cuantificadas por el método de CPC (ver Materiales y Métodos). La cuantificación fue relativizada respecto a la cepa XcFC2. Las barras de error denotan la desviación estándar de tres experimentos independientes. **(D)** La expresión de GumI en extractos totales de XcI/pBGI inducidos con arabinosa fue analizada por SDS-PAGE seguido por tinción con *Coomassie blue*. La posición de los marcadores de masa molecular se indica en la figura. La flecha indica la posición de GumI.

7.2. Localización subcelular de GumI en Xc

Dada la importancia de la participación de la membrana para el funcionamiento del sistema de síntesis de xantano, se analizó la localización subcelular de GumI recombinante, expresada a partir del plásmido pBGI, tanto en la cepa XcFC2, en XcI

como en la cepa carente del operón *gum* Xc1231 (Figura 7.2.A). En todos los casos la proteína fue hallada en la fracción de membranas, indicando que dicha localización es una propiedad intrínseca de la proteína y no depende de la interacción con otras proteínas Gum.

El análisis de secuencia de GumI predice que la proteína completa posee un pI de 8,4, mientras que su porción N-terminal y C-terminal tienen un pI de 10,3 y 5,4, respectivamente. Esto indicaría que, como en otras GTs descritas, la interacción sería mediada por el extremo N-terminal, involucrando aminoácidos básicos e hidrofóbicos de dicha región. Con el fin de estudiar las interacciones que gobiernan la unión de GumI a la membrana, se realizaron dos aproximaciones experimentales. Por un lado, se sometieron las membranas de *Xc* con el plásmido pBGI a extracción con una solución a pH básico. Luego de ultracentrifugar las membranas de XcI/pBGI y de Xc1231/pBGI previamente incubadas con una solución de 0,1 M de Na₂CO₃ (pH 11), se analizó la localización de GumI por geles desnaturalizantes e inmunodetección. Se pudo observar que GumI fue solubilizada en parte, pero no absolutamente, en medio básico (Figura 7.2.B). Este resultado sugiere que la interacción de GumI con la membrana no es meramente iónica.

Por otro lado, se extrajeron las membranas con el detergente Tritón X-114. Este detergente posee una temperatura micelar crítica de 22 °C, es decir que por encima de esta temperatura una solución de dicho detergente se separará en dos fases: acuosa y rica en detergente. Esta cualidad se utilizó para diferenciar las proteínas integrales de membrana de aquellas periféricas [56]. Las membranas de XcI/pBGI y de Xc1231/pBGI fueron incubadas con una solución de Tritón X-114 2 %, a 37 °C. Luego de la separación de fases, las proteínas localizadas en las diferentes fases fueron analizadas por inmunodetección, observando la partición diferencial de GumI en la fase detergente (Figura 7.2.C). Según estos resultados, sumando además la ausencia de predicción de segmentos transmembranas por métodos bioinformáticos, se infiere que GumI sería una proteína integral monotópica de membrana.

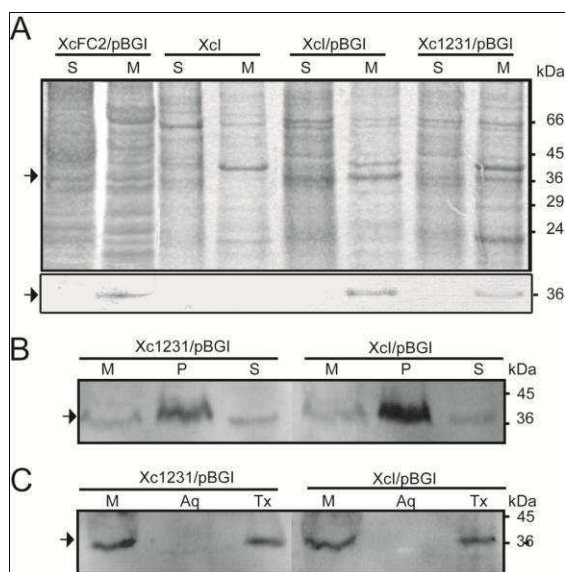


Figura 7.2. Localización subcelular de GumI y asociación a la membrana. (A) Localización subcelular de GumI. SDS-PAGE (panel superior) e inmunodetección (panel inferior) de proteínas de las fracciones soluble (S) y de membrana (M) de *X. campestris*. (B) Solubilización de proteínas de membranas de Xcl/pBGI o Xc1231/pBGI con Na_2CO_3 . Luego del tratamiento descrito, las membranas celulares totales fueron colectadas por ultracentrifugación y las muestras correspondientes a membranas celulares iniciales (M), soluble (S) e insoluble (P) fueron sometidas a inmunodetección. (C) Membranas celulares totales derivadas de Xcl/pBGI o Xc1231/pBGI fueron extraídas y sometidas a separación de fase con Tritón X-114. Las muestras correspondientes a las membranas celulares iniciales (M), acuoso (Aq) y fase detergente (Tx) fueron sometidas a inmunodetección. Las flechas indican la posición de GumI.

7.3. Expresión heteróloga del marco abierto de lectura propuesto para *gumI*

La proteína GumI se expresa en niveles muy bajos en *Xc*. Esta característica dificulta la purificación y el análisis de la proteína a partir de dicho sistema. Por tal motivo, fue necesario clonar el marco abierto de lectura *gumI* en vectores de expresión de la familia pET para el sistema heterólogo *E. coli*. Las construcciones se realizaron bajo un promotor fuerte inducible por IPTG y se fusionaron alternativamente ambos extremos del marco abierto de lectura a una secuencia nucleotídica que codifica para seis histidinas (His₆ - etiqueta de polihistidinas), para facilitar la inmunodetección y la purificación mediante cromatografía de afinidad por cationes divalentes. De esta forma se obtuvieron *E. coli* BL21(DE3)/pET28HisIN (His₆ en N-terminal) y *E. coli* BL21(DE3)/pETHisIC (His₆ en C-terminal).

Se probaron distintas condiciones de expresión, variando tiempos y temperaturas de inducción y concentración de inductor. Los extractos resultantes fueron analizados por SDS-PAGE. En todos los casos ensayados se observaron bandas diferenciales de expresión [51].

El análisis de la localización subcelular mostró que las condiciones de mayor expresión presentaron un porcentaje alto de proteína en cuerpos de inclusión. Por tal motivo, se eligieron inducciones más débiles, en condiciones suaves de temperatura (20 °C), que

minimizan la proteína ubicada en cuerpos de inclusión. Cabe destacar que, al igual que en *Xc*, GumI expresada en *E. coli* se localiza en membranas. Esta característica determinó la necesidad de utilizar detergente y fuerza iónica para la extracción de la proteína. En *Materiales y métodos* se detallan las soluciones utilizadas.

7.4. Purificación de GumI

La purificación de la enzima GumI recombinante se ensayó a partir de las dos construcciones obtenidas en *E. coli*. La proteína GumI que posee el His₆ en el extremo N-terminal mostró ser inestable durante las etapas de purificación, siendo degradado su extremo N-terminal. Su purificación será descrita más adelante. En cambio, GumI presentando el His₆ en el C-terminal fue más estable, siendo purificada en dos pasos cromatográficos^a. El primer paso consistió en una cromatografía de afinidad por cationes metálicos (IMAC), y el segundo en una cromatografía de exclusión molecular (S200), obteniéndose finalmente proteína purificada en al menos un 95 % (Figura 7.3), con un rendimiento de 5 mg de proteína purificada por litro de cultivo. Cabe destacar que el proceso de purificación fue desafiante debido a la inestabilidad intrínseca de la proteína que requiere alta fuerza iónica, detergente y glicerol 20 %. En las condiciones detalladas, GumI-His₆ a una concentración de 5 mg/ml es estable durante un mes a 4 °C y durante cinco meses a -20 °C.

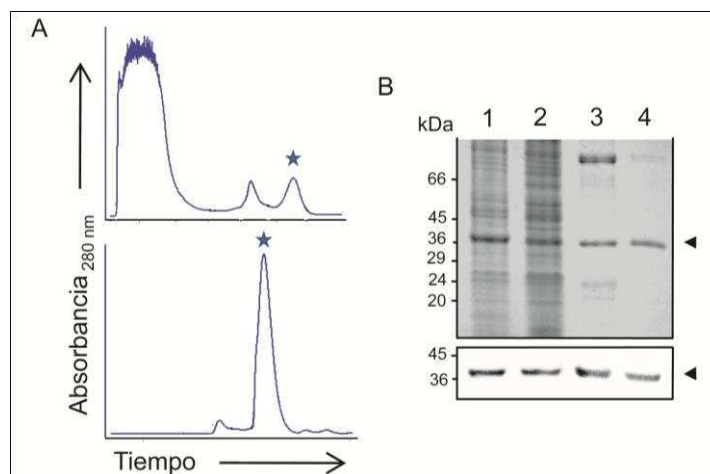


Figura 7.3. Purificación de GumI recombinante. (A) Se muestran esquemas representativos de los cromatogramas de los dos pasos cromatográficos de la purificación de GumI-His₆: IMAC (arriba) y S200 (abajo). La estrella denota la fracción correspondiente a la proteína. (B) SDS-PAGE teñido con *Coomassie blue* (arriba) e inmunodetección (abajo) del proceso de purificación: 1, Extracto total de células BL21(DE3)/pETHisIC; 2, Extracto soluble en el detergente Tritón X-100; 3, fracción IMAC; 4, fracción S200 final. La punta de flecha indica la posición de GumI.

^a En adelante, salvo se indique lo contrario, cuando se nombre GumI-His₆ se refiere la construcción purificada con el His₆ en el C-terminal.

7.5. Caracterización de la proteína GumI-His₆ purificada

Según la secuencia del gen *gumI* se espera un producto proteico de 40 kDa. En la Figura 7.3.B (carril 4) se puede observar que GumI-His₆ migra en un gel desnaturalizante como una proteína de tamaño ligeramente menor al esperado (~36 kDa). Esta diferencia puede corresponder a una migración aberrante debida a la unión de lípidos y detergentes, al igual que muchas proteínas de membrana [75]. Entonces, para comprobar el tamaño real de la proteína purificada, se realizó un análisis por espectrometría de masa *matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight* (MALDI-TOF). Como se observa en la Figura 7.4.A, la proteína purificada posee el tamaño esperado.

Con el fin de comprobar pureza y calidad de la proteína purificada se realizaron ensayos de dispersión de luz estático acoplado a cromatografías de exclusión molecular (SEC-SLS). En este caso, se observó que la proteína purificada es monodispersa, eluyendo como única especie, y no presenta agregados (Figura 7.4.B).

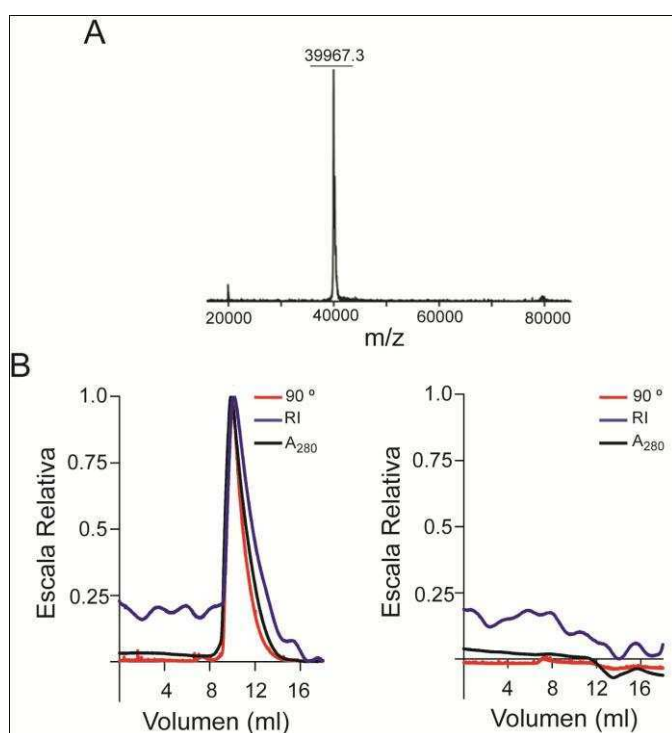


Figura 7.4. (A) Determinación de la masa molecular de GumI purificada. Se observa el valor de m/z obtenido por MALDI-TOF, el cual se acerca al valor predicho de 40.038 Da. (B) Dispersión de GumI purificada. Se analizó por dispersión de luz acoplada a exclusión molecular el estado de GumI (izquierda) y el *buffer* solo (derecha). La elución fue monitoreada por dispersión de luz a 90° (línea roja, 90°), índice de refracción (línea azul, RI) y absorbancia a 280 nm (línea negra, A_{280}). Este ensayo es representativo de cinco ensayos utilizando 300-1000 μ g de enzima purificada. Los datos fueron normalizados para proveer claridad.

7.6. Actividad de GumI-His₆

Una vez obtenida la proteína purificada de forma estable, ensayamos la actividad manosiltransferasa propuesta. Para ello utilizamos como sustratos al aceptor endógeno lip-PP-Glc₂-Man-GlcA y al nucleótido azúcar dador GDP-Man. El análisis por CP de los productos de las reacciones ensayadas demostró que al utilizar el aceptor

lip-PP-Glc₂-Man-GlcA frío, y luego de incubarlo con GDP-[¹⁴C]Man (Figura 7.5.A), se obtuvo un producto pentasacárido radiactivo. El mismo producto fue encontrado al incubar lip-PP-Glc₂-Man-[¹⁴C]GlcA con GDP-Man (Figura 7.5.B) en presencia de GumI. Estos resultados demuestran que la proteína GumI purificada tiene actividad manosiltransferasa *in vitro* (Figura 7.5). En estas condiciones, GumI tiene una tasa de transferencia de Man de más de 50 pmoles x min⁻¹ x mg⁻¹.

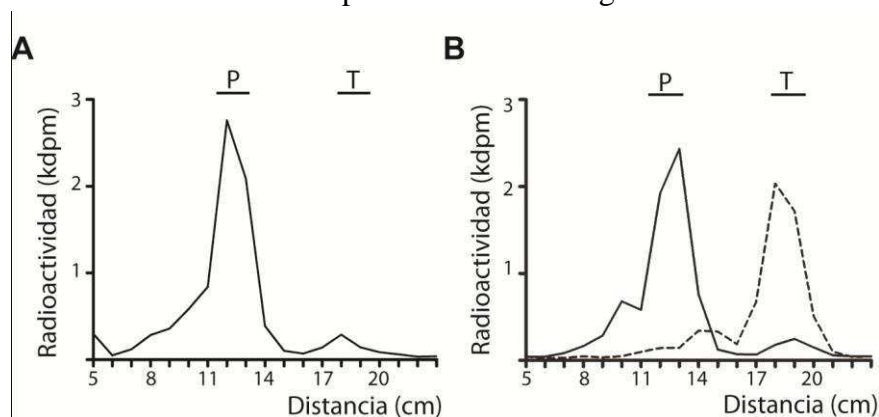


Figura 7.5. La actividad de GumI-His₆ recombinante purificada fue medida y analizada por CP, incubando (A) lip-PP-Glc₂-Man-GlcA, GDP-[¹⁴C]Man y GumI o (B) lip-PP-[¹⁴C]Glc₂-Man-GlcA y GDP-Man, con (línea continua) o sin GumI (línea discontinua). Se indica la posición de los estándares pentasacárido (P) y tetrasacárido (T).

Con el fin de investigar las condiciones óptimas de actividad de la proteína recombinante, se realizaron curvas de actividad en función del tiempo, temperatura, concentración y tipo de detergente, y presencia de cationes metálicos divalentes (Figura 7.6).

Se observó que la actividad es máxima a pH 8,0 y disminuye por debajo de pH 7,5 y por encima de pH 9,5 (Figura 7.6.A). Resulta importante destacar que la presencia de cationes metálicos divalentes no es necesaria para la actividad de la enzima, y es ligeramente estimulada en presencia del agente quelante ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (Figura 7.6.B). Este resultado tiene implicancias estructurales, debido a que hasta el momento, todas las GTs que no dependen de cationes divalentes pertenecen a la superfamilia estructural GT-B [76]. En cuanto a la temperatura, se observó que la actividad máxima es a 35 °C, con una caída del 20 % de actividad a los 20 °C y casi una completa inhibición a 60 °C, probablemente debido a la desnaturalización de la enzima (Figura 7.6.D). Se encontró además que la actividad de GumI es afectada por la concentración y estructura del detergente (Figura 7.6.C). La reducción de la concentración de detergente resultó en una disminución de la actividad en al menos

50 %. Además, la actividad óptima en presencia de Tritón X-100 resultó un 60 % menor que la obtenida con DDM. Estos resultados podrían ser explicados por el rol de las superficies de contacto lípido-proteína en la actividad enzimática.

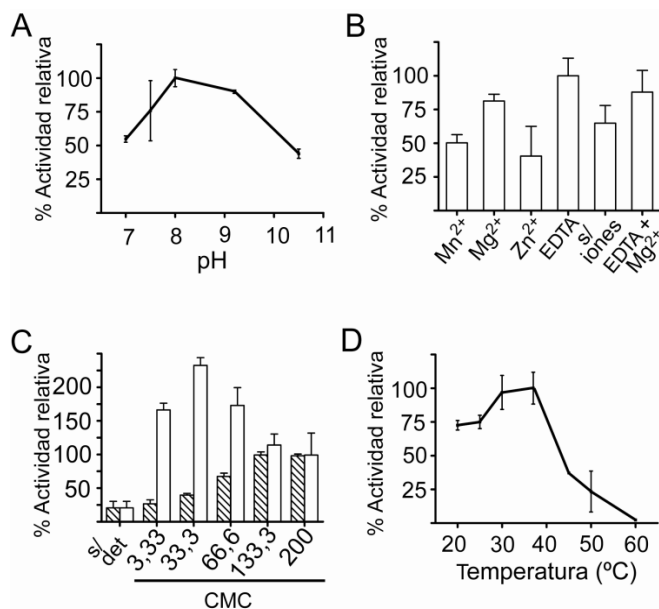


Figura 7.6. Análisis de la actividad manosiltransferasa de la enzima GumI purificada en función de la variación de diferentes parámetros de reacción. **(A) pH.** Una solución tampón Tris-HCl fue utilizada para pH 7.0 a 8.0, y Glicina-NaOH se utilizó para los valores de pH entre 9.2 y 10.5. **(B) Iones/EDTA.** La enzima fue preincubada en presencia de 10 mM de iones o 10 mM EDTA. **(C) Detergente.** La actividad fue analizada en presencia de Tritón X-100 (barras rayadas) o DDM (barras vacías). Los resultados están expresados relativos a la actividad en presencia de Tritón-X 100 y utilizando la concentración micelar crítica (CMC) como unidad de concentración. **(D) Temperatura.** Cada punto representa el promedio de tres experimentos independientes.

Además, se ensayó si GumI es capaz de hidrolizar su sustrato dador GDP-Man en ausencia del aceptor. Como se observa en la Figura 7.7, GumI es incapaz de hidrolizar el sustrato dador en ausencia del lip-PP-tetrasacárido, a diferencia de GumK [37], indicando una posible diferencia en el mecanismo catalítico entre estas dos enzimas.

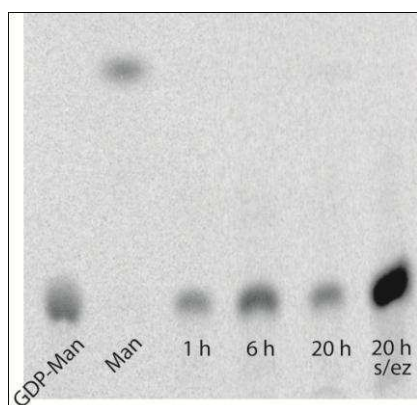


Figura 7.7. Hidrólisis del sustrato dador en ausencia del aceptor. Se incubó la enzima GumI-His₆ con GDP-[¹⁴C]Man y se tomaron alícuotas a 1, 6 y 20 h. Como control de la estabilidad del GDP-[¹⁴C]Man se lo incubó sin enzima durante 20 h (s/ez). Las muestras fueron analizadas por TLC junto a estándares GDP-[¹⁴C]Man y [¹⁴C]Man.

7.7. Caracterización del producto

Como se describió en el Capítulo 4, las GTs pueden catalizar reacciones de inversión o de retención. Esta cualidad queda en evidencia, lógicamente, en el producto de reacción.

Dado que sólo se obtienen pequeñas cantidades de producto en forma cruda, no pudimos realizar un examen químico directo del mismo. Por tal motivo, se utilizó la enzima β -manosidasa de *Helix Pomatia* para determinar la estereoquímica del producto formado por GumI. El pentasacárido radiactivo obtenido en la reacción de GumI fue digerido con β -manosidasa y se analizaron los productos de dicha reacción por CP (Figura 7.8). Como control de la digestión se utilizó el pentasacárido [14 C]Glc₂-Man-GlcA-Man obtenido a partir de XcFC2, el cual liberó tanto [14 C]Man-tetrasacárido como [14 C]Man luego de la digestión (Figura 7.8.A). La ausencia de actividad α -manosidasa se ensayó utilizando como sustrato a [14 C]Glc₂-Man preparado con células XcFC2 (Figura 7.8.B), el cual contiene un enlace en configuración α . En la digestión del producto de GumI se observó también la liberación del residuo de [14 C]Man (Figura 7.8.C), demostrando que la manosa adicionada por GumI se encuentra en configuración beta.

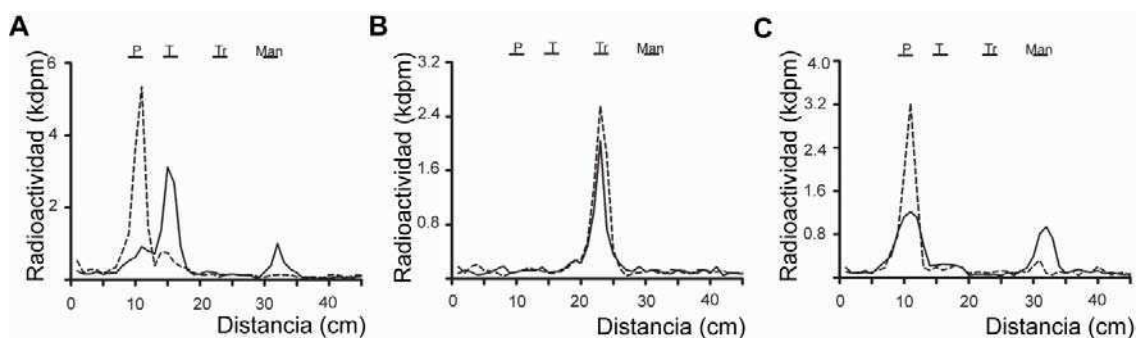


Figura 7.8. Estereoquímica del producto de GumI. (A) Los [14 C]Man-oligosacáridos obtenidos a partir de incubaciones con células permeabilizadas XcFC2 con UDP-Glc, GDP- 14 C]Man y con UDP-GlcA (B) o sin UDP-GlcA, fueron utilizados como controles positivos y negativos, respectivamente. (C) El producto de la reacción de GumI fue sometido al tratamiento con β -manosidasa. En todos los paneles, las líneas llenas representan las muestras tratadas con β -manosidasa y las líneas punteadas a las muestras sin tratar. Se indica la migración de los estándares pentasacárido (P), tetrasacárido (T), trisacárido (Tr) y manosa (Man).

7.8. Especificidad de sustrato

Se ensayó la especificidad de la enzima GumI mediante el uso de diferentes nucleótidos azúcares. Se incubó a GumI con ADP-Man o GDP-Man y los productos de reacción fueron analizados por CP (Figura 7.9.A). Se observó que GumI prefiere GDP-Man, pero puede utilizar ADP-Man con un rendimiento del 35 % aproximadamente respecto al rendimiento con GDP-Man. El rendimiento con GDP-Glc es de un 15 % aproximadamente del rendimiento con GDP-Man. Cabe destacar que ambos nucleótidos-azúcares son no fisiológicos en *Xc*. Esta flexibilidad en cuanto al sustrato se

observó también en otras GTs de la superfamilia GT-B [77-79]. Como se discutirá más adelante, esta característica es muy diferente a lo observado con GumK.

Por otro lado, se preparó mediante hidrólisis pentasacárido libre de la porción lip o lip-PP con el fin de utilizarlo como aceptor de la reacción de GumI. En este caso, se observó que GumI es incapaz de transferir el residuo de Man al tetrasacárido sin la porción lipídica, demostrando la importancia del lípido para la actividad de la enzima (Figura 7.9.B).

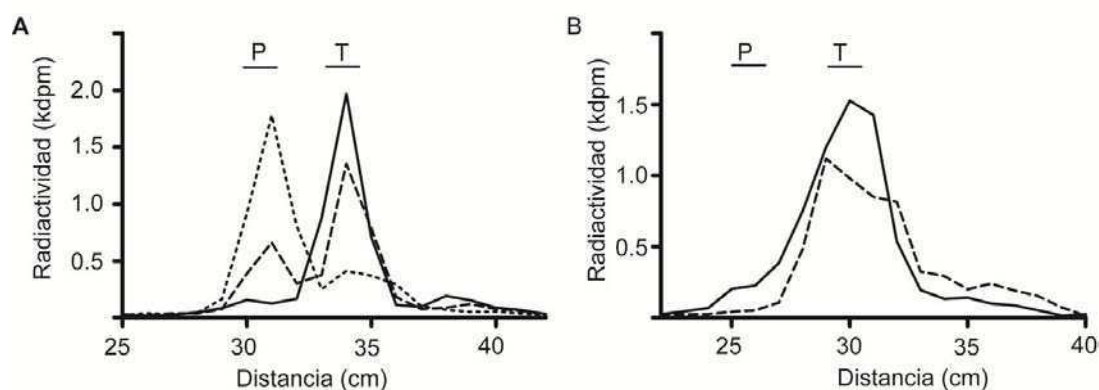


Figura 7.9. Requerimiento de sustrato y especificidad de GumI. (A) El aceptor lip-PP- ^{14}C Glc₂-Man-GlcA fue incubado con GumI y GDP-Glc (líneas llenas), ADP-Man (líneas discontinuas) o GDP-Man (líneas de puntos). (B) PP- ^{14}C Glc₂-Man-GlcA (líneas llenas) o ^{14}C Glc₂-Man-GlcA (líneas discontinuas) fue incubado con GumI y GDP-Man. Los oligosacáridos fueron liberados por hidrólisis ácida suave y alícuotas fueron analizadas por cromatografía en papel. Se indica la migración de los estándares tetrasacárido (T) y pentasacárido (P).

7.9. Reacción en *tándem* GumK y GumI

En la biosíntesis de la unidad repetitiva del xantano, GumK cataliza la transferencia de un residuo de GlcA para formar lip-PP-Glc₂-Man-GlcA, el cual es el sustrato aceptor de GumI. Dado que se dispone de ambas enzimas purificadas, se probó la síntesis de lip-PP-Glc₂-Man-GlcA-Man a partir de lip-PP-Glc₂-Man. En vista de que ambas proteínas tienen diferentes temperaturas óptimas de reacción (20 °C para GumK y 35 °C para GumI), se realizaron los ensayos a 25 °C, por 1 h. La mezcla de reacción contenía uno de los dos sustratos nucleótidos-azúcares marcados radiactivamente, el aceptor lip-PP-Glc₂-Man y las enzimas purificadas (Figura 7.10). El lípido lip-PP-Glc₂-Man-GlcA-Man fue formado solamente cuando ambas enzimas y ambos nucleótidos-azúcares estaban presentes. Como se observa en la Figura 7.10.B y C, la reacción de GumI tuvo aproximadamente un 95 % de rendimiento.

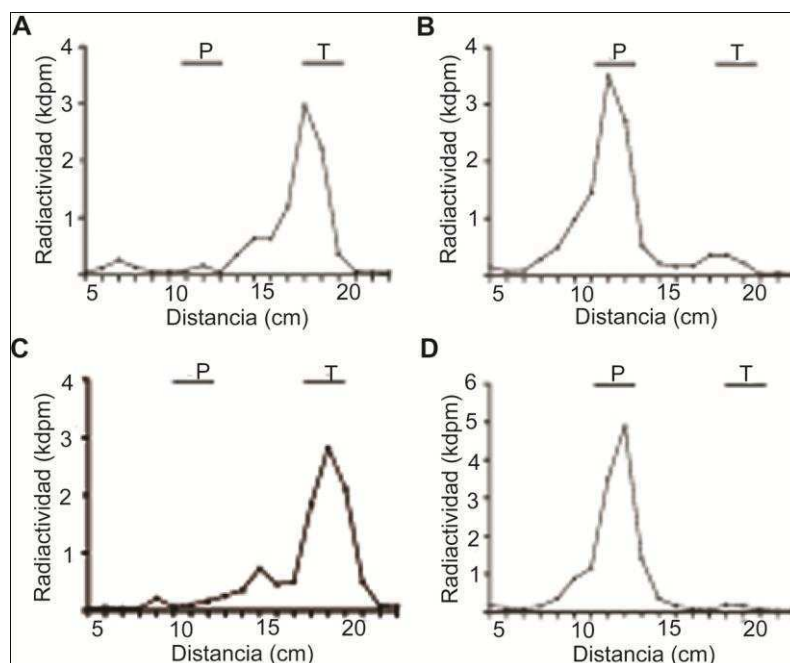


Figura 7.10. Síntesis enzimática del lip-PP-Glc₂-Man-GlcA-Man usando GumI y GumK recombinantes. GumK junto a su sustrato aceptor fueron incubados con (A) UDP-[¹⁴C]GlcA; (B) UDP-[¹⁴C]GlcA, GDP-Man y GumI; (C) UDP-[¹⁴C]GlcA, GumI sin GDP-Man (control negativo); (D) UDP-GlcA, GDP-[¹⁴C]Man y GumI. Los lipo-oligosacáridos fueron extraídos y los oligosacáridos fueron liberados por hidrólisis, y analizados por CP. La migración de los estándares pentasacárido (P) y tetrasacárido (T) se encuentra indicada.

7.10. Estudios estructurales: cristalogénesis

GumI cataliza el último paso en la síntesis de la unidad repetitiva durante la síntesis del xantano. Por lo tanto, la enzima podría funcionar como un nexo entre la síntesis del glicolípido intermediario y la reacción de polimerización. Por otra parte, hasta el momento de la realización experimental del trabajo, GumI se encontraba incluida como no clasificada en la base de datos CAZy, lo que implica que la enzima no posee proteínas homólogas o similares caracterizadas bioquímicamente. Con el fin de completar la caracterización de GumI, se realizaron ensayos de cristalogénesis.

En una primera aproximación se utilizó GumI purificada en presencia de Tritón X-100, también utilizada en los ensayos bioquímicos mostrados anteriormente. El método de cristalización utilizado fue difusión de vapor, en sus versiones de gota colgante, realizado manualmente, y gota sentada, utilizando un robot dispensador de líquidos para cristalización. Se utilizaron más de 300 soluciones de cristalización comerciales. Se ensayaron diferentes combinaciones de concentraciones de proteína, temperaturas y aditivos sin obtenerse formación de cristales (ver apartado 6.21).

Con el fin de eliminar posibles impurezas, no detectadas en la caracterización previa, que eviten el ordenamiento cristalino, se agregó al método de purificación establecido un paso de cromatografía de intercambio iónico (MonoQ). Se repitieron las mismas condiciones y variantes, sin obtenerse mejoras de resultados. Por tal motivo, se realizaron otras variantes en la purificación y en la proteína utilizada para los ensayos, las cuales se detallan en los apartados siguientes.

7.10.i. Purificación GumI-N

Como se nombró anteriormente, la construcción que expresa GumI con la etiqueta de polihistidinas en el extremo N-terminal, pese a sus buenos niveles de expresión, demostró inestabilidad durante el proceso de purificación. La inestabilidad observada es consecuencia de una proteólisis limitada de la enzima. La degradación observada probablemente sea en el N-terminal, inferido por la pérdida de detección mediante anticuerpos anti-polihistidina y por la falta de unión a la columna IMAC (Figura 7.11.A). En muchas proteínas, los residuos en los extremos suelen estar desestructurados. Dado que se perdieron aproximadamente sólo 20 aminoácidos del extremo N-terminal, esta variante fue utilizada en ensayos extensivos de cristalización, sin obtener formación de cristales.

7.10.ii. Purificación GumI con detergente DDM

Para las proteínas de membrana se ha visto que la identidad del detergente utilizado puede alterar los resultados obtenidos en la cristalización [80, 81]. Dado que en general los detergentes glucosídicos, y en particular el β -dodecilmaltósido (DDM), han dado buenos resultados en la cristalización de proteínas, se utilizó dicho detergente en reemplazo del Tritón X-100. GumI-His₆ fue extraída de membrana con una solución conteniendo 10 mM de DDM (~58 veces la CMC). Luego, la proteína fue purificada a homogeneidad mediante los métodos cromatográficos pre-establecidos, en presencia de 0,2 mM de DDM (~1.2 CMC) (Figura 7.11.B). En este caso se notó un aumento de la estabilidad de la proteína con respecto a la proteína en Tritón X-100, demostrado por la capacidad de alcanzar concentraciones más elevadas (hasta ~30 mg/ml) sin colapsar.

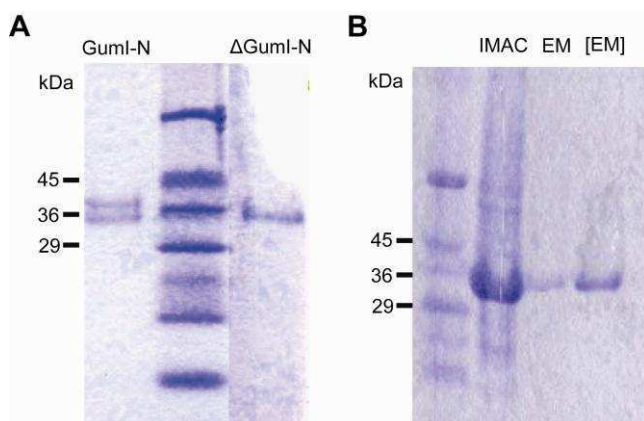


Figura 7.11. Variantes en la purificación de GumI. SDS-PAGE teñido con *Coomassie blue* de: **(A)** Purificación de GumI con la cola de polihistidina en el extremo N-terminal, donde se muestra la proteína purificada con Tritón X-100 luego de los dos pasos cromatográficos (GumI-N), y de una posterior purificación por IMAC (Δ GumI-N); **(B)** Purificación de GumI-His₆ con el detergente DDM, luego de cada etapa (IMAC, exclusión molecular EM y concentración [EM]). Se indica la posición de los marcadores de masa molecular, expresados en kDa

Utilizando los mismos métodos y combinaciones descriptas anteriormente en este apartado, se realizaron los ensayos de cristalización con la proteína GumI-His₆ purificada con DDM. En este caso se obtuvieron cristales tipo “agujas” (sólo en presencia de GDP-Man) no aptos para la cristalografía de rayos X, y otras formaciones microcristalinas (Figura 7.12).

A partir de las agujas obtenidas se realizaron experimentos de sembrado (*seeding*). El sembrado consiste en la utilización de dichas agujas como generadores de núcleos de cristalización en una gota fresca (Figura 7.13.A). Además, se ensayó la adición de pequeñas moléculas (aditivos) que pueden afectar la solubilización y/o cristalización de las proteínas (ver tabla en *Materiales y métodos*, Figura 7.13.B). En ningún caso fue posible la obtención de cristales, ni se observó una mejora considerable en las condiciones descriptas anteriormente.

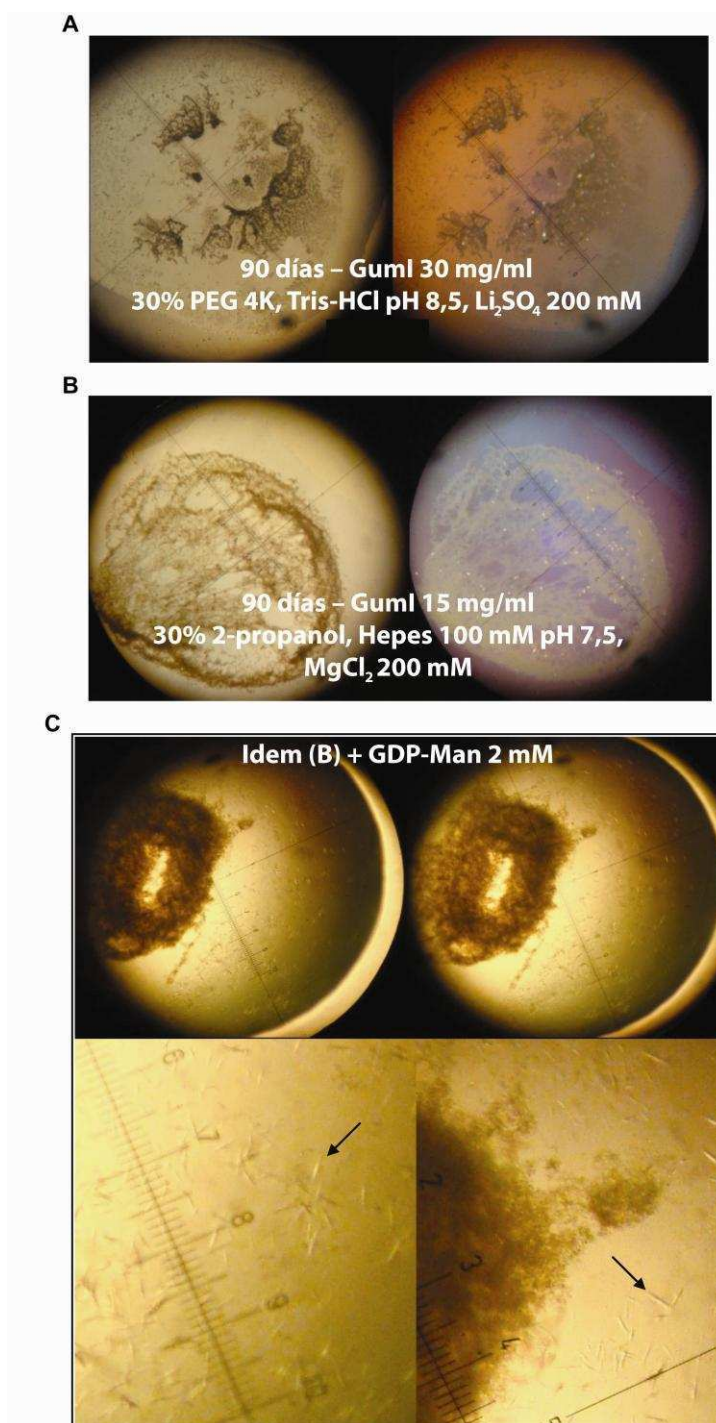


Figura 7.12. Fotografías de gotas de cristalogénesis. Para las gotas se utilizó GumI-His₆ purificada con el detergente DDM. La concentración de proteína y la composición del *buffer* se muestran en cada panel. Todas las fotografías fueron tomadas a los 90 días del inicio del ensayo. (A) y (B) representan ensayos sin aditivos, utilizando soluciones comerciales. (C) Posee la misma composición que el panel B, con el agregado del sustrato GDP-Man como aditivo. Mediante las flechas se indican las formaciones tipo “agujas”.

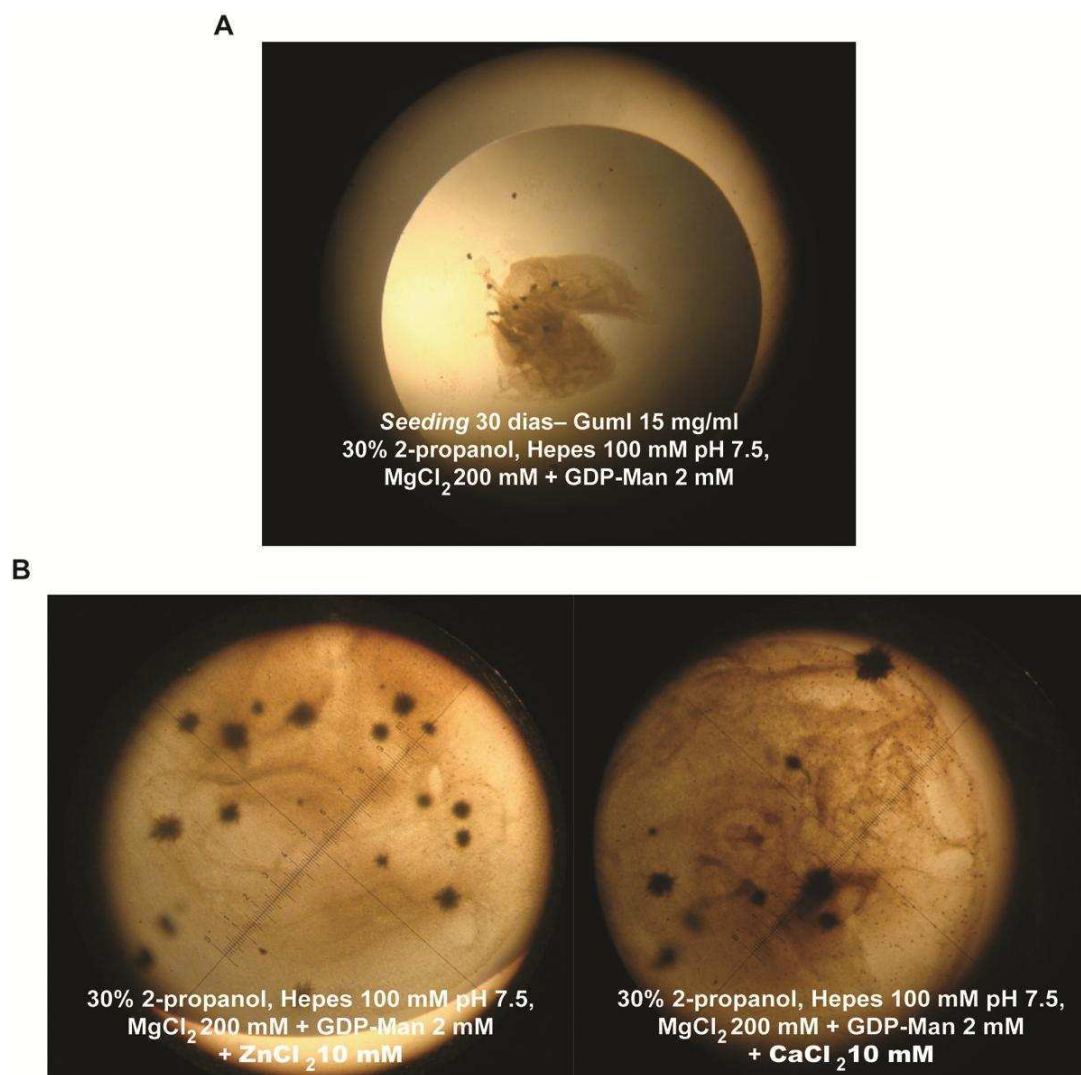


Figura 7.13. Optimización de agujas y microcristales. Se muestra fotografías de: (A) Ensayo de *seeding*, utilizando la condición y las agujas mostradas en la Figura 7.12.C; (B) ejemplos de optimización por aditivos, utilizando ZnCl₂ (izquierda) y CaCl₂ (derecha).

7.11. Identidad de secuencia

Debido a la imposibilidad encontrada de obtener la estructura de GumI mediante cristalografía, y a que su tamaño no permite el uso de otras técnicas resolutivas, como RMN, se decidió realizar un acercamiento bioinformático a la estructura de GumI.

En primer lugar, el algoritmo psi-blast fue utilizado para buscar en la base de datos no-redundante del NCBI similitudes a la secuencia de aminoácidos de GumI. Luego de dos iteraciones se identificaron 2.217 proteínas homólogas confiables. Los homólogos encontrados pertenecen a diferentes organismos, principalmente Gram-negativos y Gram-positivos ricos en G+C. Como era de esperar, los homólogos con mayor identidad pertenecen al género *Xanthomonas* (84 – 86 % identidad de aminoácidos, Tabla 7.1): *X. campestris* pv. *vasculorum*, *X. campestris* pv. *musacearum*, *X. oryzae* pv. *oryzae*, *X.*

axonopodis pv. *citri*, *X. fuscans* sp. *aurantifolii*, *X. oryzae* pv. *oryzicola*, y *X. campestris* pv. *vesicatoria*. Estas especies producen, o se predice que producen, exopolisacáridos similares o idénticos al xantano. Proteínas de los Gram-positivos ricos en G+C *Clavibacter michiganensis*, *Nakamurella multipartite*, y *Cellulomonas flavigena* son más de 40 % idénticas a GumI, y secuencias de *Cellvibrio japonicus* (γ -proteobacteria), *Trichodesmium erythraeum* (cyanobacteria), y *Rhodospirillum centenum* (α -proteobacteria) tienen una identidad alrededor del 30 %, en la región alineada.

Las proteínas en la Tabla 7.1 contienen un motivo típico de la superfamilia GT-B, observado mediante la búsqueda de dominios conservados. La búsqueda mediante psiblast identificó sólo dos proteínas con funciones establecidas. Ambas proteínas son GTs de retención y sus estructuras cristalográficas han sido resueltas. Éstas son la enzima asociada a membrana PimA (GDP-Man: inositol-fosfato manosiltransferasa, pdb 2GEJ, Cobertura 81 %, identidades 20 %; E, 5e-09) de *Mycobacterium smegmatis* y MshA (UDP-GlcNAc: inositol-fosfato N-acetilglucosaminiltransferasa, pdb 3C48, cobertura 95 %, identidades 16 %; E, 3e-08) de *Corynebacterium glutamicum*.

TABLA 7.1. Homólogos de GumI

Posición	Fuente en base de datos ^a	Especies ^b	Cobertura (identidad)	Valor E
1	ZP_06483326.1	<i>X. campestris</i> pv. <i>vasculorum</i> *	100 % (85 %)	8e-133
2	ZP_06489773.1	<i>X. campestris</i> pv. <i>musacearum</i> *	100 % (85 %)	2e-132
3	YP_452041.1	<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> *	100 % (84 %)	2e-130
4	NP_642892.1	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> *	100 % (86 %)	5e-130
5	ZP_06704790.1	<i>X. fuscans</i> sp. <i>aurantifolii</i> *	100 % (86 %)	1e-129
6	ZP_02242811.1	<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i> *	100 % (84 %)	5e-128
7	YP_364511.1	<i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> *	100 % (85 %)	2e-126
8	YP_001221571.1	<i>Clavibacter michiganensis</i> sp. <i>michiganensis</i>	92 % (43 %)	4e-86
9	YP_003203725.1	<i>Nakamurella multipartita</i>	89 % (41 %)	8e-86
10	YP_001711051.1	<i>Clavibacter michiganensis</i> sp. <i>sepedonicus</i>	97 % (41 %)	1e-85
11	YP_723605.1	<i>Trichodesmium erythraeum</i>	91 % (27 %)	8e-83
12	YP_003635853.1	<i>Cellulomonas flavigena</i>	97 % (42 %)	1e-75
13	YP_002298764.1	<i>Rhodospirillum centenum</i>	97 % (28 %)	5e-75
14	YP_001981138.1	<i>Cellvibrio japonicus</i>	93 % (28 %)	5e-74

^a Número de acceso de base de datos. ^b Especies marcadas con * se predice o está comprobado que producen polisacáridos de similar estructura al xantano de *X. campestris*.

En particular, PimA es una manosiltransferasa, que utiliza el GDP-Man como dador. Además, PimA se asocia a la membrana fuertemente y presenta un cambio conformacional luego de la unión del dador [45]. Por este motivo, analizamos con más detalle la identidad de secuencia con PimA. En este caso, se observó cómo la estructura secundaria predicha para GumI coincide con la estructura secundaria experimental de PimA, cuando estas secuencias se alinean según psi-blast (Figura 7.14). Se observa que algunos aminoácidos que en PimA resultan estar involucrados en la interacción con GDP-Man, se encuentran conservados claramente en GumI.

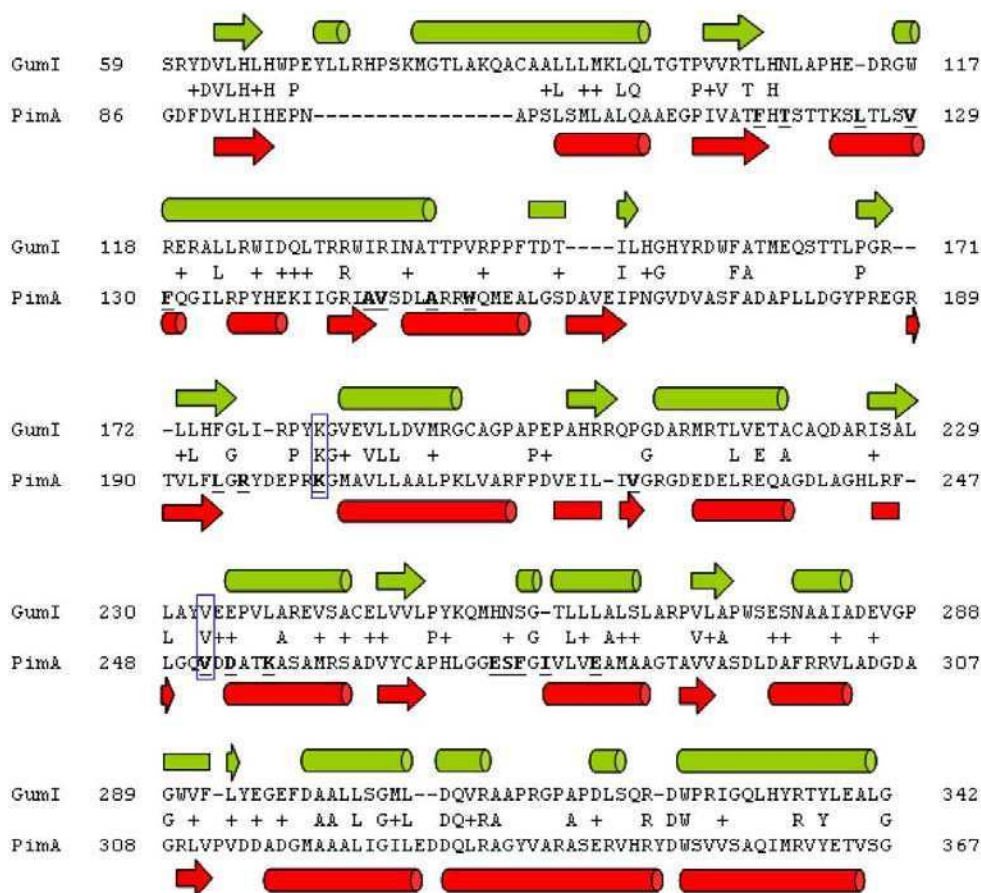
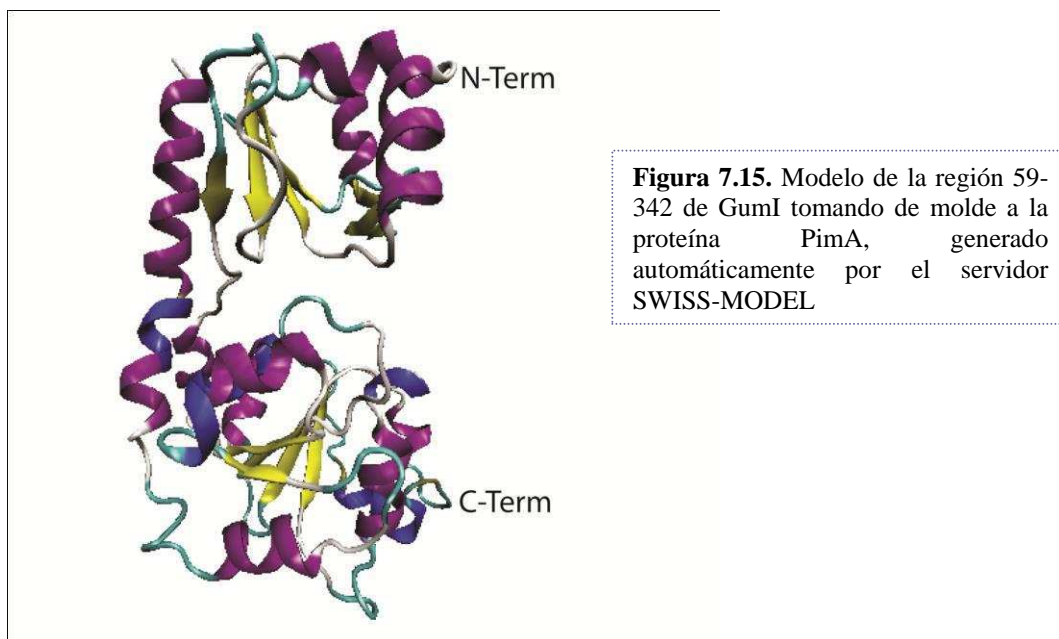


Figura 7.14. Alineamiento de secuencia de GumI y PimA. Se muestra el alineamiento psi-blast obtenido luego de dos iteraciones. La predicción de la estructura secundaria de GumI (PSIPRED) se representa arriba de la secuencia de GumI (en verde). La estructura secundaria experimental de PimA se ubica debajo de su secuencia (en rojo). Los residuos involucrados en la unión de GDP-Man por PimA se encuentran en negrita y subrayados. Dentro de ellos, los residuos invariantes están recuadrados. Los cilindros representan hélices alfa y las flechas representan láminas beta.

7.12. Modelado por homología

Teniendo en cuenta la similitud estructural entre las glicosiltransferasas, se realizó un modelado por homología automático en el servidor en línea de *SWISS-MODEL* (<http://swissmodel.expasy.org/>) [82]. Para el modelado por homología, la selección del

molde y el alineamiento con el objetivo es fundamental y puede ser la mayor fuente de error en el modelo final. El resultado obtenido para GumI arrojó 4 modelos, todos ellos con el plegamiento de la superfamilia GT-B. En la Figura 7.15 se muestra el mejor modelo obtenido para GumI, de la región 59-342, utilizando como molde a la proteína PimA. La región modelada se corresponde con la región alineada mediante psi-blast. Este modelo nos permite reafirmar la hipótesis de que GumI posee un plegamiento GT-B, aunque perfeccionar el modelo y extraer más información del mismo requiere intervención manual en el proceso del modelado.



Discusión

7.13. GumI es una β -manosiltransferasa

Como se introdujo en la sección 4.1, la caracterización de las glicosiltransferasas es fundamental para el entendimiento de los mecanismos de reacción y para la ingeniería de azúcares en búsqueda de nuevas drogas.

Como resultado principal y general de este capítulo, se demostró que GumI es una glicosiltransferasa, específicamente una manosiltransferasa, involucrada en la biosíntesis del polisacárido xantano.

En primer lugar, analizamos la actividad mediante complementación *in vivo* de la cepa mutante XcI. Observamos que la presencia en *trans* del marco de lectura abierto (ORF, de sus siglas en inglés) *gumI* propuesto es suficiente para la restauración del fenotipo salvaje. Este ensayo, si bien no es definitivo, sí es fundamental. Antecedentes previos de complementación funcional *in vivo* de la cepa XcK con el ORF propuesto de *gumK* mostraron la ausencia de producción de xantano. Dicho resultado llevó a una cuidadosa evaluación del operón *gum*. De esta forma, se extendió el gen *gumK* en 315 pares de bases en su extremo 5', siendo este último ORF el correcto, demostrado tanto por complementación funcional como por ensayos bioquímicos con proteína purificada [38]. La complementación funcional también fue analizada *in vitro* mediante la incubación de células permeabilizadas XcI/pBGI con nucleótidos-azúcares. El análisis por TLC de dichos productos mostró una especie que co-migra con el producto pentasacárido obtenido de la cepa salvaje XcFC2.

En conjunto, la restauración de la producción de polisacárido *in vivo* y la generación de pentasacárido *in vitro* permiten concluir que el ORF *gumI* es suficiente para obtener un fenotipo salvaje en la cepa XcI. Este resultado proporciona bases sólidas para cumplir el objetivo de purificar la proteína, con el fin de caracterizarla bioquímica y estructuralmente.

Con el fin de analizar bioquímicamente a la proteína, se llevó a cabo la purificación de GumI recombinante. Para ello, se analizaron diferentes condiciones de cultivo e inducción, obteniéndose, en general, una expresión de aproximadamente el 15 % de las proteínas totales en *E. coli*. Como primera característica se observó, mediante fraccionamiento subcelular, que en *E. coli* GumI se encuentra localizada en membrana.

Cabe destacar que GumI es una proteína fuertemente hidrofóbica, con gran tendencia a agregar, por lo que su purificación fue una etapa desafiante del proyecto. Obtener la proteína estable y pura requirió la presencia de glicerol como estabilizante, además de la presencia de detergente y alta fuerza iónica. GumI fue purificada, con al menos 95 % de pureza, mediante dos pasos cromatográficos (IMAC y S200). La calidad de la proteína fue evaluada por MALDI-TOF y SEC-SLS. La espectrometría de masa mostró que, a pesar de la migración anómala observada en SDS-PAGE, la proteína posee el tamaño esperado de ~ 40 kDa. Como se ha visto para proteínas de membrana, es probable que la migración anómala sea debida a la interacción de GumI con moléculas de detergente o restos de lípidos bacterianos acarreados durante el proceso de purificación [75]. La técnica de SEC-SLS da cuenta de la ausencia de agregados y la existencia de una única especie. Este procedimiento nos permitió obtener aproximadamente 5 mg de GumI por litro de cultivo, permitiendo la concentración hasta ~20 mg/ml y su almacenamiento hasta por cinco meses a -20 °C. Si bien el rendimiento es mucho menor comparado al obtenido con la mayoría de las proteínas solubles purificadas, consideramos que el mismo es adecuado, teniendo en cuenta las características hidrofóbicas de GumI.

Finalmente, la proteína purificada fue incubada con los sustratos propuestos (GDP-Man y extracto enriquecido de lip-PP-tetrasacárido). La transferencia de Man se corroboró mediante la utilización de GDP-[¹⁴C]Man como sustrato dador. El análisis de los productos obtenidos luego de la incubación con [¹⁴C]dador o [¹⁴C]aceptor muestran, en ambos casos, el mismo producto: una especie que co-migra con el producto de hidrólisis del lip-PP-pentasacárido salvaje. Se demostró de esa manera que la proteína purificada en forma estable también es activa, poseyendo actividad manosiltransferasa *in vitro*.

7.14. GumI es una proteína integral monotópica de membrana

Como primera aproximación, se analizó la localización subcelular en *Xc* de GumI producida en *trans*. Como resultado se observó que GumI se encuentra localizada en la fracción de membrana en XcFC2, XcI y Xc1231. La localización en membranas en Xc1231 es indicativo de la capacidad intrínseca de GumI para unirse a la membrana y su independencia de otras proteínas del sistema Gum.

Según la secuencia primaria de GumI, se predice un pI de 8,4 para la proteína completa, pero con un pI de 10,3 para el dominio N-terminal, indicando un posible rol de aminoácidos básicos del N-terminal en una asociación periférica con la membrana. Con

el fin de distinguir si GumI es una proteína periférica o integral de membrana, se analizó si la incubación con una solución a pH básico es suficiente para extraer a GumI de la membrana, evitando las interacciones electrostáticas. El resultado demuestra que si bien existe una cierta extracción con medio básico, la misma no es total, indicando la presencia de otro tipo de interacciones además de las electrostáticas.

Para corroborar la existencia de interacción hidrofóbica entre GumI y la membrana, se realizó la separación de fases mediada por el detergente Tritón X-114. En los resultados se observa como GumI se encuentra casi completamente en la fase detergente, indicando que GumI presenta, principalmente, una asociación hidrofóbica con la membrana.

En conjunto, nuestros resultados sugieren que GumI es una proteína integral monotópica de membrana. Las proteínas monotópicas no poseen segmentos transmembranas, y a diferencia de las proteínas periféricas, se introducen en la membrana sin llegar a atravesarla, mediante interacciones electrostáticas e interacciones hidrofóbicas.

La localización de GumI era un punto a elucidar al momento de iniciar el trabajo de tesis. Previamente, se trabajaba con un modelo hipotético de síntesis del xantano donde las GTs estaban asociadas formando un complejo multiproteico. En dicho complejo el producto de una GT era transferido internamente a la siguiente GT. Los resultados experimentales aquí mostrados, junto con los obtenidos previamente para GumK, sugieren un modelo de síntesis alternativo, en el cual las GTs se encuentran asociadas a la membrana celular por sus propiedades, y no requieren de otra proteína del sistema Gum. Una confirmación a esta aseveración es la asociación a la membrana citoplasmática en un sistema heterólogo, como es *E. coli*.

Como se mencionó anteriormente, el sustrato aceptor es un lípido azúcar embebido en la membrana interna y su sustrato dador se encuentra en el medio hidrofílico del citoplasma. En esta tesis se demostró que la porción lípido-pirofosfato es necesaria para la actividad de la enzima, aseverando la necesidad de la interacción con la membrana para su función, por lo que GumI es una proteína que requiere trabajar en la interfase membrana-citoplasma.

7.15. Caracterización bioquímica de la actividad de GumI

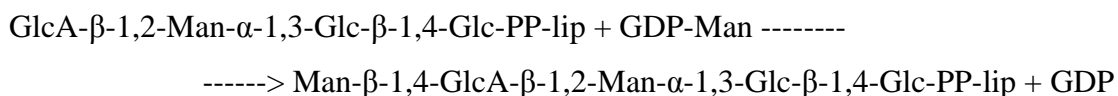
7.15.i. Especificidad y estereoquímica

Estudiamos la especificidad de sustrato a través del nucleótido y del azúcar, observando que GumI es capaz de transferir el azúcar con menor eficiencia a partir de ADP-Man (35 % respecto a GDP-Man), y aún en menor medida a partir de GDP-Glc (15 % respecto a GDP-Man). Esta flexibilidad no es común a todas las glicosiltransferasas, aunque hay ejemplos en la literatura de enzimas GT-B con esta cualidad [77-79]. Sin ir más lejos, GumK es altamente específica para su sustrato dador UDP-GlcA, como se discutirá más adelante.

También se evaluó si la porción lípido-PP del sustrato aceptor es necesaria para la actividad de GumI. Para ello se incubó GumI con GDP-Man y el sustrato delipidificado, sin obtenerse reacción de transferencia. De esta forma se demostró que la porción lípido es fundamental para la actividad enzimática. Esta característica había sido demostrada previamente también en GumK.

Además, se incubó sólo GDP-[¹⁴C]Man con GumI y las alícuotas a diferentes tiempos fueron analizadas por TLC, mostrando que al menos en 20 h de incubación no hay hidrólisis de GDP-Man en ausencia de aceptor por parte de GumI. Esta es una diferencia con GumK (como se discutirá más adelante), pero en general no hay reglas sobre este punto en las GTs. La utilización o no de moléculas de agua en reemplazo del aceptor podría tener implicancias en el mecanismo catalítico de cada GT.

Por otro lado, estudiamos la estereoquímica de la reacción mediante la hidrólisis del producto por β -manosidasa. En este sentido, observamos que el producto catalizado por GumI está en conformación beta, al igual que el producto extraído de XcFC2, siendo entonces GumI una manosiltransferasa de inversión, catalizando la siguiente reacción:



7.15.ii. Condiciones óptimas de actividad

Mediante ensayos de actividad *in vitro*, observamos que las condiciones óptimas de actividad de la enzima purificada son a pH 8,0 y a 35 °C. Además, vimos que la presencia de cationes divalentes en la reacción no afecta sustancialmente la catálisis. Como se mencionó en Introducción, una diferencia entre superfamilias es que las GT-A

requieren para su actividad la presencia de cationes. Entonces, los resultados sugerirían que GumI pertenece a la superfamilia GT-B.

También observamos que la actividad de GumI *in vitro* depende del ambiente hidrofóbico en el cual se encuentra. Nuestro análisis muestra que la enzima es 5 veces más activa en presencia de DDM en comparación con Tritón X-100 a una concentración de detergente de 33,3 veces la CMC correspondiente. Esta característica podría estar fuertemente relacionada con la unión a la membrana de GumI y con el requerimiento de un ambiente hidrofóbico para la actividad de la enzima.

7.16. Hacia la síntesis quimio-enzimática de polisacáridos

Dado que en el laboratorio disponemos de GumK y GumI purificadas en forma activa y estable, se ensayó la capacidad de generar lip-PP-pentasacárido utilizando ambas enzimas y el aceptor de GumK, lip-PP-trisacárido. Si bien ambas enzimas poseen diferentes condiciones óptimas de actividad, se logró obtener el producto deseado con más de 90 % de eficiencia. Lamentablemente, hasta el momento no se ha podido obtener de forma exitosa el lip-PP-trisacárido mediante síntesis química. Sin embargo, en un futuro es posible utilizar ambas enzimas para síntesis quimio-enzimática y, junto a la ingeniería de enzimas, generar nuevos productos purificados con una alta eficiencia.

7.17. Cristalización de GumI

Con el fin de cumplir el objetivo de caracterizar estructuralmente a GumI mediante cristalografía, se realizaron diversos ensayos de cristalización. Dichos intentos fueron infructuosos, a pesar de que se ensayaron más de 300 soluciones de cristalización, diferentes estados de la proteína, varias temperaturas y aditivos. La combinación de todas las variantes realizadas demuestra intentos exhaustivos de cristalización.

En primer lugar se utilizó en los experimentos la proteína purificada y utilizada para los ensayos bioquímicos. Pese a los intentos realizados no se obtuvo ningún tipo de formaciones cristalinas.

El proceso de cristalización requiere un ordenamiento de las moléculas de proteína [83]. Cuando se purificó GumI con la cola de poli-histidinas en el extremo N-terminal, se observó una proteólisis limitada de dicho extremo. Probablemente, la porción N-terminal sea muy flexible y/o desestructurada, pudiendo ser una limitante para la cristalización.

Por tal motivo, y haciendo uso de la enzima truncada purificada, se ensayó la cristalización de la porción estable de esta construcción, sin obtenerse tampoco cristales.

Como observamos que la actividad de GumI aumentaba notablemente con el detergente DDM, encaramos la purificación con dicho detergente. En estos ensayos sólo observamos agujas y microcristales en ciertas condiciones, cuando GDP-Man era utilizado como aditivo. Nuestros resultados, en conjunto con el hecho de que la proteína homóloga PimA presenta cambios conformacionales frente a la unión de GDP-Man, nos hace pensar que GumI presentaría una dinámica importante en su forma apo, y que su conformación sería estabilizada en presencia del sustrato. De esta forma, la estabilización con su sustrato GDP-Man permite a la proteína ordenarse en agujas. Pese a la variación de aditivos, de soluciones de cristalización y el ensayo de “sembrado”, no fue posible obtener cristales a partir de dichas agujas, y éstas no presentaron calidad ni tamaño suficiente para encarar estudios estructurales. A pesar de que aún existen muchas variantes para intentar cristalizar GumI, enfrentar ese desafío excede a los alcances de los objetivos de esta tesis.

7.18. Homólogos de GumI

En cuanto a la identidad de secuencia de GumI, observamos que tiene parientes distantes en bacterias de géneros no relacionados. Estas identidades sólo fueron encontradas mediante algoritmos de psi-blast, y todas son predichas GTs pertenecientes a la superfamilia GT-B. En particular, observamos aproximadamente un 20 % de identidad con la enzima PimA de *Mycobacterium smegmatis*. Esta enzima es una manosiltransferasa de retención de la superfamilia GT-B asociada a membrana [41, 45]. El alineamiento de la estructura secundaria experimental de PimA con la predicha para GumI muestra una gran coincidencia, principalmente en el dominio C-terminal, involucrado principalmente en la unión al sustrato dador. De todas formas sólo dos residuos que en PimA participan en la unión del sustrato dador se encuentran conservados en GumI.

A partir de los resultados discutidos hasta aquí, y luego de la publicación de la caracterización bioquímica [84], GumI dio origen a la fundación de una nueva familia en la clasificación CAZy (familia GT94). A enero de 2013 la familia GT94 agrupa a 26 putativas GTs bacterianas, siendo GumI la única caracterizada bioquímicamente. Esta familia agrupa los homólogos altamente relacionados pertenecientes al género

Xanthomonas, y otras GTs que fueron encontradas en nuestro análisis de psi-blast , las cuales pertenecían a GT0 hasta la creación de la familia GT94.

7.18. Modelo de la estructura de GumI

Dada la imposibilidad de obtener la estructura experimental, y haciendo uso de la gran similitud a nivel estructural entre glicosiltransferasas, se realizó un modelado de la estructura de GumI en el servidor de modelado automático SWISS-MODEL. El servidor seleccionó automáticamente la estructura de PimA como molde, a partir de la cual se pudieron modelar los residuos 59-342 de GumI. Se resalta que estos residuos son los mismos alineados mediante psi-blast. Por un lado, en el modelo se observa claramente el plegamiento del tipo GT-B adoptado, adicionando una fuerte sugerencia a nuestra hipótesis previa. Por otro lado, la región 1-59 correspondiente al dominio N-terminal no pudo ser modelada. Cabe destacar que el dominio N-terminal suele ser el más variable en las GT-B, dada la gran variedad de aceptores que pueden unir estas enzimas mediante ese dominio. Teniendo en cuenta que los aceptores de GumI y de PimA son notablemente diferentes, es esperable la diferencia estructural en este sector de la proteína.

Los mecanismos catalíticos moleculares y de interacción con sustrato no pueden ser inferidos por medio del modelado por homología, ya que es posible que haya cambios conformacionales en GumI, que intervengan con su actividad. Además, dado que GumI es una proteína monotópica de membrana, es posible que la interacción con los lípidos de la membrana participen indirectamente del mecanismo de acción de esta GT. Los resultados de la actividad de GumI en función del detergente soportan dicha hipótesis.

8. Resultados y Discusión – GumK

Resultados

8.1. Asociación de GumK a la membrana. *Mutantes puntuales*

GumK pertenece a la superfamilia estructural GT-B, conformada por dos dominios con plegamientos del tipo Rossmann formando una hendidura entre ellos, donde se encuentra el sitio activo. El análisis de la superficie electrostática de la estructura de la enzima pone en evidencia una región con alto contenido de aminoácidos básicos e hidrofóbicos en el dominio N-terminal, alejada del sitio activo. En GumK, como se postula para otras GTs [41, 85-87], éstos aminoácidos podrían estar involucrados en la interacción con la membrana y/o con el sustrato aceptor (lip-PP-trisacárido).

Recientemente, se describió una aproximación computacional para evaluar la orientación relativa de las proteínas respecto a las membranas [65]. Utilizando dicho método, se postuló un modelo de unión de GumK a la membrana que involucra una inclinación de 61° respecto al eje de la proteína y una inserción de 5 \AA en la membrana simulada (Figura 8.1). Dicho modelo es acorde a lo observado en el análisis de la estructura de GumK. Estos datos están descriptos en la base de datos *Orientation of Proteins in Membranes (OPM)* [64].

Para estudiar el rol en la unión a la membrana de los residuos del parche básico-hidrofóbico, se realizaron mutantes sitio-dirigidas en dicha zona (Figura 8.1) utilizando como molde el plásmido con el gen *gumK* salvaje pBHisKC. Las mutantes obtenidas fueron: *B1*: R55N/R58N/K60Q; *B3*: R86N; *H1*: L56S/M59S, *H2*: L99S/V102T/M106S.

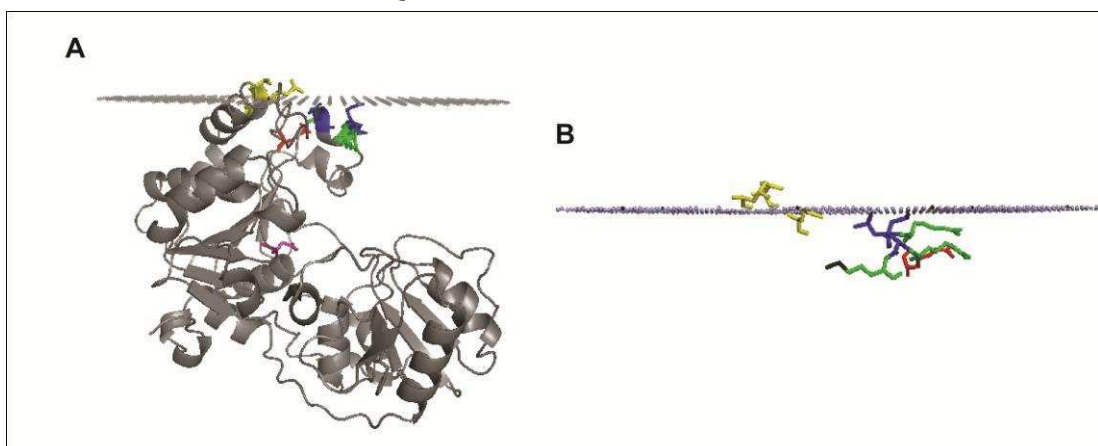


Figura 8.1. Asociación de GumK a la membrana bacteriana. **A)** Predicción de la base de datos OPM en donde se muestra el arreglo espacial de GumK respecto a un núcleo de hidrocarburos de la bicapa lipídica. **B)** Localización de los residuos mutagenizados según la predicción *in silico*. B1, verde; B3, rojo; H1, azul; H2, amarillo; D157, magenta.

8.2. Localización subcelular de las mutantes puntuales en *X. campestris*

Con el fin de estudiar la importancia relativa para la asociación a la membrana de los aminoácidos básicos e hidrofóbicos mutagenizados, se analizó la localización subcelular de las proteínas mutantes, expresadas a partir de los plásmidos obtenidos, en las cepas XcFC2, XcK (mutante *gumK*) y Xc1231. Células de los cultivos de las diferentes cepas fueron lisadas y sometidas a centrifugaciones diferenciales, con el fin de separar las fracciones celulares solubles de las de membrana. Las fracciones obtenidas fueron analizadas por inmunodetección (Figura 8.2). En todos los casos se observó que las mutaciones realizadas no afectan la localización en la membrana.

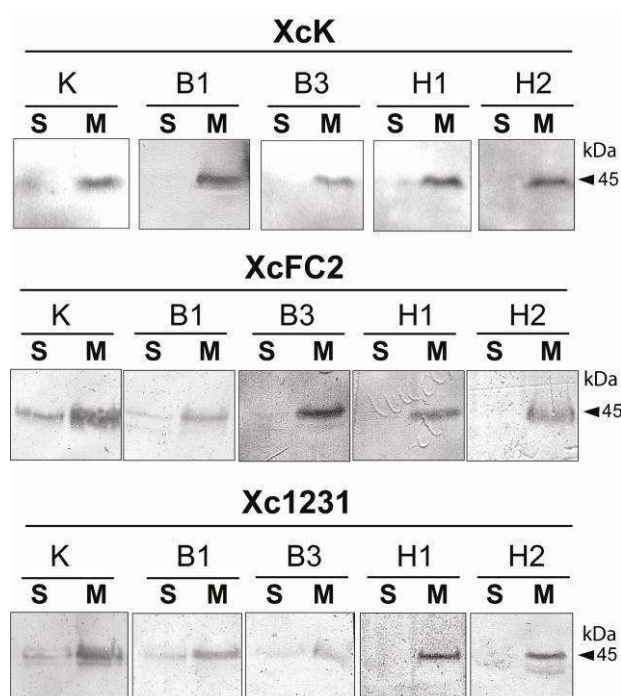


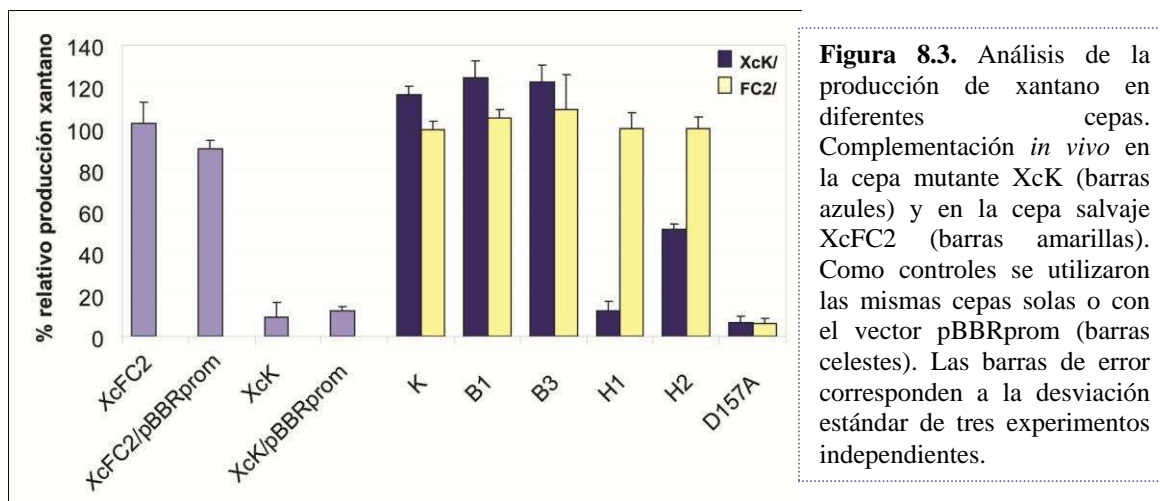
Figura 8.2. Localización subcelular de GumK y mutantes puntuales en *X. campestris*. Fracciones de membranas (M) y solubles (S) fueron analizadas por inmunodetección. K: plásmido con el gen *gumK* salvaje. B1, B3, H1 y H2, plásmidos conteniendo el gen *gumK* con las mutaciones indicadas en el texto.

8.3. Complementación funcional *in vivo*

Dada la correcta localización de las proteínas en la membrana, se estudió si las mismas poseían actividad. La actividad *in vivo* fue estudiada midiendo la producción de xantano en la cepa XcK complementada con las mutantes de GumK (Figura 8.3). Se observó que tanto la expresión de GumKH1 como de GumKH2, fueron incapaces de restaurar los niveles salvajes de producción de xantano.

Previamente, se observó que GumK con una mutación puntual a alanina en el propuesto aminoácido catalítico D157 es capaz de anular la producción de xantano cuando es expresada en *trans* en la cepa XcFC2, a pesar de contar con la presencia endógena de

GumK salvaje [37]. Una de las explicaciones posibles de tal efecto es que GumK salvaje funcione como dímero, por lo que un monómero inactivo anularía su actividad enzimática. Con la intención de profundizar sobre dicha hipótesis, se estudió el efecto de expresión en *trans* de las proteínas mutantes en XcFC2. En ningún caso la expresión de las mutantes de GumK alteró la producción de xantano en la cepa salvaje XcFC2 (Figura 8.3).



8.4. Actividad de las proteínas mutantes puntuales *in vitro*

Con el fin de evaluar la actividad glicosiltransferasa de las proteínas mutantes, se estudió la actividad *in vitro* de las mismas. Por un lado, células permeabilizadas de cada cepa *Xc* fueron incubadas con UDP-Glc, UDP-GlcA y GDP-[¹⁴C]Man (ver *Materiales y métodos*) y los productos orgánicos radiactivos extraídos fueron analizados por TLC (Figura 8.4.A). El análisis por TLC de los intermediarios producidos por las cepas XcK complementadas con las distintas mutantes mostró que la cepa XcK/H1 produjo el mismo lípido intermediario que la cepa XcK (lip-PP-Glc₂-Man). El resto de las proteínas mutantes produjeron, además de lip-PP-Glc₂-Man, un lípido intermediario similar al pentasacárido producido por XcFC2. En los productos de las reacciones con la cepa XcK/B1 y XcK/B3 se encontró, además, un intermediario similar al lip-PP-Glc₂-Man-GlcA.

Por otra parte, se analizó la actividad de las mutantes sobre-expresadas en extractos de *E. coli*. Para ello, las proteínas solubles en el detergente Tritón X-100 fueron incubadas con el aceptor endógeno extraído de *Xc* y con UDP-[¹⁴C]GlcA. Los glicolípidos fueron extraídos mediante mezclas de solventes orgánicos, siendo posible relacionar la

radiactividad de la fracción orgánica con la incorporación de [^{14}C]Man a un glicolípido (ver *Materiales y métodos*). Se halló radiactividad en todas las fracciones orgánicas extraídas de las reacciones, mostrando así que todas las mutantes de GumK mantienen la actividad glucuronosiltransferasa en extractos de *E. coli* en presencia de detergente (Figura 8.4.B).

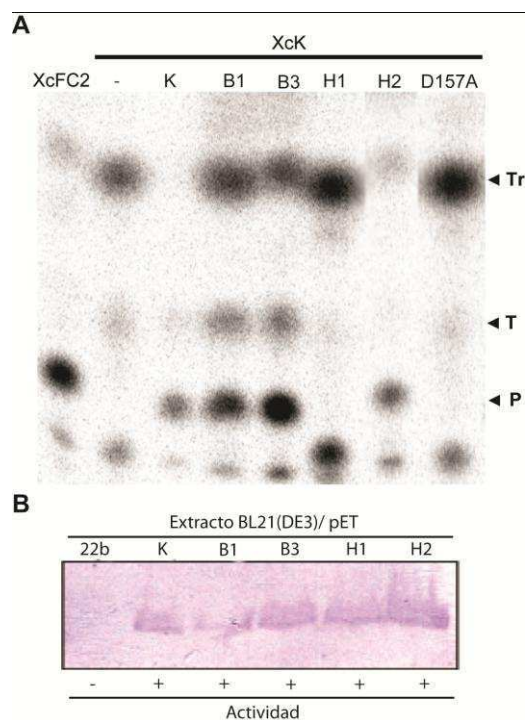


Figura 8.4. Análisis de la actividad *in vitro* de las mutantes puntuales. (A) Análisis por TLC de los productos ^{14}C -intermediarios obtenidos en las incubaciones con células de Xc permeabilizadas. Tr: trisacárido, T: tetrasacárido P: pentasacárido. (B) Inmunodetección de GumK en extractos de células de *E. coli* y detección (+) o no (-) de actividad GT.

8.5. Asociación de GumK a la membrana. *Mutantes por delección*^b

Como se mencionó anteriormente, se ha visto en otras GTs que mutantes por delección de determinadas estructuras α -hélices anfipáticas evitan la interacción con la membrana [41]. Entonces, como segunda aproximación en el estudio de la asociación de GumK a la membrana, se realizaron delecciones de las regiones propuestas para dicha asociación, descritas en el apartado 4.5.iii. Las delecciones obtenidas fueron: $\Delta\text{R55-K60}$ ($\text{N}\alpha\text{2}$), $\Delta\text{S97-A112}$ ($\text{N}\alpha\text{4}$), $\Delta\text{W85-R96}$ (loop), $\Delta\text{S97-D104}$ ($\text{N}\alpha\text{4-N}$), $\Delta\text{A105-A112}$ ($\text{N}\alpha\text{4-C}$), $\Delta\text{W85-H90}$ (loop-N), $\Delta\text{P91-R96}$ (loop-C).

^b Este trabajo ha sido realizado en parte por el estudiante Nicolás G. Brukman, en el contexto de su Tesis de Licenciatura (FCEN, UBA – 2013) titulada “Identificación de la región de unión a membrana citoplasmática de GumK, una glucuronosiltransferasa bacteriana”, de la cual la autora del presente trabajo es la Directora Asistente.

8.6. Expresión y localización subcelular de mutantes por delección de GumK en *X. campestris*

Debido a la posibilidad de inestabilidad mediada por las delecciones realizadas, se analizó, en primer lugar, la expresión de las mutantes por delección de GumK en la cepa XcK. Como se observa en la Figura 8.5.A, las cepas complementadas con las proteínas mutantes cuyas delecciones son de mayor tamaño presentan una disminución en la cantidad de proteína detectada respecto a la expresión en *trans* de la proteína salvaje.

Con el fin de estudiar si las delecciones afectaron la asociación a la membrana de GumK, se realizó un estudio de localización subcelular de las proteínas mutantes. Pese a la detección de proteína en la fracción soluble y que en algunos casos se dificultó la detección de proteínas por su escasa cantidad, se observó que todas las mutantes mantuvieron su localización en membrana (Figura 8.5.B)

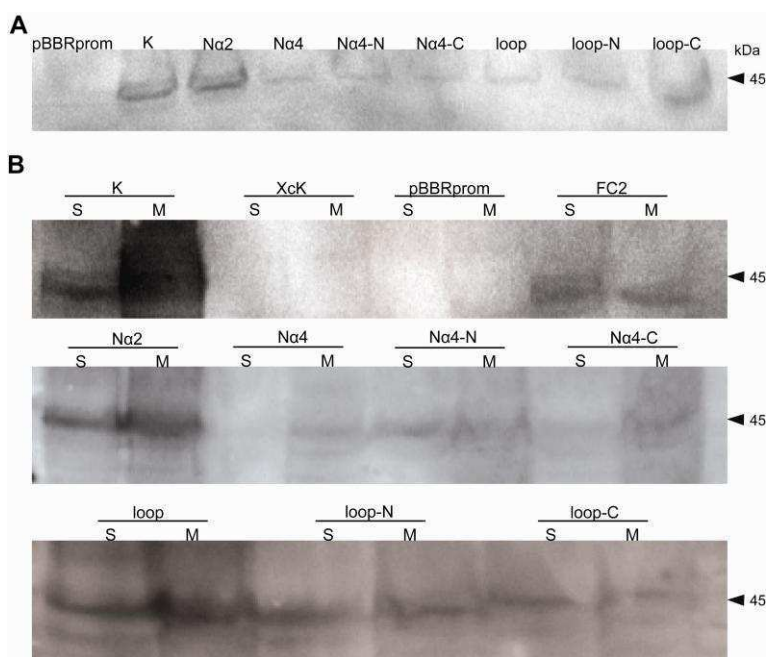


Figura 8.5. Expresión y localización subcelular de las mutantes por delección de GumK en XcK. **(A)** Inmunodetección de GumK en extractos totales, provenientes de cultivos de dos días en medio líquido **(B)** Fracciones de proteínas solubles (S) y de membrana (M). Como controles se utilizaron las cepas XcK/pBBRprom (pBBRprom) y XcK/pBHisK (K).

8.7. Complementación *in vivo* y actividad *in vitro*

Se midió la producción de xantano *in vivo* por las cepas XcK complementadas con las diferentes mutantes. Como se puede ver en la Figura 8.6.A, ninguna cepa produjo xantano, a pesar de la existencia de proteína en la membrana. A su vez, tampoco las mutantes interfirieron con la producción de xantano en la cepa salvaje XcFC2 (no mostrado).

A su vez, la actividad *in vitro* de células permeabilizadas XcK conteniendo las proteínas mutantes fue medida incubando dichas células con los nucleótidos azúcares necesarios.

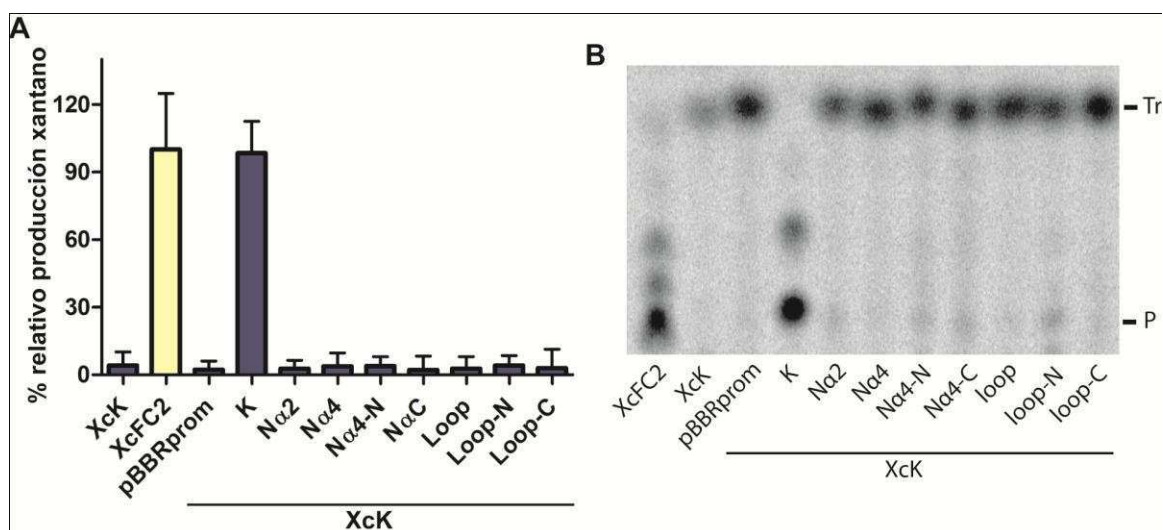


Figura 8.6. Actividad de las cepas complementadas con las mutantes por delección. **(A)** Cuantificación de la producción de xantano, relativa a la producción en la cepa salvaje XcFC2. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de tres experimentos independientes. **(B)** Análisis por TLC de los productos ¹⁴C-intermediarios producidos en incubaciones de las correspondientes células permeabilizadas con nucleótidos azúcares. Se indica la migración de los estándares trisacárido (Tr) y pentasacárido (P).

Los glicolípidos extraídos fueron hidrolizados y analizados por TLC (Figura 8.6.B). Se observó que ninguna de las proteínas mutantes produjo glicolípidos pentasacáridicos con la misma eficiencia que la proteína salvaje. En conjunto, se puede inferir que la asociación a la membrana es un proceso complejo que involucra, probablemente, a un estado dinámico de la proteína y podría estar relacionado con la unión de sustratos.

8.8. Dinámica de GumK. Simulación computacional

Es sabido que la dinámica de las proteínas es, en la mayoría de los casos, fundamental para su función [88, 89]. En las últimas décadas, con el desarrollo de la tecnología computacional, ha sido posible avanzar en la exploración temporal de la superficie de energía potencial teórica de numerosos sistemas biológicos. Esta metodología es denominada simulación de dinámica molecular (DM), y permite analizar al nivel atómico la dinámica de un sin fin de sistemas. El complemento de dicha metodología con resultados experimentales es de fundamental ayuda a la hora de la comprensión del comportamiento molecular.

Por lo tanto, con el fin de explotar la estructura tridimensional de GumK y de conocer su dinámica en sus formas apo y holo, se realizaron simulaciones de DM a partir de las estructuras obtenidas experimentalmente. Los sistemas utilizados fueron apo-GumK (pdb 2HY7) y GumK/UDP (pdb 2Q6V). Como primer paso fundamental para la DM, se

prepararon bioinformáticamente las estructuras experimentales, adicionándoles los átomos de hidrógenos correspondientes y solvatando con moléculas de agua en un octaedro regular con una distancia del borde a la proteína de 6 Å (Figura 8.7.A).

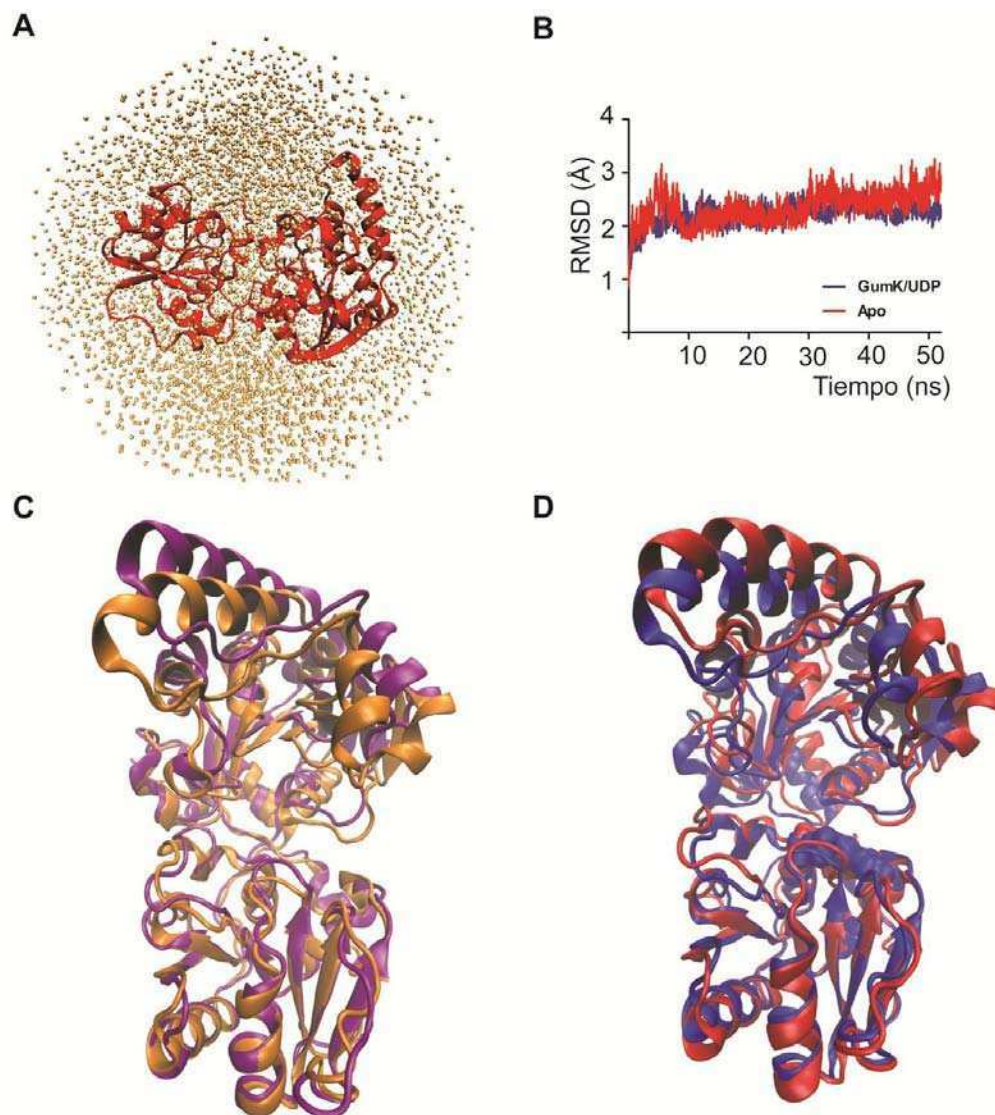


Figura 8.7. Dinámica Molecular de apo-GumK y GumK/UDP. (A) Representación del sistema inicial solvatado apo-GumK. (B) RMSD en función del tiempo simulado de las DM de apo-GumK (rojo) y de GumK/UDP (azul). (C) Superposición de la estructura experimental (naranja) y representativa de la DM (púrpura) de apo-GumK. (D) Superposición de la estructura experimental (azul) y representativa de la DM (rojo) de GumK/UDP.

Los sistemas fueron minimizados y sometidos a 50 ns de simulación de dinámica molecular, con el sistema de fuerzas clásico de Amber [90]. Ambos sistemas sufrieron rearrreglos conformacionales estables. El análisis de la raíz cuadrada de la desviación cuadrática media (RMSD, por sus siglas en inglés) permite obtener las distancias

promedio entre átomos equivalentes en estructuras superpuestas. El RMSD de las DMs (Figura 8.7.B) muestra que la desviación de la estructura cristalina se da antes de los 5 ns, y luego de ello, el sistema se mantiene estable durante toda la DM. En las Figuras 8.7.C y D se muestran las estructuras representativas obtenidas en las DMs comparadas con las estructuras cristalinas, donde quedó en evidencia la existencia de un pequeño cambio en la conformación de la proteína, manteniendo la estructura secundaria individual de cada dominio.

La raíz cuadrada de la fluctuación cuadrática media (RMSF, de sus siglas en inglés) ofrece información de la fluctuación en el tiempo de los átomos seleccionados. El RMSF de cada residuo durante las dinámicas fue analizado (Figura 8.8.A). En general, se observó que tanto en presencia de UDP como en su ausencia, los residuos de las proteínas sufrieron prácticamente las mismas fluctuaciones, excepto en la región 258-280. Esta zona presenta una menor fluctuación en la DM con UDP, probablemente porque dichos residuos están localizados en la hendidura y sufren menor fluctuación debido a la interacción con el ligando. Se pueden relacionar estos resultados comparando el factor b de las estructuras cristalinas (factor que describe la dispersión de la densidad electrónica), en donde no se observaron diferencias entre apo-GumK y GumK/UDP (Figura 8.8.B). La ausencia de correlación entre el RMSF y el factor b demuestra la limitante de la cristalografía de rayos-X con respecto a la dinámica de los átomos para este sistema.

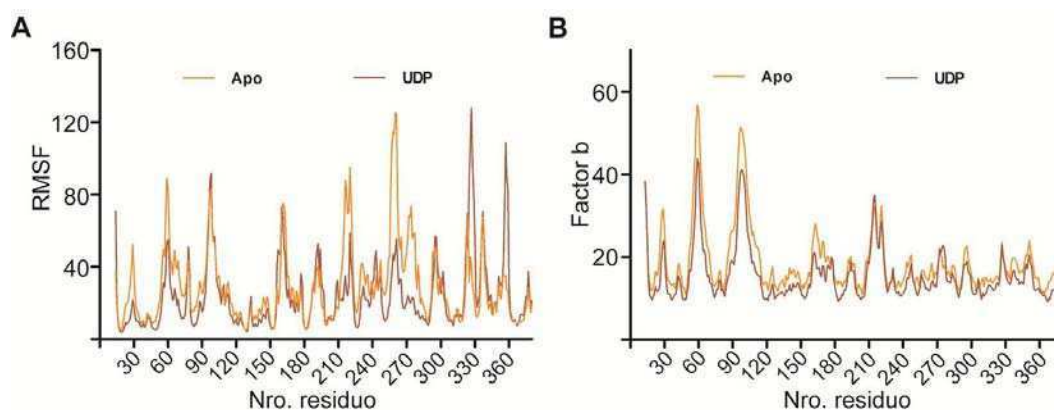


Figura 8.8. (A) RMSF de la cadena principal durante la DM de apo-GumK (naranja) y GumK/UDP (marrón). (B) Factor b de la cadena principal en función del número de residuo del cristal de apo-GumK (naranja) y GumK/UDP (marrón).

8.9. Construcción *in silico* del complejo GumK/UDP-GlcA

Los esfuerzos previos por obtener la estructura experimental del complejo GumK/UDP-GlcA fueron infructuosos. Como se detalló anteriormente, sólo se obtuvo la estructura de la porción UDP aún en presencia del ligando completo. Con el fin de conocer las bases moleculares de la especificidad de sustrato de GumK, se realizaron estudios *in silico* de simulación computacional. Para este fin se utilizó el método de *docking*, técnica con capacidad de predecir la ubicación de una molécula respecto de otra.

En primer lugar, se construyó la molécula de UDP-GlcA (UGA) agregando el residuo GlcA al UDP en la estructura representativa de la DM del complejo GumK/UDP. Las posibles orientaciones fueron analizadas por *docking*. En segundo lugar, se analizó la posición de las moléculas de agua, tanto en el cristal como en las DM. Antecedentes previos indican que la ubicación de un grupo hidroxilo de un ligando puede estar relacionada con la ubicación de moléculas de agua en las estructuras de apo-proteínas [73, 91], desplazando dicha molécula de agua en el complejo proteína-ligando. En conjunto, los resultados del *docking* y de los sitios de agua arrojaron una sola posición viable química y estéricamente para la localización del azúcar, a partir de la cual se obtuvo el complejo completo.

Además, dado que GumK no es capaz de utilizar como dador a nucleótidos-azúcares relacionados como UDP-Glc (UPG) y UDP-GalA (UGB), también se construyeron dichos azúcares a fin de comprender a nivel dinámico y molecular las bases de la especificidad. En la Figura 8.9 se muestran las estructuras modeladas de los nucleótidos azúcares en la hendidura de GumK.

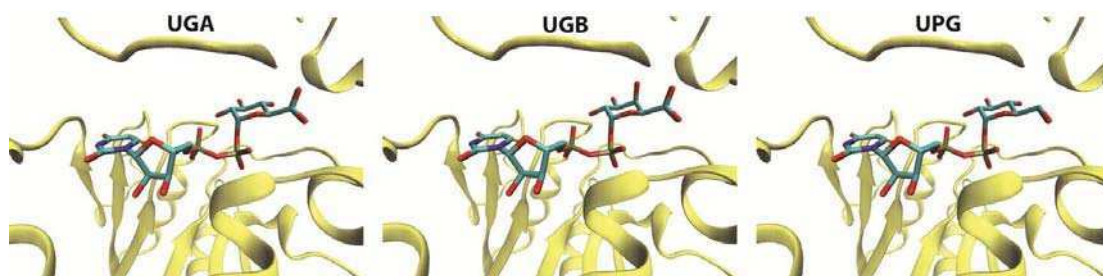


Figura 8.9. Construcción de los modelos de los ligandos en GumK. Se modeló, mediante *docking* el UGA, sustrato de la enzima. A partir de dicho modelo, se construyeron los análogos UGB (isómero en el 4-OH) y UPG (carece del ácido en C6). En la figura se observan las estructuras iniciales para DM.

8.10. Dinámica Molecular con ligandos

Se realizaron 40 ns de simulación de los sistemas presentados en el apartado anterior. En las estructuras representativas de las DMs se observó que, si bien todas las simulaciones resultaron nuevamente en un pequeño movimiento intra-dominio con respecto a las estructuras iniciales, en la DM con UGA el movimiento de la proteína fue mayor que en las simulaciones con los otros ligandos (Figura 8.10.A). En el análisis del RMSD de cada ligando se observó que los tres nucleótidos azúcares variaron con respecto a la estructura de partida, siendo UGA el ligando con mayor variación (Figura 8.10.B). En todos los casos, se alcanzó la estabilidad de la dinámica del ligando en el sitio de unión a los 10 ns de simulación.

En la Figura 8.10.C se observa una foto representativa de cada uno de los ligandos en el sitio de unión en la conformación representativa obtenida. Claramente, se observa cómo cada nucleótido azúcar cambió su conformación y cómo interaccionan diferencialmente con GumK. Estas interacciones fueron cuantificadas mediante el análisis de las energías en la dinámica mediante el método MM/GBSA (*Molecular Mechanics/Generalized Born Surface Area*), que opera sobre la trayectoria obtenida de la simulación de DM. Brevemente, MM/GBSA es un modelo conocido como un método de energía libre de punto final, ya que únicamente serán evaluados los estados iniciales y finales del sistema a partir de la trayectoria obtenida del complejo, asumiendo que la estructura proteica no experimenta grandes cambios en ausencia de ligando. El análisis mostró que la energía de interacción electrostática contribuye mayoritariamente a la unión de UGA, y que UGB se une con un 92 % de energía y UPG con un 70 %, respecto a la energía de unión de UGA. En parte, esta diferencia de energía entre los ligandos se deba posiblemente a una mayor estabilización de la carga negativa del UGA durante la dinámica. A partir del análisis visual de las trayectorias, se encontró que el residuo Arg29, sólo en el complejo GumK/UGA, orientó su cadena lateral para dejar su carga positiva en posición cercana al pirofosfato y al grupo ácido del UGA (Figura 8.10.C y Figura 8.11.C), estabilizando de esta manera la carga negativa del ligando.

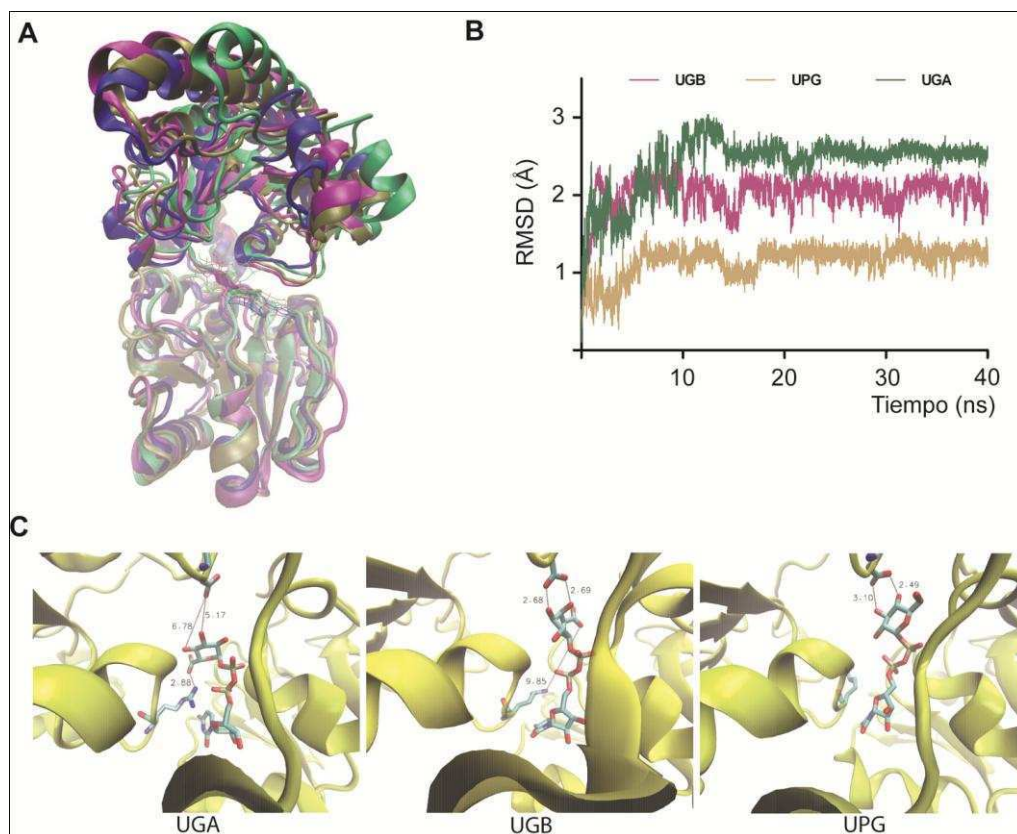


Figura 8.10. Dinámica Molecular de GumK con ligandos. **(A)** Superposición de la estructura experimental con UDP (azul) y de las estructuras representativas de las DMs con UGB (púrpura), UPG (marrón) y UGA (verde). **(B)** RMSD de los nucleótidos azúcares en las DMs. **(C)** Estructuras representativas de los ligandos en el sitio de unión a GumK obtenidas en las DMs. Se muestran las interacciones significativas; nótese la torsión adoptada por cada ligando.

El cambio en la conformación de los ligandos durante la dinámica involucró además un acercamiento al residuo catalítico Asp157 (Figura 8.11.A y 8.11.B), desde 9 Å a 3 Å aproximadamente, aunque este acercamiento es menos estable en la dinámica UGA, por lo que no se observó finalmente en la estructura representativa obtenida.

El análisis de RMSF de GumK (Figura 8.11.D) mostró nuevamente un mayor movimiento en la DM con UGA en la región del sitio activo y, notablemente, en la región correspondiente a la hélice de putativa interacción con la membrana Na₂ (55-60). Dicha región carece de contacto directo con los ligandos simulados.

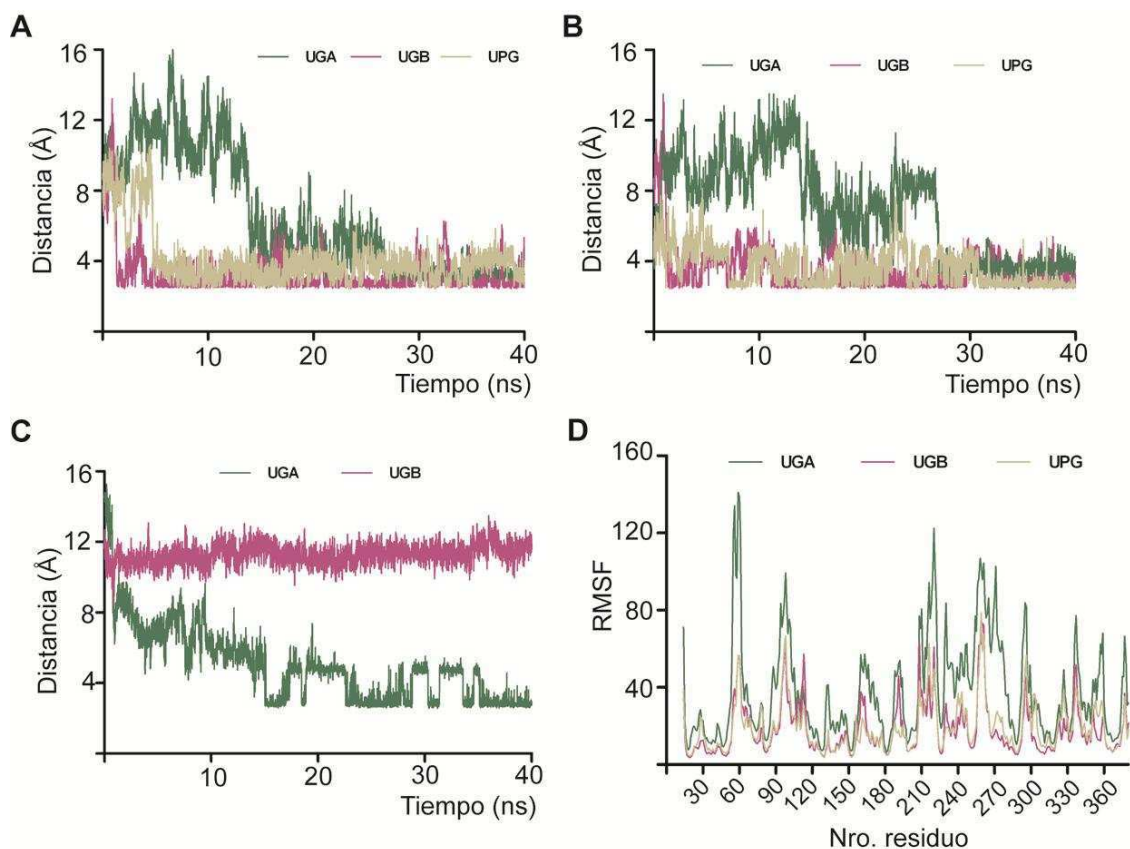


Figura 8.11. Reordenamiento de ligandos. Distancias durante las dinámicas del Asp157 al O3 (A) y al O4 (B) de las hexosas, y de la Arg29 al grupo ácido de UGA y UGB (C). (D) RMSF de los residuos de GumK en cada DM.

El análisis de los sitios de aguas en las simulaciones con ligandos mostraron una molécula de agua fuertemente localizada cerca del C1 del UDP-GlcA (3,6 Å). Esto no se observó en las MDs con los otros nucleótidos azúcares (Figura 8.12). La presencia de una molécula de agua fuertemente estabilizada en dicha región podría explicar el mecanismo por el cual, en ausencia de sustrato aceptor, el UDP-GlcA es hidrolizado, y no así los análogos.

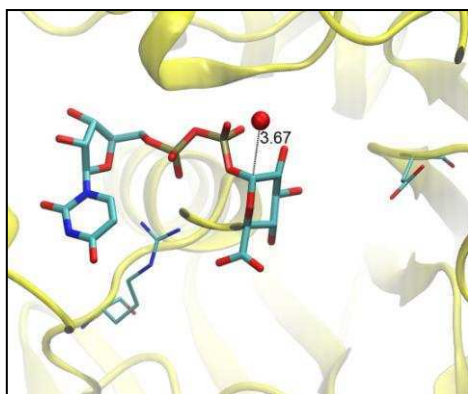


Figura 8.12. Hidrólisis del UGA en ausencia del aceptor mediada por H₂O. Ubicación de un sitio de agua cercana al C1 del ácido glucurónico. En las dinámicas con los sustratos UGB y UPG no se observaron sitios similares, coincidentemente con la ausencia de hidrólisis de dichos sustratos analizados experimentalmente.

8.11. Agregación por interacción con el sustrato

Debido al indicio de la existencia de movimientos en GumK en presencia de UDP-GlcA observado en las MDs, se desarrollaron diferentes técnicas bioquímicas y biofísicas para estudiar dicha interacción.

En primer lugar, se estudió la existencia de cambios macroscópicos en solución disparados por la presencia de UDP-GlcA. Mediante el monitoreo en función del tiempo de la absorbancia a 350 nm (turbidez), se observó la agregación de GumK (preparada según [35]) en presencia de ligandos. Como se observa en la Figura 8.13, GumK agregó en presencia de UDP-GlcA, de forma directamente dependiente de la concentración de ligando. En presencia de UDP-GalA, se comienza a observar agregación a los 50 min de incubación, indicando una posible interacción. Esta característica no fue observada con el agregado de UDP-Glc.

Debido a que la insolubilidad de los agregados interfiere con las mediciones biofísicas, se decidió ensayar la estabilidad de la proteína en diferentes *buffers*. De esta forma, se cambió el sistema Tris-HCl a fosfato, manteniendo el pH y demás aditivos. Además, la adición de glicerol fue necesaria para mantener a la enzima soluble. En este sistema, GumK purificada no acusa turbidez aún en presencia de exceso de UDP-GlcA (Figura 8.13).

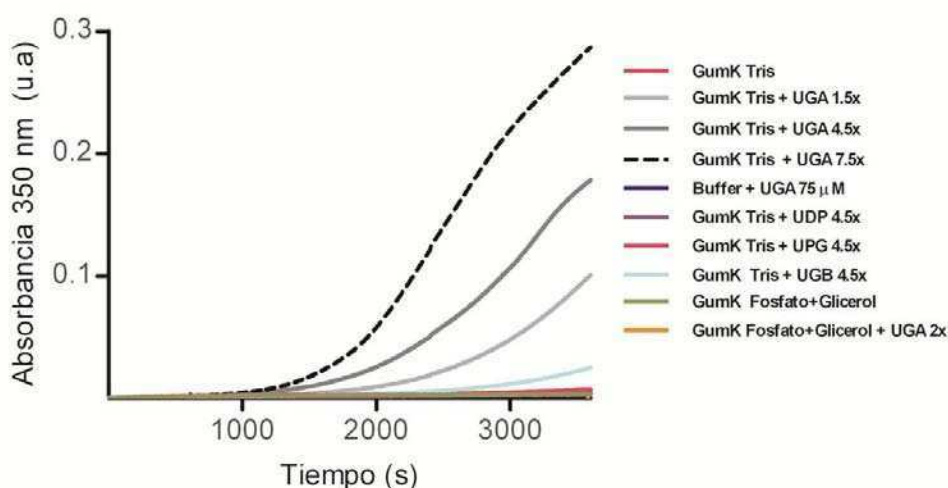


Figura 8.13. Monitoreo de agregación mediante absorbancia a 350 nm. Se observa que en *buffer* Tris y en presencia de sustrato, existe agregación disparada por UGA. Tanto con los análogos como en *buffer* fosfato+glicerol, si existe agregación, la misma es despreciable.

8.12. Proteólisis limitada

Como una aproximación alternativa para estudiar si la presencia de UDP-GlcA ejerce un cambio estructural sobre GumK, se realizaron ensayos de proteólisis limitada del complejo GumK/UDP-GlcA con tripsina. Además, se ensayaron UDP, y los análogos UDP-GalA y UDP-Glc. Como se observa en la Figura 8.14, GumK se digiere más lentamente y en forma diferencial en presencia de UDP, y más aún en presencia de UDP-GlcA.

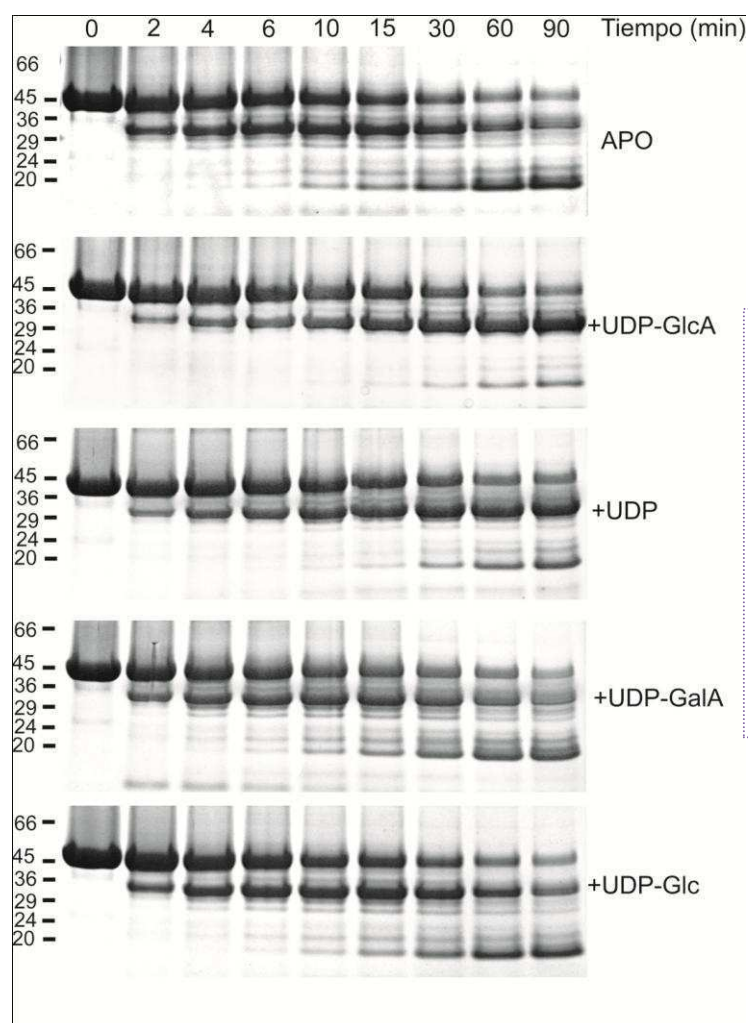


Figura 8.14. Proteólisis limitada con tripsina. Se llevaron a cabo reacciones de digestión con tripsina de apo-GumK y GumK con UDP, UDP-GlcA, UDP-GalA y UDP-Glc. Alícuotas a diferentes tiempos fueron analizadas por SDS-PAGE seguido por tinción con *Coomassie blue*. Se muestra la posición de los marcadores de masa molecular en kDa.

Los extremos N-terminal de los productos de digestión mayoritarios fueron secuenciados por el método de Edman y se infirió precisamente la identidad de los fragmentos (Figura 8.15). El fragmento de ~34 kDa liberado en primer lugar corresponde al segmento 97-406, abarcando el dominio C completo y una parte del dominio N. Este fragmento se ve notablemente protegido de digestión. Luego, ese fragmento es digerido principalmente en un fragmento de ~20 kDa (correspondiente al

dominio C completo), siendo la cinética de aparición de éste más rápida en apo-GumK respecto de GumK/UDP-GlcA.

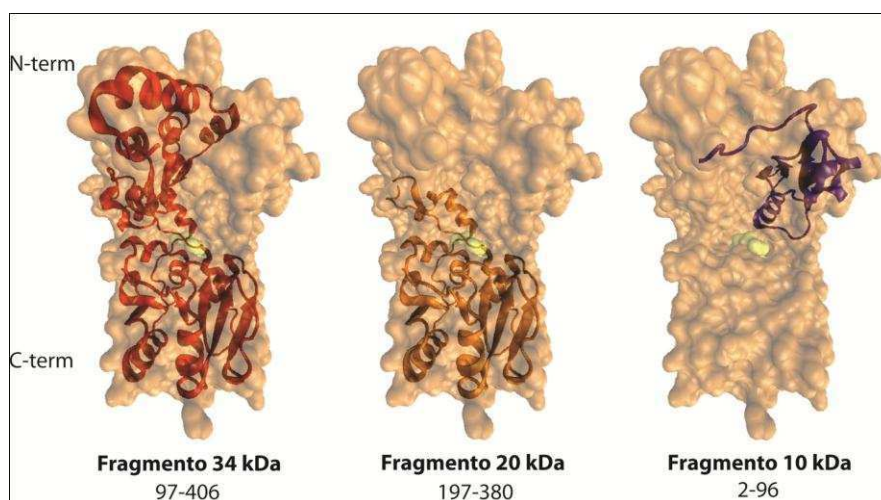


Figura 8.15. Fragmentos principales de la proteólisis. Los extremos amino-terminal de los fragmentos fueron secuenciados por el método de Edman. Se muestran las estructuras correspondientes a dichas regiones, deducidas en función de la secuenciación y del tamaño del fragmento. En amarillo se muestra la posición del UDP.

Se realizó también el ensayo de proteólisis limitada utilizando la proteasa α -quimotripsina (Figura 8.16.A, panel izquierdo). En este caso, se observa que toda la proteína es más estable en presencia de sustrato. Sin embargo, un análisis detallado de las bandas de digestión es muy complejo.

Anteriormente se observó que GumK purificada según Barreras y col. hidroliza al UDP-GlcA en ausencia del sustrato aceptor [35, 37]. Para corroborar la estabilidad del sustrato dador en los tiempos ensayados y con GumK obtenida con el nuevo método de purificación, se ensayó la hidrólisis del UDP-GlcA en ausencia del sustrato aceptor. Como se puede observar en la Figura 8.16.C, el UDP-GlcA comienza a ser hidrolizado luego de 2 h de incubación. Para analizar si la protección frente a la proteólisis otorgada por el sustrato está relacionada con el mecanismo catalítico de hidrólisis, se realizaron ensayos similares con la mutante inactiva (no hidrolítica) GumK/D157A [37]. Como se observa en la Figura 8.16.A y 8.16.B, tanto GumK salvaje como GumK/D157A resultaron menos sensibles a proteólisis en presencia del sustrato UDP-GlcA y de UDP.

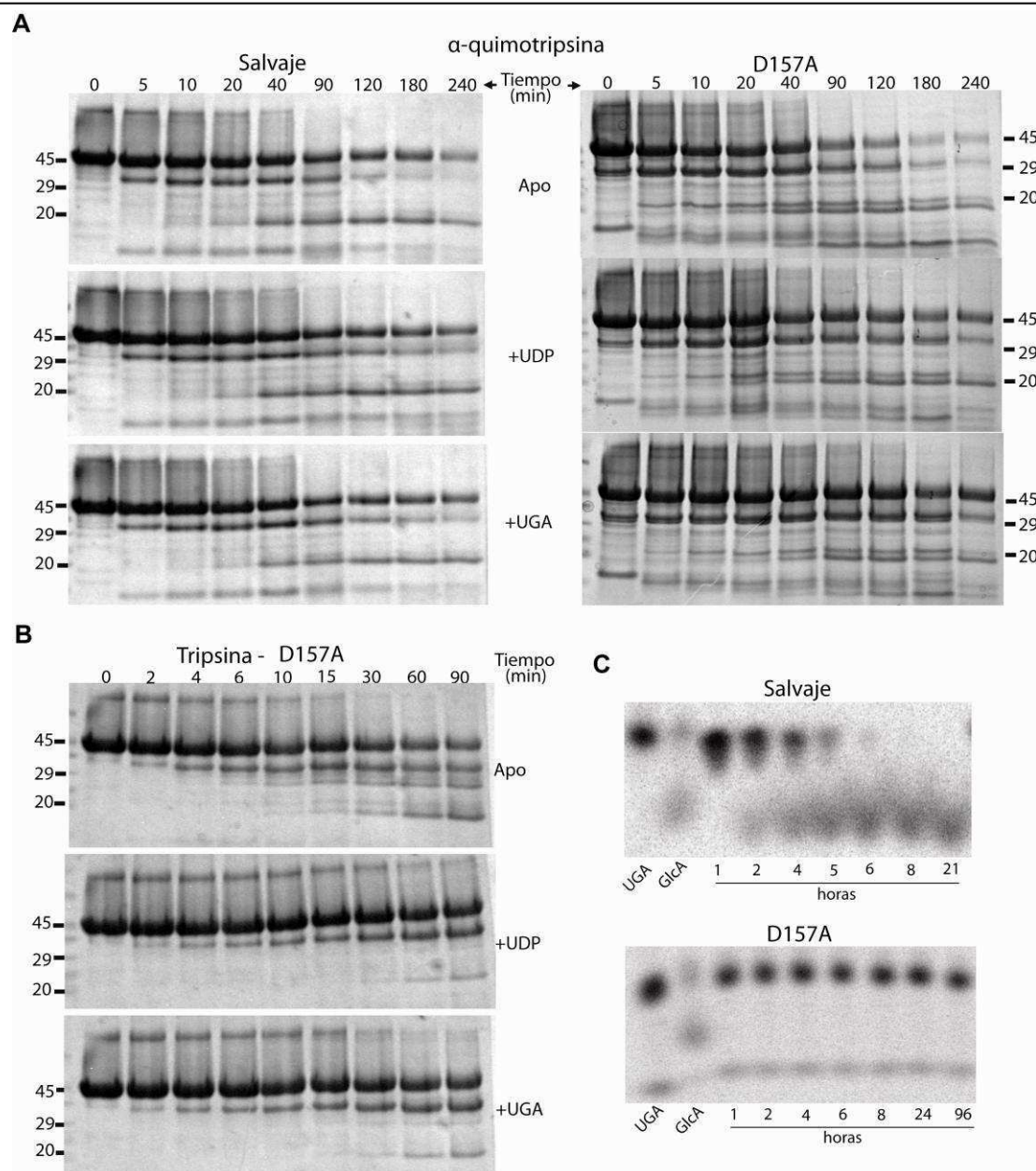


Figura 8.16. Proteólisis limitada de GumK salvaje y GumK/D157A e hidrólisis de UGA. SDS-PAGE teñido con *Coomasie blue* de alícuotas de proteólisis limitada con (A) α -quimotripsina de GumK salvaje (izq.) y GumK/D157A (der.) y (B) con tripsina de GumK/D157A. (C) Análisis por TLC de hidrólisis de [^{14}C]UGA en ausencia de aceptor por parte de GumK salvaje (arriba) y GumK/D157A (abajo).

8.13. Estudios biofísicos de GumK en presencia de ligandos

Las técnicas biofísicas permiten el estudio del comportamiento de las proteínas frente a ligandos, obteniéndose de dichos experimentos datos tales como constantes de afinidad, por ejemplo.

En proteínas, el aminoácido triptófano es una importante sonda fluorescente intrínseca. Al excitarse las proteínas a 295 nm, la fluorescencia emitida por el triptófano es la

dominante. La observación de cambios en la fluorescencia intrínseca de proteínas puede ser de utilidad para monitorear cambios estructurales. Con dicho fin, se analizó la fluorescencia emitida intrínsecamente por los triptófanos de GumK luego de la excitación de las muestras a 295 nm, en ausencia y presencia de concentraciones crecientes de sustratos (Figura 8.17). Además, se siguió la fluorescencia emitida de las mismas muestras, pero excitando específicamente el detergente Tritón X-100 presente en el *buffer* a 229 nm (Figura 8.18).

Como se puede observar en la Figura 8.17, si bien se observaron cambios en la intensidad de la fluorescencia emitida por las muestras, no hubo cambios en las longitudes de onda correspondientes a los máximos de emisión de los espectros de emisión del triptófano.

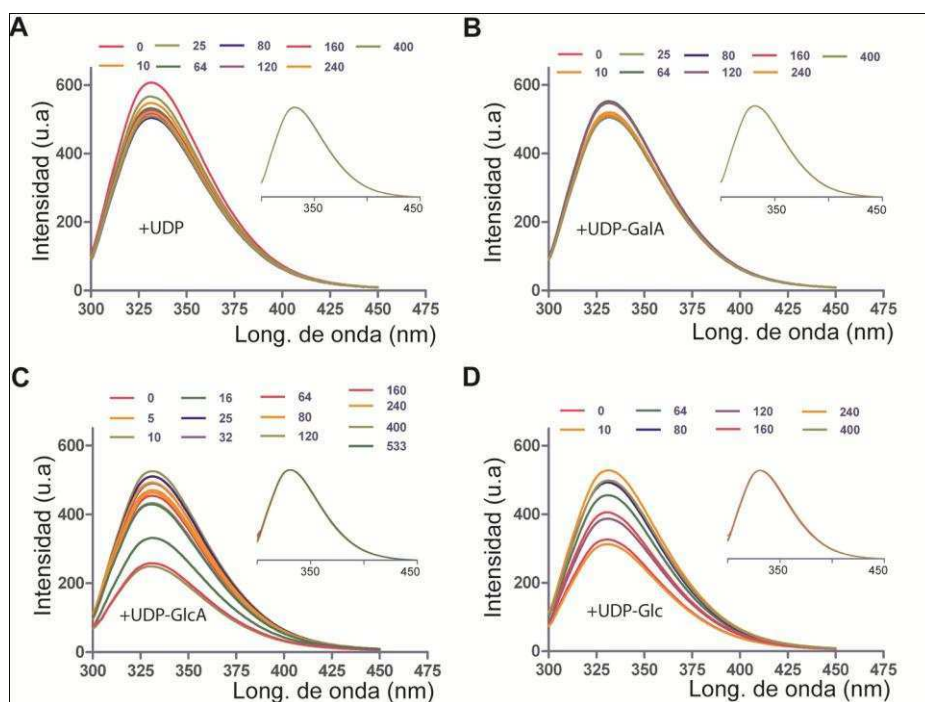


Figura 8.17. Espectros de fluorescencia intrínseca de triptófanos en función del agregado de los ligandos (A) UDP, (B) UGB, (C) UGA y (D) UPG. Las figuras internas representan los datos normalizados. Se indica los colores correspondientes a cada concentración de ligando en μM .

Con respecto a la emisión obtenida luego de la excitación del Tritón X-100, se observó un desplazamiento del máximo de emisión frente a la adición de UDP-GlcA (Figura 8.18.C).

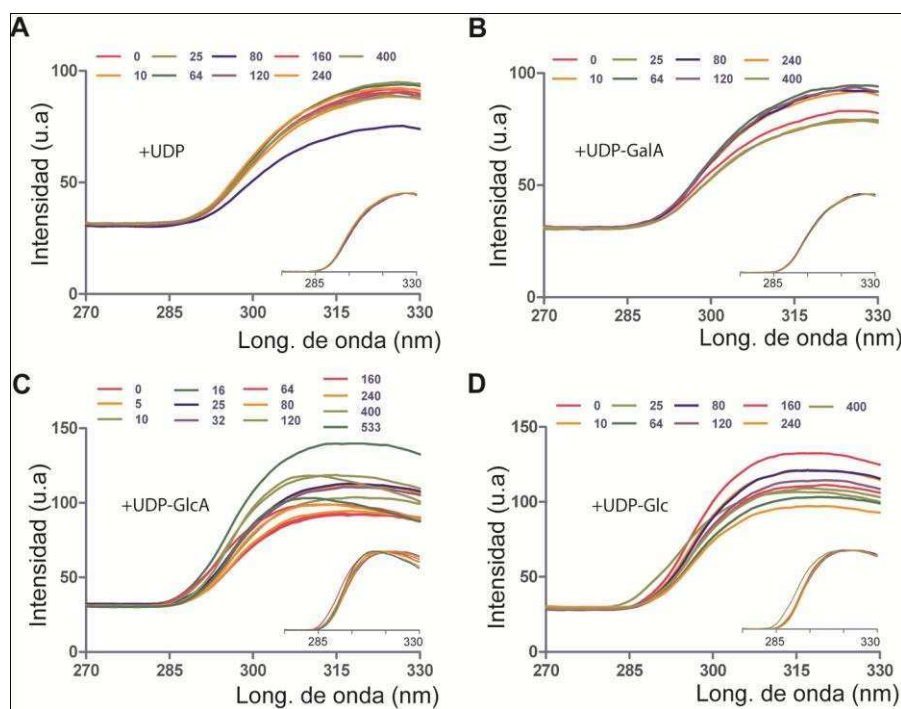


Figura 8.18. Espectros de fluorescencia luego de excitar las moléculas de Tritón X-100, en función del agregado de los ligandos (A) UDP, (B) UGB, (C) UGA y (D) UPG. Las figuras internas representan los datos normalizados. Se indica los colores correspondientes a cada concentración de

Como se ha reportado previamente que la excitación a 229 nm de las moléculas de Tritón X-100 puede tener un efecto resonante a 280 nm [92], y además considerando un posible efecto de corrimiento del máximo debido a agregación (por ende la disminución de la concentración de proteína), se monitoreó la agregación mediante la dispersión resultante de excitar las muestras y analizar la emisión a la misma longitud de onda (Em/Exc: 690 nm/690nm – Figura 8.19.A). Estos experimentos mostraron que no hay agregación detectada por dispersión, o bien la misma fue reversible. Cabe destacar que en los puntos correspondientes a una relación molar ligando/GumK de aproximadamente 1, las mediciones de dispersión acusaron un aumento de la relación R/R_0 (no mostrado), pero la misma fue reversible, retornando a los valores esperados para una muestra sin agregados. Se discutirá más adelante las posibles razones para ello. Además se realizaron, con el fin de detectar agregación, incubaciones de la proteína con exceso de sustrato, a diferentes temperaturas y en presencia de diferentes concentraciones del agente entrecruzador de grupos amino ditiobis[succinimidil propionato] (DSP). En todos los casos se observó que GumK mantuvo su estado monomérico pese a la adición de sustrato (Figuras 8.19.B y C).

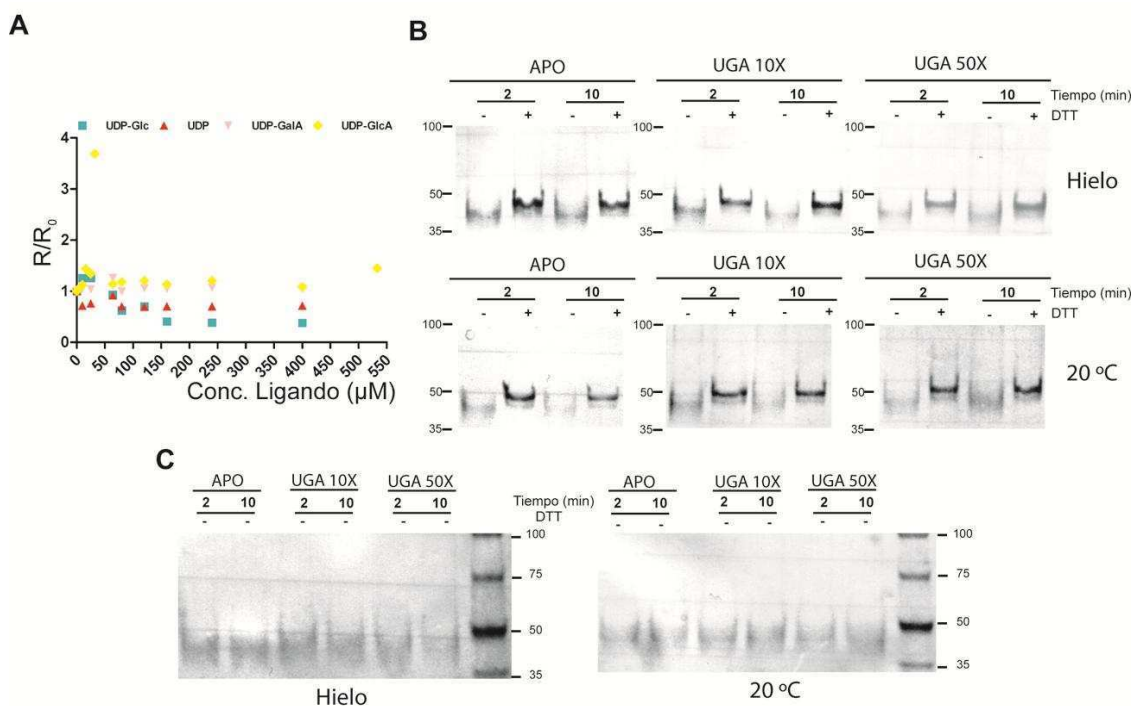


Figura 8.19. Agregación/oligomerización de GumK en presencia de ligandos. **(A)** Dispersión a 690 nm relativizada a la dispersión sin ligando de las muestras analizadas por fluorescencia. **(B)** SDS-PAGE teñidos con *Coomassie blue* de reacciones de entrecruzamiento con 0,1 mM de DSP de GumK sola (APO) o con exceso de sustrato (UGA 10x y 50x). El entrecruzamiento con DSP es reversible por DTT. **(C)** SDS-PAGE teñidos con *Coomassie blue* de reacciones de entrecruzamiento con 0,5 mM de DSP de GumK sola (APO) o con exceso de sustrato (UGA 10x y 50x). Las reacciones mostradas en **(B)** y **(C)** se realizaron tanto en hielo como a 20 °C.

Estos resultados mostraron que, si bien hubo efectos de dispersión sólo en algunos puntos, discutidos más adelante, éstos fueron despreciables y no están relacionados al corrimiento del máximo de emisión luego de la excitación del Tritón X-100.

Por otro lado, se analizaron los espectros de diroísmo circular (CD) en el UV cercano de las mismas muestras utilizadas para los ensayos de fluorescencia. Como se observa en la Figura 8.20, los espectros no variaron con la adición de ligando, excepto con UDP-GlcA. En presencia de UDP-GlcA, se observó la disminución de señal a 260 nm, provocando en consecuencia un corrimiento del máximo. Como se verá a continuación, el cambio en el espectro difiere del cambio obtenido por la agregación inducida por temperatura.

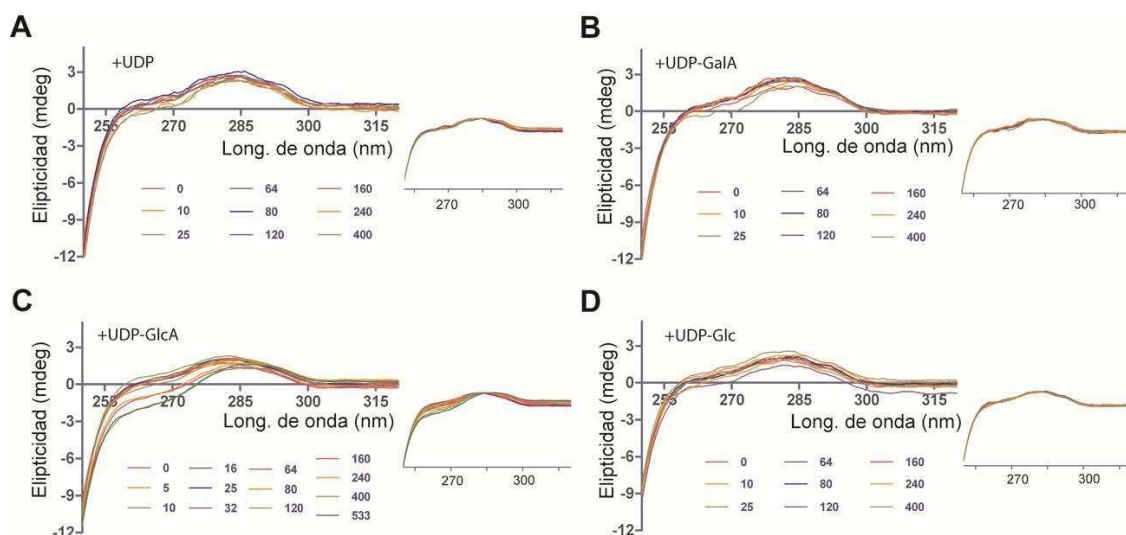


Figura 8.20. Espectros de dicroísmo circular en el UV cercano, en función del agregado de los ligandos (A) UDP, (B) UGB, (C) UGA y (D) UPG. Las figuras a la derecha de cada panel representan los datos normalizados. Se indican los colores correspondientes a cada concentración de ligando en

8.14. Estabilidad Térmica

Con el fin de estudiar si la presencia de sustrato introduce una estabilidad adicional en la estructura de GumK, se realizó el seguimiento de la agregación/desnaturalización en respuesta a la temperatura, mediante varias técnicas:

8.14.i. Fluorescencia

La emisión de los triptófanos y del Tritón X-100 fue medida en ausencia y presencia de sustrato, en función de la temperatura (Figura 8.21.A y 8.21.B). Tanto para la apo-proteína como para el complejo GumK/UDP-GlcA se observó una T_m aparente de 38 °C.

8.14.ii. Dynamic Light Scattering (DLS)

La agregación en función de la temperatura fue medida por DLS (Figura 8.21.C). Se observó que la proteína comenzó a agregar (incrementando el valor R_h medido) a los 35 °C, alcanzando su máximo a los 50 °C, tanto en presencia como en ausencia de GlcA.

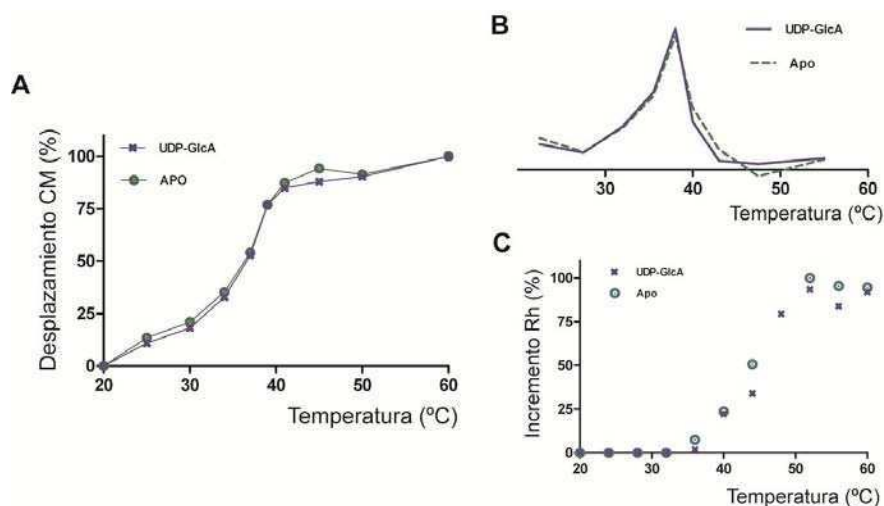


Figura 8.21. Respuesta de GumK con y sin sustrato frente a la temperatura monitoreada por fluorescencia y DLS. (A) Se grafica el desplazamiento relativo de centro de masa relativo de los espectros de fluorescencia intrínseca de triptófanos en función de la temperatura. (B) Primera derivada de (A), mostrando el punto de inflexión de la curva. (C) Incremento del R_h medido por DLS.

8.14.iii. CD

Se obtuvieron y analizaron los espectros de CD en el UV lejano (Figura 8.22.A y 8.22.B) y cercano (Figura 8.22.C,D y E), en función de la temperatura, de GumK con y sin sustratos. Por CD en el UV lejano se observó que, si bien ambos presentan la misma T_m aparente de aproximadamente 38 °C, la apo-proteína comienza primero la pérdida de señal, y el estado final del complejo GumK/UDP-GlcA perdió sólo un 60 % de la señal con respecto a la apo-proteína.

Los espectros en función de la temperatura en el UV cercano mostraron un comportamiento similar para la forma apo y para el complejo, pese a la diferencia inicial de señal a 260 nm otorgada por la interacción de GumK con UDP-GlcA.

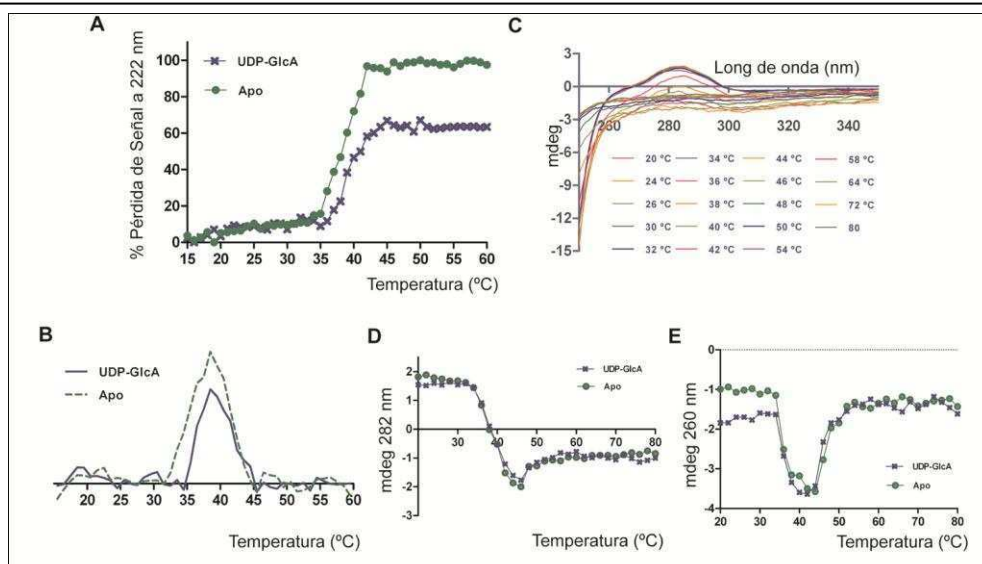


Figura 8.22. Respuesta de GumK con y sin sustrato frente a la temperatura monitoreada por dicroísmo circular (A) Se grafica el porcentaje de pérdida de señal de CD a 222 nm (B) Primera derivada de (A), mostrando el punto de inflexión de la curva. (C) Espectros de CD en el UV cercano de Apo-GumK en función de la temperatura. Se grafica la señal versus temperaturas para Apo-GumK y GumK/UGA a 282 nm (D) y 260 nm (E).

8.14.iv. Proteólisis limitada vs. temperatura

Para corroborar las posibles diferencias en la cinética de agregación en apo-GumK con respecto a GumK/UDP-GlcA, se incubó GumK con y sin sustrato a diferentes temperaturas. Luego, las mezclas fueron sometidas a proteólisis con tripsina a 20 °C. En la Figura 8.23 se observa que luego de la incubación a 20 °C y 30 °C, se mantuvo la protección frente a la proteólisis en el complejo GumK/UDP-GlcA descrita anteriormente. Posterior a la incubación a 40 °C, hubo digestión sólo en el complejo GumK/UDP-GlcA, indicando la agregación de la apo-proteína. A 50 °C, ambas se encontraban agregadas, por lo cual no se observó digestión en ningún caso.

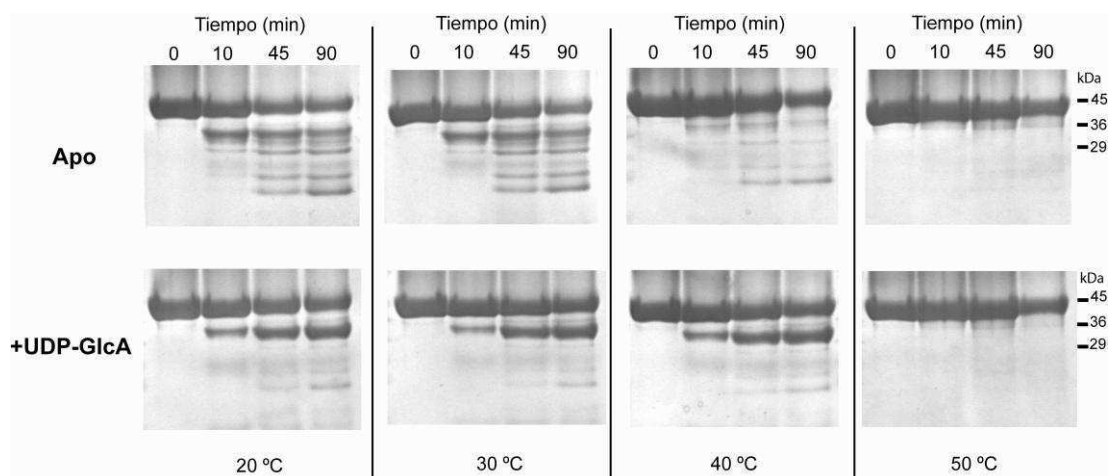


Figura 8.23. Proteólisis limitada en función de la temperatura. Apo-GumK y GumK/UDP-GlcA fue incubada a 20, 30, 40 y 50 °C, y luego se incubó a 20 °C con tripsina. Se muestran en las figura SDS-PAGE teñido con Coomassie blue de alícuotas de las digestiones tomadas a los tiempos indicados.

8.15. Calorimetría de titulación isotérmica (ITC)

Mediante el uso de las técnicas biofísicas detalladas anteriormente no fue posible la obtención de parámetros de afinidad, y los resultados acusan un mecanismo complejo de unión a ligando. Con el fin de profundizar en el mecanismo de unión se realizaron experimentos de ITC. Se utilizó una concentración de GumK de 80 μM y de 3 mM de UDP-GlcA o de análogos, o bien 128 μM de GumK y 4,8 mM de ligandos. De esta forma, se obtuvieron isotermas de unión sólo para la reacción de unión a UDP-GlcA. Concentraciones más elevadas de análogos fueron ensayadas, sin obtenerse señal de unión en dichas condiciones. En la Figura 8.24 se muestran los resultados obtenidos. Como se observa claramente, la isoterma obtenida en la titulación con UDP-GlcA no se corresponde con un modelo de unión simple. Los datos obtenidos acusan dos etapas en el *binding* (Figura 8.24.A). En cambio, en la titulación con UDP se observó una entalpía de valor absoluto menor, con una isoterma de unión diferente (Figura 8.24.B). A modo de ejemplo, se muestran los resultados obtenidos con UDP-Glc (Figura 8.24.C). En la estructura de GumK es claro que la misma posee sólo un sitio de unión. Aun así, esfuerzos por ajustar los datos experimentales a modelos de un solo sitio de unión, o a otros modelos simples, no han dado resultado.

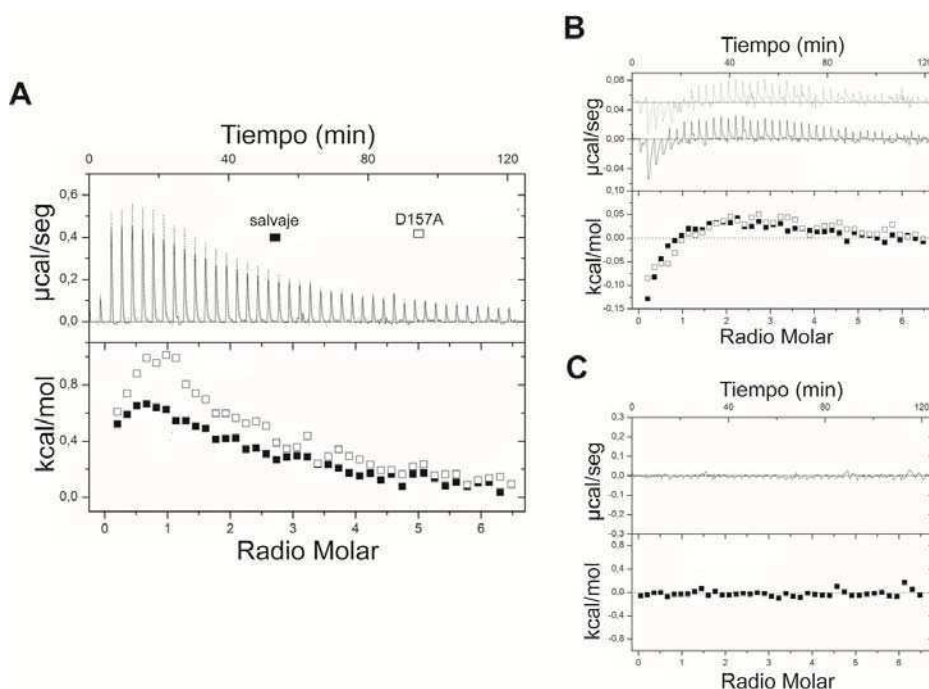


Figura 8.24. ITC. Se muestran el termograma y su integración, resultante de titular GumK salvaje o GumKD157A con UDP-GlcA (A), GumK salvaje con UDP (B) o GumK salvaje con UDP-Glc (C).

Si bien la hidrólisis de UDP-GlcA es despreciable en los tiempos ensayados, se realizó una titulación de la forma inactiva GumKD157A con UDP-GlcA, para analizar si las dos etapas se correspondían a procesos de unión e hidrólisis. Se obtuvo un perfil de titulación similar al obtenido con la proteína salvaje, con una diferencia en la cantidad de entalpía producida en el proceso de unión. Esto último indicaría que la hidrólisis podría enmascarar la entalpía obtenida con la unión de GumK salvaje a UDP-GlcA. Además, afirma que las etapas observadas en las isotermas de GumK salvaje corresponden al proceso de unión, y no al de hidrólisis.

8.16. Dispersión de rayos-X de bajo ángulo (SAXs)

Con el fin de observar la respuesta en solución de GumK frente a la unión del sustrato, se utilizó una técnica de mediana resolución como lo es SAXs. En los casos más exitosos, SAXS permite la obtención del *envelope* de la proteína en solución. En este caso, se observó un cambio sistemático disparado por la unión de GumK a UDP-GlcA y, en menor medida, a UDP (Figura 8.25.A). La función $p(r)$ (*pair-distance distribution function*) otorga información sobre la probabilidad de encontrar un átomo a una determinada distancia (r). Según el cálculo de la función $p(r)$ a partir de los datos obtenidos por SAXs, la conformación en presencia de ligando sería más compacta, acercando los dos dominios que componen la proteína.

8.17. Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Los espectros monodimensionales de ^1H para un gradiente de campo pulsado fueron tomados a 20 °C, en ausencia y presencia de UDP. El R_h obtenido para la apo-proteína fue de 28,7 Å, esperable en función de la estructura cristalina del monómero. El R_h de GumK en presencia de UDP no pudo ser determinado, debido a la imposibilidad de ajustar los datos experimentales. Sin embargo, se observó un claro cambio en los espectros, indicando la presencia de interacción (Figura 8.25.B). Dado que las mediciones demandaron aproximadamente 40 h, no fue posible realizar el experimento con GumK salvaje y UDP-GlcA debido a la hidrólisis del UDP-GlcA en dicho tiempo. En su lugar, se utilizó la mutante GumKD157A obteniendo un R_h del complejo de 27,3 Å, sugiriendo una compactación de la proteína en presencia del ligando.

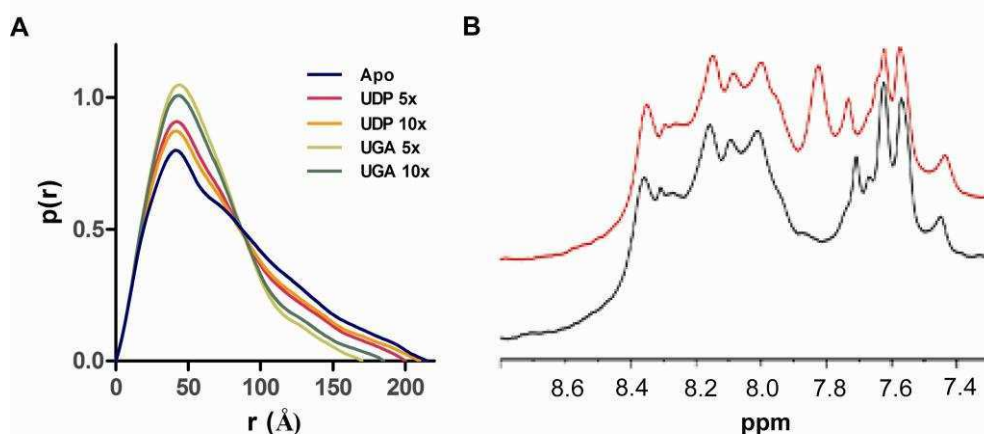


Figura 8.25. SAXS y RMN. (A) Se muestra la función $p(r)$ obtenida por SAXS para apo-GumK, GumK/UDP y GumK/UGA. (B) Se muestran el espectro monodimensional ^1H de RMN para apo-GumK salvaje (negro) y GumK/UDP (rojo).

8.18. Unión al sustrato aceptor

Como aproximación al estudio estructural de la unión al sustrato glicolípídico, se realizaron ensayos de “remojo” (*soaking*) con análogos del sustrato. Esta técnica consiste en sumergir el cristal de la apo-proteína en una solución conteniendo los análogos. Estos análogos no poseen la porción oligosacáridica completa. Sin embargo poseen la porción lípido-fosfato, indispensable para la actividad de GumK. Los análogos utilizados fueron *C*₅₅-prenil-*P*, *C*₃₅-heptaprenil-*P* y *fitanil-PP-celobiosa*. Además se realizaron los mismos ensayos de inmersión en presencia del sustrato dador UDP-GlcA o del producto de reacción, UDP. Cabe destacar que, en presencia de los lípidos, los cristales se tornaron muy frágiles. Los datos cristalográficos correspondientes fueron colectados en la línea DO3B-MX1 para cristalografía de macromoléculas de la fuente de luz sincrotrón LNLS (Laboratorio Nacional de Luz Síncrotron, Campinas, Brasil).

Los datos fueron analizados y las estructuras fueron resueltas por reemplazo molecular, utilizando como molde la estructura apo-GumK. En los datos analizados no se observaron ligandos ni diferencias con la estructura resuelta previamente.

8.19. Construcción del complejo ternario.

8.19.i. Docking

Al no disponer del sustrato aceptor completo en forma comercial para encarar experimentos estructurales, se intentó modelar el lip-PP-trisacárido en GumK. Dado que

se no se conoce con exactitud la identidad del lípido aceptor de GumK en *Xc*, se utilizó como lípido modelo una molécula del prenol geranil. Para la construcción del sustrato aceptor completo, se utilizaron diferentes estrategias. La estrategia principal se basó en la utilización de algoritmos de *docking* sobre la estructura representativa del modelo del complejo GumK/UDP-GlcA. El sustrato fue diseccionado en partes, y se realizaron *dockings* con las siguientes entidades: pirofosfato (PP), geranil-PP, trisacárido, combinaciones de disacáridos y monosacáridos.

El *docking* de PP sobre la estructura representativa de la DM de GumK/UGA mostró, como resultado con mayor probabilidad, una ubicación que se corresponde con el PP de UDP, sirviendo dicho resultado de control interno. Los demás resultados obtenidos para el PP se localizaron en el N-terminal, como era de esperarse. En todos los casos, se lo encontró interaccionando con residuos básicos, propuestos además como residuos de interacción con los fosfolípidos de membrana (Figura 8.26.A). Resultados similares se obtuvieron con el *docking* de geranil-PP. En cambio, los resultados del *docking* con los azúcares, en todas las variantes ensayadas, fueron muy dispersos, no encontrándose una localización clara de la porción sacarídica.

8.19.ii. *Bias docking*

Con el fin de localizar de manera confiable al trisacárido, se analizaron los sitios de agua generados durante la DM del sistema GumK/UDP-GlcA. Como se comentó anteriormente, los sitios de agua generados en la dinámica pueden ser desplazados por los grupos OH de los azúcares. Por tal motivo, los sitios de agua encontrados cerca de la probable localización del trisacárido fueron utilizados para realizar *bias docking* (Figura 8.26.B). En esta técnica, al *docking* convencional se le adicionan pozos de energía en los mapas de cada átomo de O, de tal forma que tengan una preferencia por localizarse en estos sitios. De esta forma, y teniendo en cuenta principalmente los resultados de *docking* del PP, se obtuvo un primer modelo de complejo ternario (Figura 8.26.C).

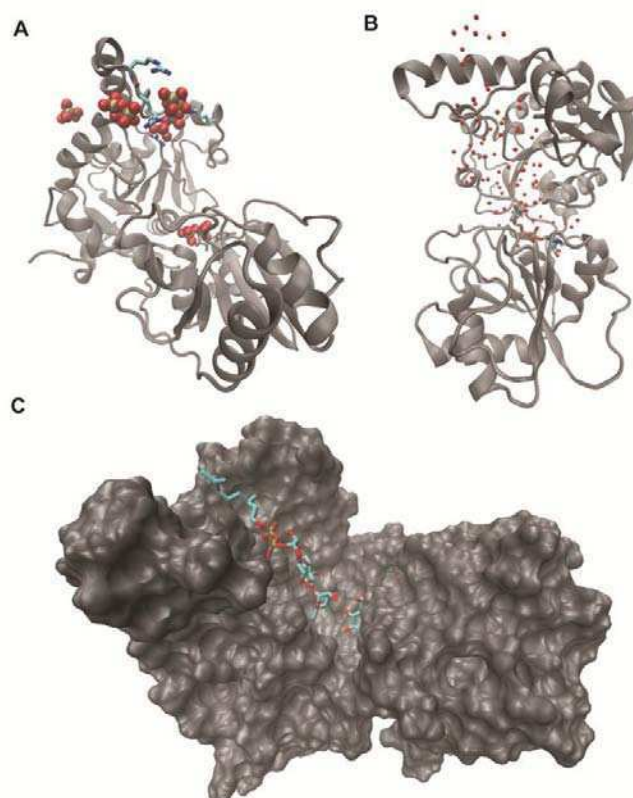


Figura 8.26. Construcción del lip-PP-trisacárido. (A) Resultados del *docking* del PP sobre la estructura del complejo GumK/UGA. (B) Localización de sitios de agua, generados en la DM GumK/UGA, en la probable zona de unión del trisacárido. (C) Modelo del complejo ternario formado. Se muestra la superficie de GumK en donde se puede observar la disponibilidad estérica de la hendidura.

8.20. Dinámica Molecular del complejo ternario

Con el complejo modelado indicado en el apartado anterior se realizaron simulaciones de DM. En este caso, se observó que el O2 de la manosa terminal del trisacárido se aleja del C1 del glucurónico, desde 6 Å hasta 10 Å, quedando muy lejos para la reacción de transferencia (Figura 8.27.A). Además, según el mecanismo propuesto, el residuo D157 atacaría al O2 de la manosa del aceptor. Cuando se analizó la distancia D157(OD)-Man(O2) en la DM se observó que la misma se mantuvo relativamente estable alrededor de 6 Å (Figura 8.27.B). Este resultado resalta el hecho de que, probablemente, exista un cambio conformacional grande disparado por la unión de UDP-GlcA, que permitiría acercar ambos sustratos. Este tipo de cambio no es viable de ser analizado por simulación computacional hasta el momento.

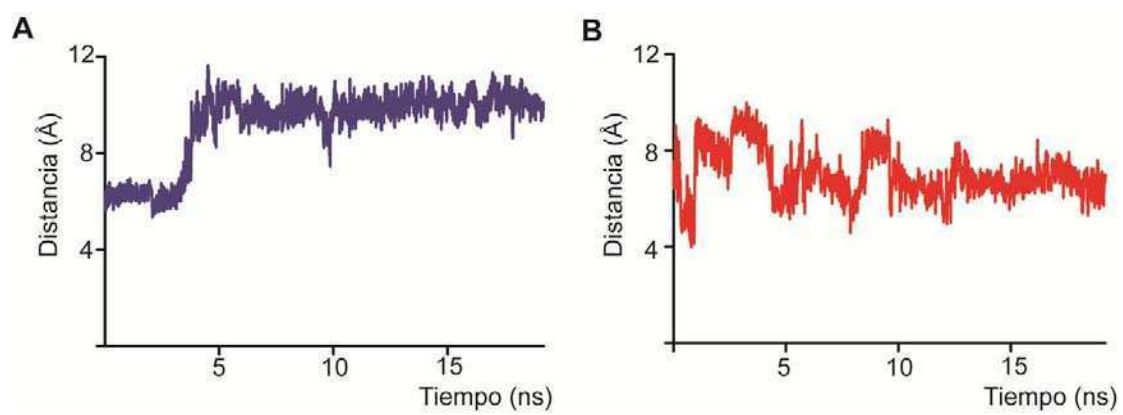


Figura 8.27. Análisis de distancias durante la DM del complejo ternario. **(A)** Distancia Man(O2)-GlcA(C1). **(B)** Distancia Man(O2)-D157(OD).

Discusión

8.21. Interacción de GumK con la membrana

Experimentos previos realizados durante la caracterización bioquímica de GumK demostraron que la proteína se encuentra asociada a membrana, siendo probablemente una proteína integral monotópica de membrana. Al obtenerse la estructura, el cálculo de superficie electrostática mostró una región en el N-terminal con alta probabilidad de ser responsable de la unión a la bicapa, debido a su concentración de aminoácidos básicos e hidrofóbicos. Además, mediante estudios *in silico* de asociación a una membrana modelo, GumK se insertaría en la membrana por la región propuesta previamente. Dichos datos son de acceso público en la base de datos OPM [64].

Para estudiar más en profundidad la región, y teniendo en cuenta que además dicha región podría estar involucrada en la interacción con el lípido-PP-trisacárido aceptor, se realizaron las mutantes puntuales y las mutantes por delección descritas en Resultados. Como primera conclusión se puede decir que ninguna de las mutantes realizadas afecta significativamente la localización en la membrana de la enzima. Sin embargo, la actividad se ve afectada en diferente medida en cada mutante.

En cuanto a las mutantes puntuales observamos que en *Xc*, excepto H1 (L56S/M59S), todas mantienen la actividad glucuronosiltransferasa pero poseen una eficiencia menor de transferencia. Esto es evidenciado por la presencia de intermediario lip-PP-trisacárido en el análisis por TLC, encontrándose una relación entre los productos trisacárido/pentasacárido de aproximadamente 0,5. Por otro lado, la presencia del intermediario lip-PP-tetrasacárido en las reacciones con las mutantes B1 y B3 podría indicar la disminución de la actividad de GumI, posiblemente por ver afectada la interacción con GumK.

En *Xc*, la única mutante que perdió su actividad fue la mutante H1. Se observó que esta mutante no es capaz de complementar la producción de xantano en la cepa *XcK*. La mutante H2 sí mantiene la actividad GT, pero complementa en aproximadamente un 50 % con respecto al nivel de xantano salvaje en *XcFC2*. Ninguna de las mutantes puntuales interfiere con la producción de xantano cuando son expresadas en *trans* en *XcFC2*. Teniendo en cuenta estos resultados, y que la mutante inactiva GumKD157A en *XcFC2* interfiere con la producción de polisacárido, se puede pensar que las

mutaciones H1 y H2 afectarían a una posible interacción con otros componentes del sistema o que pierde afinidad por el aceptor, dejando a este último totalmente disponible para GumK salvaje. Llamativamente, en extractos de *E. coli* y en presencia del detergente Tritón X-100 todas las mutantes presentan actividad GT, en acuerdo con la necesidad de un ambiente símil-membrana para la actividad de la enzima.

Las mutantes por delección tampoco perdieron su capacidad de unirse a membrana, sin embargo también se encontró a las mutantes en la fracción soluble. En este caso, y como era de esperar, se observó inestabilidad en las proteínas truncadas, evidenciada por el análisis de la expresión. Todas las mutantes resultaron inactivas *in vivo* y con una eficiencia prácticamente nula en ensayos *in vitro* con células permeabilizadas.

Al comienzo de este trabajo se postulaba que la interacción con la membrana aportaba solamente a la correcta localización espacial para interactuar con ambos sustratos. Sin embargo, queda claro que la interacción con la membrana es parte además del mecanismo global de catálisis. Tanto la orientación relativa de la proteína respecto a la membrana como su grado de inserción en la misma son determinantes en diferentes procesos, por ejemplo la unión a un sustrato embebido en la membrana [65]. Existen diferentes mecanismos de unión a la membrana, encontrándose ejemplos en numerosos sistemas biológicos [93]. En cuanto a las GTs, al menos ocho familias CAZy poseen miembros caracterizados que cumplen su función asociados a membrana. Por ejemplo, como se mencionó en Introducción, la $N\alpha 2$ en PimA es fundamental para la interacción con fosfolípidos, a su vez resultando en una mejora de la actividad GT [41]. Como otro ejemplo podemos nombrar a la proteína alMGS de *Acholeplasma laidlawii*. Se ha demostrado que la proteína monotópica de membrana alMGS tiene la capacidad de sensor la curvatura y la calidad de los lípidos, regulando así su actividad enzimática [94].

En conjunto, se puede decir que la asociación a membrana es un proceso complejo en GumK, que probablemente dependa de varios determinantes moleculares. Los resultados obtenidos con la mutante H1 indicarían un posible rol de esta región, $N\alpha 2$, en la unión al sustrato aceptor. Con el fin de estudiar biofísica y estructuralmente a GumKH1, se realizó la purificación de la proteína a partir de *E. coli*. La mutación puntual introducida otorgó inestabilidad a la proteína y no fue posible obtener cantidades suficientes para la realización de los estudios propuestos (no mostrado).

Cabe destacar que la estructura secundaria N α 2 es conservada en otras GTs monotópicas probablemente debido a su importancia [42, 45].

8.22. Modelo de la localización de UDP-GlcA en GumK

En esta tesis se intentaron explotar los conocimientos estructurales de GumK, con el fin de obtener indicios sobre el mecanismo y la especificidad de la enzima hacia su sustrato dador. Previamente observamos mediante ensayos de actividad que GumK es altamente específica hacia UDP-GlcA. Nucleótidos-azúcares relacionados, como UDP-Glc y UDP-GalA, no son empleados como sustratos dadores por GumK. En el laboratorio se realizaron esfuerzos tanto en la co-cristalización como en experimentos de “remojo” de GumK con UDP-GlcA. Al resolver las estructuras de los cristales provenientes de los experimentos de “remojo” con UDP-GlcA se encontró sólo la región UDP. Visto esto, se postuló que o bien existe la hidrólisis del UDP-GlcA ó la porción del azúcar es flexible en el cristal. Por TLC se observó que GumK hidroliza al UDP-GlcA en condiciones similares a las del cristal. Por tal motivo, se intentó responder los interrogantes planteados mediante herramientas de simulación computacional.

En primer lugar, se realizaron DMs a partir de las estructuras cristalinas de apo-GumK y GumK-UDP. En las dinámicas se observa que el esqueleto de ambas estructuras se reordena, dando un RMSD en el equilibrio de aproximadamente 2,5 Å. Este reordenamiento está dado por la flexibilidad en la región bisagra. Se observa en la Figura 7.21.C y 7.21.D cómo al alinear un dominio el otro se ve desplazado con respecto a la estructura cristalina, sin obtenerse modificación en la estructura secundaria. El análisis de la fluctuación de cada residuo durante la dinámica (RMSF) muestra que en la DM con UDP los residuos 255-275 se encuentran más estabilizados con respecto a la DM de apo-GumK, probablemente debido a que en dicha región se encuentran la mayor parte de los residuos que interactúan con UDP. Si bien ésto es un estudio *in silico*, los resultados presentan lógica y permiten observar comportamientos dinámicos que, por ejemplo, al analizar los valores de factores de temperatura (b) en el cristal no es posible observar.

En segundo lugar, mediante *dockings* obtuvimos un modelo lógico de la ubicación de la porción GlcA del UDP-GlcA. Además, utilizando de base al modelo GumK/UDP-GlcA se realizaron modelos de GumK con UDP-Glc y UDP-GalA. Con cada uno de estos sistemas se realizaron DMs, que permitieron profundizar sobre la especificidad de

GumK con su sustrato dador. Nuevamente observamos un reordenamiento conformacional en todos los casos. Sin embargo, el movimiento relativo de dominios en presencia de UDP-GlcA es diferente a los observados con los nucleótidos-azúcares análogos y con UDP. Todos los nucleótidos-azúcares cambian su conformación, siendo el UDP-GlcA el que presenta una mayor RMSD en la DM. De esta forma, sólo el UDP-GlcA se posiciona de una manera favorable para la reacción química de transferencia, dejando expuesto el C1 del GlcA. Esta ubicación más favorable es dada en parte por la interacción específica con la Arg29, la cual se reorienta hacia el α -fosfato y hacia el grupo ácido del GlcA. Debido a que el UDP-GalA interacciona mediante su OH3 y OH4 con el Asp157, no genera un cambio en su conformación y tampoco interacciona con Arg29.

Además, los cálculos de las energías de unión, si bien son meramente estimativos, son coherentes con la especificidad de sustrato ($E_{\text{UDP-GlcA}} > E_{\text{UDP-GalA}} > E_{\text{UDP-Glc}}$).

El análisis de las DMs con los ligandos nos permitió encontrar un “sitio de agua”, es decir una región con mayor ocupancia de agua que el promedio del solvente, ubicado a una distancia de 3,61 Å del C1 del GlcA, siendo dicha distancia adecuada para la reacción de hidrólisis. Este resultado está de acuerdo con la reacción de hidrólisis observada experimentalmente.

El análisis de RMSF de los residuos en cada DM demuestra que en presencia de UDP-GlcA los residuos que interactúan con el UDP en la región 255-275 se encuentran menos estabilizados y sorpresivamente se encontró mayor movilidad en los residuos pertenecientes a la hélice N α 2 del N-terminal. Este indicio es el primero que indicaría que la unión del UDP-GlcA influye en la región N-terminal, mediante posibles cambios conformacionales, probablemente preparando un sitio para la unión del aceptor. Dado que los tiempos de simulación fueron de 40 ns, no es posible observar en este tiempo grandes cambios conformacionales, si los hubiere.

8.23. La unión de UDP-GlcA dispara un cambio conformacional en GumK

El modelo propuesto se complementó con estudios biofísicos, orientados a la comprensión de la bioquímica detrás de la especificidad. En primer lugar, observamos que GumK purificada en forma estándar descrita por Barreras y col. [35] agrega de forma insoluble cuando se adiciona UDP-GlcA a la solución de proteína. Éste fue el

primer indicio experimental de la existencia de un cambio conformacional, probablemente con la exposición de parches hidrofóbicos, disparado por la unión del ligando dador. Por tal motivo se debieron optimizar las condiciones de purificación, de forma tal que no se detecte insolubilidad en presencia del sustrato. El sistema encontrado fue la utilización de *buffer* fosfato (en lugar de Tris-HCl) y glicerol 10 %, manteniendo el NaCl y el detergente Tritón X-100.

8.23.i. Estudios biofísicos/bioquímicos en presencia de ligandos.

Ensayos de proteólisis limitada con tripsina y α -quimotripsina dejaron a la luz que la presencia de UDP-GlcA produce un cambio conformacional en GumK, de modo tal que es menos sensible a la digestión enzimática. La secuenciación de las principales bandas de degradación permite distinguir la región más estable. Esta región incluye todo el dominio C-terminal y parte del N-terminal. Los resultados de la proteólisis están de acuerdo con una flexibilidad en el dominio N-terminal, específicamente en la Na2 y el *loop8* (elementos propuestos como responsables de la asociación a membrana y/o sustrato aceptor), localizados en el primer fragmento de digestión de 10 kDa. El fragmento de 34 kDa es el que presenta mayor protección frente a tripsina, posiblemente debido a un acercamiento entre los dominios y a una consecuente menor accesibilidad a la región bisagra. En la apo-enzima se observa como el fragmento de 34 kDa es mucho menos estable siendo digerido en la región bisagra, para formar el fragmento de 20 kDa. Además, se comprobó que la protección, y por ende el cambio conformacional, es independiente del mecanismo catalítico, ya que se observó el mismo comportamiento utilizando la mutante GumKD157A, la cual no hidroliza el UDP-GlcA aún en 96 h de incubación.

Luego, se utilizaron en conjunto las técnicas biofísicas de fluorescencia y CD. Dado que los ensayos fueron realizados con las mismas muestras, es posible una observación global de los resultados. De todas formas cabe resaltar que la presencia de detergente dificulta la interpretación de los resultados.

En primer lugar se observó que, al excitar los triptófanos de GumK y registrar la emisión de fluorescencia, hay un cambio de intensidad, en presencia de UDP-GlcA, y en menor medida en presencia de los otros ligandos analizados. Este cambio en la intensidad de la fluorescencia no conlleva un corrimiento en la longitud de onda del máximo, como se puede apreciar en los espectros normalizados. La variación del

máximo en la intensidad no es dada siempre de la misma manera, y no fue posible encontrar una relación entre la intensidad y la concentración de ligando. Mecanismos de unión a ligandos con cambios conformacionales, como *induced-fit* o selección conformacional pueden variar la intensidad de la emisión de fluorescencia [95-97].

Las mismas muestras fueron excitadas a 229 nm, longitud de onda que excita las moléculas de Tritón X-100 presentes en la solución. La literatura existente admite la posibilidad de que ocurra un efecto resonante a 285 nm, excitando a su vez los grupos aromáticos presentes en la proteína [92]. Por ende, es posible que los espectros representen sucesos ocurridos tanto en el detergente como en GumK. En este caso, también se observaron cambios en la intensidad en todas las condiciones, pero sólo con UDP-GlcA se observó corrimiento del máximo en los espectros (observado claramente en los datos normalizados). El máximo de emisión de una solución de Tritón X-100 ronda los 303 nm y en presencia de GumK el máximo es de aproximadamente 320 nm. A medida que se adiciona UDP-GlcA a GumK, se observa un corrimiento hacia longitudes de onda cercana al máximo del Tritón X-100 puro. Este corrimiento se podría interpretar como que, en presencia del sustrato, existiría una disminución de la interacción de la proteína con el detergente, o algún cambio en dicha interacción. Para comprobar si existió una disminución de la interacción de GumK con el detergente mediada por la agregación de la proteína, se estudió en paralelo la dispersión de las muestras a 690 nm. Como se observa, no existe agregación neta. En el gráfico de la Figura 7.33.A se observa la dispersión neta final (R/R_0) de cada muestra. Sin embargo, cabe destacar que sólo en presencia de UDP-GlcA, la dispersión aumentó dinámicamente en presencia de hasta dos equivalentes de ligando, y luego volvió a los valores iniciales, de forma dinámica y en el tiempo que duraron las mediciones. También, el análisis por columnas de exclusión molecular de una mezcla de GumK con dos equivalentes de UDP-GlcA presenta el mismo perfil monodisperso que la apo-proteína, indicando la ausencia de agregación. En conjunto, los resultados podrían sugerir un rearrreglo conformacional que incluya al detergente, obteniéndose dispersión por la presencia de proteomicelas y no por la agregación de proteína. Los ensayos de entrecruzamiento apoyan la idea de que no hay oligomerización dependiente del sustrato.

Luego, las mezclas fueron analizadas por CD en el UV cercano. En este caso se observó un claro cambio en el espectro de GumK en presencia de UDP-GlcA. Nuevamente, este cambio en los espectros es diferente a los cambios obtenidos en los experimentos de desnaturalización/agregación en función de la temperatura, por ejemplo. En conjunto, estos resultados apoyarían la existencia de un cambio conformacional en presencia del sustrato dador.

8.23.ii. Estabilidad térmica en presencia de ligandos

Se ha observado previamente que la interacción con ligandos ofrece estabilidad a la proteína, permitiendo por ejemplo una mayor estabilidad térmica [45]. Para analizar si los posibles cambios conformacionales desatados en GumK en respuesta a la adición de UDP-GlcA ofrecen una estabilidad térmica superior, se realizaron varios estudios biofísicos. Al analizar la fluorescencia intrínseca de triptófanos, se observa que la respuesta frente a la temperatura es prácticamente idéntica en las formas apo y holo. Cabe destacar que en cada punto se estudió además la dispersión a 690 nm (no mostrado), observando que a 38 °C, si bien la tendencia al aumento de la dispersión por agregación es clara e irreversible, la cinética es mucho más rápida en la apo-proteína. Esto se ve apoyado en el estudio de CD en el UV lejano (Figura 7.36.A y 7.36.B), en donde se observan dos detalles relevantes. Por un lado, se observa que hay una cinética diferente en la pérdida de señal, siendo esta última más rápida en apo-GumK. Sin embargo, esta diferencia de cinética no altera el punto de inflexión de la curva, y por ende, la T_m aparente. Por otro lado, se observa que la pérdida de señal en el estado final en presencia de UDP-GlcA es mucho menor con respecto a la apo-proteína. Este resultado podría indicar la existencia de un estado desnaturalizado parcialmente desplegado en presencia de sustrato, aunque el experimento realizado no es suficiente para asegurarlo.

El análisis de CD en el UV cercano no acusa diferencias en el comportamiento frente a la temperatura. En este punto se analizaron las señales a dos longitudes de onda (260 nm y 282 nm), correspondientes a picos en el espectro (Figuras 8.22.D y E). Se observa nuevamente la diferencia de señal inicial a las longitudes de onda elegidas debida a la interacción con el sustrato, pero luego las curvas son solapadas perfectamente.

Mediante DLS se observa un punto de inflexión en la curva R_h vs. Temperatura. Dado que en este experimento lo que se observa es el R_h promedio en la cubeta, es decir,

agregación, podemos concluir que a 35 °C comienza a agregarse GumK, encontrándose completamente agregada a los 50 °C.

Por último, dado que se observaron aparentes diferencias en la cinética de desnaturalización, se realizaron ensayos de proteólisis limitada a 20 °C con tripsina luego de incubar a GumK o al complejo GumK/UDP-GlcA a diferentes temperaturas. Luego de la incubación a 20 °C y 30 °C, se observa nuevamente la diferencia entre la proteólisis con y sin sustrato. Después de la incubación a 40 °C, se observa que sólo hay proteólisis en la mezcla GumK/UDP-GlcA. Dado que al formarse agregados insolubles la proteasa no puede actuar y, teniendo en cuenta que sólo hay proteólisis en presencia de sustrato, se puede inferir que hay una diferencia en la cinética de agregación. Además, esta diferencia se determinó visiblemente durante el ensayo, observándose clara turbidez en la muestra correspondiente a la apo-proteína incubada a 40 °C, pero no en su par con sustrato (no mostrado). Luego de incubar a 50 °C, el comportamiento frente a proteólisis es idéntico.

En conjunto, se puede decir que si bien la unión al UDP-GlcA no ofrece un aumento en la estabilidad térmica respecto a la T_m , la cinética de agregación puede ser diferente, probablemente debido a una conformación distinta de GumK en el complejo.

8.23.iii. ITC

La técnica de ITC es sumamente poderosa y es mucha la información que se puede extraer de los ensayos.

Como primera conclusión simple, podemos definir claramente que el UDP-GlcA interacciona con GumK. La unión de UDP presenta un comportamiento diferencial frente a la unión, y con UDP-GalA y UDP-Glc no fue posible detectar interacción.

Luego, podemos ver que las isotermas de unión al UDP-GlcA presentan claramente al menos dos etapas, no pudiendo ajustar las isotermas a los modelos simples de unión (un solo sitio, dos sitios independientes, o dos sitios secuenciales). Con el fin de distinguir si lo observado correspondía a los procesos de interacción junto a la hidrólisis del sustrato, se realizaron los experimentos con la mutante no hidrolítica GumKD157A. Como se observa claramente, se mantiene la forma de la isoterma, cambiando la entalpía del proceso. Probablemente, ésto se deba a que el proceso de hidrólisis tenga una entalpía opuesta y disminuya globalmente la isoterma de GumK salvaje con UDP-GlcA.

Entonces, la isoterma podría estar informando tanto la interacción como el cambio conformacional observado. En particular, se ha visto en la GT-A GpgS [98], isotermas de unión para el UDP-Glc similares a las obtenidas con GumK/UDP-GlcA. Para explicar esa observación se postuló un modelo de unión que implica la presencia de dos conformaciones de GpgS en equilibrio, de las cuales sólo una es capaz de unir al ligando. A medida que la unión se lleva a cabo, el equilibrio es desplazado hacia la conformación activa, como ocurre en procesos de selección conformacional. Un mecanismo similar fue demostrado en la galactosiltransferasa de *Neisseria meningitidis* LgtC. Mediante estudios de RMN se observó que la proteína adopta principalmente dos estados conformacionales, siendo sólo uno de ellos competente para la unión del sustrato. Si bien no fue posible relacionar directamente los movimientos detectados con el mecanismo enzimático, se demostró claramente la dinámica estructural compleja de esta GT [99]. Ambos ejemplos son claros mecanismos de selección conformacional.

La creación de un modelo que explique lo observado en GumK requiere de profundos conocimientos y mediciones adicionales. Ésto se está llevando a cabo en el laboratorio y excede a esta tesis.

8.23.iv. SAXs y RMN

Los resultados de los experimentos diseñados para SAXs y RMN fueron analizados por respectivos expertos (ver Materiales y Métodos). Por un lado, SAXs no nos permitió obtener un valor de R_g confiable, debido a la complicación que agrega la presencia de detergente. Sin embargo, se observa claramente como la función de distribución $p(r)$ cambia en presencia tanto de UDP-GlcA como de UDP.

La función $p(r)$ de la apo-GumK muestra dos picos, clásicos de una proteína no globular con al menos dos dominios separados entre sí. En cambio, la función del complejo GumK/UDP-GlcA muestra una tendencia a una forma de “campana” de la curva $p(r)$, correspondiente a un estado más globular de la proteína. Este cambio se puede corresponder a un cambio conformacional tendiente al acercamiento de los dos dominios de GumK.

En cuanto a RMN, se pudo obtener un R_h de 28.7 Å para la apo-proteína que se acerca notablemente al esperado por la estructura cristalográfica. En presencia de UDP, no se pudo calcular un R_h confiable. Sin embargo, se observa el cambio en el espectro monodimensional, indicando la interacción. Dado que las mediciones de RMN llevan

aproximadamente 40 horas, no se pudo realizar el experimento de difusión de la proteína salvaje con UDP-GlcA, ya que el sistema analizado va transformándose en el tiempo por la hidrólisis del sustrato. Para analizar el R_h de GumK/UDP-GlcA se utilizó nuevamente la mutante GumK/D157A. En este caso, se observó una disminución en 1 Å del R_h , apoyando la hipótesis del cambio conformacional con tendencia al acercamiento de dominios.

8.24. Modelo del complejo ternario

Cómo se nombró en la Introducción de este trabajo, no hay conocimientos certeros sobre la ubicación del sustrato aceptor ni acerca del mecanismo de interacción.

Experimentos de “remojo” utilizando algunos lípidos-P fueron realizados, sin obtenerse ningún cambio en las estructuras analizadas. Por ese motivo se modeló el sustrato aceptor utilizando *docking*. Los resultados obtenidos con la porción pirofosfato demostraron una posición clara de dicha porción, ubicada en el dominio N-terminal, estabilizado con residuos básicos. Resultados similares fueron obtenidos con el *docking* de un lípido geranil-pirofosfato. En contraste, como se detalla en Resultados, la localización del trisacárido no fue tan obvia. Sin embargo, junto a los resultados de *docking* y de *bias-docking*, se pudo localizar el trisacárido, generando finalmente el geranil-PP-Glc₂-Man. Del complejo final formado y su análisis se deduce que no son muchas las posibilidades de localizar al aceptor dentro de GumK. Cabe destacar que en este modelo la Arg60 de la Nα2 se encuentra estabilizando al pirofosfato del sustrato aceptor. Como se ve en la representación de la superficie en la Figura 8.40.C, el aceptor se acomoda sobre GumK en dirección al GlcA, que es la única porción estéricamente disponible del UDP-GlcA. De todas formas, el complejo inicial formado posiciona al O2 de la manosa terminal del trisacárido a 6 Å del C1 del GlcA y del Asp157, siendo estas distancias no aptas para la catálisis. Se realizó la DM esperando observar un reacomodamiento de los sustratos, obteniéndose por el contrario un alejamiento de los átomos participantes. Revisiones exhaustivas de los resultados obtenidos y un cuidadoso análisis de la estructura y sus cavidades nos permite concluir que en las conformaciones obtenidas tanto por cristalografía como en las relajadas mediante DM no es posible acomodar el sustrato aceptor. Estos resultados están de acuerdo con la idea del cambio conformacional para generar el sitio de sustrato aceptor acorde.

9. Conclusiones generales y perspectivas

La primera parte del presente trabajo consistió en el estudio de la proteína GumI. Hasta el comienzo de este trabajo de tesis, GumI no había sido caracterizada. Su actividad glicosiltransferasa fue inferida en función de las características de una cepa *Xc* mutante para el gen *gumI*. De esa manera, se había propuesto que GumI catalizaría el último paso de la síntesis de la unidad repetitiva del xantano, produciendo el lípido-pirofosfato-pentasacárido. Partiendo de dicha hipótesis, en este trabajo se desarrolló la caracterización de la enzima GumI. Las conclusiones obtenidas en este trabajo se describen a continuación.

El gen propuesto *gumI* codifica para la glicosiltransferasa GumI, siendo suficiente dicho gen para restaurar el fenotipo salvaje de una cepa mutante *XcI*.

En *Xc*, la proteína GumI se encuentra localizada en la membrana, siendo dicha asociación una propiedad intrínseca de la proteína GumI, sin ser necesaria la asociación con otras proteínas del sistema de síntesis de xantano. Además, GumI se comporta como una proteína monotópica de membrana, es decir que la unión es mediada por interacciones hidrofóbicas y electrostáticas, penetrando la membrana bacteriana sin atravesarla.

GumI recombinante fue purificada en forma estable y activa. La proteína mostró ser una manosiltransferasa de inversión, catalizando la adición de un residuo de Man para formar el producto lip-PP-Glc₂-Man-GlcA-Man. Además, GumI resultó ser altamente específica para GDP-Man, si bien puede utilizar ADP-Man y GDP-Glc con menor rendimiento.

En las condiciones de purificación y de reacción utilizadas en el presente trabajo, la actividad óptima de GumI es a 35°C, sin requerimiento de cationes, a pH 8,0 y en presencia de 5,6 mM del detergente DDM.

La proteína GumI presenta, probablemente, una dinámica importante. Por tal motivo no se pudieron obtener cristales tridimensionales de la enzima. La presencia del sustrato GDP-Man provee cierta estabilidad y permite la formación de un ordenamiento en forma de “agujas” de las moléculas de proteína.

De los homólogos encontrados para GumI, sólo dos se encuentran caracterizados bioquímica y estructuralmente. A partir de esta homología, de los resultados obtenidos

con el modelado automático por homología, y del no requerimiento de cationes para la actividad, se concluye que GumI pertenece a la superfamilia estructural GT-B.

Cómo ya se ha discutido, aún quedan muchas posibilidades para ensayar con respecto a la cristalización. Los métodos para coleccionar datos a partir de formaciones cristalinas pequeñas han mejorado notoriamente. De todas formas, se debe tener en cuenta que la diversidad estructural en GTs dependientes de nucleótidos-azúcares es mínima y es posible que no se encuentren sorpresas en la estructura de GumI. Sin embargo, la caracterización bioquímica, de mecanismos de reacción y de estructuras de GTs es la base para la ingeniería racional de enzimas. En algunos casos, la novedad de las GTs se encuentra en los mecanismos de catálisis y los cambios conformacionales inducidos por ligandos. Estos aspectos no son menores a la hora de la ingeniería y el desarrollo de drogas [100]. Estudiar el comportamiento biofísico de GumI frente a sus ligandos sin duda aportaría al entendimiento de estas enzimas.

En la segunda etapa del presente trabajo se profundizó el estudio sobre la glicosiltransferasa GumK. La actividad bioquímica glucuronosiltransferasa había sido previamente descrita en el laboratorio. Además, la estructura tridimensional de GumK mostró que la proteína presenta un plegamiento de la superfamilia GT-B. A partir de dichos conocimientos, en este trabajo se profundizó en dos aspectos esenciales de la proteína: la asociación a membrana y la unión a sus sustratos. A continuación, se detallan las conclusiones obtenidas.

La interacción de GumK con la membrana es un proceso complejo. Si bien GumK, al igual que GumI, posee la propiedad intrínseca de unirse a membrana, probablemente dicho proceso sea altamente dinámico y regulado, por ejemplo, por la unión de ligando. Se obtuvo un modelo racional de la posición del residuo GlcA del UDP-GlcA mediante simulación computacional. Este modelo concuerda con la especificidad de sustrato que presenta GumK experimentalmente.

La unión de UDP-GlcA a GumK dispara cambios conformacionales en la proteína. Si bien dichos cambios no pudieron ser descritos con precisión, el análisis en conjunto de los resultados indicaría que al unirse el UDP-GlcA, GumK acerca sus dominios, reduciendo la superficie accesible al solvente de la hendidura, y generando cambios en residuos del N-terminal. Probablemente el cambio conformacional esté relacionado por

un lado a la exposición de regiones hidrofóbicas, que “atrapen” al sustrato aceptor, y por otro lado a un acercamiento de dominios, para retener al aceptor y permitir la reacción de transferencia. Estos tipos de cambios de conformación son comunes en muchos sistemas y se han comenzado a describir en GTs como parte del mecanismo de catálisis.

Mediante simulación computacional se creó un modelo del complejo ternario GumK/aceptor/dador. Sin embargo, la MD del complejo es incoherente con un mecanismo de catálisis. La observación de la trayectoria obtenida, junto a los indicios de cambios conformacionales, sugiere que el sitio de unión completo del sustrato aceptor es generado como consecuencia de la unión del UDP-GlcA.

Sin duda que los resultados obtenidos en esta tesis abren caminos a profundizar. El estudio de GumK es un claro ejemplo de cómo el obtener la estructura tridimensional de una enzima es simplemente la apertura a un camino aún más complejo. GumK es una proteína que debe trabajar en la interfase membrana-citoplasma. Por tal motivo, y como se ha discutido, posee una cierta naturaleza hidrofóbica. Realizar estudios biofísicos *in vitro*, si bien ha sido un desafío, ha dado ciertos frutos. Como conclusión general se puede decir que GumK presenta un cambio conformacional en respuesta al sustrato dador UDP-GlcA. Como último proyecto, para culminar la demostración de presencia de cambios conformacionales inducidos por ligando, se están realizando experimentos más profundos utilizando ITC. De esta forma, se espera demostrar termodinámicamente el modelo de cambio conformacional propuesto. Si bien el sistema de *buffer* de GumK es complejo, es posible con cuidado diseñar aún más experimentos bioquímicos/biofísicos en pos de discernir el comportamiento de GumK frente al ligando. Por ejemplo, estudios de cinética de unión del ligando podrían discernir entre mecanismos de selección conformacional e *induced fit*. Sería un logro mayor, además, obtener la estructura experimental del complejo GumK/UDP-GlcA en un estado fisiológicamente relevante.

Por otro lado, obtener un análogo del sustrato aceptor permitiría la realización de un estudio bioquímico y estructural completo. El análisis en conjunto del comportamiento de GumK frente al sustrato dador y al aceptor probablemente otorgue una visión global y certera del mecanismo de catálisis de esta glicosiltransferasa.

10. Bibliografía

1. Markine-Goriaynoff, N., L. Gillet, J.L. Van Etten, H. Korres, N. Verma, and A. Vanderplassen, *Glycosyltransferases encoded by viruses*. Journal of General Virology, 2004. **85**(10): p. 2741-2754.
2. Nishihara, S., *Glycosyltransferases and transporters that contribute to proteoglycan synthesis in Drosophila: Identification and functional analyses using the heritable and inducible RNAi system*. Methods Enzymol. **480**: p. 323-51.
3. Zhao, Y., Y. Sato, T. Isaji, T. Fukuda, A. Matsumoto, E. Miyoshi, J. Gu, and N. Taniguchi, *Branched N-glycans regulate the biological functions of integrins and cadherins*. FEBS Journal, 2008. **275**(9): p. 1939-1948.
4. von Saint Paul, V., W. Zhang, B. Kanawati, B. Geist, T. Faus-Kessler, P. Schmitt-Kopplin, and A.R. Schaffner, *The Arabidopsis glucosyltransferase UGT76B1 conjugates isoleucic acid and modulates plant defense and senescence*. Plant Cell. **23**(11): p. 4124-45.
5. Luzhetskyy, A. and A. Bechthold, *Features and applications of bacterial glycosyltransferases: current state and prospects*. Appl Microbiol Biotechnol, 2008. **80**(6): p. 945-52.
6. Luzhetskyy, A., C. Mendez, J.A. Salas, and A. Bechthold, *Glycosyltransferases, important tools for drug design*. Curr Top Med Chem, 2008. **8**(8): p. 680-709.
7. Unligil, U.M. and J.M. Rini, *Glycosyltransferase structure and mechanism*. Curr Opin Struct Biol, 2000. **10**(5): p. 510-7.
8. Breton, C., and A. Imberty, *Structure/function studies of glycosyltransferases*. Curr. Opin. Struct. Biol, 1999. **9**(5): p. 563-571.
9. Cantarel, B., P. Coutinho, C. Rancurel, T. Bernard, V. Lombard, and B. Henrissat, *The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics*. Nucleic Acids Res, 2009. **37**: p. 233-238.
10. Campbell, J.A., G. J. Davies, V. Bulone, and B. Henrissat, *A classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities*. Biochem. J., 1997. **326**(Pt 3): p. 929-939.
11. Coutinho, P.M., E. Deleury, G.J. Davies, and B. Henrissat, *An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases*. J Mol Biol, 2003. **328**(2): p. 307-17.
12. Chang, A., S. Singh, G.N. Phillips, Jr., and J.S. Thorson, *Glycosyltransferase structural biology and its role in the design of catalysts for glycosylation*. Curr Opin Biotechnol, 2011. **22**(6): p. 800-8.
13. Jakeman, D.L., *Mechanisms of glycosyltransferases: the in and the out*. Chembiochem. **12**(17): p. 2540-2.
14. Soya, N., Y. Fang, M.M. Palcic, and J.S. Klassen, *Trapping and characterization of covalent intermediates of mutant retaining glycosyltransferases*. Glycobiology, 2010. **21**(5): p. 547-52.
15. Lairson, L.L., C.P. Chiu, H.D. Ly, S. He, W.W. Wakarchuk, N.C. Strynadka, and S.G. Withers, *Intermediate trapping on a mutant retaining alpha-galactosyltransferase identifies an unexpected aspartate residue*. J Biol Chem, 2004. **279**(27): p. 28339-44.
16. Breton, C., S. Fournel-Gigleux, and M.M. Palcic, *Recent structures, evolution and mechanisms of glycosyltransferases*. Curr Opin Struct Biol. **22**(5): p. 540-9.

17. Breton, C., L. Snajdrova, C. Jeanneau, J. Koca, and A. Imberty, *Structures and mechanisms of glycosyltransferases*. *Glycobiology*, 2006. **16**(2): p. 29R-37R.
18. Henrissat, B., G. Sulzenbacher, and Y. Bourne, *Glycosyltransferases, glycoside hydrolases: surprise, surprise!* *Curr Opin Struct Biol*, 2008. **18**(5): p. 527-33.
19. Lizak, C., S. Gerber, S. Numao, M. Aebi, and K.P. Locher, *X-ray structure of a bacterial oligosaccharyltransferase*. *Nature*, 2011. **474**(7351): p. 350-5.
20. Qasba, P.K., B. Ramakrishnan, and E. Boeggeman, *Substrate-induced conformational changes in glycosyltransferases*. *Trends Biochem Sci*, 2005. **30**(1): p. 53-62.
21. Qasba, P.K., B. Ramakrishnan, and E. Boeggeman, *Structure and function of beta -1,4-galactosyltransferase*. *Curr Drug Targets*, 2008. **9**(4): p. 292-309.
22. Vetting, M.W., P.A. Frantom, and J.S. Blanchard, *Structural and enzymatic analysis of MshA from Corynebacterium glutamicum: substrate-assisted catalysis*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(23): p. 15834-44.
23. Lin, L.Y., B. Rakic, C.P. Chiu, E. Lameignere, W.W. Wakarchuk, S.G. Withers, and N.C. Strynadka, *Structure and mechanism of the lipooligosaccharide sialyltransferase from Neisseria meningitidis*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(43): p. 37237-48.
24. Rosen, M.L., M. Edman, M. Sjoström, and A. Wieslander, *Recognition of fold and sugar linkage for glycosyltransferases by multivariate sequence analysis*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(37): p. 38683-92.
25. Maita, N., J. Nyirenda, M. Igura, J. Kamishikiryo, and D. Kohda, *Comparative structural biology of eubacterial and archaeal oligosaccharyltransferases*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(7): p. 4941-50.
26. Igura, M., N. Maita, J. Kamishikiryo, M. Yamada, T. Obita, K. Maenaka, and D. Kohda, *Structure-guided identification of a new catalytic motif of oligosaccharyltransferase*. *Embo J*, 2008. **27**(1): p. 234-43.
27. Williams, G., R. Goff, and C.T. Zhang, JS, *Optimizing Glycosyltransferase Specificity via "Hot Spot" Saturation Mutagenesis Presents a Catalyst for Novobiocin Glycorandomization*. *Chem Biol*, 2008. **15**: p. 393-401.
28. Zhang, C., B. Griffith, Q. Fu, C. Albermann, X. Fu, I. Lee, L. Li, and J. Thorson, *Exploiting the reversibility of natural product glycosyltransferase-catalyzed reactions*. *Science*, 2006. **313**(5791): p. 1291-1294.
29. Park, S.H., H.Y. Park, J.K. Sohng, H.C. Lee, K. Liou, Y.J. Yoon, and B.G. Kim, *Expanding substrate specificity of GT-B fold glycosyltransferase via domain swapping and high-throughput screening*. *Biotechnol Bioeng*, 2009. **102**(4): p. 988-94.
30. Dunger, G., V.M. Relling, M.L. Tondo, M. Barreras, L. Ielpi, E.G. Orellano, and J. Ottado, *Xanthan is not essential for pathogenicity in citrus canker but contributes to Xanthomonas epiphytic survival*. *Arch Microbiol*, 2007. **188**(2): p. 127-35.
31. Garcia-Ochoa, F., V.E. Santos, J.A. Casas, and E. Gomez, *Xanthan gum: production, recovery, and properties*. *Biotechnol Adv*, 2000. **18**(7): p. 549-79.
32. Galvan, E.M., M.V. Ielmini, Y. Patel, M.I. Bianco, E.A. Franceschini, J.C. Schneider, and L. Ielpi, *Xanthan chain length is modulated by increasing the availability of the polysaccharide copolymerase protein GumC and the outer membrane polysaccharide export protein GumB*. *Glycobiology*, En prensa.

33. Katzen, F.D.U.F., C. G. Oddo, M. V. Ielmini, A. Becker, A. Pühler, and L. Ielpi, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* gum Mutants: Effects on Xanthan Biosynthesis and Plant Virulence. *J Bacteriol*, 1998. **180**(7): p. 1607-1617.
34. Ielmini, M.V., *Genética molecular y bioquímica de la síntesis de exopolisacáridos bacterianos*, in *Facultad de Ciencias Exactas y Naturales*. 2007, Universidad de Buenos Aires.
35. Barreras, M., P.L. Abdian, and L. Ielpi, *Functional characterization of GumK, a membrane-associated beta-glucuronosyltransferase from Xanthomonas campestris required for xanthan polysaccharide synthesis*. *Glycobiology*, 2004. **14**(3): p. 233-41.
36. Barreras, M., M.A. Bianchet, and L. Ielpi, *Crystallization and preliminary crystallographic characterization of GumK, a membrane-associated glucuronosyltransferase from Xanthomonas campestris required for xanthan polysaccharide synthesis*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 2006. **62**(Pt 9): p. 880-3.
37. Barreras, M., S.R. Salinas, P.L. Abdian, M.A. Kampel, and L. Ielpi, *Structure and mechanism of GumK, a membrane-associated glucuronosyltransferase*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(36): p. 25027-35.
38. Barreras, M., P.L. Abdian, and L. Ielpi, *Functional characterization of GumK, a membrane-associated {beta}-glucuronosyltransferase from Xanthomonas campestris required for xanthan polysaccharide synthesis*. *Glycobiology*, 2004. **14**(3): p. 233-241.
39. Wolfe, M.S. and R. Kopan, *Intramembrane proteolysis: theme and variations*. *Science*, 2004. **305**(5687): p. 1119-23.
40. Ha, S., D. Walker, Y. Shi, and S. Walker, *The 1.9 Å crystal structure of Escherichia coli MurG, a membrane-associated glycosyltransferase involved in peptidoglycan biosynthesis*. *Protein Sci*, 2000. **9**(6): p. 1045-52.
41. Guerin, M.E., J. Kordulakova, F. Schaeffer, Z. Svetlikova, A. Buschiazzi, D. Giganti, B. Gicquel, K. Mikusova, M. Jackson, and P.M. Alzari, *Molecular Recognition and Interfacial Catalysis by the Essential Phosphatidylinositol Mannosyltransferase PimA from Mycobacteria*. *Journal of Biological Chemistry*, 2007. **282**(28): p. 20705-20714.
42. Schmidt, H., G. Hansen, S. Singh, A. Hanuszkiewicz, B. Lindner, K. Fukase, R.W. Woodard, O. Holst, R. Hilgenfeld, U. Mamat, and J.R. Mesters, *Structural and mechanistic analysis of the membrane-embedded glycosyltransferase WaaA required for lipopolysaccharide synthesis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012. **109**(16): p. 6253-6258.
43. Blobel, G., *Intracellular protein topogenesis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1980. **77**(3): p. 1496-500.
44. Guerin, M.E., A. Buschiazzi, J. Kordulakova, M. Jackson, and P.M. Alzari, *Crystallization and preliminary crystallographic analysis of PimA, an essential mannosyltransferase from Mycobacterium smegmatis*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 2005. **61**(Pt 5): p. 518-20.
45. Guerin, M.E., F. Schaeffer, A. Chaffotte, P. Gest, D. Giganti, J. Kordulakova, M. van der Woerd, M. Jackson, and P.M. Alzari, *Substrate-induced conformational changes in the essential peripheral membrane-associated mannosyltransferase PimA from mycobacteria: implications for catalysis*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(32): p. 21613-25.

46. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
47. Ielpi, L., R. O. Couso, and M. A. Dankert, *Sequential assembly and polymerization of the polyprenol-linked pentasaccharide repeating unit of the xanthan polysaccharide in Xanthomonas campestris*. J. Bacteriol., 1993. **175**(9): p. 2490-2500.
48. Katzen, F., D.U. Ferreira, C.G. Oddo, M.V. Ielmini, A. Becker, A. Puhler, and L. Ielpi, *Xanthomonas campestris pv. campestris gum mutants: effects on xanthan biosynthesis and plant virulence*. J Bacteriol, 1998. **180**(7): p. 1607-17.
49. Capage, M.A., D. H. Doherty, M.R. Betlach, and R. W. Vanderslice, *Recombinant-DNA mediated production of xanthan gum*. 1987, International patent.
50. Sukchawalit, R., P. Vattanaviboon, R. Sallabhan, and S. Mongkolsuk, *Construction and characterization of regulated L-arabinose-inducible broad host range expression vectors in Xanthomonas*. FEMS Microbiol Lett, 1999. **181**(2): p. 217-23.
51. Salinas, S.R., *Caracterización bioquímica de una glicosiltransferasa bacteriana*, in *Departamento de Ciencia y Tecnología*. 2006, Universidad Nacional de Quilmes.
52. Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis, *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 2nd ed. 1989, Cold Spring Harbor, N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
53. Ielpi, L., R.O. Couso, and M.A. Dankert, *Sequential assembly and polymerization of the polyprenol-linked pentasaccharide repeating unit of the xanthan polysaccharide in Xanthomonas campestris*. J Bacteriol, 1993. **175**(9): p. 2490-500.
54. le Maire, M., P. Champeil, and J.V. Moller, *Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1508**(1-2): p. 86-111.
55. Scott, J.E., *Fractionation by precipitation with quaternary ammonium salts*, in *General polysaccharides*, R.L. Whistler, Editor. 1965, Academic Press: New York. p. 38-44.
56. Brusca, J.S. and J.D. Radolf, *Isolation of integral membrane proteins by phase partitioning with Triton X-114*. Methods Enzymol, 1994. **228**: p. 182-93.
57. Wilkins, M.R., E. Gasteiger, A. Bairoch, J.C. Sanchez, K.L. Williams, R.D. Appel, and D.F. Hochstrasser, *Protein identification and analysis tools in the ExPASy server*. Methods Mol Biol, 1999. **112**: p. 531-52.
58. Altschul, S.F., T.L. Madden, A.A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D.J. Lipman, *Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs*. Nucleic Acids Res, 1997. **25**(17): p. 3389-402.
59. Tusnady, G.E. and I. Simon, *Principles governing amino acid composition of integral membrane proteins: application to topology prediction*. J Mol Biol, 1998. **283**(2): p. 489-506.
60. Cserzo, M., E. Wallin, I. Simon, G. von Heijne, and A. Elofsson, *Prediction of transmembrane alpha-helices in prokaryotic membrane proteins: the dense alignment surface method*. Protein Eng, 1997. **10**(6): p. 673-6.

61. Hirokawa, T., S. Boon-Chieng, and S. Mitaku, *SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins*. *Bioinformatics*, 1998. **14**(4): p. 378-9.
62. Sonnhammer, E.L., G. von Heijne, and A. Krogh, *A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences*. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol*, 1998. **6**: p. 175-82.
63. Sapay, N., Y. Guermeur, and G. Deleage, *Prediction of amphipathic in-plane membrane anchors in monotopic proteins using a SVM classifier*. *BMC Bioinformatics*, 2006. **7**: p. 255.
64. Lomize, M.A., A.L. Lomize, I.D. Pogozheva, and H.I. Mosberg, *OPM: orientations of proteins in membranes database*. *Bioinformatics*, 2006. **22**(5): p. 623-5.
65. Lomize, A.L., I.D. Pogozheva, M.A. Lomize, and H.I. Mosberg, *Positioning of proteins in membranes: a computational approach*. *Protein Sci*, 2006. **15**(6): p. 1318-33.
66. Arnold, K., L. Bordoli, J. Kopp, and T. Schwede, *The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling*. *Bioinformatics*, 2006. **22**(2): p. 195-201.
67. Case, D.A., T.E. Cheatham, 3rd, T. Darden, H. Gohlke, R. Luo, K.M. Merz, Jr., A. Onufriev, C. Simmerling, B. Wang, and R.J. Woods, *The Amber biomolecular simulation programs*. *J Comput Chem*, 2005. **26**(16): p. 1668-88.
68. Kirschner, K.N., A.B. Yongye, S.M. Tschampel, J. Gonzalez-Outeirino, C.R. Daniels, B.L. Foley, and R.J. Woods, *GLYCAM06: a generalizable biomolecular force field. Carbohydrates*. *J Comput Chem*, 2008. **29**(4): p. 622-55.
69. Leach, A., *Molecular Modelling: Principles and Applications*. Second ed. 2001: Prentice Hall.
70. Humphrey, W., A. Dalke, and K. Schulten, *VMD: visual molecular dynamics*. *J Mol Graph*, 1996. **14**(1): p. 33-8, 27-8.
71. Morris, G.M., R. Huey, W. Lindstrom, M.F. Sanner, R.K. Belew, D.S. Goodsell, and A.J. Olson, *AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility*. *J Comput Chem*, 2009. **30**(16): p. 2785-91.
72. Besler, B.H., K.M. Merz, and P.A. Kollman, *Atomic charges derived from semiempirical methods*. *Journal of Computational Chemistry*, 1990. **11**(4): p. 431-439.
73. Gauto, D.F., A.A. Petruk, C.P. Modenutti, J.I. Blanco, S. Di Lella, and M.A. Marti, *Solvent structure improves docking prediction in Lectin-Carbohydrate complexes*. *Glycobiology*, En prensa.
74. Wilkins, D.K., S.B. Grimshaw, V. Receveur, C.M. Dobson, J.A. Jones, and L.J. Smith, *Hydrodynamic radii of native and denatured proteins measured by pulse field gradient NMR techniques*. *Biochemistry*, 1999. **38**(50): p. 16424-31.
75. Rath, A., M. Glibowicka, V.G. Nadeau, G. Chen, and C.M. Deber, *Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(6): p. 1760-5.
76. Lairson, L.L., B. Henrissat, G.J. Davies, and S.G. Withers, *Glycosyltransferases: structures, functions, and mechanisms*. *Annu Rev Biochem*, 2008. **77**: p. 521-55.
77. Losey, H.C., M.W. Pecuh, Z. Chen, U.S. Eggert, S.D. Dong, I. Pelczer, D. Kahne, and C.T. Walsh, *Tandem Action of Glycosyltransferases in the*

- Maturation of Vancomycin and Teicoplanin Aglycones: Novel Glycopeptides.* Biochemistry, 2001. **40**(15): p. 4745-4755.
78. Albermann, C., A. Soriano, J. Jiang, H. Vollmer, J.B. Biggins, W.A. Barton, J. Lesniak, D.B. Nikolov, and J.S. Thorson, *Substrate Specificity of NovM: Implications for Novobiocin Biosynthesis and Glycorandomization.* Organic Letters, 2003. **5**(6): p. 933-936.
79. Chen, Y.-L., Y.-H. Chen, Y.-C. Lin, K.-C. Tsai, and H.-T. Chiu, *Functional Characterization and Substrate Specificity of Spinosyn Rhamnosyltransferase by in Vitro Reconstitution of Spinosyn Biosynthetic Enzymes.* Journal of Biological Chemistry, 2009. **284**(11): p. 7352-7363.
80. Prive, G.G., *Detergents for the stabilization and crystallization of membrane proteins.* Methods, 2007. **41**(4): p. 388-97.
81. Zhang, Q., H. Tao, and W.X. Hong, *New amphiphiles for membrane protein structural biology.* Methods, 2011. **55**(4): p. 318-23.
82. Schwede, T., J. Kopp, N. Guex, and M.C. Peitsch, *SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server.* Nucleic Acids Res, 2003. **31**(13): p. 3381-5.
83. Bergfors, T., *Protein Crystallization.* 2nd ed. 2009: International University Line.
84. Salinas, S.R., M.I. Bianco, M. Barreras, and L. Ielpi, *Expression, purification and biochemical characterization of GumI, a monotopic membrane GDP-mannose:glycolipid 4-{beta}-D-mannosyltransferase from Xanthomonas campestris pv. campestris.* Glycobiology, 2011. **21**(7): p. 903-13.
85. Hu, Y., L. Chen, S. Ha, B. Gross, B. Falcone, D. Walker, M. Mokhtarzadeh, and S. Walker, *Crystal structure of the MurG:UDP-GlcNAc complex reveals common structural principles of a superfamily of glycosyltransferases.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(3): p. 845-9.
86. van den Brink-van der Laan, E., J.W. Boots, R.E. Spelbrink, G.M. Kool, E. Breukink, J.A. Killian, and B. de Kruijff, *Membrane interaction of the glycosyltransferase MurG: a special role for cardiolipin.* J Bacteriol, 2003. **185**(13): p. 3773-9.
87. Ge, C., A. Georgiev, A. Ohman, A. Wieslander, and A.A. Kelly, *Tryptophan Residues Promote Membrane Association for a Plant Lipid Glycosyltransferase Involved in Phosphate Stress.* Journal of Biological Chemistry, 2011. **286**(8): p. 6669-6684.
88. Vinson, V.J., *Proteins in Motion.* Science, 2009. **324**(5924): p. 197.
89. Hammes-Schiffer, S. and S.J. Benkovic, *Relating Protein Motion to Catalysis.* Annual Review of Biochemistry, 2006. **75**(1): p. 519-541.
90. Ponder, J.W. and D.A. Case, *Force fields for protein simulations.* Adv Protein Chem, 2003. **66**: p. 27-85.
91. Gauto, D.F., S. Di Lella, C.M. Guardia, D.A. Estrin, and M.A. Marti, *Carbohydrate-binding proteins: Dissecting ligand structures through solvent environment occupancy.* J Phys Chem B, 2009. **113**(25): p. 8717-24.
92. Zhao, J. and Y.J. Wei, *Fluorescence spectra and fluorescence quantum yield of triton X-100.* Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi, 2006. **26**(8): p. 1523-5.
93. Forneris, F. and A. Mattevi, *Enzymes without borders: mobilizing substrates, delivering products.* Science, 2008. **321**(5886): p. 213-216.
94. Edman, M., S. Berg, P. Storm, M. Wikstrom, S. Vikstrom, A. Ohman, and A. Wieslander, *Structural features of glycosyltransferases synthesizing major*

- bilayer and nonbilayer-prone membrane lipids in Acholeplasma laidlawii and Streptococcus pneumoniae*. J Biol Chem, 2003. **278**(10): p. 8420-8.
95. Changeux, J.P. and S. Edelstein, *Conformational selection or induced fit? 50 years of debate resolved*. F1000 Biol Rep. **3**: p. 19.
96. Ma, B., S. Kumar, C.-J. Tsai, H. Wolfson, N. Sinha, and R. Nussinov, *Protein–Ligand Interactions: Induced Fit*, in *eLS*. 2001, John Wiley & Sons, Ltd.
97. Singh, T.S., B.J. Rao, and G. Krishnamoorthy, *GTP Binding Leads to Narrowing of the Conformer Population While Preserving the Structure of the RNA Aptamer: A Site-Specific Time-Resolved Fluorescence Dynamics Study*. Biochemistry, En prensa.
98. Urresti, S., D. Albesa-Jove, F. Schaeffer, H.T. Pham, D. Kaur, P. Gest, M.J. van der Woerd, A. Carreras-Gonzalez, S. Lopez-Fernandez, P.M. Alzari, P.J. Brennan, M. Jackson, and M.E. Guerin, *Mechanistic insights into the retaining glucosyl-3-phosphoglycerate synthase from mycobacteria*. J Biol Chem, 2012. **287**(29): p. 24649-61.
99. Chan, P.H., A.H. Cheung, M. Okon, H.M. Chen, S.G. Withers, and L.P. McIntosh, *Investigating the Structural Dynamics of alpha-1,4-Galactosyltransferase C from Neisseria meningitidis by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*. Biochemistry, 2013. **52**(2): p. 320-32.
100. Surade, S. and T.L. Blundell, *Structural biology and drug discovery of difficult targets: the limits of ligandability*. Chem Biol, 2012. **19**(1): p. 42-50.