

Este trabajo está bajo licencia [CC BY-NC-SA 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)© 2 de Issoglio, Federico Matías



“ESTUDIOS ESTRUCTURALES Y BIOQUÍMICOS DE ENZIMAS Y REACCIONES DE INICIACIÓN DE LA BIOSÍNTESIS DE PROTEOGLUCÓGENO”

Trabajo de tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Químicas

Lic. en Química Federico Matías Issoglio

Director de Tesis: Dr. Juan A. Curtino



Comisión de Tesis: Dra. Graciela Ma. Panzetta

Dra. Carolina L. Montes



Dra. María Elena Carrizo Garcia



Evaluador Externo: Dr. Alberto A. Iglesias



Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba, CIQUIBIC-CONICET

Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas

Universidad Nacional de Córdoba

Córdoba, Argentina

2014

..... K-1 574 10245

..... F
..... 15763

..... Autor

..... /2020

700L		
------	--	--

Agradecimientos...

En primer lugar a los organismos que hicieron posible el financiamiento de este trabajo de tesis doctoral a través de becas y subsidios, como CONICET, FONCyT, SeCyT, MAE, LNLS y la Università degli studi di Verona. También a la Universidad Nacional de Córdoba por brindar la infraestructura necesaria para llevar a cabo este estudio.

Al Departamento de Química Biológica – CIQUIBIC, que a través de sus autoridades, me permitió ingresar como becario a esta institución. Y desde el primer momento en que me convertí en parte de esta familia, la actitud de sus integrantes (desde directores de grupo hasta becarios) me mostró que en este lugar la camaradería y la buena predisposición predominan ampliamente en todos los pasillos. En muchos casos este grato ambiente de trabajo convirtió a buenos compañeros de trabajo en verdaderos amigos. A todos y cada uno, mi mas sincera gratitud.

A los miembros de la comisión de tesis, Dra. Graciela Panzetta y Dra. Carolina Montes por demostrar un gran interés y por las muy útiles correcciones y aportes que han incorporado desde la primer reunión anual, hasta estas últimas instancias. Además de las contribuciones profesionales, quiero agradecerles la paciencia que me han tenido en todas las idas y vueltas relacionadas a las cuestiones reglamentarias formales, para las cuales evidentemente no tengo cabeza.

Al grupo de Biofísica, quienes me adoptaron (o me colé yo, no se bien...) luego de que "la Vane" y "Pablopedía" me introdujesen en cursos y congresos del área. Una vez que nos hicimos buenos amigos, no les quedó otra que aceptarme en sus seminarios, y así tuve la oportunidad de aprender mucho de ustedes. Por suerte puedo decir que siempre encuentro sus puertas abiertas, ya sea que voy en busca de consultas, mates, o herramientas.

Al Dr. Marcos Villarreal y la Dra. Vanesa Galassi, por estar siempre disponibles cuando acudo en busca de ayuda bioinformática, a través de la cual pude ir aprendiendo algo del mundo *in silico*, y al Dr. Guillermo Montich por permitirme ampliar en muchas oportunidades el poder computacional necesario para trabajar con este tipo de metodologías.

Al Dr. Curtino tengo mucho por agradecerle, ya que me abrió las puertas de su laboratorio para poder realizar este doctorado, oportunidad que muy difícilmente pudiese haber encontrado en otro lugar. Siempre valoraré el voto de confianza que

depositó en mí. Un director muy presente, y de quien nunca se deja de aprender. Desde el primer momento escuchó todas las voces, incluso la del estudiante recién llegado.

A “la María” (Dra. María Elena Carrizo) le tocó un duro trabajo. Hizo de co-directora (porque me sufrió a la par del Dr. Curtino), miembro de comisión de tesis, compañera de mesada, confidente y amiga. Sin opacar el gran trabajo de mi director de tesis, debo confesar que el criterio científico que he formado en estos años (o al menos espero haberlo hecho...) es el resultado de lo que aprendí de ella y del Dr. Curtino.

A los integrantes del laboratorio que, aunque muchos de ellos fueron fugaces, siempre supieron trabajar codo a codo con el mejor humor y compañerismo. Fiel reflejo es “la Sole”, la primera amiga dentro del CIQUI (cómo no ser amigo de la Sole...), y con quien diera algunos de los primeros pasos en la mesada. Aún después de irse del laboratorio me siguió marcando el paso presentándome el mundo bioinformático.

A mis amigos de la facu Juan, Sergio, Romi y Lau. Los primeros amigos que hice en el ingreso, y curiosamente todos nos quedamos para continuar con los estudios de posgrado. Aunque las diferentes carreras nos separaron al principio, ese primer lazo de amistad (generado por mi inestable banqueta) aún se mantiene intacto.

A “los changos”... o quienes en algún momento fueran “los talibanes”... grupo de personas nucleadas con los objetivos más nobles e importantes: jugar al fútbol y comer asados. Algunos dispersos por el mundo y otros aquí, están siempre listos (aunque no son *boy scouts*). A algunos los conozco desde hace mucho (como el Seba, desde que tengo uso de razón), y a otros recientemente, todos ellos grandes amigos.

Y hablando de grandes amigos, uno se acuerda de “los cayos” de Las Varillas, Chino, Jorgito, KB, Certa, Cachumba, Meri, Muque, Pololo, Pepa, Choco, Tina, Todito, Tene, Choco, Guido (ju ju)... pedazo de amigos, sin palabras (o al menos sin palabras que parezcan suficientes).

Por último quiero dedicar este trabajo a toda mi familia, pilar fundamental en todo lo que hago. La versión más reducida de mis afectos son mis padres, Tito y Ceci, y mi hermano, Cachu. Soy quien soy por ellos y para ellos, por lo que la gratitud trasciende a la culminación de esta tesis. A estos afectos se suma Cecilia, mi compañera de la vida en estos últimos años. Seguramente se llevó la peor parte, ya que en ella se fusionaron el mundo laboral y el personal, y por lo tanto en ella también se funden el agradecimiento y la dedicatoria.

ÍNDICE

Resumen	4
Acrónimos y abreviaturas	6
Introducción General	
El glucógeno	9
La glucogenina	11
La enzima ramificante	15
Objetivo General	22
Capítulo 1: Elucidación del rol que cumplen los mecanismos inter- e intrasubunidad en la autoglicosilación de la glucogenina	
1.1. Introducción	24
1.2. Objetivos	27
1.3. Resultados	28
1.3.1. Máxima extensión de autogluco-polimerización del monómero de glucogenina ..	28
1.3.2. Máxima extensión de autogluco-polimerización intra e intersubunidad del dímero de glucogenina	30
1.3.2.1. Reacción intersubunidad en el dímero de glucogenina	31
1.3.2.2. Reacción intrasubunidad en el dímero de glucogenina	32
1.3.2.3. Control estructural de las mutantes de glucogenina	34
1.3.2.4. Control de la formación de heterodímeros	36
1.4. Discusión	37
1.5. Procedimientos experimentales	41
1.5.1. Materiales	41
1.5.2. Glucogeninas mutantes y de tipo salvaje utilizadas	42
1.5.3. Expresión y purificación de glucogeninas	43
1.5.4. Cristalización y determinación de estructuras tridimensionales	46
1.5.5. Ensayos de autoglicosilación	47
1.5.6. Cromatografía de exclusión molecular	47
1.5.7. Autorradiografías	48
1.5.8. Espectrometría de Masa	48
Capítulo 2: Caracterización de la enzima ramificante del glucógeno humana	
2.1. Introducción	51
2.2. Objetivos	54

2.3.	Resultados	55
2.3.1.	Expresión y purificación de la enzima ramificante de glucógeno humana	55
2.3.2.	Medición de actividad a través del complejo amilosa-iodo	60
2.3.3.	Identificación y cuantificación de las ramas generadas en amilosa por la HBE	64
2.3.3.1.	Cinética de formación de ramificaciones	66
2.3.4.	Glucogenina autoglucosilada como sustrato de la HBE	74
2.4.	Discusión	77
2.5.	Procedimientos experimentales	85
2.5.1.	Medios y reactivos	85
2.5.2.	Materiales	88
2.5.3.	Inserción de la secuencia que codifica para HBE en el genoma viral	88
2.5.4.	Transfección se células Sf9 con el baculovirus recombinante	89
2.5.5.	Amplificación del título del baculovirus recombinante	89
2.5.6.	Pruebas de expresión de HBE	90
2.5.7.	Pruebas de inhibición de proteólisis	91
2.5.8.	Expresión y purificación de HBE en células de insecto Sf9	92
2.5.9.	Actividad medida por disminución de la absorbancia del complejo amilosa-iodo	93
2.5.9.1.	Actividad en función del tiempo	93
2.5.9.2.	Actividad en función del pH	93
2.5.9.3.	Actividad en función de la temperatura	93
2.5.9.4.	Actividad en función de la concentración de HBE	94
2.5.10.	Identificación por electroforesis en gel de poliacrilamida asistida por fluoróforo (FACE) de las ramificaciones generadas por HBE	94
2.5.10.1.	Obtención de productos de reacción	95
2.5.10.2.	Electroforesis, adquisición de imágenes y desitomería	96
2.5.11.	Actividad de HBE sobre la cadena glucosídica unida a glucogenina	98
2.5.11.1.	Liberación de la cabena transferida mediante isoamilólisis	98
2.5.11.2.	Cambio en el límite de β -amilólisis sobre la cadena glucosídica unida a glucogenina	99

Capítulo 3: Simulaciones de dinámica molecular del cambio conformacional requerido para la transferencia de la primera glucosa de la glucogenina

3.1. Introducción	101
3.2. Objetivos	105
3.3. Resultados	106
3.3.1. Búsqueda del camino para tirosina-195	106
3.3.2. Interacciones estabilizantes de la conformación final	111
3.3.3. Conformaciones de ataque	115
3.4. Discusión	118
3.5. Procedimientos experimentales	121
3.5.1. Herramientas y software	121
3.5.2. Preparación del sistema	121
3.5.3. Simulaciones de dinámica molecular guiada	122
Conclusiones	123
Bibliografía	127

RESUMEN

En mamíferos la biosíntesis *de novo* de glucógeno comienza con la acción de una enzima llamada glucogenina, que es capaz de incorporar sobre sí misma, de manera autocatalítica, una molécula de glucosa, a través de la formación de un enlace O-glicosídico entre un residuo tirosina y el extremo reductor de la glucosa (α -1-O-Tyr). Además, puede catalizar un segundo proceso químicamente diferente, la incorporación sucesiva de glucosas mediante la formación de enlaces α -(1-4), formando así un oligoglucano lineal sobre el que actúan las enzimas glucógeno sintasa (GS) y ramificante (GBE) para dar lugar a una nueva molécula de proteoglucógeno. Aquí se presentan los resultados obtenidos a partir de estudios relacionados con la estructura y función de glucogenina y GBE, dos de los tres actores principales en la biosíntesis *de novo* del glucógeno.

En particular, en este trabajo de tesis doctoral se profundizó en el conocimiento acerca del mecanismo por el cual la autoglucosilación de glucogenina genera el oligoglucano necesario para que se inicie la biosíntesis *de novo* del glucógeno. Hace unos años se había demostrado que el dímero de glucogenina tiene la capacidad de autoglucosilarse mediante un mecanismo de glucosilación intersubunidad, y nuestro grupo había aportado evidencias de que el monómero era capaz de autoglucosilarse, sugiriendo que el dímero podía glucosilarse por un mecanismo intrasubunidad. A través del diseño de experimentos que incluyeron la mezcla de mutantes de glucogenina inactivas para la catálisis o incapaces de funcionar como sustrato aceptor de glucosa, en este trabajo de tesis doctoral se pudo revelar que ambos mecanismos, intra- e intersubunidad, se complementan en el dímero para alcanzar el máximo grado de autoglucosilación. También se analizó la posibilidad de que el monómero de



glucogenina sea capaz de generar un oligoglucano que pueda ser utilizado como sustrato por las enzimas GS y GBE para dar lugar a una nueva molécula de glucógeno madura.

En el caso de la enzima ramificante del glucógeno es menor la cantidad de datos de que se dispone acerca de su mecanismo de acción, y muchos de los informes al respecto corresponden a enzimas de la familia de glicosil hidrolasas GH13, a la que pertenece GBE, tales como α -amilasas e isoamilasas. Los estudios bioquímicos y cinéticos de GBE publicados hasta el momento fueron realizados con enzimas de origen bacteriano, y algunos de origen vegetal para el caso de la enzima ramificante del almidón (SBE). En el segundo capítulo se presentan los primeros resultados de la caracterización de GBE humana, que incluyen el perfil de la longitud de las ramas que genera y un estudio cinético de la reacción que cataliza.

Por último, se abordó un enfoque bioinformático para tratar de develar el interrogante acerca de cuál es la estructura que glucogenina debe adoptar para superar la distancia de 12-20 Å que separa a la tirosina aceptora del UDP-glucosa, y así lograr la incorporación de la primera glucosa que da comienzo a la reacción de autoglucosilación. Para llevar a cabo esto se utilizaron simulaciones de dinámica molecular guiada, con lo que se consiguió obtener detalles a nivel atómico de las interacciones que podrían ser responsables para que el cambio conformacional tenga lugar.

Acónimos y abreviaturas

ANDS:	ácido 7-amino naftalen-1,3-disulfónico
ANTS:	ácido 8-amino naftalen-1,3,6-trisulfónico
APMSF:	4-amidinofenilmetanosulfonilo flúor clorhidrato
ARN:	ácido ribonucleico
Ci:	Curie (Unidad de radioactividad; cantidad de material en la que se desintegran $3,7 \times 10^{10}$ átomos por segundo)
NaCNBH ₃	cianoborohidruro de sodio
cpm:	cuentas por minuto
csp:	cantidad suficiente para
Da:	Daltons
DMSO:	dimetilsulfóxido
EDTA:	ácido etilendiaminotetraacético
EMAE:	extensión máxima de autoglucosilación específica
ESI-MS:	espectrometría de masas con ionización por electropray
g:	fuerza gravitatoria (9.80665 m/s^2)
GBE:	enzima ramificante de glucógeno
GPU:	unidad de procesamiento gráfico
GS:	glucógeno sintasa
His ₆ tag:	secuencia de 6 histidinas
IPTG:	isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
kDa:	kilodaltons
Leupeptina:	N-acetil-L-leucil-L-leucil-L-argininal
MES:	ácido 2-(N-morfolino) etano sulfónico
MS:	espectrometría de masas
OD:	densidad óptica
pb:	pares de bases
PEG:	polietilenglicol
PTA:	ácido fosfotúngtico
PVDF:	difluoruro de polivinilideno
RMSD:	raíz de la desviación cuadrática media
rpm:	revoluciones por minuto
SB:	buffer de muestra

SDS:	dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE:	electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio
SMD:	Steered molecular dynamics (dinámica molecular guiada)
CMD:	Conventional molecular dynamics (dinámica molecular convencional)
SFB:	Suero fetal bovino
TCA:	ácido tricloroacético
UDP:	uridina difosfato
UDPG:	uridina difosfato glucosa

INTRODUCCIÓN GENERAL



El Glucógeno

La glucosa es la principal fuente de energía de las células. La glucólisis (degradación de glucosa a piruvato y lactato) es la forma más rápida en que una célula puede conseguir energía, obteniéndose de dos a tres moles de adenosina trifosfato (ATP) por cada mol de glucosa. La manera en que las células logran almacenar glucosa como reserva de energía de manera muy eficiente, es mediante la polimerización de la glucosa. En plantas dicho polímero es llamado almidón, mientras que en mamíferos, bacterias y hongos se denomina glucógeno. El almidón está compuesto por una mezcla de dos tipos de polisacáridos: amilosa que es un polímero lineal en el que los residuos de glucosa están unidos mediante uniones glucosídicas de tipo α -(1 \rightarrow 4), y amilopectina que es un polímero ramificado en el que además de los enlaces α -(1 \rightarrow 4) se encuentran enlaces de tipo α -(1 \rightarrow 6), en los llamados puntos de ramificación. El glucógeno es un homopolisacárido ramificado que posee una estructura similar a la de la amilopectina, pero con mayor frecuencia de ramificaciones, y con cadenas que tienen entre 10 y 14 glucosas de longitud. Se cree que la estructura altamente ramificada del glucógeno es consecuencia de una optimización evolutiva, ya que de este modo la molécula logra almacenar una mayor cantidad de glucosa en el mínimo espacio posible, aumentando además la proporción de glucosa que puede ser liberada antes de que ocurra una desramificación, y la velocidad de liberación de glucosa debida a la gran cantidad de extremos no reductores, a partir de los cuales se puede degradar el glucano (1-4).

En mamíferos el glucógeno se encuentra principalmente en hígado, músculo y cerebro. En el hígado representa la reserva de glucosa que el organismo necesita para mantener la homeostasis de glucosa en sangre. En músculo el glucógeno constituye la fuente de energía inmediata necesaria para que el proceso de contracción muscular se lleve a cabo. En cerebro, fundamentalmente tendría un rol imprescindible como reserva energética ante situaciones de estrés como hipoxia e isquemia.

Cuando la célula (o el organismo) necesita glucosa, puede obtenerla degradando el glucógeno (glucogenólisis). La enzima glucógeno fosforilasa (5, 6) hidroliza los enlaces α -(1 \rightarrow 4) liberando glucosa-1-fosfato, que la enzima fosfoglucomutasa transforma en glucosa-6-fosfato, intermediario en la vía de la glucólisis. La enzima glucógeno fosforilasa puede degradar una cadena lineal hasta que quedan 4 unidades de glucosa. En este punto es donde interviene la enzima desramificante de glucógeno (7), catalizando primero la transferencia de maltotriosa hacia el extremo no reductor de una cadena lineal, y posteriormente hidrolizando el enlace α -(1 \rightarrow 6) liberando la glucosa remanente (8-12).

Por otra parte, la síntesis de glucógeno (glucogenogénesis) es llevada a cabo fundamentalmente por dos enzimas, la glucógeno sintasa (13) que elonga las cadenas lineales incorporando glucosa utilizando como sustrato dador uridina difosfato glucosa (UDPG), y la enzima ramificante de glucógeno (14) que escinde una cadena terminal mediante la hidrólisis de un enlace α -(1 \rightarrow 4), para luego transferirla sobre una cadena lineal, catalizando la formación de un enlace α -(1 \rightarrow 6) (15, 16).

No obstante, estas enzimas sólo pueden ejercer su actividad sobre un oligosacárido ya existente. Algunos autores analizaron diversos oligosacáridos pequeños como posibles aceptores de la glucógeno sintasa, aunque las bajas afinidades obtenidas descartaron que realmente sean utilizados *in vivo* (17, 18). Entre 1972 y 1984 se realizaron numerosos estudios en los que se demostró que el sustrato inicial utilizado por la enzima ramificante y la glucógeno sintasa para producir una molécula de glucógeno madura, lo constituye una cadena lineal de glucosas unida a través de su extremo reductor a una enzima (19-28). A esta enzima se la llamó glucogenina (29), y es ella misma quien cataliza la polimerización de la cadena de glucosas a la que se encuentra unida (30, 31). Glucogenina permanece unida al homopolisacárido, razón por la cual se lo denominó proteoglucógeno (28), mientras que la cantidad de moléculas de proteoglucógeno que una célula puede sintetizar depende de la cantidad de glucogenina disponible y de su actividad.

En la Figura 1 se muestra un esquema del mecanismo propuesto por la Dra. Soledad Bazán durante el desarrollo de su trabajo de tesis doctoral para la biosíntesis *de novo* del proteoglucógeno, basándose en resultados que advierten que en la molécula de proteoglucógeno maduro la rama más interna (unida a glucogenina) tiene de 6 a 7 glucosas (32) y no 10-14 como el resto de las ramas, pudiendo admitir sólo una ramificación en lugar de 2 como se creía anteriormente (4).

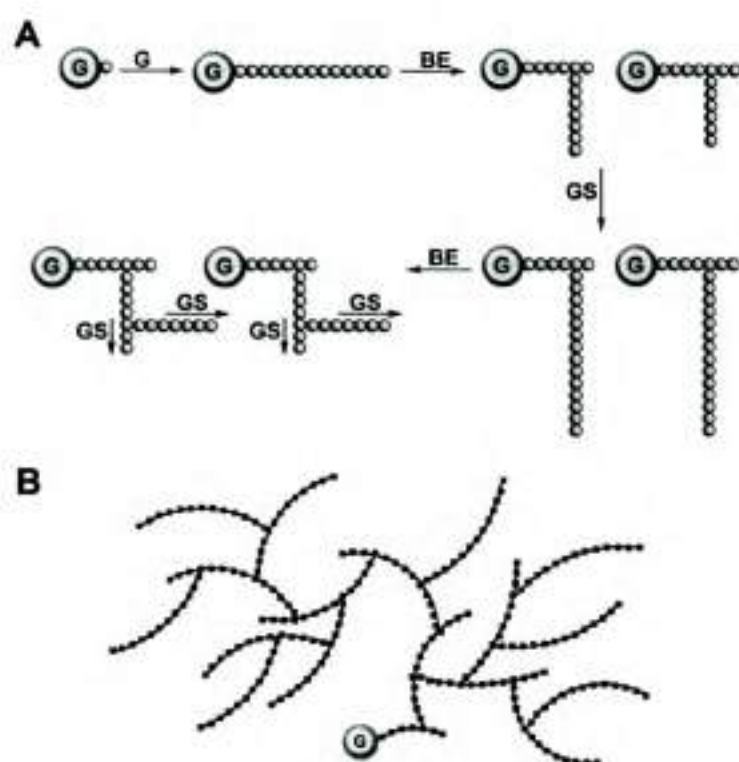


Figura I: (A) Mecanismo propuesto para la biosíntesis *de novo* de proteoglicógeno por Bazán y col. BE, enzima ramificante; G, glucogenina; GS, glucógeno sintasa. (B) Esquema de una molécula de proteoglicógeno con una rama en la cadena más interna del polisacárido. Imagen extraída de Bazán y col 2005 (32)

La glucogenina

La primera vez que se postuló que una proteína podría estar unida covalentemente al glucógeno fue en el año 1934, aunque esa hipótesis fue desacreditada por otros autores que atribuyeron dichos resultados a fallas metodológicas (34), o a que se trataba de enzimas ligadas no covalentemente al glucógeno (35). En 1972 se presentaron nuevos datos que indicaban que el glucógeno podría estar unido covalentemente a una proteína (19, 20), proponiendo que esta proteína funcionaría como aceptora, con múltiples sitios de glucosilación, y que de este modo actuaría como intermediario en la biosíntesis *de novo* del glucógeno (21). A raíz de esto, otros autores, trabajando con preparados enzimáticos de diferentes orígenes obtuvieron resultados que apoyaban la idea de que la biosíntesis *de novo* del glucógeno comenzaría a partir de un oligosacárido unido a una proteína (22-27). En 1984 se confirmó la naturaleza covalente de la unión entre el glucógeno y una proteína, identificando la porción proteica mediante tinción con azul de

Coomassie y marcación con ^{131}I (28), y en 1985 se logró liberarla mediante amilólisis, identificando una proteína de 37 kDa. (36) a la que llamaron glucogenina (29). En ese mismo año se logró caracterizar el tipo de unión entre glucogenina y el glucógeno, identificándose que la unión se llevaba a cabo entre una tirosina y la primer glucosa (37), siendo ésta la primera evidencia de que ese residuo se encuentre involucrado en la unión entre una proteína y un carbohidrato. Más tarde, se comprobó que en la glucogenina sólo un residuo tirosina es glucosilado, y a través de la determinación de la estructura primaria de glucogenina de músculo de conejo se identificó al aminoácido aceptor, siendo para este caso la tirosina 194 (37, 38).

En los estudios iniciales en que se purificaba glucógeno sintasa a partir preparados de músculo de conejo, se la encontró asociada con una proteína de 38 kDa, que según se demostró más tarde era la glucogenina (40). Luego de aislar la glucogenina de estos preparados, estos y otros autores establecieron que es la misma glucogenina la que cataliza la incorporación de glucosas sobre sí misma (30, 31). Además, se demostró que utiliza UDP-glucosa como sustrato dador, al igual que la glucógeno sintasa, pero que a diferencia de ésta es dependiente de un catión divalente como Mn^{2+} o Mg^{2+} . Quedó entonces comprobado que la glucogenina es la responsable de sintetizar sobre si misma una cadena lineal de glucosas a través de la formación de enlaces $\alpha\text{-1}\rightarrow\text{4}$, y que a medida que aumenta el grado de glucopolimerización del oligoglucano unido a ella, se convierte en mejor sustrato para la glucógeno sintasa (41).

Un importante aporte al estudio de la glucogenina fue el clonado del ADNc que codifica para la enzima de conejo (42), que hizo posible su expresión recombinante tanto en bacterias como en células de mamífero (41, 43, 44). Esto también permitió resolver el interrogante acerca de cómo se lleva a cabo la incorporación de la primera glucosa, que se une a la proteína mediante un enlace glucosa-1-O-tirosina, diferente a los enlaces $\alpha\text{-1}\rightarrow\text{4}$ con que se unen el resto de las glucosas. Inicialmente las dos posibilidades que se consideraban eran, que otra glucosiltransferasa incorporara la primera glucosa sobre glucogenina, o que ella misma fuera capaz de catalizar la unión de la primera glucosa sobre su tirosina. Varios fueron los estudios que trataron de responder esta incógnita (42, 45), pero el resultado más contundente lo aportó la expresión de la proteína recombinante en una cepa de *Escherichia coli* carente de actividad UDP-glucosa pirofosforilasa (46). Dicha enzima cataliza la formación de UDP-glucosa a partir de UTP y glucosa-1-fosfato, lo que permitió obtener una glucogenina libre de glucosas (apo-glucogenina). De esta manera, la capacidad de apo-

glucogenina de generar un oligoglucano a partir de UDP-glucosa demostró que la enzima cataliza la formación de los dos tipos de enlace, primero glucosa-1-O-tirosina y luego los siguientes de tipo α -1 \rightarrow 4 entre glucosas. Otro dato importante obtenido del análisis de la secuencia de glucogenina, es que muestra una alta conservación entre las especies, con un 86-96 % de identidad de secuencia reportado para un alineamiento parcial (160 aminoácidos) realizado entre las enzimas de conejo, rata y vaca (42). Posteriormente, con el clonado del ADNc de glucogenina de músculo humano se determinó que ésta tiene un 93 % de identidad de secuencia con su homóloga de conejo (47, 48).

La mayoría de los estudios desarrollados con el fin de comprender el mecanismo de catálisis de glucogenina, se realizaron con la enzima de conejo recombinante, por lo que a partir de aquí la numeración de los aminoácidos utilizada es la correspondiente a esta enzima. Como se dijo anteriormente, la enzima de conejo tiene un peso molecular aproximado de 38 kDa (333 aminoácidos). Ya sea que la glucogenina se obtenga a partir de la amilólisis completa de proteoglucógeno purificado de músculo de conejo o por la expresión heteróloga de la enzima, la especie de 38 kDa resulta ser susceptible a perder un segmento de 7 kDa de su extremo carboxilo terminal, probablemente debido a alguna actividad proteolítica resistente a los inhibidores leupeptina, pepstatina y APMSF (49, 50). La proteína truncada de 31 kDa es estable y muestra una actividad similar a la de la enzima entera (51, 55), y es debido a esto que se la ha utilizado ampliamente por muchos autores para llevar a cabo estudios cinéticos, bioquímicos y estructurales.

Glucogenina pertenece a la familia GT8 de glicosiltransferasas que retienen la configuración del carbono anomérico del glúcido que es transferido (52-44). La primera estructura tridimensional de una glucogenina en ser resuelta fue la de la proteína de conejo, utilizando para tal fin la técnica de cristalografía de rayos X (55). La enzima posee un plegamiento GT-A, compuesto por dos dominios tipo Rossmann $\beta/\alpha/\beta$ estrechamente contiguos, y además tiene el motivo DXD (residuos 101-103) que coordina un catión divalente (altamente conservado en las estructuras GT-A), el cual interacciona con los fosfatos del sustrato dador, actuando como base de Lewis y facilitando la salida del grupo saliente (UDP). A partir del análisis de la estructura tridimensional de algunos miembros de esta familia (55-58), se propuso un mecanismo de reacción para este tipo de enzimas que comprende dos pasos. El primero es un ataque nucleofílico tipo S_n2 por parte de un residuo de la enzima, que resulta en la formación

de un intermediario enzima-sustrato unido covalentemente en el que se invierte la configuración del carbono anomérico, y el segundo es otro ataque S_N2 del sustrato aceptor al intermediario, con una nueva inversión de la configuración, haciendo que el producto final retenga la estereoquímica inicial de la glucosa. Sin embargo, estos resultados carecen de fortaleza para confirmar la hipótesis planteada. Incluso existen reportes de estudios realizados en lipopolisacárido- α -1,4-galactosiltransferasa (LgtC) y α -1,3-galactosiltransferasa (α -3GT), otras glicosiltransferasas que retienen la configuración del carbono anomérico del carbohidrato transferido, aportan datos que apoyan la existencia de un mecanismo diferente para la catálisis (59, 60), que involucra un único ataque nucleofílico frontal de tipo S_N1 por parte del sustrato aceptor, y donde no tiene lugar la formación de un intermediario covalente. Con el fin de tratar de esclarecer cuál es el mecanismo por el que este grupo de enzimas ejercen su actividad, se realizó un análisis por cristalografía de rayos X de mutantes de glucogenina de conejo (51). La selección de los aminoácidos a ser sustituidos se realizó basándose en los datos cristalográficos previos (55-60), y en estudios de conservación de secuencia (61). En el estudio de las mutantes de glucogenina de conejo para los residuos aspartato 159 y 162, se encontró que la sustitución de cualquiera de estos aminoácidos por serina o asparragina derivó en la pérdida de actividad, sin producir cambios en la estructura general de la proteína (51). Estos aminoácidos son parte de un motivo DXXD, muy conservado en glucogeninas de diferentes orígenes (62). Si bien los autores no lograron resolver el dilema de cuál es el mecanismo que utilizan este tipo de enzimas para catalizar la transferencia de glúcidos, sugirieron el rol que podrían cumplir estos dos aminoácidos en cada uno de los mecanismos propuestos. Los aspartatos 162 y 159 se encuentran a 6 y 6,5 Å del carbono 1 de la glucosa, respectivamente, convirtiéndolos en posibles nucleófilos. En el caso en que la reacción procediese a través de una doble sustitución nucleofílica de tipo S_N2 , primero el aspartato-162 atacaría al carbono 1 de la glucosa unida al sustrato dador. Luego, la transferencia se completaría mediante un segundo ataque S_N2 con el aceptor final actuando como nucleófilo, el que puede ser la tirosina-194 (38), una molécula de glucosa previamente incorporada, un aceptor exógeno (63-65), o agua en el caso de la reacción secundaria de hidrólisis (49, 51). Por otro lado, si la transferencia ocurriese a través de un ataque nucleofílico frontal de tipo S_N1 , el aspartato-162 podría facilitar la ruptura del enlace entre el carbono anomérico de la glucosa y el oxígeno del grupo fosfato, estabilizando electrostáticamente la formación de un intermediario oxocarbenio. En los dos mecanismos propuestos el aspartato-159

tendría una participación muy importante en la unión y activación del sustrato aceptor. En la Figura II se muestra un esquema donde se representan los dos mecanismos propuestos.

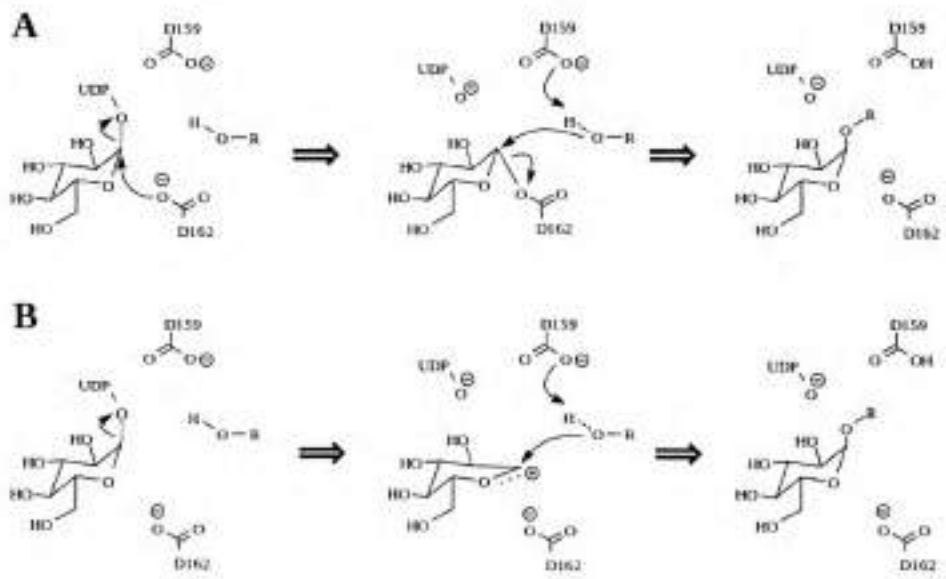


Figura II: Posibles mecanismos para la reacción catalizada por glucogenina (55). Las flechas delgadas representan el movimiento de un par de electrones. La numeración de los aminoácidos es la correspondiente a la enzima de conejo. (A) Mecanismo sugerido si la reacción transcurre a través de un doble ataque S_N2. (B) Mecanismo sugerido si la reacción ocurre por un único ataque de tipo S_N1, donde el sustrato aceptor se acerca con la misma orientación que se encuentra el grupo saliente.

La enzima ramificante

En 1943 se logró determinar por primera vez que la naturaleza ramificada del glucógeno y de la amilopectina era el resultado de la acción catalítica de dos enzimas diferentes, una elongando la cadena de glucosas, y la segunda generando las ramificaciones (14). Luego, en 1953, se describió a la enzima encargada de generar los puntos de ramificación (enzima ramificante) como una amilo-(1,4→1,6)-transglucosidasa. Trabajando con preparados enzimáticos de papa y de hígado y músculo de rata (15), los autores determinaron la naturaleza de las reacciones que esta

enzima cataliza para poder generar las ramificaciones (hidrólisis de enlace α -1,4 y la formación de enlace α -1,6), sometiendo a glucógeno de conejo previamente digerido con la enzima glucógeno fosforilasa, a la incorporación de [14 C]-glucosa en sus ramas externas, para luego ser incubado con el preparado de enzima ramificante. La generación de nuevas ramificaciones fue confirmada detectando la liberación de [14 C]-glucosa. Como ya se ha mencionado anteriormente, la primera glucosa de la ramificación, aquella que se encuentra formando un enlace α -1,6 con la cadena principal, es liberada como glucosa libre por acción de la enzima desramificante de glucógeno. Algunos años más tarde, en 1966, otros autores demostraron que la mínima porción glucosídica que puede transferir la enzima ramificante de hígado de rata es de 6 glucosas, teniendo preferencia por cadenas de 7 glucosas (16). Otra confirmación de su capacidad transglucosidasa se obtuvo midiendo la estimulación producida por la enzima ramificante en la incorporación de glucosas sobre glucógeno por acción de la enzima fosforilasa utilizando glucosa-1-fosfato como sustrato dador (66). La única forma de explicar la mencionada estimulación en la incorporación de glucosas, es que la enzima ramificante haya generado nuevos extremos no reductores capaces de aceptar esas glucosas. Vale aclarar que la enzima glucógeno fosforilasa es capaz de catalizar la reacción inversa, e incorporar glucosas sobre un oligoglucano existente, cuando se encuentra en presencia de un exceso de glucosa-1-fosfato.

En 1986 se clonó el ADNc que codifica para la enzima ramificante de *Escherichia coli*, y se determinó su secuencia primaria de aminoácidos, deducida a partir de su secuencia nucleotídica (67). Simplemente con el conocimiento de la estructura primaria, se logró obtener información muy valiosa acerca de este tipo de enzimas desde el punto de vista mecanístico y estructural. De esta manera, a partir del análisis de alineamiento de secuencias, predicción de estructura secundaria y de "clusters" hidrofóbicos, se postuló que la enzima ramificante de *Escherichia coli* posee un dominio de tipo barril (β/α)₈ (68), dentro del cual se encuentran cuatro regiones altamente conservadas que contienen tres residuos aminoácidos que han sido propuestos como responsables de la actividad catalítica de la enzima, así como también aquellos involucrados en la unión del sustrato al sitio activo (69, 70) (Figura III).

		Región 1	Región 2	Región 3	Región 4
α -Amylase	<i>Aspergillus oryzae</i>	317 DVVAKH	202 QLALIVYKH	230 LVLD	292 FVENH
COTase	<i>Bacillus macerans</i>	335 DFAPNH	225 GIKPAVKH	258 FWF	324 FLENH
Pullulanase	<i>Klebsiella aerogenes</i>	600 DVVYNH	671 GFRPLMGY	764 GMD	827 YVSKH
Isoamylase	<i>Pseudomonas amyloletarcea</i>	392 DVVYNH	371 GFRPLASY	435 LPWA	505 FLDVH
Branching enzyme	<i>Escherichia coli</i>	335 DWVPGH	401 ALMVAVAS	458 EEST	521 LPLGHD
Neopullulanase	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	342 DAVFHH	324 GKRLVYKH	357 EIVH	419 LLDSEH
α -Amylase	<i>Clostridium thermolyticum</i>	488 DQVESH	594 GKRLVYKH	627 ENNH	699 LLDSEH
α -Glucosidase	<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>	206 DLVINH	210 GSRIDAGL	276 EVAH	344 YLENH
Cyclodextrinase	<i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i>	338 DAVFHH	321 GKRLVYKH	354 EIVH	416 LLDSEH
Oligo-1,6-glucosidase	<i>Bacillus cereus</i>	38 DLVYKH	195 GSRMVIHF	255 EMPG	324 YVSKH
Dextran glucosidase	<i>Streptococcus mutans</i>	38 DLVYKH	190 GSRMVIDM	206 EIVG	308 FWRNH
Amylomaltase	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	224 DQVAND	291 IVRIIDFPG	332 FELG	391 YVYKH
Glycogen debranching enzyme	Human	298 DVVYKH	504 GVRIDNCHS	534 ELFT	605 MDITH
Glycogen Branching Enzyme	Human	298 DVVYKH	353 GFRPGVYS	412 EDVS	476 YAEED

Figura III: Alineamiento de secuencias en las cuatro regiones altamente conservadas para algunas enzimas pertenecientes de diferente origen a la familia de las α -amilasas (88).

Estas conclusiones se originaron a partir del estudio de conservación de secuencia de la enzima α -amilasa (1,4- α -D-glucano glucanohidrolasa) en diferentes organismos (69, 71, 72), donde se identificaron por primera vez las cuatro regiones mencionadas, y del análisis estructural de la primer α -amilasa en ser estudiada por cristalografía de rayos X, la Taka-amilasa A de *Aspergillus oryzae* (73), a partir del cual se identificaron los aminoácidos involucrados en la catálisis y en la unión de sustratos. Luego, se descubrió que estas cuatro regiones altamente conservadas se encontraban también en isoamilasas (74), ciclodextrina-glucanotransferasas (75) y enzimas ramificantes (68), entre otras. Todas las enzimas que presentan la conservación de las cuatro regiones descritas, actúan sobre enlaces glucosídicos de tipo α -1,4 o α -1,6 ya sea hidrolizándolos o catalizando su formación por transglucosilación. El hecho de que los aminoácidos involucrados en la acción catalítica de este grupo de enzimas se encuentran perfectamente conservados, sumado al descubrimiento de una enzima llamada neopululanasa (de *Bacillus subtilis*), que es capaz que catalizar cualquiera de las cuatro reacciones mencionadas, llevó a proponer la definición de una familia que incluía a estas enzimas a la que llamaron "familia de las α -amilasas". Los autores propusieron que las cuatro reacciones catalizadas por la neopululanasa son llevadas a cabo por un mismo mecanismo catalítico. Para demostrarlo, estudiaron los productos de transglucosilación por resonancia magnética nuclear, y el impacto sobre la actividad

hidrolítica producido por el cambio de aminoácidos involucrados en la actividad catalítica y en la unión del sustrato mediante el uso de mutagénesis sitio dirigida (76, 77).

De esta manera, a partir de 1992 (77) quedó definido que una enzima pertenece a la familia de las α -amilasas si cumple con las siguientes características: a) debe ejercer su actividad sobre enlaces α -glucosídicos, b) debe producir mono- u oligosacáridos α -anómicos por hidrólisis, o formar enlaces α -glucosídicos por transglucosilación, c) debe tener conservadas las cuatro regiones mencionadas anteriormente (Figura III), d) debe poseer los tres aminoácidos catalíticos, correspondientes a los residuos Asp-206, Glu-230 y Asp-297 de Taka-amilasa A (73). Casi simultáneamente otros autores realizaron una clasificación para las glicosil hidrolasas (enzimas que hidrolizan enlaces *O*-glucosídicos), valiéndose de herramientas bioinformáticas para la identificación de regiones hidrofóbicas, alineamientos de secuencias, etc (78). El criterio utilizado para definir una familia fue que al menos dos secuencias manifiesten una significativa similitud de aminoácidos, y que no presenten una similitud significativa con otras familias. Así, se definieron 35 familias de glicosil hidrolasas (GH), y esta clasificación fue evolucionando hasta dar origen a la base de datos CAZY (Carbohydrate-Active enZYmes; <http://www.cazy.org/>), en la cual se conoce a la familia de las α -amilasas como GH13.

Se considera que la función que cumplen los aminoácidos catalíticos propuesta para el caso de Taka-amilasa A es común a todas las enzimas que forman parte de esta familia, y por lo tanto que todas ellas siguen el mismo mecanismo de reacción, el cual involucra la formación de un intermediario con unión covalente entre la enzima y el sustrato. En la Figura IV se representa este mecanismo de reacción donde, utilizando la numeración correspondiente a Taka-amilasa A de *Aspergillus oryzae*, el Asp-206 actúa como nucleófilo atacando al carbono-1 de un residuo glucosídico del sustrato mediante un ataque tipo S_n2 , resultando en la formación de un enlace covalente 1- β -O-glicosídico. Para que la formación de este intermediario covalente enzima-sustrato sea posible, primero Glu-230 actúa como catalizador ácido-base, protonando el oxígeno glicosídico de un enlace α -1,4 o α -1,6 facilitando su ruptura, con la consiguiente formación de la estructura tipo oxocarbenio en el estado de transición. La carga negativa del aminoácido Asp-297 estabiliza el estado de transición, y debido a su proximidad a Glu-230 contribuye al incremento del pKa del mismo. Además, interacciona a través de enlaces puente de hidrógeno con los grupos -OH de los carbonos 2 y 3 del residuo de

glucosa sobre el que se forma el ión oxocarbenio, promoviendo la formación de la estructura planar en el ángulo de torsión entre C2-C1-O5-C5, y disminuyendo la electronegatividad del grupo -OH unido al carbono-2 lo cual favorece la formación de un estado de transición cargado positivamente. Luego, Glu-230 en su forma carboxilato activa al aceptor desprotonándolo (y por lo tanto haciéndolo un mejor nucleófilo), preparándolo para el ataque nucleofílico (de tipo Sn2) sobre en carbono anomérico, con una nueva inversión en la configuración que da como resultado un producto α -anomérico.

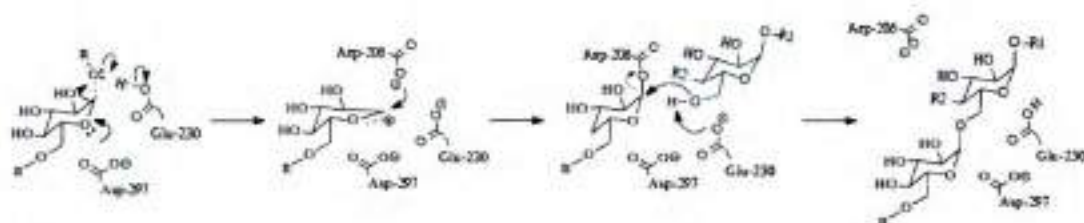
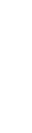


Figura IV: Mecanismo propuesto para la acción catalítica de las enzimas ramificantes. La numeración de los aminoácidos catalíticos corresponde a aquellos de la taka-amilasa A, pero se colocó como sustrato aceptor el grupo hidroxilo del carbono 6 de un oligosacárido para representar la reacción que cataliza la enzima ramificante.

En un estudio cristalográfico realizado con ciclodextrina glucanotransferasa (CGTasa) de *Bacillus circulans* se logró atrapar el intermediario covalente, y a un sustrato natural intacto unido al sitio activo de la enzima (79). Este estudio representa la evidencia más contundente de que el mecanismo de acción de las enzimas de la familia GH13 procede a través de una doble sustitución nucleofílica, y aportó detalles relacionados con el rol que cumplen cada uno de los aminoácidos catalíticos, así como el de algunos de los involucrados en la unión del sustrato.

Además del dominio catalítico central, la enzima ramificante posee otros dos dominios de aproximadamente unos 20 kDa, uno en el extremo N-terminal y el otro hacia el extremo C-terminal, ambos con una estructura secundaria formada por láminas β antiparalelas (80). En la figura V se muestra la estructura cristalina de la GBE de *Escherichia coli*, donde se pueden identificar los tres dominios descritos, y la ubicación de los aminoácidos catalíticos en el dominio central.



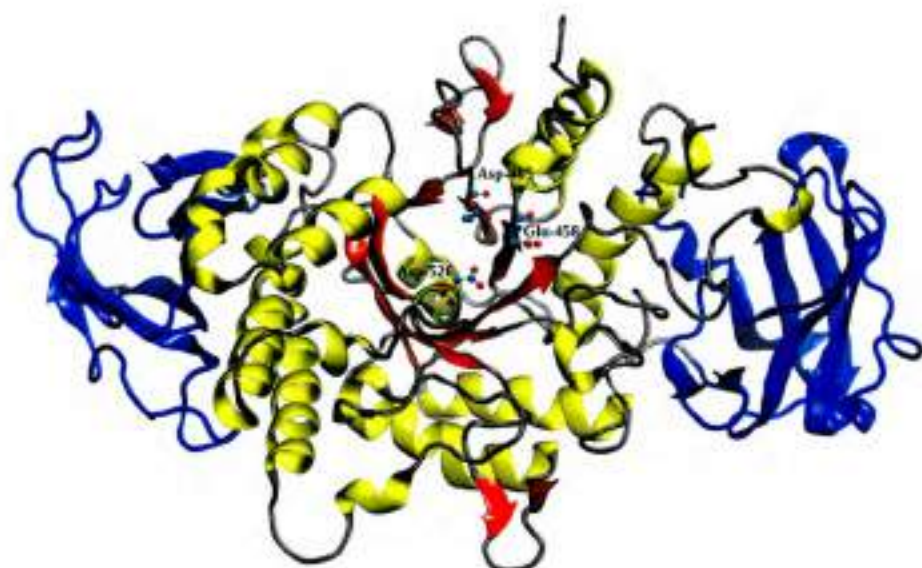


Figura V: Estructura cristalina de la GBE de *Escherichia coli* truncada en su aminoácido 113. La cadena principal se encuentra representada con cintas, coloreando en azul los dominios N- y C-terminal, y el dominio central según su estructura secundaria (rojo para las láminas β y amarillo para las hélices α). Además se representan mediante esferas y palos los aminoácidos catalíticos, ubicados en el dominio catalítico.

Se han realizado algunos estudios sobre las enzimas ramificantes de maíz y *Escherichia coli* con el fin de determinar el rol que cumplen los dominios N- y C-terminal, mediante la construcción de enzimas quiméricas (81, 82). De esta manera, se llegó a la conclusión de que el dominio N-terminal está íntimamente relacionado con la preferencia en la longitud del oligosacárido a ser transferido, mientras que el extremo C-terminal estaría relacionado con el reconocimiento y preferencia del sustrato sobre el que la enzima ejerce su acción catalítica (81). En el estudio concerniente al dominio N-terminal, se observó que mientras mayor es la cantidad de aminoácidos que se deletan a partir del extremo N-terminal de la enzima de *Escherichia coli*, disminuye gradualmente la especificidad de la longitud de la cadena de glucosas que es transferida (82). Por otra parte, la función que cumple el dominio C-terminal se estudió empleando las isoformas I y II de la enzima ramificante de endosperma de maíz (mBE I y II), donde la isoforma I presenta mayor afinidad por actuar sobre amilosa y transferir cadenas de 11-12 glucosas, mientras que la isoforma II tiene mayor afinidad por la amilopectina y transfiere oligosacáridos de 6-7 glucosas de longitud. Al intercambiar los dominios C-terminal de mBEI y mBEII se observó que se invierte la preferencia por el

sustrato sobre el que las enzimas actúan, manteniendo la especificidad de la longitud del oligosacarido transferido (82).

OBJETIVO GENERAL

La finalidad del presente estudio es profundizar los conocimientos existentes acerca del mecanismo por el cual trabajan las enzimas glucogenina y la ramificante del glucógeno, empleando para tal fin enfoques desde el punto de vista bioquímico, cinético y estructural.

En la introducción general se presentó el tema en estudio y sus protagonistas. En el desarrollo de cada capítulo se encontrará una introducción más detallada referente al objetivo específico que se aborda en el mismo.

**ELUCIDACIÓN DEL ROL QUE CUMPLEN LOS MECANISMOS INTER- E
INTRASUBUNIDAD EN LA AUTOGLUCOSILACIÓN DE LA GLUCOGENINA**

1.1 - INTRODUCCIÓN

Hasta el presente sólo se ha logrado resolver la estructura cristalina de la especie truncada de glucogenina (residuos 1 a 260), en su forma dimérica (55, 89). Este dato sumado a resultados obtenidos de análisis por SDS-PAGE, en los que se detecta [^{14}C]-autoglucosilación intersubunidad entre especies de glucogenina con diferentes pesos moleculares, y de la cinética de la reacción de autoglucosilación (41, 90), condujeron a la interpretación de que el dímero es la especie activa, sin considerar que pudiese existir actividad en la especie monomérica. En uno de los estudios cinéticos (90) los autores reportaron que la incorporación de glucosa disminuye por debajo de la constante de disociación calculada ($2\ \mu\text{M}$), y que sigue una cinética de primer orden por encima de ella. Todos estos resultados condujeron a presentar la hipótesis de que la autoglucosilación es llevada a cabo a través de un mecanismo de tipo intersubunidad. Para fortalecer esta conclusión, los autores estudiaron un sistema que consiste en la mezcla de dos mutantes de glucogenina inactivas para la reacción de autoglucosilación, la primera, en la que lisina-85 fue reemplazada por glutamina (K85Q) carece de actividad catalítica pero puede funcionar como sustrato, y la segunda donde tirosina-194 fue mutada por fenilalanina (Y194F) que posee actividad catalítica pero es incapaz de funcionar como sustrato aceptor en una reacción de autoglucosilación. Es así que, al analizar la autoglucosilación en la mezcla de estas dos mutantes, la incorporación de glucosas observada sobre el residuo tirosina-194 de la mutante K85Q sólo podía explicarse por la formación de un heterodímero, en el cual la mutante Y194F es la responsable de catalizar la transferencia de glucosas, y confirmando de esta manera la existencia de un mecanismo intersubunidad en el dímero. No obstante, no se demostró que mediante este mecanismo glucogenina fuera capaz generar un oligoglucano con una

elongación máxima promedio de 12-13 glucosas como la reportada para el dímero *wild type* (51).

Más tarde, en nuestro laboratorio se exploró con mayor detalle el comportamiento de glucogenina a concentraciones submicromolares (91), descubriendo que el monómero existe de manera estable, y demostrando por primera vez que esta especie tiene la capacidad de autoglucosilarse (Figura 1.1-A). La cinética de primer orden observada a bajas concentraciones revelaba que la reacción procedía a través de un mecanismo de glucosilación intramonómico (Figura 1.1-B), aunque no se demostró que esta especie consiguiera generar un oligoglucano con la elongación máxima de 12-13 glucosas alcanzada por el dímero.

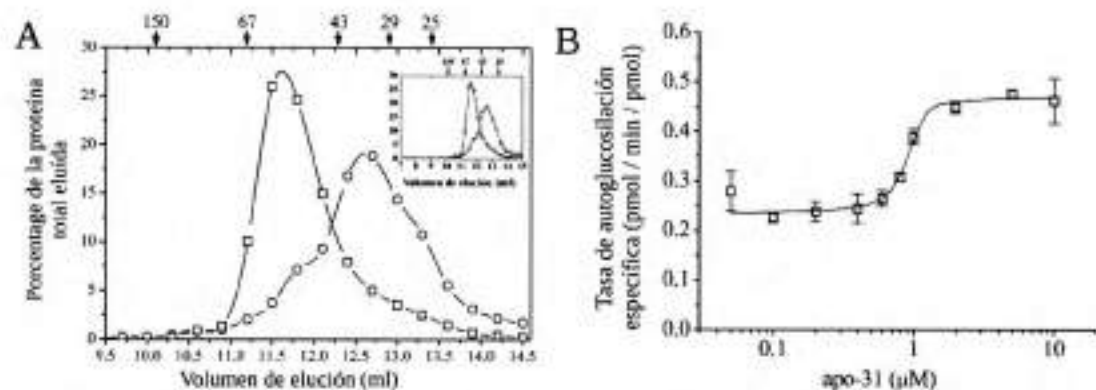


Figura 1.1: (A) Filtración molecular para glucogenina 20 μM ($-\square-$) y 0.1 μM ($-o-$), cargadas en una columna de exclusión molecular, habiendo sido previamente sometidas a auto ^{14}C glucosilación. (B) Velocidad de autoglucosilación específica para glucogenina de conejo sin glucosilar (apo-31) en función de la concentración de enzima. Ambas imágenes fueron extraídas de Bazán *et al.* 2008 (91).

Recientemente se ha reportado la existencia de una enfermedad vinculada a una deficiencia de glucógeno causada por una heterocigocidad dada por la combinación de una mutación sin sentido con otra con cambio de sentido sobre glucogenina-1 humana (92), siendo éste el único informe de una glucogenosis causada por una falla en la actividad de esta enzima. La mutación con cambio de sentido treonina-82 por metionina (T82M) da como resultado una especie inactiva, convirtiéndose en un buen candidato para un estudio mecanístico que arroje luz a la comprensión de las bases moleculares que generan dicha inactividad. Consecuentemente, en nuestro laboratorio se realizó un estudio estructural y cinético de la mutante T82M (93). A través del análisis comparativo entre las estructuras cristalinas de la mutante y la especie salvaje, pudo

advertirse que la mutación T82M produce la pérdida de un enlace puente hidrógeno formado entre el grupo hidroxilo de la cadena lateral de treonina-82 y el aspartato-162, siendo éste último un aminoácido esencial para la actividad de glucogenina, como ya se mencionó anteriormente (51). Esta interacción podría ser importante en la estabilización de la posición del residuo aspartato-162, permitiendo que cumpla normalmente con su función. Con el fin de corroborar dicha conclusión, se construyeron mutantes donde se cambió treonina-82 por serina o valina. Cuando el cambio fue por serina, la mutante presentó actividades casi normales de autoglicosilación, transglucosilación e hidrolítica de UDP-glucosa. En cambio, cuando la sustitución se hizo por valina, se perdieron por completo las tres actividades, de manera análoga a lo que sucede en la variante natural T82M.

1.2 - OBJETIVOS

El objetivo desarrollado en este capítulo está centrado por un lado en la determinación de la capacidad del monómero de la glucogenina para generar un oligoglucano de similar longitud al reportado para el dímero.

Por otra parte, basándose en el hecho de que el monómero de la glucogenina es capaz de autoglucosilarse a través de una reacción intramolecular, se desarrollaron estrategias experimentales que permiten el estudio individual de las reacciones intra- e intersubunidad en el dímero de glucogenina. De esta manera se busca confirmar si el mecanismo intrasubunidad tiene lugar en el dímero.

1.3 - RESULTADOS

1.3.1 - Máxima extensión de autoglucopolimerización del monómero de glucogenina

La actividad autocatalítica de glucogenina fue ensayada a dos concentraciones, 0,04 y 4 μM . En estas condiciones la enzima se encuentra en las formas monomérica y dimérica respectivamente, tomando como referencia una constante de disociación de 0,85 μM que fuera calculada previamente (91). Con el fin de comparar la incorporación de glucosas sobre glucogenina en sus dos estados oligoméricos (0,04 y 4 μM), se cuantificó la incorporación de [^{14}C]-glucosa en apo- $\Delta 270$ a 5, 20, 60, y 120 minutos (Figura 1.2-A). Se tomó como referencia el tiempo mínimo de reacción en el que la velocidad de incorporación de glucosas tiende a ser nula. De esta manera, se definió la extensión máxima de autoglucosilación específica (EMAE) como el número de pmoles de glucosa incorporada por pmol de glucogenina, producido por la incubación con 320 μM de UDP- ^{14}C -glucosa durante 60 minutos (Figura 1.2-A). Previamente se determinó que 320 μM UDP- ^{14}C -glucosa aseguraba la saturación con el sustrato donador para la mayor concentración de enzima utilizada en los ensayos (Figura 1.2-B). La EMAE registrada fue de 13.3 ± 1.9 unidades de glucosa para el monómero y el $12,5 \pm 1.4$ unidades de glucosa para el dímero. Mediante el análisis por MS de una muestra de glucogenina dimérica en su máximo grado de glucopolimerización, pudo corroborarse el valor obtenido por EMAE. A partir de la interpretación del espectro deconvolucionado pudo determinarse que glucogenina estaba unida a glucanos de 10, 12, 13, 14, y 16 unidades de glucosa. Considerando la abundancia relativa de cada especie glucosilada (7.2, 21.4, 37.5, 25.0 y 8.8%, respectivamente), se puede decir que el grado de polimerización promedio fue de 13 glucosas (Figura 1.3), siendo este

resultado coherente si es comparado con la longitud media de cadena de 12 glucosas que fuera descripta previamente (94). La baja concentración a la que existe la enzima como monómero representó un obstáculo para determinar del grado autogluco-polimerización utilizando ESI-MS. De todas maneras, la concordancia entre la máxima capacidad de autoglicosilación específica medida para el dímero y el valor promedio determinado por análisis de MS sustenta la validez del EMAE determinado para la forma monomérica de glucogenina.

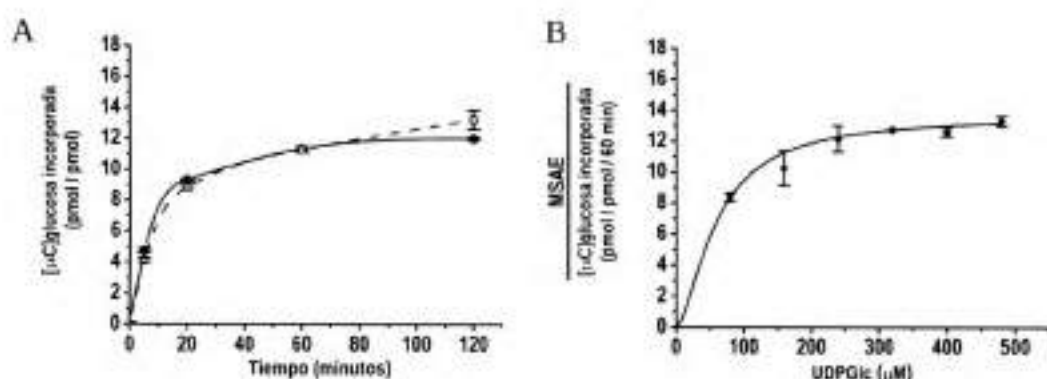


Figura 1.2: (A) Autoglicosilación específica en función del tiempo para glucogenina monomérica a 0,04 μM (\square) y dimerica a 4 μM (\bullet). (B) EMAE en función de la concentración de UDP-glucosa.

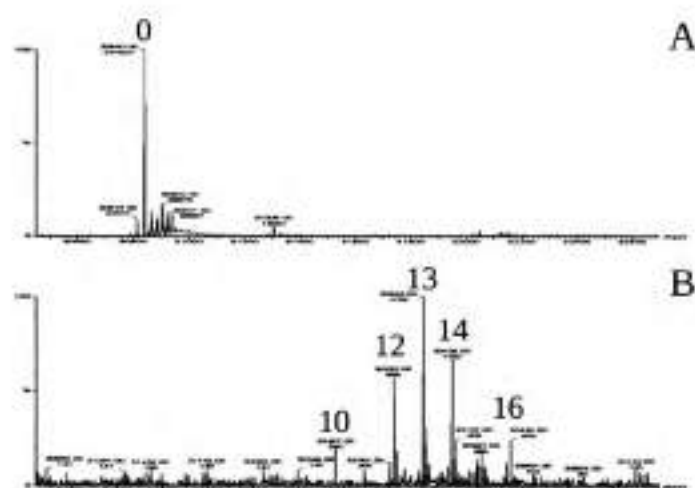
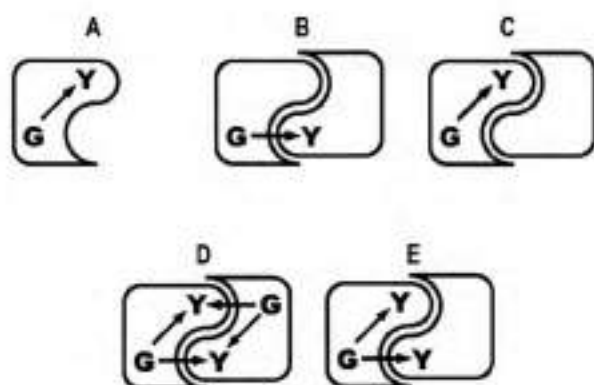


Figura 1.3: La especie apo- $\Delta 270$ autoglicosilada en su máxima capacidad fue analizada por ESI-MS. Espectro deconvolucionado de apo- $\Delta 270$ antes (A) y después (B) de ser incubada con UDP-glucosa durante 60 minutos. Los números 0, 10, 12, 13, 14, y 16 ubicados sobre cada pico corresponden a la cantidad de glucosas que forman la cadena unida a cada población de enzima glucosilada.

1.3.2 - Máxima extensión de autoglucopolimerización intra- e intersubunidad del dímero de glucogenina

La mezcla de dos mutantes de glucogenina inactivas para la autoglucosilación, una por carecer de capacidad para transferir glucosas pero con su tirosina aceptora intacta, y la otra por no poder funcionar como sustrato aceptor por carecer de la tirosina glucosilable, da como resultado la formación de un heterodímero que presenta una cinética de autoglucosilación coherente con un mecanismo de glucosilación intersubunidad (90). Sin embargo, no se ha demostrado que mediante este mecanismo se logre reproducir el máximo grado de glucopolimerización reportado para el dímero de glucogenina. Además, teniendo en cuenta el reporte de la existencia de un mecanismo de autoglucosilación intramonomérico (91), en este trabajo se diseñó un sistema que permite medir de manera independiente la autoglucosilación en el dímero por los dos mecanismos posibles de reacción: intersubunidad e intrasubunidad. Para medir la EMAE intersubunidad se construyó un heterodímero formado entre Y194F- Δ 270 (activa para glucosilar pero inactiva como sustrato) y T82M- Δ 270 (que es activa como sustrato pero inactiva para glucosilar) (Esquema 1B). La elección de la mutante T82M se basó en el hecho de que dicha modificación fue recientemente descrita como la causante de una deficiencia en la síntesis de glucógeno en humanos (92), como se mencionó anteriormente. Para el caso de la medición de EMAE sólo mediante el mecanismo intrasubunidad, se formó un heterodímero con la doble mutante D159S/Y194F- Δ 270 (inactiva tanto para glucosilar como para incorporar glucosa) y la especie activa apo- Δ 270 (activa para glucosilar y como sustrato) (Esquema 1C). El propósito del diseño experimental, es obtener un sistema en el que una de las especies se encuentre totalmente formando heterodímeros, y expresar la EMAE en función de la cantidad de esta especie. Para lograr esto, se mezcló y se dejó equilibrar una especie en estado monomérico ($0,04 \mu\text{M}$) con la otra especie en su forma dimerica ($3,96 \mu\text{M}$). Con esto se pretende que la diferencia de concentración de 2 órdenes de magnitud favorezca un desplazamiento en el equilibrio hacia la conversión en heterodímero de la especie que se encontraba como monómero.



Esquema 1: Diagrama de monómero y dímeros de glucogenina. Las flechas indican la transferencia de glucosa desde el UDP-glucosa unido en el sitio activo (G) hacia la Tirosina-194 (Y), en el monómero (A), heterodímeros sólo con capacidad de glucosilación intersubunitaria (B) o intrasubunitaria (C), y dímeros con capacidad de glucosilación tanto intrasubunitaria como intersubunitaria (D y E).

1.3.2.1 – Reacción intersubunitaria en el dímero de glucogenina

La autoglucosilación específica en función del tiempo, de heterodímeros formados con subunidades de glucogenina, con capacidades complementarias de glucosilación y de sustrato aceptor, se muestra en la Figura 1.4. El heterodímero obtenido mediante la mezcla de Y194F- Δ 270 0,04 μ M con T82M- Δ 270 3,96 μ M (Esquema 1B) mostró un aumento lineal autoglucosilación sin alcanzar una meseta (Figura 1.4-A). El grado de autoglucosilación a los 60 minutos de reacción fue de 34 moles de glucosa por cada mol de heterodímero. Esto es aproximadamente 3 veces mayor que la EMAE correspondiente a la enzima dimerica apo- Δ 270 (Figura 1.2-A). El aumento constante observado en la autoglucosilación específica, mostraba un intercambio dinámico entre las subunidades del heterodímero durante el transcurso de la reacción, con la sustitución de la subunidad T82M- Δ 270 glucosilada por otra T82M- Δ 270 no glucosilada. Al invertir las proporciones de las mutantes mezclando T82M- Δ 270 0,04 μ M con Y194F- Δ 270 3,96 μ M, era de esperar que ocurriera un intercambio similar entre las subunidades, dando como resultado la autoglucosilación máxima de la subunidad T82M- Δ 270 del heterodímero. En estas condiciones, la autoglucosilación medida fue de 6,3 moles de glucosa por mol de heterodímero en 60 minutos de reacción, alcanzando un valor máximo de 7,5 unidades de glucosa a los 120 minutos de reacción (Figura 1.4-B). Tanto la velocidad de incorporación como el grado máximo de glucopolimerización

de este heterodímero resultaron ser más bajos que los determinados en la enzima dimerica de tipo salvaje (Figura 1.2-A). También se incubó durante 60 y 120 minutos una mezcla de Y194F- Δ 270 0,04 μ M y T82M- Δ 270 0,04 μ M (ambas como monómero), en la que no se registró incorporación alguna (Figura 1.4-B). Este último dato reforzaba la existencia del monómero de glucogenina en concentraciones submicromolares (91), y descartaba la posibilidad de que en esas condiciones ocurriese autoglucosilación intersubunidad debida a la formación transitoria de dímeros, no detectables por cromatografía de exclusión molecular.

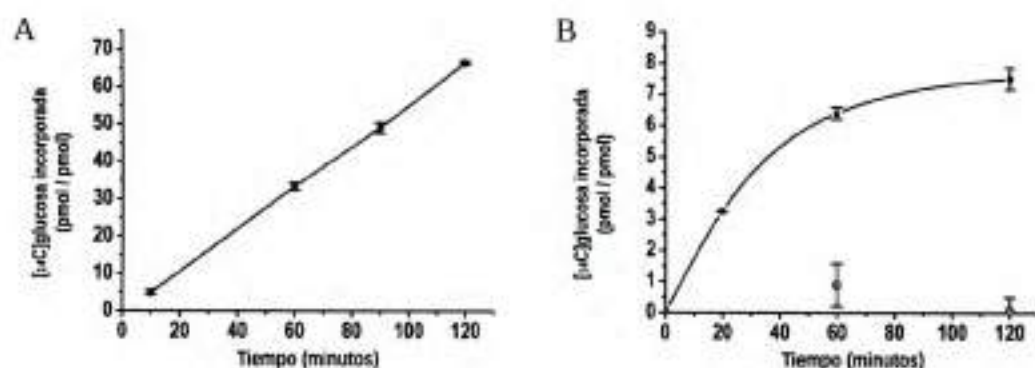


Figura 1.4: Autoglucosilación en función del tiempo para heterodímeros de glucogenina, formados a partir de la mezcla de Y194F- Δ 270 0.04 μ M con T82M- Δ 270 3.96 μ M (A), T82M- Δ 270 0.04 μ M con Y194F- Δ 270 3.96 μ M (\bullet) y T82M- Δ 270 0.04 μ M con Y194F- Δ 270 0.04 μ M (\square) (B). La incorporación de [¹⁴C]-glucosa se representa como pmoles/pmol de heterodímero.

1.3.2.2 – Reacción intrasubunidad en el dímero de glucogenina

Dado que se ha descrito que el monómero de glucogenina es capaz de autoglucosilarse (91), se procedió a estudiar la posibilidad de que la reacción intrasubunidad pudiese ocurrir en el dímero de la enzima. La primer evidencia se obtuvo por análisis en SDS-PAGE de heterodímeros [¹⁴C]-autoglucosilados, formados con especies de glucogenina troncada (31 kDa) y completa (38 kDa). Al mezclar el monómero de la especie activa parcialmente glucosilada WT-38 (0,04 μ M) con el dímero de la mutante T82M- Δ 270 (3,96 μ M) que sólo posee capacidad aceptora (Esquema 1E), se observó que ocurrían simultáneamente incorporación intra e intersubunidad (Figura 1.5, carril 2). La glucosilación intrasubunidad de la especie WT-38 en el heterodímero fue ligeramente inhibida por la subunidad T82M- Δ 270, si se la

compara con la incorporación observada cuando se encuentra como monómero (Figura 1.5, carril 3). De manera similar, una leve inhibición de la glucosilación intrasubunidad de WT-38 se produjo cuando se la hace formar heterodímeros con la doble mutante D159S/Y194F- Δ 270 (Figura 1.5, carril 4). Por otro lado, cuando la especie activa no glucosilada apo- Δ 270 fue sometida a la dimerización con la doble mutante D159S/Y194F- Δ 270 (Esquema 1C), su autoglucosilación se vio fuertemente inhibida (Figura 1.5, carriles 5 y 6).

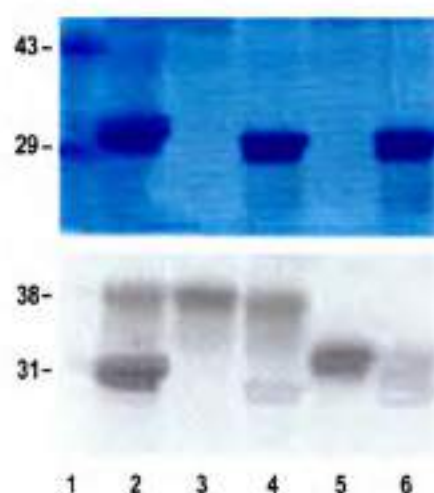


Figura 1.5: Electroforesis en gel de poliacrilamida en el que se demuestra que en el proceso de autoglucosilación conviven ambos mecanismos, intra- e intersubunidad. La especie monomérica (0,04 μM) WT-38 (carriles 2 a 4) y apo- Δ 270 (carriles 5 y 6) fueron sometidas a [^{14}C]-autoglucosilación antes (carriles 3 y 5) o después de ser mezcladas y equilibradas con dímeros (3,96 μM) de T82M- Δ 270 (carril 2) y D159S/Y194F- Δ 270 (carriles 4 y 6). Luego, alícuotas fueron sometidas a SDS-PAGE y posterior autorradiografía. En el panel superior se muestra la tinción con azul de Coomassie, donde se marca el peso molecular correspondiente a los estándares sembrados en el carril 1. En el panel inferior se muestra la autorradiografía correspondiente, en la que se marca el peso molecular de las especies de glucogenina utilizadas.

Con el propósito de cuantificar el grado de inhibición observado en la reacción intrasubunidad en el dímero de glucogenina durante la incorporación de los primeros residuos de glucosa, se midió la autoglucosilación específica de 0,04 μM apo- Δ 270 antes y después de formar un heterodímero con la doble mutante D159S/Y194F- Δ 270 (3,96 μM). De manera análoga, se cuantificó el efecto en la capacidad de glucosilación intrasubunidad de una especie que se encuentra parcialmente glucosilada (WT- Δ 270). La Figura 1.6 muestra que la EMAE de la especie no glucosilada apo- Δ 270 en su forma

monomérica, se ve reducida ~5 veces cuando se encuentra formando el heterodímero. Por otra parte, la EMAE de la especie parcialmente glucosilada WT- Δ 270 fue sólo ligeramente inhibida bajo la forma de subunidad del heterodímero, como ya se podía apreciar anteriormente en la Figura 1.5, ensayo donde se utilizó la especie WT-38.

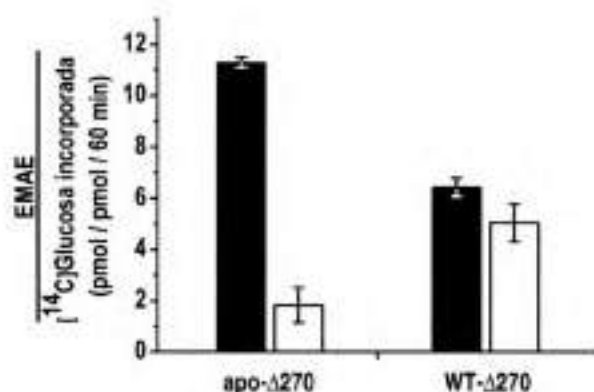
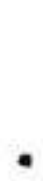
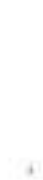


Figura 1.6: Autoglucosilación intrasubunidad en heterodímeros formados entre la doble mutante D159S/Y194F- Δ 270 y las especies activas apo- Δ 270 y WT- Δ 270. Se midió la incorporación de [14 C]-glucosa en monómeros (0,04 μ M) de apo- Δ 270 y WT- Δ 270 antes (barras negras) o después (barras blancas) de ser mezcladas y equilibradas con dímeros (3,96 μ M) de la doble mutante D159S/Y194F- Δ 270.

1.3.2.3 – Control estructural de las mutantes de glucogenina

Con el objetivo de corroborar que las mutaciones introducidas en apo- Δ 270 no afectaron a su estructura tridimensional, se obtuvieron las estructuras de las mutantes Y194F- Δ 270 y D159S/Y194F- Δ 270 por cristalografía de rayos X, que mostraron una gran similitud estructural global con respecto a la estructura correspondiente a la enzima de tipo salvaje apo- Δ 270, con un RMSD para los átomos de la cadena principal de 0,22 y 0,31 Å, respectivamente. Los cristales de las mutantes Y194F- Δ 270 y D159S/Y194F- Δ 270 pertenecen al grupo espacial I222, con una subunidad en la unidad asimétrica. La superposición de estas estructuras con la estructura tridimensional de T82M- Δ 270 (93) resalta la similitud entre las mismas, a pesar de la pérdida de actividad (Figura 1.7).



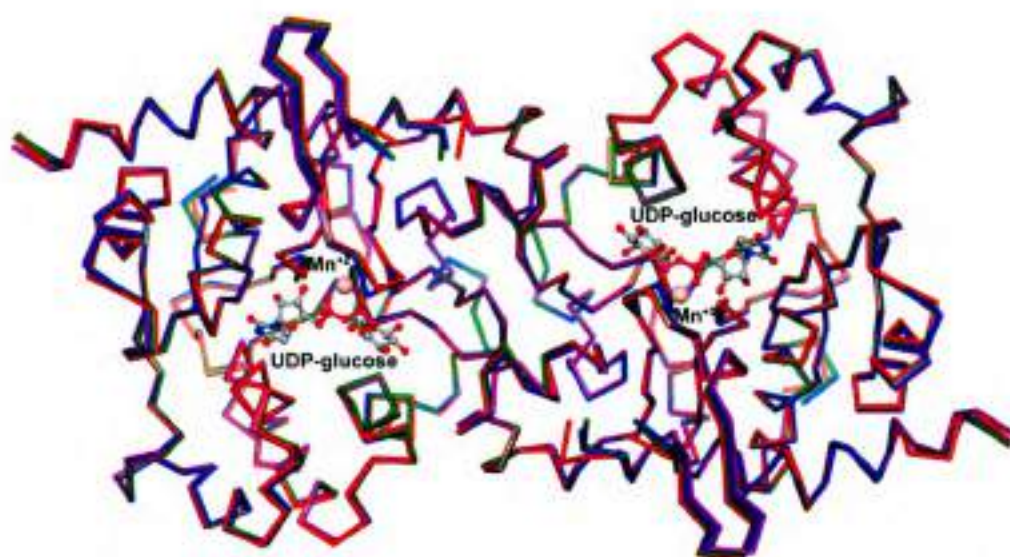


Figura 1.7: Superposición de las estructuras cristalográficas de Y194F-Δ270 (verde), T82M-Δ270 (rojo) y D159S/Y194F-Δ270 (púrpura). En el sitio de unión de cada subunidad se representa el UDP-glucosa y el ión Mn²⁺.

A continuación se presenta una tabla con las estadísticas del análisis de los conjuntos de datos de difracción seleccionados para la resolución de las estructuras de Y194F-Δ270 y D159S/Y194F-Δ270.

Set de datos	Y194F-Δ270	D159S/Y194F-Δ270
Grupo espacial	I222	I222
a (Å)	58,28	56,53
b (Å)	103,37	105,64
c (Å)	119,63	120,08
Rango de resolución (Å)	25,77-2,10 (2,21-2,10)	25,72-2,40 (2,53-2,40)
Reflexiones observadas	85692	56698
Reflexiones independientes	21489	14436
Rmerge (%) ^a	6,8 (29,5)	6,9 (39,7)
I/σ 8.8	(2,6)	8,6 (1,9)
Exhaustividad	99,9 (99,9)	99,9 (100,0)
Refinamiento		
Reflexiones en el refinamiento	20342	13710
R _{cryst} (%) ^b	19,62	21,28
R _{free} (%) (set de prueba 5%) ^c	23,94	25,92
RMSD sobre longitud de enlace (Å)	0,009	0,011
RMSD sobre ángulos de enlace (°)	1,178	1,307

Tabla 1.1: Estadísticas de los datos obtenidos y del refinamiento del modelo. Los valores entre paréntesis se refieren a las capas de más alta resolución.

^aRmerge = $\sum_i \sum_j |I_{ij} - \langle I \rangle| / \sum_i \sum_j \langle I \rangle$ donde $\langle I \rangle$ es la intensidad promedio de las i observaciones de la reflexión h .

^bR_{cryst} = $\sum_i ||F_{obs} - |F_{calc}|| / \sum_i |F_{obs}|$. Donde $|F_{obs}|$ y $|F_{calc}|$ son las amplitudes de los factores de estructuras observados y calculados, respectivamente. La sumatoria incluye todas las reflexiones utilizadas en el refinamiento.

^cR_{free} = $\sum_i ||F_{obs} - |F_{calc}|| / \sum_i |F_{obs}|$. Misma fórmula que es R_{cryst}, pero el cálculo se hace para un conjunto de datos elegidos al azar, que representan un 5% de los datos de difracción que no fueron incluidos en el refinamiento.

1.3.2.4 – Control de la formación de heterodímeros

Para verificar la formación de los heterodímeros se utilizó la cromatografía de exclusión molecular (Figura 1.8), ya que se conoce el perfil de elución que presentan las formas monomérica y dimérica de glucogenina en este tipo de ensayo (91). Cuando se mezcló glucogenina monomérica apo- $\Delta 270$ 0,1 μM , marcada parcialmente por ^{14}C -autoglicosilación, con la doble mutante D159S/Y194F- $\Delta 270$ dimérica 20 μM , y se eluyó a través de una columna de exclusión molecular Superdex 75, se observó un desplazamiento absoluto de la marca radioactiva recuperada, hacia un volumen de elución inferior (correspondiente a la elución de glucogenina dimérica). Un cambio similar en el perfil de elución fue detectado cuando se hicieron mezclas entre apo- $\Delta 270$ 0,1 μM y las proteínas mutantes Y194F- $\Delta 270$ o T82M- $\Delta 270$ en una concentración 20 μM (Figura 1.8). Este resultado es consistente con la conversión de la glucogenina marcada con ^{14}C -glucosa desde un estado monomérico hacia la formación de un heterodímero, con cualquiera de las especies mutantes con las que se la ha combinado. Para corroborar que el cambio en el perfil de elución de apo- $\Delta 270$ es debido a la especificidad de la formación de heterodímeros, se hizo una mezcla de la misma proporción de glucogenina monomérica ^{14}C -glucosilada y albúmina, que no produjo ningún cambio en la elución de la enzima marcada (Figura 1.8).

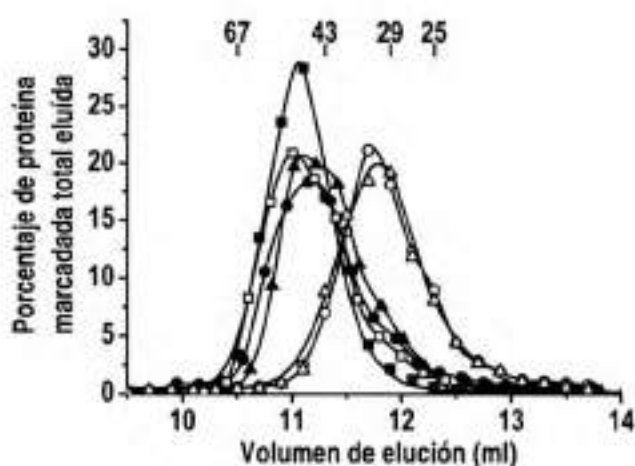


Figura 1.8: Control de formación de heterodímeros por cromatografía de exclusión molecular. Glucogenina en su estado monomérico fue sometida a autoglicosilación con UDP- ^{14}C -glucosa, y se sembró en la columna Superdex-75 antes (-○-) o después de ser mezclada con dímeros (20 μM) de T82M- $\Delta 270$ (-■-), Y194F- $\Delta 270$ (-▲-), D159S/Y194F- $\Delta 270$ (-●-) o albúmina (-△-). También se sembró glucogenina dimérica (20 μM ; -□-) autoglicosilada con UDP-glucosa 10 μM durante 5 minutos.

1.4 - DISCUSIÓN

Los antecedentes demuestran que la glucogenina puede autoglucosilarse tanto en su forma monomérica como dimérica, y por lo tanto cualquiera de estos estados oligoméricos son potenciales candidatos para dar inicio la biosíntesis *de novo* del glucógeno. En el caso del monómero de glucogenina se había descrito que podía autoglucosilarse a través de un mecanismo intramolecular, aunque no se había determinado el grado de elongación máximo que podría alcanzar la cadena de glucosas en estas condiciones. Por otro lado, se había comprobado que el dímero de glucogenina era capaz de sintetizar un oligoglucano de hasta 12 unidades de glucosa, pero no había sido demostrado que esto ocurriera exclusivamente por mecanismo de glucosilación intersubunidad, como fuera propuesto. Por lo tanto, en este trabajo se determinó la extensión máxima de autoglucosilación específica (EMAE) del monómero y el dímero de glucogenina, y se cuantificó de manera individual la participación que pudiesen tener los mecanismos inter- e intrasubunidad en la glucogenina dimérica.

El valor de la EMAE producida por el monómero de glucogenina fue de $13,3 \pm 1,9$ unidades de glucosa, muy semejante a la EMAE de $12,5 \pm 1,4$ unidades de glucosa obtenida para el dímero. Este resultado pone de manifiesto la capacidad que tiene el monómero de glucogenina de llevar a cabo una autogluco-polimerización de la misma magnitud que la encontrada en el dímero, colocando al monómero en un rol funcional con capacidad de satisfacer la necesidad de la célula de contar con el sustrato necesario para que la GBE y la GS puedan generar una nueva molécula de proteoglucógeno. Además, la gran similitud que presentan las cinéticas de autoglucosilación del monómero y el dímero fortalecen dicha conclusión (Figura 1.2-A). Por lo tanto, *in vivo* glucogenina podría autoglucosilarse y dar cominezo a la biosíntesis *de novo* de

proteoglucógeno, inmediatamente después de ser expresada, sin necesidad de alcanzar la concentración necesaria para formar un dímero.

Por otra parte, se analizó la capacidad de glucopolimerización en el dímero, a través de los mecanismos intra e intersubunidad de manera independiente. Para lograr esto, se utilizaron dos mutantes simples, Y194F- Δ 270 y T82M- Δ 270, y la doble mutante D159S/Y194F- Δ 270, todas inactivas para llevar a cabo el proceso de autoglucosilación por sí mismas. Se verificó mediante cristalografía de rayos X que en cada una de las mutantes la estructura tridimensional no se encontrase afectada por la sustitución de los diferentes aminoácidos (Figura 1.7). Asimismo, haciendo uso de la posibilidad de identificar los diferentes estados oligoméricos de glucogenina a través cromatografía de exclusión molecular, se confirmó que cada una de las mutantes fuese capaz de formar heterodímeros cuando se las mezclaba con la enzima sin modificar apo- Δ 270 (Figura 1.8).

Como se puede apreciar en la Figura 1.4, la medición de autoglucosilación específica por mecanismo intersubunidad en función del tiempo, referente a heterodímeros formados con las mutantes Y194F- Δ 270 y T82M- Δ 270 (Esquema 1B), arroja dos datos importantes. Primero, en la Figura 1.4-A se pone en evidencia el dinamismo con que se intercambian las subunidades en el heterodímero, proceso que bien podría ocurrir de la misma manera durante la incorporación de las primeras unidades de glucosa en un homodímero de la especie salvaje de glucogenina. Segundo, y posiblemente consecuencia de dicho dinamismo, la Figura 1.4-B revela la incapacidad del mecanismo intersubunidad para reproducir tanto la velocidad de incorporación, como la longitud máxima de glucopolimerización que se observa en el homodímero de glucogenina de la especie salvaje. Como la velocidad de incorporación disminuye a medida que aumenta la longitud del oligoglucano unido a glucogenina (Figura 1.2-A), lo que probablemente ocurre en el heterodímero es que se llega a un punto en donde la velocidad de glucopolimerización intersubunidad se vuelve tan baja, que resulta ser menor a la velocidad con que se produce el intercambio entre las subunidades. La mezcla de las mutantes Y194F- Δ 270 y T82M- Δ 270 a concentración 0,04 μ M (ambas en estado monomérico) no mostró incorporación alguna (Fig. 1.4-B). Este resultado apoya la presencia de monómeros estables a las concentraciones submicromolares en las que se midió la EMAE, sin la formación detectable de dímeros transitorios autoglucosilables, siendo por lo tanto un nuevo dato que fortalece el concepto del monómero de

glucogenina valiéndose de un mecanismo intramolecular de reacción para autoglucosilarse.

En el intento de demostrar la posibilidad de que la reacción intramonomérica tuviese lugar cuando la glucogenina se encuentra formando dímeros (Esquema 1C), se llevó a cabo la heterodimerización de las especies activas apo- $\Delta 270$ y WT-38 con la doble mutante inactiva D159S/Y194F- $\Delta 270$. Se encontró que la reacción intrasubunidad se ve fuertemente disminuida cuando se trata de la incorporación de las primeras glucosas (Figura 1.6), pero que sólo afecta ligeramente la elongación de una cadena ya formada (Figura 1.6). La determinación del grado de autoglucosilación mostró que las EMAE de las formas monoméricas WT- $\Delta 270$ y apo- $\Delta 270$ se redujeron en un 16 y 84 %, respectivamente, después de formar heterodímeros con la doble mutante D159S/Y194F- $\Delta 270$ (Figura 1.6). La pequeña disminución en el valor de EMAE obtenido para WT- $\Delta 270$ luego de heterodimerizar, podría deberse a que, si bien la expresión de la proteína recombinante en la cepa *E. coli* Rosetta (DE3) produce una especie parcialmente glucosilada, también existe una población de enzima sin glucosilar (41). Según los resultados presentados, esa población no podría glucosilarse una vez formado el heterodímero, dando así la ligera diferencia observada. Por otra parte, el bajo nivel de incorporación encontrada cuando apo- $\Delta 270$ forma dímeros con la doble mutante D159S/Y194F- $\Delta 270$, podría explicarse teniendo en cuenta que en solución, el dímero se encuentra en equilibrio con una población de monómero, que es menor a medida que la concentración total se aleja del valor de la constante de disociación. Así, la especie activa apo- $\Delta 270$ que se encuentra formando heterodímeros transitaría en algún momento por su estado monomérico, permitiendo que algún residuo de glucosa sea incorporado. En conclusión, el análisis de estos resultados indican que en el dímero la autoglucosilación intrasubunidad no sería capaz de iniciar la glucopolimerización de la tirosina-194, pero sí tiene la facultad de completar la elongación de la cadena de oligoglucano después de que la tirosina ha adquirido algunas unidades de glucosa (por ejemplo a través de glucosilación intersubunidad). Una posible interpretación de este fenómeno, es que una vez formado el dímero podrían generarse restricciones estructurales en cuanto a los movimientos permitidos de la proteína, afectando el acceso que tiene la tirosina hacia el UDP-glucosa ubicado en el centro de reacción de la misma subunidad, pero no hacia el correspondiente de la otra subunidad, derivando en la imposibilidad del dímero de adquirir las primeras unidades de glucosa mediante un mecanismo de autoglucosilación intrasubunidad.

El examen de la estructura cristalina de la glucogenina (55, 89) muestra que el grupo hidroxilo de la tirosina-194 se encuentra a una distancia de 12 a 15 Å del UDP-glucosa unido a cualquiera de los sitios activos, dependiendo de la orientación de la cadena lateral. En virtud de estas grandes distancias, parece imposible que la primera incorporación tenga lugar, a menos que ocurra un cambio conformacional que acerque a la tirosina hacia el sitio activo. El hecho de que las hélices α que contienen los residuos de tirosina-194 se encuentren íntimamente relacionadas con la superficie de contacto entre las subunidades (55), fortalece la hipótesis de que la restricción planteada se genere como consecuencia de la dimerización de la enzima. Una vez que se han incorporado 2 o 3 unidades de glucosa, quedaría superado el obstáculo que impone la distancia que separa al sustrato aceptor de cualquiera de los centros reactivos, y por lo tanto el cambio conformacional ya no es requerido. Entonces, una vez que la glucogenina se encuentra parcialmente glucosilada por la reacción intersubunidad, el oligoglucano unido a la tirosina se vuelve accesible para ser glucosilado a través de la reacción intrasubunidad.

Los resultados presentados revelan que el mecanismo de autoglucosilación intramonómero de la glucogenina no sólo es eficiente para producir la máxima elongación del oligoglucano sino que es necesario para que dicha elongación máxima pueda también ser alcanzada en el dímero. En este caso, ambos mecanismos (intra- e intersubunidad) necesitan actuar acoplados para lograr la elongación máxima del oligoglucano. Ciertamente el mecanismo intrasubunidad es imprescindible para que la glucogenina monomérica logre autoglucosilarse, pero la evidencia de que mediante este camino pueda adquirir la máxima glucopolimerización reportada, ubica al monómero como protagonista ineludible en la biosíntesis *de novo* de proteoglucógeno.

1.5 - PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

1.5.1 - Materiales

- Medio de cultivo LB: Triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 5 g/L.
- Medio de cultivo LB-amp: medio LB con ampicilina 0,1 g/L.
- Medio de cultivo LB-agar: medio LB con agar 15 g/L.
- Medio de cultivo LB-agar-amp: medio LB-agar con ampicilina 0,1 g/L.
- SB 3X: buffer Tris-HCl 150 mM (pH 6,8), SDS 4,5 %, glicerol 30 %, β -mercaptoetanol 9 % y azul de bromofenol 0,01 %.
- Solución de azul de Coomassie: Etanol 25 %, ácido acético 5 %, Coomassie Brilliant Blue R 0,25 %.
- Solución desteñidora: Etanol 25 %, ácido acético 5 %.
- Buffer A: buffer Tris-HCl 20 mM (pH 7,5), NaCl 0,5 M, Imidazol 10 mM.
- Buffer B: buffer Tris-HCl 20 mM (pH 7,5), NaCl 0,5 M, Imidazol 500 mM.
- Solución de centelleo líquido Optiphase HiSafe 3 (Perkin-Elmer).
- Cepa de *Escherichia coli* Rosetta (DE3) (Novagen).
- Vector pET15b (Novagen).
- La cepa de *Escherichia coli* CGSC 4997, cepa que carece de actividad de UDP-glucosa pirofosforilasa (por lo tanto incapaz de producir UDP-glucosa), se obtuvo del "E. coli Genetic Stock Center of the Department of Molecular, Cellular, and Developmental Biology at Yale University".

- El clon de glucogenina de músculo de conejo de fue cedido por el doctor P. J. Roach (Facultad de Medicina de la Universidad de Indiana).
- UDP-[¹⁴C]-glucosa (320 mCi/mmol) (Instituto de Investigaciones Bioquímicas Fundación Leloir, Buenos Aires, Argentina).
- Columnas de afinidad HisTrap FF, y de exclusión molecular Superdex 75 (General Electric Healthcare).
- Excepto donde se indica, todos los demás reactivos fueron adquiridos en Sigma-Aldrich.

1.5.2 - Glucogeninas mutantes y de tipo salvaje utilizadas

En este trabajo de tesis se emplearon tres versiones de la glucogenina de conejo de tipo salvaje, la especie de 38 kDa parcialmente glucosilada (WT-38), y las especies truncadas en el residuo 270 no glucosilada (apo- Δ 270) y parcialmente glucosilada (WT- Δ 270). La interrupción de la secuencia de glucogenina en el residuo 270 da lugar a una proteína de 31 kDa más estable, sin pérdida de actividad (51, 90). También se utilizaron las siguientes mutantes inactivas para la autoglucosilación: la mutante simple Y194F- Δ 270 que carece de capacidad aceptora, la doble mutante D159S/Y194F- Δ 270 que carece tanto de la actividad glucosilante como de capacidad aceptora, y la mutante T82M- Δ 270. La mutación T82M ha sido descrita como causante de una enfermedad humana provocada por una deficiencia en la actividad de glucogenina, lo que la hace incapaz de generar sustrato inicial que da comienzo a la biosíntesis *de novo* de proteoglicógeno (92). Recientemente se determinó que la mutante recombinante T82M- Δ 270 carece de actividad autoglucosilante, transglucosilante e hidrolizante de UDP-glucosa, y que muestra una estructura tridimensional similar a la de apo- Δ 270 (93). También ha sido demostrado que la sustitución del aminoácido Tirosina-194 por Fenilalanina elimina su capacidad de actuar como sustrato aceptor, y que el reemplazo del Aspártico-159 por Serina elimina su actividad autoglucosilante (90), sin afectarse en esta última la estructura tridimensional (51).

1.5.3 - Expresión y purificación de glucogeninas

En nuestro laboratorio ya se contaba con la construcción necesaria para la expresión de la forma truncada en el residuo 270 de la glucogenina de conejo, preparada como se ha descrito anteriormente (91). El cDNA se encuentra inserto en el vector pET15b (Figura 1.9), próximo a una secuencia que codifica para 6 residuos de Histidina que quedan unidas al extremo amino terminal de la proteína recombinante, y permiten su posterior purificación. El plásmido resultante (pET15b-RGN31) se utilizó como molde para generar todas las mutantes por mutagénesis sitio dirigida, utilizando el kit QuikChange (Stratagene). Para la sustitución de los diferentes aminoácidos en la generación de las mutantes se diseñaron los siguientes oligonucleótidos, denotando los codones originales en verde y los cambios en rojo:

	Y194F-Δ270
Secuencia original (directa)	5' GCATTICTATATA TACT CTACCTCCC 3'
Directo	5' GCATTICTATATA TTC CTACCTCCC 3'
Reverso	5' GGGAGGTAGGA GA ATATAGAAATGC 3'

	D159S-Δ270
Secuencia original (directa)	5' GCAAGGCAGTTTT GAT GGTGGGACCAGGG 3'
Directo	5' GCAAGGCAGTTTT AGC GGTGGGACCAGGG 3'
Reverso	5' CCCTGGTCCCCACCG CT AAAACCTGCCTTGC 3'

Se hicieron 18 ciclos entre las etapas 2 y 4, y se utilizó la ADN polimerasa *Pfu*. En todos los casos, una alícuota del producto de PCR se incubó con la enzima Dpn I para eliminar el ADN metilado (secuencia molde, proveniente de la bacteria), que luego se empleó para transformar células de la cepa XL1Blue de *E. coli* para aumentar la cantidad de plásmido, que luego fue purificado. Como se observa en la Figura 1.9 el plásmido pET15b posee un promotor reconocido por la ARN polimerasa T7. Por esto, para la preparación de la especie truncada no glucosilada (apo- $\Delta 270$) el plásmido pET15b-RGN31 se transformó en la cepa de *E. coli* CGSC 4997, previamente lisogenizada para la incorporación sitio específica del gen que codifica para la ARN polimerasa T7, utilizando para ello el kit de lisogenización λ DE3 (Novagen). Para la obtención de la especie glucosilada WT- $\Delta 270$ y las mutantes se repitió el procedimiento con el plásmido correspondiente empleando la cepa de *E. coli* Rosetta (DE3). Las transformaciones se llevaron cabo agregando 5 ng del plásmido correspondiente a 100 μ l de bacterias competentes. Primero se incubó la mezcla durante 30 minutos en hielo, a continuación se la llevó a 42°C durante 70 segundos, e inmediatamente después se la colocó nuevamente en hielo durante 5 minutos. Luego se le agregaron 200 μ l de medio LB y se la incubó por 1 hora a 37°C. Por último se plaquearon las bacterias transformadas en cápsulas de petri con medio LB-agar que fueron incubadas a 37°C durante 18 horas.

Para la obtención de las proteínas típicamente, se cultivó 1 litro de medio LB a 37°C hasta alcanzar una OD de 0,8 -1,0 para luego inducir la expresión de la enzima recombinante con IPTG csp 0,15 mM, e incubando a 20° C durante 18 horas. Las células se recogieron por centrifugación a 3500 x g durante 10 minutos, se resuspendieron en buffer A, y se lisaron utilizando el dispositivo EmulsiFlex-C3 (Avestin, Inc., Ottawa, Canadá). Para la purificación de las glucogeninas-His6tag, el lisado fue centrifugado a 10000 x g, y se pasó el sobrenadante a un flujo de 1 ml/min a través de una columna de afinidad HisTrap FF (1 ml), previamente equilibrada en buffer A. Luego de la siembra se conectó la columna al equipo ÄKTA Purifier (GE Healthcare), y se la lavó con buffer A hasta obtener un registro de absorbancia a 280 nm estable. Las proteínas se eluyeron haciendo un gradiente de 20 ml entre el buffer A y buffer B, recolectando alícuotas de 1 ml. Se analizaron las fracciones por SDS-PAGE discontinuo con 15% de acrilamida en el gel separador y 3% en el gel concentrador, según el método descrito por Laemmli (95), utilizando el equipo Miniprotean III Dual Slab Cell Electrophoresis System (BioRad) para la preparación de los geles. Para

realizar la corrida se agregó a cada muestra SB 3X (csp 1X) y luego se las calentó a 100° C durante 3 minutos. La electroforesis se realizó a 200 V durante 50 minutos. Para la visualización de las proteínas se sumergieron los geles en una solución de azul de Coomassie durante 30 minutos, y luego se realizaron sucesivos lavados con solución desteñidora. La identificación a partir de la estimación de sus pesos moleculares se hizo posible mediante el uso de proteínas estándar. A partir del análisis del SDS-PAGE se seleccionaron y juntaron aquellas fracciones que contenían sólo la enzima recombinante de interés, las que fueron concentradas y desaladas utilizando unidades de filtración para centrifuga Amicon Ultra-4 y Ultra-15 con un límite de peso molecular nominal de 10,000 Da, a 1500 x g y buffer Tris-HCl 20 mM (pH 7,5) conteniendo sacarosa 0,24 M. Finalmente se almacenaron a -20° C.

1.5.4 - Cristalización y determinación de estructuras tridimensionales

Las mutantes de glucogenina Y194F- Δ 270 y D159S/Y194F- Δ 270 en una concentración de 10 mg/ml se emplearon para obtener cristales en presencia de PEG monometiléter 5000 12%, MES 0,1 M (pH 6,5), y sulfato de amonio 0,2 M utilizando el método de difusión de vapor en gota colgante a 4° C, como se describió previamente (51). Previo a las mediciones de difracción los cristales fueron sumergidos en una solución crioprotectora que contenía 70 % de la solución de cristalización y 30 % de glicerol, e inmediatamente congelados en nitrógeno líquido. Los datos de difracción fueron medidos en la línea de cristalografía de proteínas D03B-MX1 (longitud de onda 1,430 Å) del Laboratorio Nacional de Luz Síncrotrón (LNLS, Campinas, Brasil) a 100 K usando un detector CCD Marresearch. Los datos fueron procesados y escalados utilizando los programas MOSFLM (96) y Scala (97). El subsecuente análisis de los datos cristalográficos fue realizado utilizando el paquete de programas CCP4 (98). Las estadísticas de los datos de difracción del conjunto de datos seleccionado se resumen en la Tabla 1.1. Dado que los cristales de ambas mutantes de glucogenina son isomorfos con respecto a los de la proteína sin modificar, se utilizó la estructura refinada de apo- Δ 270 (sin moléculas de solvente) (93) como modelo de partida para el refinamiento de las estructuras de Y194F- Δ 270 y D159S/Y194F- Δ 270, usando el programa REFMAC5 (99). Después de ubicar las cadenas laterales de los aminoácidos Ser-159 y Phe-194, los modelos fueron sometidos a sucesivos ciclos del refinamiento, alternados con inspección manual y la construcción del modelo con los programas de REFMAC5 y

Coot (100). En las etapas finales de refinamiento se añadieron moléculas de solvente a los modelos, basándose en el análisis de los mapas de densidad electrónica.

1.5.5 - Ensayos de autoglicosilación

Los ensayos de autoglicosilación de glucogenina en su forma monomérica (0,04 μM), dimerica (4 μM) y de los distintos heterodímeros con las mutantes, obtenidos como se detalla en cada caso, se llevaron a cabo incubando la cantidad correspondiente de proteína con 320 μM de UDP-[^{14}C]-glucosa (20 mCi/mmol) en presencia de 0,1 M MES (pH 7,0), 5 mM MnSO_4 y BSA 1 mg/ml a 30° C, en un volumen final de 10 μl para el dímero y 100 μl para el monómero y los heterodímeros. A menos que se indique lo contrario, el tiempo de incubación fue de 60 minutos. Como se describiera anteriormente (101), la cantidad de [^{14}C]-glucosa incorporada se cuantificó mediante la precipitación de la proteína con 200 μl de una solución fría de TCA/PTA 5%/0,5% después de la adición de 6 μl de albúmina sérica bovina 10%. La mezcla se enfrió en hielo durante 5 minutos y se centrifugó a 13.000 xg durante 5 minutos a 4° C. El precipitado se lavó dos veces, por centrifugación y resuspensión por sonicación (Sonifier B12, Branson Sonic Power Company) en 0,4 ml de la misma solución de TCA/PTA. Luego, el precipitado se solubilizó por sonicación en 0,2 ml de SDS 20% y 20 μl de Tris 0,1 M. Luego se mezcló con 1 ml de solución de centelleo y se midió la radiactividad incorporada en un contador de centelleo líquido (RackBeta modelo 1214, Pharmacia) para determinar la cantidad de [^{14}C]-glucosa unida covalentemente a la glucogenina. A menos que se indique lo contrario, los resultados representan el valor promedio de tres experimentos independientes, y las barras de error muestran la desviación estándar.

1.5.6 - Cromatografía de Exclusión Molecular

La cromatografía de filtración en gel se llevó a cabo en una columna Superdex 75 (24 ml) como se ha descrito previamente (91) equilibrada en buffer fosfato 0,1 M (pH 7,4) y 0,1 M de NaCl. La columna se calibró utilizando como marcadores de peso molecular azul de dextrano (para determinar el volumen vacío), albúmina de sérica bovina (67 kDa), ovoalbúmina (43 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa) y quimotripsina

(25 kDa). La especie apo- $\Delta 270$ a una concentración monomérica de 0,1 μM se sometió a autoglucosilación incubando con 10 μM UDP-[^{14}C]-glucosa en buffer MES 0,1 M y Mn_2SO_4 5 mM durante 5 minutos, y se sembró en la columna antes, o después de mezclar y equilibrar durante 20 minutos con albúmina o con las mutantes T82M- $\Delta 270$, Y194F- $\Delta 270$ y D159S/Y194F- $\Delta 270$ a una concentración de 20 μM . También se sembró una muestra del dímero de apo- $\Delta 270$ a una concentración de 20 μM , previamente ^{14}C -autoglucosilada en las mismas condiciones descritas más arriba. La columna se hizo funcionar con un flujo de 0,5 ml/min y se recogieron fracciones de 0,2 ml. A cada fracción se agregó 1 ml de solución de centelleo y se midió la radiactividad incorporada como se ha descrito en el apartado anterior.

1.5.7 - Autorradiografías

El monómero de glucogenina y los heterodímeros con las distintas mutantes fueron autoglucosilados utilizando como sustrato dador UDP-[^{14}C]-glucosa, como se describió anteriormente. Luego las muestras se corrieron en SDS-PAGE con 12% de acrilamida en el gel separador y 3% en el gel concentrador, siguiendo la misma metodología del apartado 1.4.3. Posteriormente los geles se tiñeron con azul de Coomassie y se secaron durante 1 hora a 80°C en secador de geles BioRad (modelo 583). Posteriormente fueron expuestos durante 4 días a una placa de imagen FUJIFLM, que acumula y almacena la energía radioactiva emitida. Finalmente se obtuvo la imagen que reveló la existencia de señales radiactivas en un analizador de imágenes fluorescentes FLA-3000 (FUJIFILM).

1.5.8 - Espectrometría de Masas

La espectrometría de masas con ionización por electrospray (MS-ESI) se llevó a cabo en un espectrómetro Micromass Q-TOF (Waters, Milford, Massachusetts) en el Laboratorio de Recursos Biotecnológicos W.M. Keck de la Universidad de Yale. Se analizaron dos muestras, una sin autoglucosilar y otra en su grado máximo de autoglucosilación. Las muestras se prepararon con apo- $\Delta 270$ 4,0 μM (320 pmoles) sin o con la presencia de 320 μM UDP-glucosa, en 0,1 M MES y 5 mM MnSO_4 , incubando a 30° C durante 60 minutos. Ambas muestras se precipitaron y lavaron dos veces con acetona fría. Para la inyección de las muestras en el espectrómetro de masas, el material

seco se resuspendió en 10 μ l de una solución compuesta por acetonitrilo 60% y ácido fórmico 0,1%.

CAPITULO 2

**CARACTERIZACIÓN DE LA ENZIMA RAMIFICANTE DEL
GLUCÓGENO HUMANA**

2.1 - INTRODUCCIÓN

La deficiencia en actividad de la enzima ramificante humana (HBE) es causante de una afección llamada Glucogenosis tipo IV (GSD-IV, por sus siglas en inglés de Glycogen Storage Disease type IV), o enfermedad de Andersen (83). GSD-IV es una enfermedad autosomal recesiva, que presenta acumulación de glucógeno pobremente ramificado y con cadenas externas más largas, que lleva a la formación de un polisacárido con estructura similar a la amilopectina (razón por la cual también se la denomina "amilopectinosis"). Clínicamente es un trastorno muy variable y con una notable heterogeneidad, presentándose comúnmente con cirrosis progresiva en los primeros 18 meses de vida, hepatoesplenomegalia y falla en el desarrollo, conduciendo generalmente a la muerte antes de los 5 años de vida (84,85). También se han reportado casos en los que se ha detectado una forma neuromuscular de la enfermedad, manifestándose con diferentes grados de severidad, que puede ir desde hipotonía y atrofia muscular severas e implicancias neuronales que pueden llevar a la muerte en el período neonatal (86), hasta miopatía y cardiopatía en jóvenes (87), o disfunciones en el sistema nervioso central y periférico con acúmulo de cuerpos poliglucosanos en el sistema nervioso en adultos (87).

Por otra parte, la actividad de HBE en su estado nativo podría estar regulada por modificaciones post-traducción como acetilación y fosforilación. En un reporte donde se realizó un acetiloma en tres líneas celulares tumorales (Jurkat, A549 y MV4-11) se identificó a HBE como una de las 1750 proteínas que se encontraron acetiladas (102). La modificación ocurriría sobre el aminoácido Lisina-86, cambiando drásticamente la carga neta de la cadena lateral, lo cual afecta de diversas maneras la función de algunas proteínas (103, 104). La evidencia que señala que HBE puede ser fosforilada se obtuvo en un estudio similar, en el que se realizó un fosfoproteoma en tres líneas tumorales

(Jurkat, Karpas 299 y SU-DHL-1). El aminoácido identificado como aceptor de esta modificación fue la Tirosina-173 (105). Hasta el momento no se ha publicado ningún estudio que confirme si alguna de esas modificaciones modula la actividad de HBE. Se ha demostrado para otras enzimas involucradas en el metabolismo del glucógeno que sus actividades se ven reguladas por fosforilación y/o acetilación. Un buen ejemplo lo constituye la enzima fosforilasa de glucógeno, que es activada/inactivada por fosforilación reversible (106, 107), mientras que la acetilación la inactiva de dos maneras, disminuyendo directamente su actividad y promoviendo su defosforilación (108). Otro ejemplo es la glucógeno sintasa, cuya actividad catalítica se encuentra regulada a través de múltiples sitios de fosforilación (109).

Hasta el momento ninguna enzima ramificante de glucógeno (GBE) de mamífero ha sido producida de manera recombinante. Sólo existen reportes de estudios bioquímicos y biofísicos en los que se utilizan GBEs recombinantes de origen bacteriano (110-114), y otros realizados con enzimas de origen vegetal como la de maíz (115) o arroz (116), denominadas en este caso enzimas ramificantes del almidón (SBE). Consecuentemente, sólo se ha resuelto la estructura cristalina de 3 GBEs de origen bacteriano (80, 117, 118) y una SBE de arroz (119, 120). Muy recientemente, se ha depositado en la base de datos de estructuras tridimensionales Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/>) la estructura cristalina de la enzima ramificante del glucógeno humana (PDB ID: 4BZY), aunque no se ha publicado ningún trabajo al respecto, posiblemente debido a que la resolución y los parámetros estadísticos que dan cuenta de la calidad de la estructura no son muy buenos.

Existen tres ensayos ampliamente utilizados para medir la actividad de enzimas ramificantes de glucógeno y almidón. Uno utiliza el estímulo de la actividad de la enzima glucógeno fosforilasa. Esta enzima es conocida por su actividad en la degradación del glucógeno, liberando glucosa-1-fosfato y utilizando para ello iones fosfato. En presencia de un exceso de glucosa-1-fosfato, el equilibrio se desplaza y la enzima cataliza la reacción inversa, incorporando glucosa en el extremo no reductor de una cadena lineal preexistente, formando enlaces α -1,4. Por lo tanto si se incubaba un sustrato como la amilosa con la enzima ramificante, se generará una mayor cantidad de extremos no reductores, aumentando así la cantidad de sustratos aceptores sobre los que la fosforilasa puede actuar (66). Otro ensayo consiste en el uso de la enzima isoamilasa, que hidroliza enlaces α -1,6 y libera las cadenas que en una etapa anterior fueron transferidas por la enzima ramificante, generando nuevos extremos reductores. Luego se

cuantifican las cadenas liberadas comparando el poder reductor del sustrato antes y después de haber sido sometido a la acción de estas dos enzimas (121, 122). El tercer ensayo utiliza la propiedad que tienen los α -glucanos de formar un complejo coloreado cuando se los mezcla con una solución de I_2/I^- (123). El complejo formado tiene un pico de absorbancia que depende de la longitud de la cadena del oligosacárido (124), que va desde los 490 nm (cadenas de 12-14 glucosas) hasta los 645 nm (cadenas de más de 550 glucosas). La amilosa forma un complejo de color azul intenso, la amilopectina uno rojo-púrpura y el glucógeno uno rojo-pardo. Cuando un glucano como amilosa o amilopectina, es sometido a la acción de la enzima ramificante, disminuye la longitud de onda del pico de absorción característico del complejo con I_2/I^- , debido a la disminución de la longitud promedio de las cadenas. Este corrimiento de máxima absorbancia no es específico de la acción de la enzima ramificante ya que una enzima que hidroliza enlaces α -1,4 como la α -amilasa, produce similar corrimiento debido a la disminución de la longitud promedio de las cadenas. Cuando el ensayo de enzima ramificante de glucógeno (o de almidón) es realizado utilizando amilosa, la actividad se determina monitoreando la disminución de la absorbancia a 660 nm, mientras que si se usa como sustrato amilopectina las mediciones se realizan a 530 nm (125).

2.2 - OBJETIVOS

El objetivo perseguido en este capítulo fue intentar obtener la enzima ramificante de glucógeno humana (HBE) soluble y funcionalmente activa, para su estudio estructural, bioquímico y cinético. Para llevar a cabo esto, se planeó expresar la enzima de manera recombinante en células de insecto Sf9, utilizando el sistema baculovirus.

Para los estudios bioquímicos y cinéticos se se procurará adaptar la técnica de electroforesis de carbohidratos asistida por fluoróforo (FACE o PAGEFS; ref. 35), que permita analizar el perfil del tamaño de las cadenas transferidas por HBE.

También se realizarán ensayos destinados a analizar la posibilidad de que HBE pueda utilizar la cadena lineal de glucosas unida covalentemente a glucogenina, generada por autoglucosilación, como sustrato para la introducción de la primera ramificación del proteoglucógeno.

2.3 - RESULTADOS

2.3.1 - Expresión y purificación de la enzima ramificante de glucógeno humana (HBE)

Para la producción heteróloga de la enzima ramificante de glucógeno humana (HBE) se utilizó el kit comercial Baculodirect® (Invitrogen) para la expresión de proteínas en células de insecto. El sistema hace uso de la tecnología Gateway® (126, 127) para la introducción del gen de interés en el genoma viral, colocándolo bajo el control del promotor de la polihedrina, una proteína que tiene altos niveles de expresión en estadios muy avanzados de infección. Con el virus recombinante se infecta la línea celular Sf9 derivada de tejido de insecto (*Spodoptera frugiperda*), y la proteína de interés es expresada durante el ciclo vital del baculovirus.

Se logró introducir con éxito el gen que codifica para HBE en el genoma viral linealizado (noinfectivo), contiguo a una secuencia de 6 histidinas (His6tag) ubicadas en su extremo N-terminal. Esto produce la circularización del baculovirus, que luego es transfectado en las células Sf9, donde comienza por primera vez su ciclo de vida. El stock viral se obtiene a partir del medio de cultivo resultante, centrifugado para eliminar residuos sólidos, y es almacenado a 4 °C. Posteriormente se realizan sucesivas infecciones para amplificar el título del virus, utilizando una alícuota del medio de cultivo recuperado de una infección para infectar el siguiente cultivo celular fresco. Durante estas etapas se realizaron pruebas de expresión de HBE en células Sf9 para cada stock viral con el fin de determinar que el título fuese suficiente para la producción de la proteína a gran escala. Los ensayos fueron hechos en placas de poliestireno de 6 pocillos, y por lo general en cada placa se analizaron dos cantidades diferentes de stock, a tres tiempos post infección. La presencia de HBE fue examinada por SDS-PAGE,

posterior electrotransferencia a una membrana de PVDF e inmunodetección con los anticuerpos primarios anti-GBE1 (policlonal, Proteintech Group) que reconoce a la enzima ramificante de glucógeno humana, y anti-His₆tag que reconoce la secuencia de 6 histidinas unida al extremo amino terminal de HBE. En la Figura 2.1 se muestra el análisis de una prueba de expresión realizada con el stock viral final, durante 5, 6 y 7 días post infección, utilizándose el anticuerpo anti-GBE1 para la identificación de HBE. Para controlar la expresión de la enzima se sembraron alícuotas del lisado total de cada muestra (Figura 2.1 A y B, carriles impares), y para verificar cual es la proporción de enzima expresada en forma soluble, se sembraron alícuotas del sobrenadante producto de la centrifugación del lisado celular (Figura 2.1 A y B, carriles pares). Como puede apreciarse, con el stock viral utilizado, a partir del quinto día post infección la cantidad de HBE recuperada comienza a disminuir. Por otro lado, en los sobrenadantes (Figura 2.1-B, carriles pares) el anticuerpo anti-GBE1 reconoció dos bandas, una de 40 kDa y otra con una movilidad esperada para la enzima intacta (el peso molecular teórico es de 80 kDa).

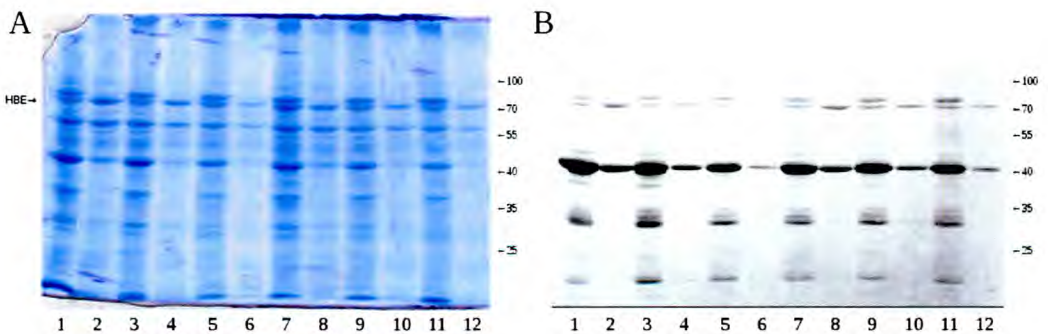


Figura 2.1: Ensayo de expresión de HBE en células Sf9 en función del tiempo y de la cantidad de baculovirus recombinante utilizada en la infección. Alícuotas del lisado total (carriles impares) y del sobrenadante (carriles pares) fueron sometidas a SDS-PAGE y posterior electrotransferencia a una membrana de PVDF. El material proteico remanente en el gel de poliacrilamida fue visualizado mediante tinción con azul de Coomassie (A), y la presencia de HBE en membrana de PVDF fue analizada mediante inmunodetección con un anticuerpo anti-GBE1 (B). En este caso se presentan pruebas realizadas en placas de 3,5 cm, con 50 y 100 μ l de stock viral (carriles 1 a 6, y 7 a 12, respectivamente), durante 5 (carriles 1, 2, 7 y 8), 6 (carriles 3, 4, 9 y 10) y 7 días post infección (carriles 5, 6, 11 y 12).

En la Figura 2.2 se muestra una prueba de expresión a 3, 4 y 5 días post infección, donde se utilizó el anticuerpo anti-His₆tag para la identificación de HBE. Este análisis no cuenta con un control de carga que permita una correcta determinación del nivel máximo de expresión de HBE en función del tiempo de infección. Sin embargo, en base

a las señales registradas para las bandas correspondientes a HBE de la Figura 2.2, y teniendo en cuenta el nivel de infección observado a través de la morfología de las células Sf9, se consideró que la máxima expresión de la enzima recombinante se obtuvo al quinto día post infección. El anticuerpo anti-His6tag generó una señal más intensa con una banda de 30 kDa (Figura 2.2). Por otro lado, con el anticuerpo anti-GBE1 la señal más intensa registrada había sido la de la banda que se corresponde con un peso molecular de 40 kDa (Figura 2.1 A). El patrón de bandas de mayor movilidad que la correspondiente a HBE reconocido por los anticuerpos podía ser el resultado de algún tipo de actividad proteolítica. Para confirmarlo, y buscando prevenirla, se llevaron a cabo pruebas de protección contra la degradación mediante el agregado de los inhibidores Leupeptina (inhibidor de cisteína, serina y treonina peptidasas), Pepstatina-A (aspartil proteasa), Cloroquina (inhibidor a nivel lisosomal), MG132 y Lactacistina (ambos inhibidores proteosomales). En la Figura 2.3 se puede visualizar que Leupeptina podría ofrecer un cierto grado de protección frente a la proteólisis. A 5 días post infección se alcanzó a diferenciar un leve aumento en la cantidad de HBE recuperada con la concentración de Leupeptina más elevada (48 µg/ml) (Figura 2.4). Por consiguiente Leupeptina a esa concentración fue utilizada en todas las posteriores expresiones de HBE. El resto de los inhibidores no presentaron diferencias significativas en las cantidades de HBE que se registraron en las pruebas de expresión.

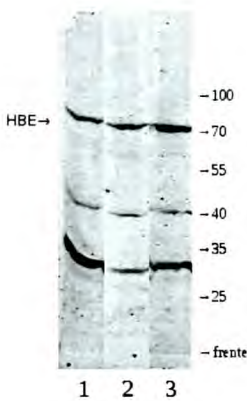


Figura 2.2: Inmunodetección de HBE en un análisis de la expresión en función del tiempo de células Sf9 cosechadas a 3, 4 y 5 días post infección (carriles 1, 2 y 3 respectivamente; sólo fracciones solubles). Para la visualización de las bandas se utilizó el anticuerpo anti-His6tag.

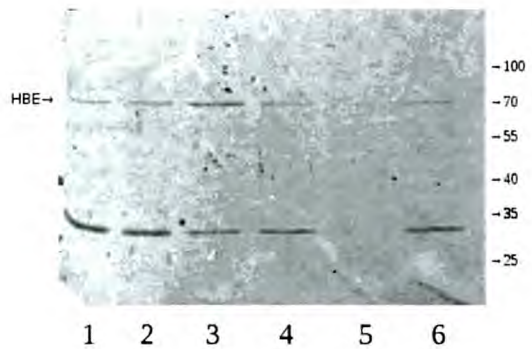


Figura 2.3: Inmunodetección de HBE en un ensayo de inhibición de proteólisis en células Sf9 infectadas con baculovirus recombinante durante 5 días, utilizando Pepstatina A (carril 2), Leupeptina (carril 3), MG132 (carril 4), Lactacistina (carril 5) y Cloroquina (carril 6). En el carril 1 se sembró un control sin inhibidor. Para la visualización de las bandas se utilizó el anticuerpo anti-His6tag. Sólo se sembraron las fracciones solubles del lisado celular.

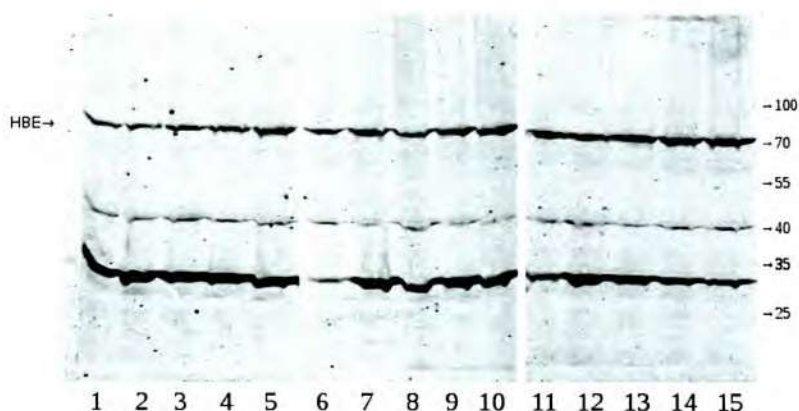


Figura 2.4: Inmunodetección de HBE en un ensayo de inhibición de proteólisis en células Sf9 infectadas con baculovirus recombinante durante 3 días (carriles 1 a 5), 4 días (carriles 6 a 10) y 5 días (carriles 11 a 15), utilizando Leupeptina en concentración 6 µg/ml (carriles 2, 7 y 12), 12 µg/ml (carriles 3, 8 y 13), 24 µg/ml (carriles 4, 9 y 14) y 48 µg/ml (carriles 5, 10 y 15). En los carriles 1, 6 y 11 se sembraron controles sin inhibidor. En cada carril se sembraron 15 µl de la fracción soluble del lisado celular. Para la visualización de las bandas se utilizó el anticuerpo anti-His₆tag.

La HBE se encuentra fusionada en su extremo amino terminal a una secuencia de 6 histidinas que permitió su purificación por cromatografía de afinidad con metal inmovilizado (IMAC) en la columna HisTrap FF, cargada con iones Ni²⁺ (128). Para la producir la HBE en cantidad conveniente se infectaron células Sf9, utilizando la concentración de stock viral suficiente para que se genere un pico en la expresión de HBE a los 5 días post infección. El volumen de sobrenadante conteniendo baculovirus recombinante utilizado fue diferente dependiendo del stock viral empleado, variando entre 0,03 y 0,05 ml/ml de medio de cultivo. De esta manera, para obtener una buena cantidad de HBE, se infectaron no menos de 6 placas de 10 cm de diámetro conteniendo 5 x 10⁶ células por placa. Pasados 5 días de infección se lisaron las células y se purificó HBE en la columna de afinidad, como se indica en los procedimientos experimentales. Para la cromatografía de afinidad en la citada columna se empleó el equipo Äkta Purifier que permitió hacer un gradiente de concentración de imidazol entre 10 mM y 250 mM, monitorear la elución de proteínas a 280 nm, recolectando el eluato en fracciones de 0,5 ml.

En la Figura 2.5 se muestra el cromatograma correspondiente a una purificación de HBE realizada a partir de la infección de 6 placas de 10 cm de células Sf9 (60 ml de medio de cultivo). En el cromatograma pueden identificarse 2 picos de absorbancia

correspondientes a material proteico eluido con diferentes concentraciones de imidazol. La identidad del eluato fue examinada por SDS-PAGE, analizando alícuotas de 20 μ l de cada fracción. En la Figura 2.6 se muestra el gel de poliacrilamida correspondiente al análisis de las fracciones 5 a 18 del ensayo presentado en la Figura 2.5. Se reunieron las fracciones 10 a 18, obteniendo un rendimiento aproximado de 0,8 mg de HBE/100 ml de medio de cultivo. Una vez purificada, la enzima se mantuvo estructural y funcionalmente estable al menos por 6 meses, almacenada a 4° C en buffer Tris-HCl 20 mM, conteniendo glicerol 10 %.

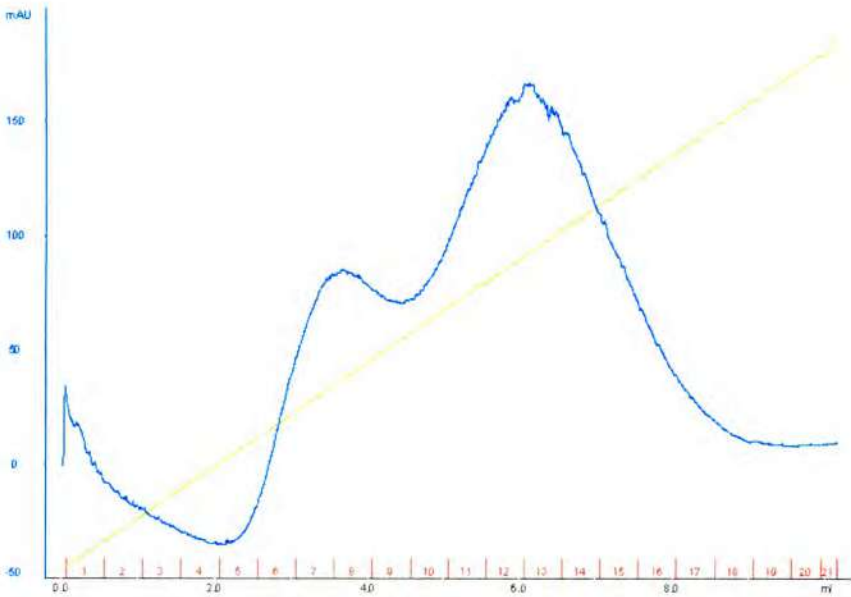


Figura 2.5: Cromatograma de una purificación de HBE en columna de afinidad HisTrap FF. Los colores del registro corresponden a la absorbancia relativa medida a 280 nm (azul), el avance del gradiente entre el buffer B y el buffer C (verde) y el número de la fracción recolectada (rojo). En el eje de las abscisas se representa el volumen de elución, y en el de las ordenadas el valor de la absorbancia.

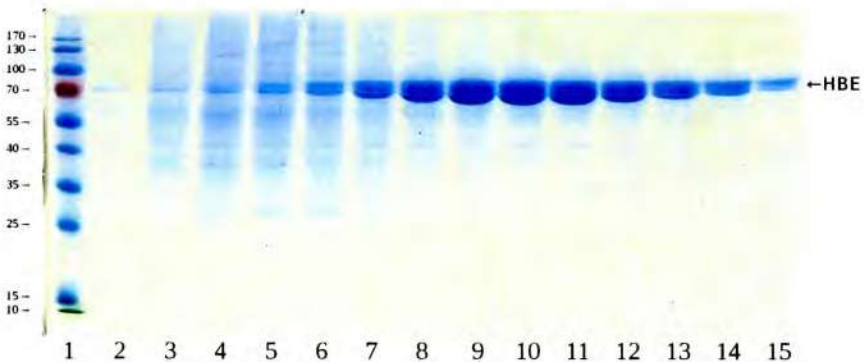


Figura 2.6: SDS-PAGE con alícuotas de 20 μ l de las fracciones 5 a 18 (carriles 2 a 15) de la elución de la Figura 2.5. En el carril 1 se sembró una alícuota de estándares proteicos preteñidos. La visualización de las bandas se realizó mediante tinción con azul de Coomassie.

2.3.2 - Medición de actividad a través del complejo amilosa-iodo

A continuación se describen los resultados obtenidos al medir la actividad de HBE expresada en células Sf9, utilizando la disminución de la absorbancia del complejo amilosa-iodo (125). Inicialmente se obtuvieron las curvas espectrales del complejo amilosa-iodo, registradas entre 400 y 700 nm, luego de incubar la amilosa con HBE durante diferentes tiempos, observándose tanto el corrimiento del pico de máxima absorbancia (Figura 2.7-A), como la disminución de absorbancia a 660 nm en función del tiempo de incubación (Figura 2.7-B). Existe una amplia variedad de enzimas que degradan oligoglucanos como la amilosa, disminuyendo así la longitud promedio de sus cadenas. En la Figura 2.8 se muestra la similitud que los resultados obtenidos con HBE presentan con las curvas espectrales y la disminución de la absorbancia a 660 nm en función del tiempo, producidos al incubar amilosa con α -amilasa. Esta comparación pone de manifiesto el carácter inespecífico que posee la medición de la actividad de HBE a través de la absorbancia del complejo amilosa-iodo.

A medida que avanza el tiempo de reacción, la longitud de onda correspondiente a la absorbancia máxima va acercándose al valor característico del complejo que forma el reactivo de yodo con amilopectina (530 nm). Los valores de la longitud de onda correspondientes a la absorbancia máxima a 0, 2, 4, 10 y 30 minutos de incubado con HBE fueron 618, 609, 600, 590 y 580 nm, respectivamente. Basado en datos bibliográficos que relacionan el grado de polimerización de la cadena con la longitud de onda de máxima absorbancia (124), en el experimento de la Figura 2.7-A se habría producido el acortamiento de cadenas con una extensión promedio no menor de 200 glucosas, alcanzando 55 glucosas en 30 minutos de incubación. La disminución de absorbancia a 660 nm en función del tiempo fue lineal hasta los 10 minutos. Del valor de la pendiente en la regresión lineal aplicada para los datos comprendidos entre 0 y 10 minutos, se obtuvo la disminución de la absorbancia a 660 nm por minuto. La unidad de actividad enzimática es definida como la disminución en una unidad de la absorbancia por minuto a 660 nm y en condiciones de velocidad inicial (8 minutos de incubación). En el ensayo que se describe, la actividad medida fue $0,025 \pm 0,003$ unidades y la actividad específica $31,295 \pm 3,445$ unidades/mg de HBE.

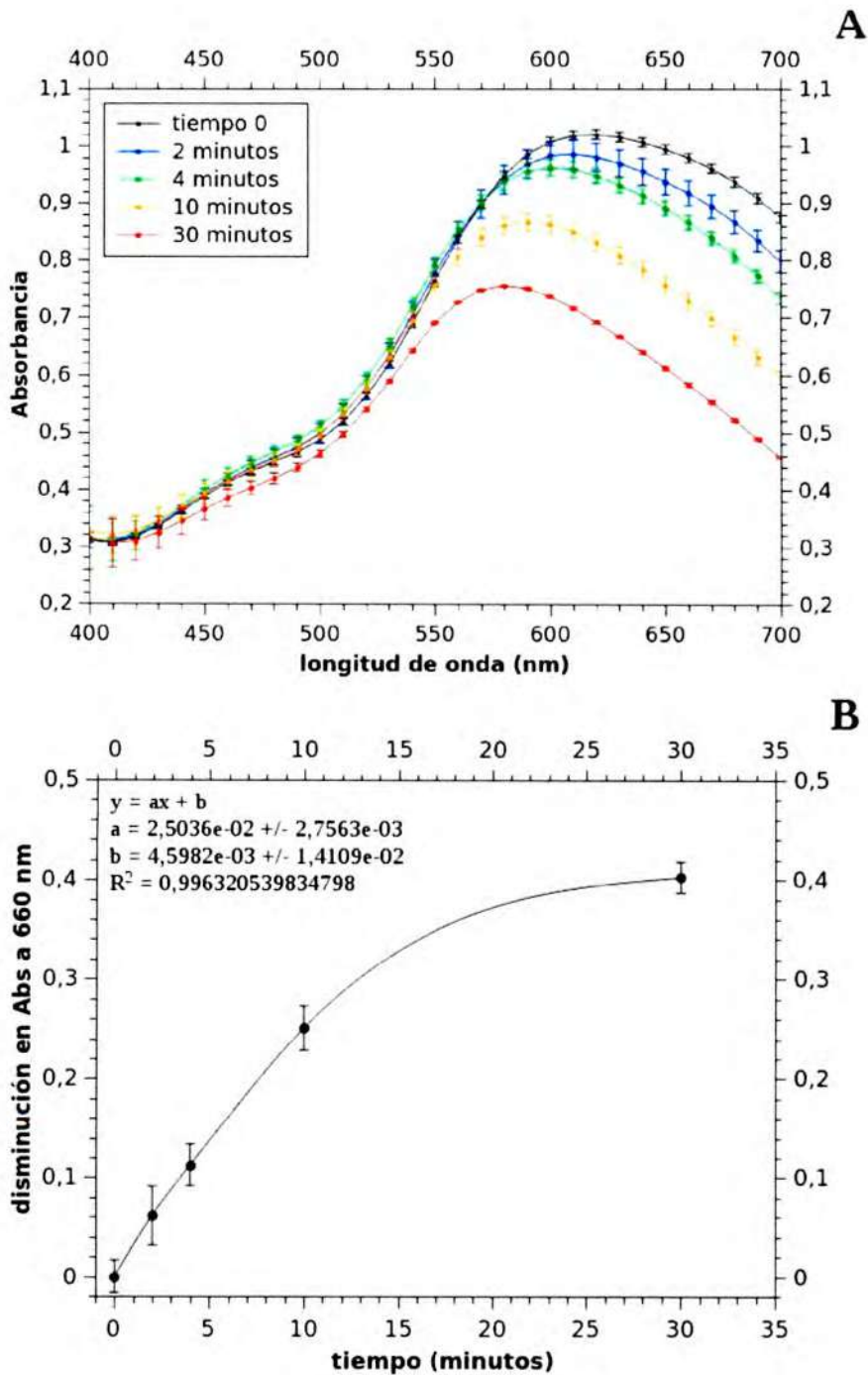


Figura 2.7: (A) Curvas espectrales del complejo que forma el reactivo de iodo con la amilosa (50 μg) luego de ser incubada con HBE (0,8 μg) en un volumen final de 50 μl , durante los tiempos indicados. Cada valor representa el promedio de 3 experimentos independientes, y las barras la desviación estándar. (B) Disminución de la absorbancia a 660 nm, calculada tomando los valores de absorbancia presentados en (A). En el extremo superior izquierdo se muestran los parámetros de una regresión lineal realizada sobre los datos comprendidos entre 0 y 10 minutos. En este caso la magnitud de las barras es el producto de la aplicación de propagación de errores sobre la desviación estándar de los datos utilizados para obtener el cambio en la absorbancia.

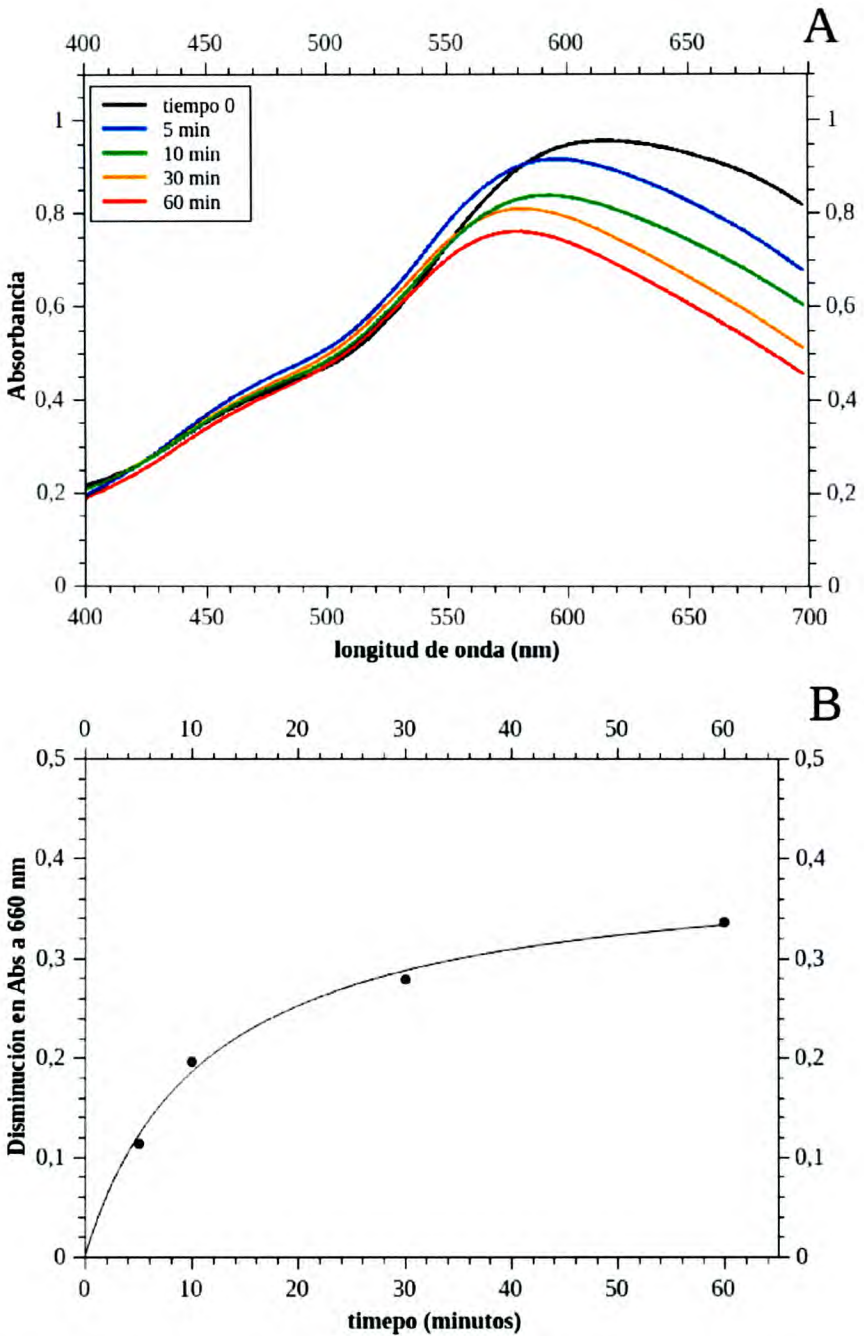


Figura 1.8: (A) Curvas espectrales del complejo que forma el reactivo de yodo con la amilasa (50 μg) luego de ser incubada con α -amilasa (1,5 μg) en un volumen final de 50 μl , durante los tiempos indicados. Las longitudes de onda de máxima absorción, en orden ascendente de tiempo de incubado, fueron 615, 597, 592, 582 y 579 nm. (B) Disminución de la absorbancia a 660 nm, calculada tomando los valores de absorbancia presentados en (A).

La determinación del rango lineal de actividad en función de la cantidad de enzima se muestra en la Figura 2.9. Se ensayaron entre 2,5 y 40 pmoles de HBE, obteniéndose linealidad hasta 12,5 pmoles. Si bien la cantidad más baja de HBE a la que pudo ser medida su actividad en las condiciones del ensayo fue 2,5 pmoles, el error asociado a dicha medición es muy grande (disminución de absorbancia a 660 nm $0,0327 \pm 0,0271$), por lo que se tomó como límite de cuantificación la siguiente cantidad de HBE analizada, o sea 5 pmoles (0,4 μ g, tomando un peso molecular teórico de 80445,8 Da), que genera una disminución en la absorbancia de $0,103 \pm 0,020$. Expresada la actividad en unidades, el límite de cuantificación fue de $0,0129$ U, siguiendo una relación lineal hasta $0,0305$ U, rango donde la actividad específica de HBE es constante.

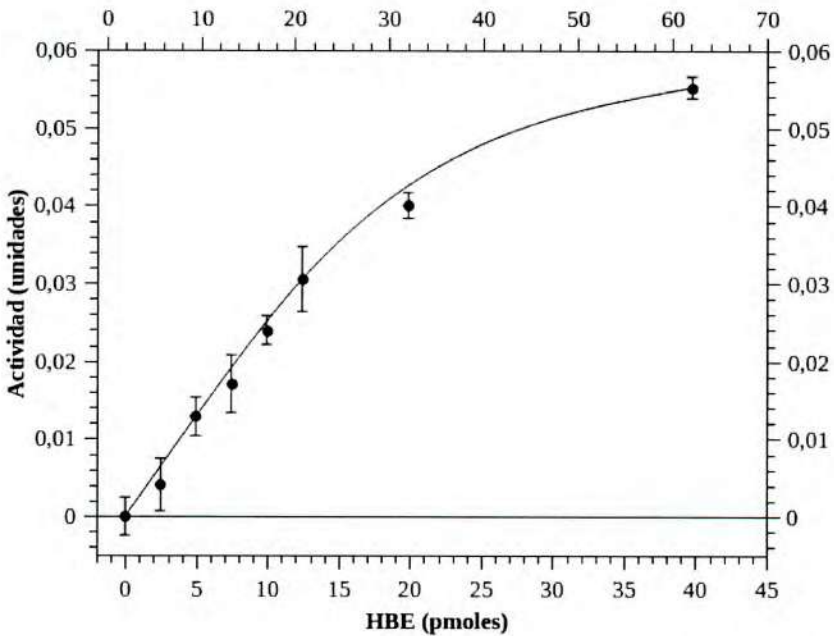


Figura 2.9: Actividad de HBE sobre amilosa en función de la concentración de enzima, medida a partir de la desaparición de sustrato.

En la Tabla 2.1 se presenta el valor la concentración de HBE correspondiente a cada cantidad analizada en la Figura 2.9, así como el cálculo de actividad específica para cada una.

HBE ($\mu\text{g/ml}$)	HBE (pmoles)	HBE ($\times 10^{-3}$ mg)	Actividad específica (unidades/mg)
4	2,5	0,2	$20,44 \pm 16,93$
8	5,0	0,4	$32,17 \pm 6,23$
12	7,5	0,6	$28,47 \pm 6,21$
16	10,0	0,8	$29,99 \pm 2,33$
20	12,5	1,0	$30,53 \pm 4,18$
32	20,0	1,6	$25,01 \pm 1,04$
64	40,0	3,2	$17,25 \pm 0,44$

Tabla 2.1: Cálculo de la actividad específica para cada punto del gráfico de la Figura 2.9. Con sombreado se denota el rango de concentraciones en el que se mantiene una linealidad entre la disminución de la absorbancia a 660 nm y la concentración de HBE. La primera columna representa la concentración de HBE en la mezcla de reacción (de 50 μl de volumen final), y será de utilidad en análisis posteriores.

Se determinaron las condiciones óptimas de pH y temperatura (Figura 2.10), obteniéndose un resultado muy similar a los reportados por otros autores en estudios realizados con enzimas ramificantes de diferentes orígenes, como *Mycobacterium tuberculosis*, *Escherichia coli*, *Synechocystis sp.* y *Bacillus stearothermophilus*, (15-18).

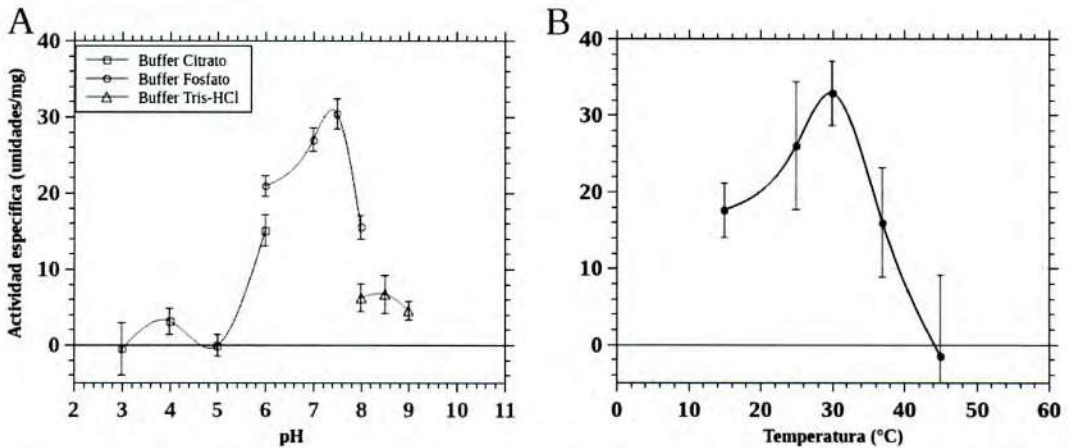


Figura 2.10: Actividad específica de HBE medida a 30° C en función del pH (A) y a pH 7,5 en función de la temperatura (B). La unidad de actividad representa una disminución de 1.0 en absorbancia por minuto. Las barras de error representan la desviación estándar de 3 medidas de absorbancia independientes.

2.3.3 - Identificación y cuantificación de las ramas generadas en amilosa por la HBE

Un método alternativo para la determinación de la actividad de la HBE la electroforesis de carbohidratos asistida por fluoróforo (FACE) mediante la que se pueden identificar y cuantificar las ramas generadas por la enzima sobre amilosa. La

derivatización de oligosacáridos con un fluoróforo, en este caso ANDS, necesita de los extremos reductores libres con los que el fluoróforo forma una base de Schiff (ver en Procedimientos Experimentales, Figura 2.22). Por lo tanto, luego de someter a la amilosa a la acción de HBE, se liberaron las cadenas transferidas mediante el uso de la enzima isoamilasa que hidroliza los enlaces α -1,6, las que fueron derivatizadas con ANDS y analizadas por electroforesis en gel de poliacrilamida sin SDS. Inmediatamente después de finalizada la corrida, el gel fue expuesto a una fuente UV-B (280-320 nm) y se tomaron imágenes con una cámara digital para identificar y cuantificar las bandas fluorescentes correspondientes a las cadenas liberadas, como se describe en Procedimientos Experimentales.

Con el fin de establecer las condiciones necesarias para cuantificar sólo los oligosacáridos originados por la acción conjunta de HBE e isoamilasa, se realizaron los controles pertinentes incubando amilosa, con y sin las mencionadas enzimas. Como puede observarse en la Figura 2.12-A, carril 2, el incubado de amilosa en ausencia de ambas enzimas no presentó niveles detectables de oligosacáridos de bajo peso molecular. Igual resultado se obtuvo al incubar amilosa con HBE sin la posterior isoamilólisis (Figura 2.12-A carril 3), mientras que en el incubado con isoamilasa sin la previa acción de la HBE, mostró bandas muy tenuemente visibles de oligosacáridos, posiblemente liberados por isoamilasa de alguna mínima impureza de amilopectina presente en la amilosa comercial utilizada como sustrato (Figura 2.12-A carril 4). Generalmente las corridas electroforéticas se realizaron hasta que el frente de corrida saliera del gel, logrando de esta manera eliminar el excedente de ANDS que origina una fuerte señal cuando se toma la fotografía. En el caso de los resultados presentados en la Figura 2.12, se dejó correr la electroforesis unos 5 minutos extra luego de la salida del frente de corrida, con el objeto de poder resolver mejor aquellos oligosacáridos de peso molecular mayor que maltoheptaosa. La movilidad de los azúcares está relacionada con el peso molecular, disminuyendo a medida que aumenta su masa, aunque se ha reportado que la estructura química también afecta la migración electroforética, pudiendo distinguirse entre isómeros de posición y algunos epímeros (129).

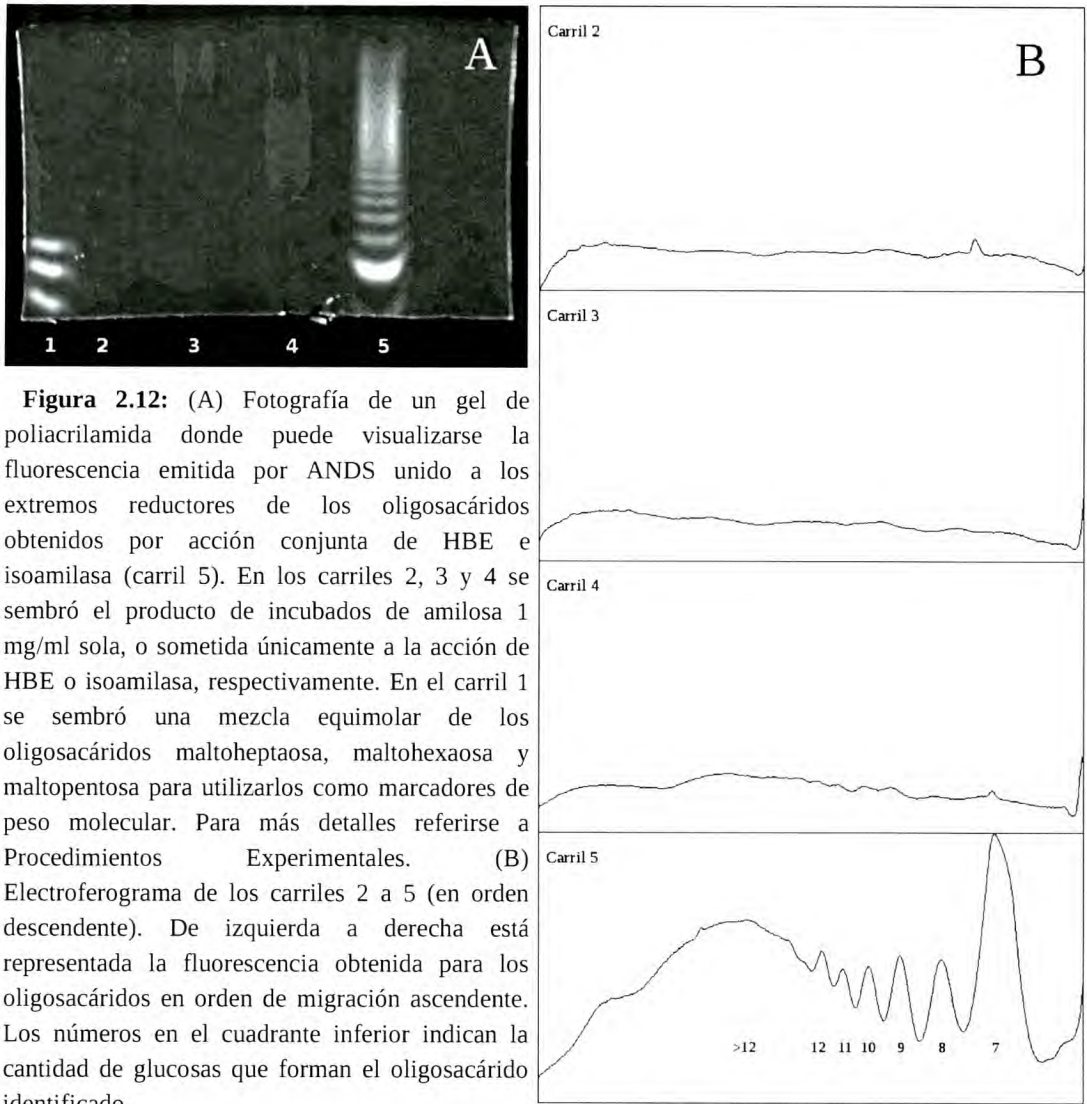


Figura 2.12: (A) Fotografía de un gel de poliacrilamida donde puede visualizarse la fluorescencia emitida por ANDS unido a los extremos reductores de los oligosacáridos obtenidos por acción conjunta de HBE e isoamilasa (carril 5). En los carriles 2, 3 y 4 se sembró el producto de incubados de amilosa 1 mg/ml sola, o sometida únicamente a la acción de HBE o isoamilasa, respectivamente. En el carril 1 se sembró una mezcla equimolar de los oligosacáridos maltoheptaosa, maltohexaosa y maltopentosa para utilizarlos como marcadores de peso molecular. Para más detalles referirse a Procedimientos Experimentales. (B) Electroferograma de los carriles 2 a 5 (en orden descendente). De izquierda a derecha está representada la fluorescencia obtenida para los oligosacáridos en orden de migración ascendente. Los números en el cuadrante inferior indican la cantidad de glucosas que forman el oligosacárido identificado.

2.3.3.1 - Cinética de formación de ramificaciones

En la Figura 2.13-A se muestra la fotografía correspondiente al análisis por FACE de reacciones donde amilosa fue sometida a la acción de HBE durante 0, 4, 10, 30 y 60 minutos. Como ya pudo advertirse de manera cualitativa en la Figura 2.12, la banda con mayor intensidad de fluorescencia corresponde a maltoheptaosa, indicando que HBE tiene preferencia por generar ramas de 7 glucosas (gel superior en la Figura 2.13-A). Además, el procedimiento desarrollado permitió determinar que maltohexaosa es la mínima porción oligoglucano que esta enzima es capaz de transferir.

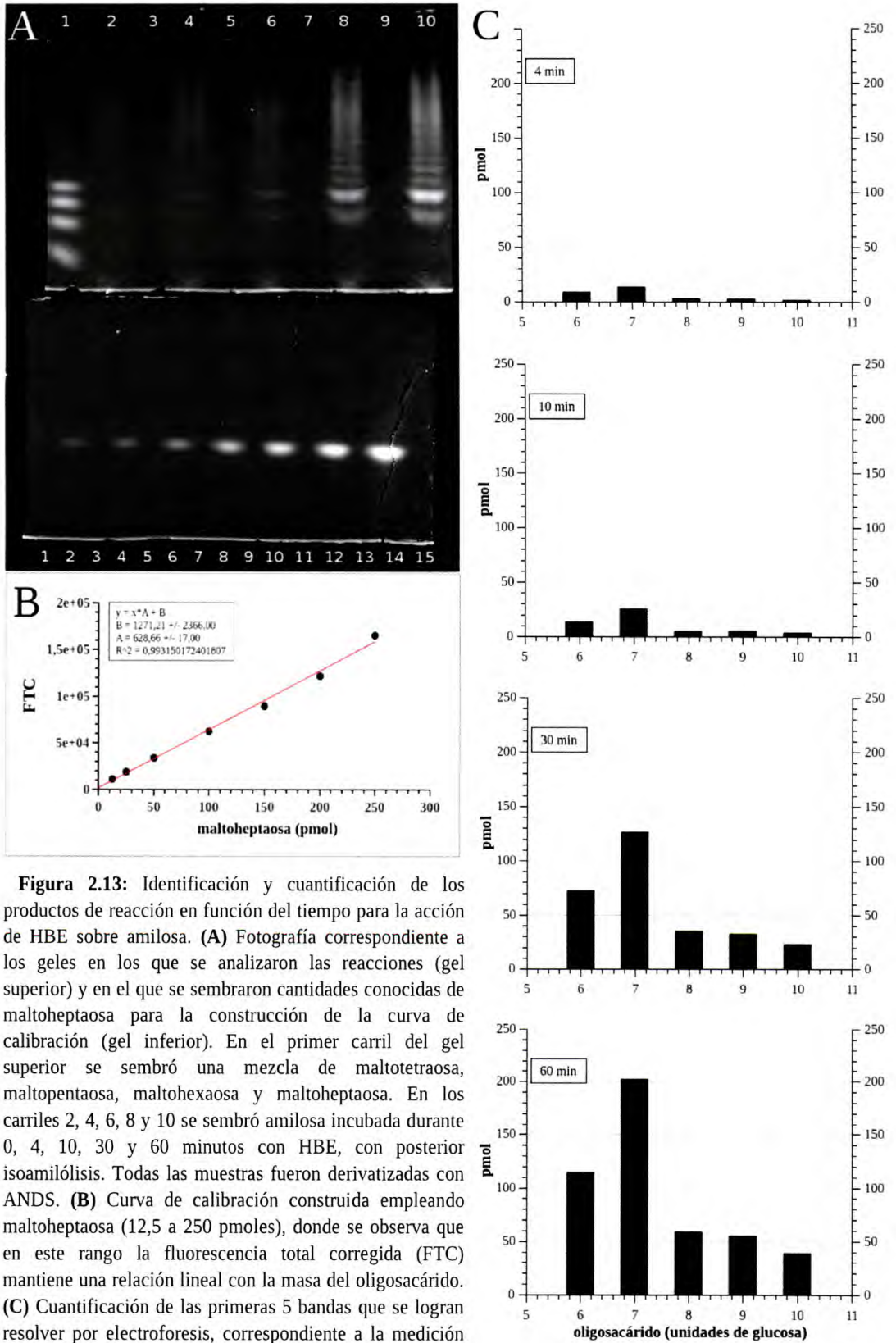


Figura 2.13: Identificación y cuantificación de los productos de reacción en función del tiempo para la acción de HBE sobre amilosa. **(A)** Fotografía correspondiente a los geles en los que se analizaron las reacciones (gel superior) y en el que se sembraron cantidades conocidas de maltoheptaosa para la construcción de la curva de calibración (gel inferior). En el primer carril del gel superior se sembró una mezcla de maltotetraosa, maltopentaosa, maltohexaosa y maltoheptaosa. En los carriles 2, 4, 6, 8 y 10 se sembró amilosa incubada durante 0, 4, 10, 30 y 60 minutos con HBE, con posterior isoamilólisis. Todas las muestras fueron derivatizadas con ANDS. **(B)** Curva de calibración construida empleando maltoheptaosa (12,5 a 250 pmoles), donde se observa que en este rango la fluorescencia total corregida (FTC) mantiene una relación lineal con la masa del oligosacárido. **(C)** Cuantificación de las primeras 5 bandas que se logran resolver por electroforesis, correspondiente a la medición de actividad de HBE en función del tiempo. La leyenda indica el tiempo de incubado. La intensidad registrada a 0 minutos de incubado con HBE fue descontada a la correspondiente a cada tiempo.

La densitometría de las bandas se realizó como se describe en los Procedimientos Experimentales, obteniendo para cada una un valor de fluorescencia total corregida (FTC). Debido a que la intensidad registrada es proporcional a la cantidad de extremos reductores, que en este caso se corresponden con los moles de oligosacárido, es posible construir la curva de calibración para la cuantificación con cantidades conocidas de un único oligosacárido. Generalmente las curvas de calibración se realizaron con maltoheptaosa, en el rango de 12,5 a 250 pmoles (gel inferior de la Figura 2.13-A), graficando la FTC en función de la masa del oligosacárido (Figura 2.13-B). En los 4 paneles verticales de la Figura 2.13-C se representa la cuantificación en pmoles para las bandas correspondientes a oligosacáridos de 6, 7, 8, 9, y 10 glucosas que la electroforesis logró resolver, indicándose en la leyenda de cada panel a qué tiempo de incubación con HBE corresponde. Las intensidades correspondientes a 0 minutos de incubación no se grafican debido a que fueron descontadas en cada uno de los tiempos ensayados.

La Figura 2.14-A muestra la cuantificación de maltoheptaosa en función del tiempo. También se midió la fluorescencia total de cada carril. De esta manera se fueron cuantificadas la totalidad de cadenas transferidas por la HBE en función del tiempo de incubación, sin discriminación de tamaño (Figura 2.14-B). El 33 % del total de las cadenas transferidas correspondieron a 6 o 7 glucosas (13 y 20 % respectivamente), y sólo las cadenas que se logran resolver en la electroforesis (6, 7, 8, 9, y 10 glucosas) representaron el 45 % del total de las cadenas transferidas.

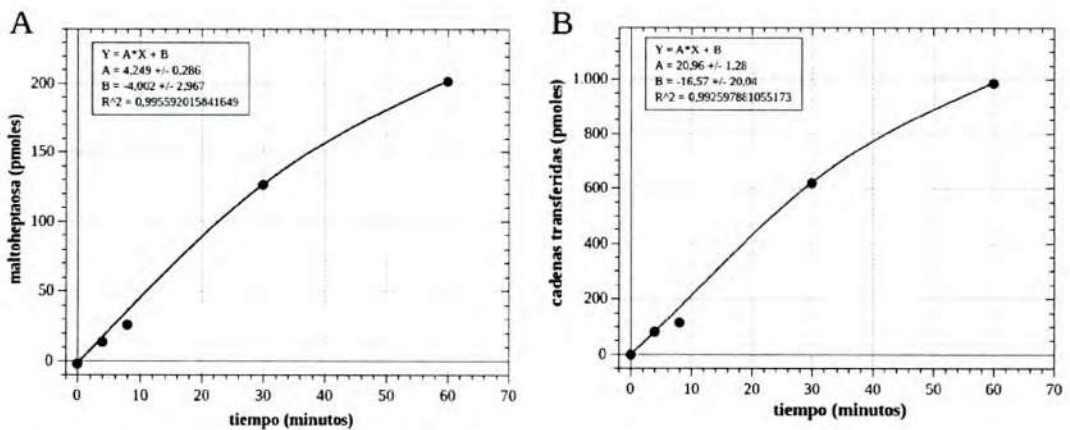


Figura 2.14: Formación de ramificaciones de 7 unidades de glucosa (A) y ramificaciones totales (B) sobre amilosa por acción de HBE en función del tiempo de incubado. Los datos utilizados provienen de la cuantificación presentada en la figura 2.13. En la leyenda de cada gráfica se indican los parámetros resultantes de una regresión lineal realizada con los valores comprendidos en el rango de tiempo en el que se mantienen las condiciones lineales (0 a 30 minutos).



Si se compara la formación de ramas de 7 glucosas con las ramificaciones totales generadas por HBE, puede apreciarse que ocurren con la misma cinética, siendo en ambos casos lineal hasta los 30 minutos de incubación.

Establecido el rango lineal en la cinética de formación de ramificaciones, se procedió a estudiar la cinética de la actividad de la HBE en función de su concentración, en condiciones de velocidad inicial (8 minutos de incubación). Nuevamente, se realizó el análisis cuantitativo para maltoheptaosa y para la totalidad de los oligosacáridos presentes en cada carril de la electroforesis. Las concentraciones de HBE ensayadas fueron 8, 16, 32, 64 y 128 $\mu\text{g/ml}$ (correspondientes a 2, 4, 6, 8, 16 y 32 pmoles en el volumen de reacción), siendo 16 $\mu\text{g/ml}$ la concentración utilizada en los estudios presentados anteriormente (Figuras 2.12 a 2.14). Notar que el rango de concentraciones de HBE analizado es muy similar a aquel empleado en las mediciones de actividad mediante el uso de la absorbancia del complejo amilosa-iodo (Tabla 2.1), y que en este caso en todo el rango se mantiene una relación lineal. A la concentración más baja analizada no se generaron ramificaciones suficientes que pudiesen ser detectadas por esta metodología, mientras que tanto la cantidad de maltoheptaosa como de oligosacáridos totales que se registró en el resto de las concentraciones presentaron un aumento lineal (Figura 2.15).

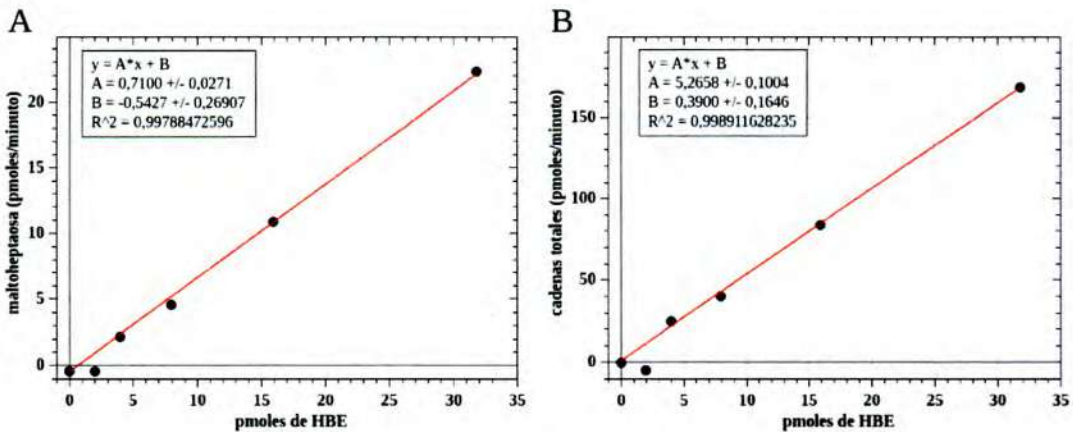
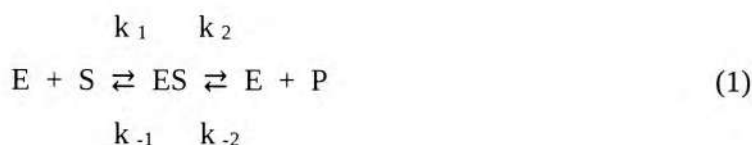


Figura 2.15: Velocidades iniciales (pmol/min) para la formación de ramificaciones en anilosa en función de la concentración de HBE. La cuantificación fue realizada para la transferencia de maltoheptaosa (A) y para la totalidad de las ramificaciones generadas (B).

La ecuación general para una reacción simple catalizada por una enzima, en la conversión de un sustrato en un producto es:



donde E es la enzima, S el sustrato, ES es el complejo enzima-sustrato, P es el producto y k_1 , k_{-1} , k_2 y k_{-2} son las constantes cinéticas para las reacciones directa e inversa para el primer y segundo equilibrio. Como el ensayo fue realizado en condiciones de velocidad inicial (V_0), se considera que la cantidad de producto formado es despreciable frente a la cantidad de sustrato, y la reacción inversa del segundo equilibrio es despreciable (eliminando k_{-2} de la ecuación 1). Independientemente de que HBE tenga o no un comportamiento Michaeliano (130, 131), en condiciones de saturación todos los sitios activos están ocupados, y toda la enzima se encuentra formando el complejo ES. En esta situación la velocidad inicial toma su valor máximo (V_{\max}), y su relación con la concentración de enzima responde a la siguiente ecuación:

$$V_{\max} = k_{cat} * [E] \quad (2)$$

donde k_2 es la misma de la ecuación 1 y es denominada constante catalítica (k_{cat}), y $[E]$ es la concentración total de la enzima.

Por lo tanto, en la representación de V_0 (en pmoles/minuto) en función de la cantidad de HBE (Figura 2.15), la pendiente obtenida en la regresión lineal correspondiente a cada una de las gráficas arrojan el valor de la k_{cat} para la transferencia de maltoheptaosa (Figura 2.15-A), y de la k_{cat} para la transferencia de un oligosacárido sin distinción de la longitud del mismo (Figura 2.15-B). En la leyenda de cada gráfico se encuentran los datos de la regresión lineal, donde la pendiente en el gráfico para maltoheptaosa es $0,7100 \pm 0,0271 \text{ min}^{-1}$ y para el total de las cadenas transferidas es $5,2658 \pm 0,1004 \text{ min}^{-1}$. La k_{cat} suele expresarse como la cantidad de moléculas que son convertidas a producto por molécula de enzima por segundo. Por lo tanto, la k_{cat} de HBE para la transferencia de maltoheptaosa y para la transferencia de cadenas en general, utilizando amilosa como sustrato es:

$$k_{cat} \text{ maltoheptaosa} = 0,012 \pm 0,001 \text{ s}^{-1}$$

$$k_{cat} \text{ total} = 0,088 \pm 0,017 \text{ s}^{-1}$$

Analizando la formación de ramificaciones en función de la concentración de amilosa, se realizaron incubados de 25 minutos con HBE 0,016 mg/ml (0,32 μg en el volumen de ensayo) y amilosa a diferentes concentraciones (entre 0,1 y 1 mg/ml). Se cuantificaron maltoheptaosa y oligosacáridos totales, y se graficó la velocidad de aparición de productos en función de la concentración de amilosa (Figura 2.16). Como se puede apreciar los datos obtenidos generaron una curva de tipo sigmoidea.

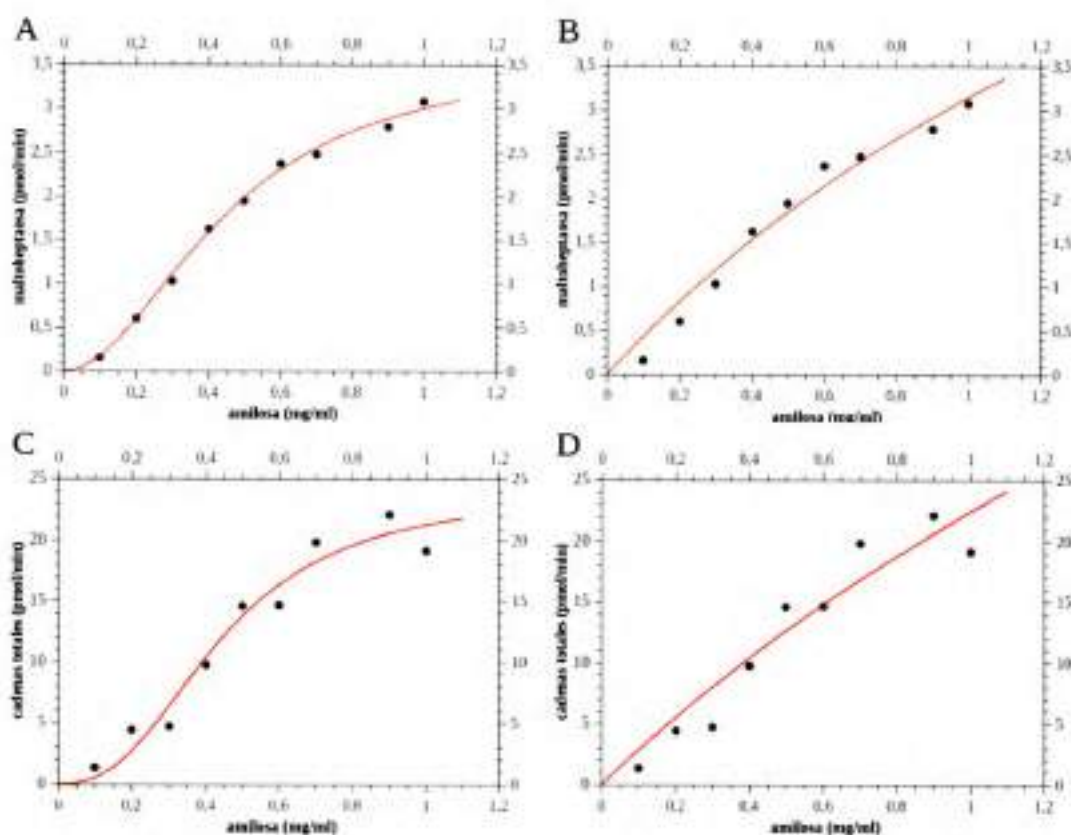


Figura 2.16: Curvas de saturación para la formación de cadenas (pmol/min) por acción de HBE en condiciones de velocidad inicial, en función de la concentración de amilosa (mg/ml). Se cuantificó la transferencia de maltoheptaosa (A y B), así como la totalidad de ramificaciones generadas (C y D). Las líneas continuas en rojo corresponden al ajuste de los datos utilizando la ecuación de Hill (A y C; ecuación 3), y de Michaelis-Menten (B y D; ecuación 4).

La ecuación que mejor se ajusta a estos datos es aquella que fue definida en 1910 por A. V. Hill (132) para explicar la unión cooperativa del sustrato en enzimas que poseen más de un sitio de unión (Figuras 2.16 A y C). Las enzimas que presentan un comportamiento cinético de este tipo son también conocidas como “enzimas alostéricas”. Esto significa que la unión de una molécula de sustrato altera la unión subsiguiente de otras moléculas de sustrato. La ecuación que describe este comportamiento es:

$$V_0 = \frac{V_{\max} [S]^n}{K^n [S]^n} \quad (3)$$

muy similar a la ecuación de Michaelis-Menten:

$$V_0 = \frac{V_{\max} [S]}{K_M [S]} \quad (4)$$

donde V_0 es la velocidad inicial, V_{\max} la velocidad máxima, $[S]$ la concentración de sustrato, K_M y K_H representan la concentración de sustrato a la cual $V_0 = 0,5 * V_{\max}$, y “n” es el coeficiente de Hill, el cual da cuenta de la cooperatividad de la unión del sustrato a la enzima. Cuando “n” es menor a 1 la cooperatividad es negativa, mientras que un valor mayor a 1 indica una cooperatividad positiva.

El coeficiente de Hill que arrojó el ajuste de los datos experimentales fue igual a **2,14** para los datos correspondientes a la cuantificación de maltoheptaosa (Figura 2.16-A), y **3,41** en el análisis de todas las cadenas transferidas por HBE (Figura 2.16-C), señalando una cooperatividad positiva entre los diferentes sitios de unión a sustrato. A modo comparativo, se realizó el ajuste de los datos con la ecuación de Michaelis-Menten (ecuación 4; Figuras 2.16 B y D). Los valores de K_H (o K_M según corresponda), V_{\max} y k_{cat} obtenidos para cada uno de los ajustes se resumen en la Tabla 2.2. Los valores de k_{cat} obtenidos mediante el ajuste con la ecuación de Hill (ecuación 3) concuerdan con aquellos obtenidos en el análisis de las cadenas transferidas en función de la concentración de HBE (Figura 2.15), mientras que el ajuste con la ecuación de Michaelis-Menten arroja valores de k_{cat} muy diferentes. El valor de K_H representa la afinidad que tiene la enzima por el sustrato, por lo que es lógico que se haya obtenido

un valor muy similar cuando se calcula este parámetro a partir de la cuantificación de la totalidad de las cadenas transferidas o sólo mediante la cantidad de maltoheptaosa transferida. Por otra parte, era de esperarse que la cantidad de moléculas de maltoheptaosa transferidas por molécula de enzima por segundo (k_{cat} maltoheptaosa) sea menor a la cantidad de cadenas totales transferidas en la misma unidad de tiempo (k_{cat} total), ya que el primer producto de reacción mencionado representa una fracción del segundo.

	Hill	Recíproca de Hill	Michaelis-Menten	Lineweaver-Burk
Maltoheptaosa				
V_{max} (pmol/min)	3,623	3,425	10,71	$1,09 \times 10^6$
k_{cat} (S^{-1})	0,015	0,014	0,045	4581,6
K_H (mg/ml)	0,450	0,429	-	-
K_M (mg/ml)	-	-	2,41	$5,5 \times 10^5$
R^2	0,99596	0,99975	0,97048	0,87886
Cadenas totales				
V_{max} (pmol/min)	23,88	35,71	101,04	-16,01
k_{cat} (S^{-1})	0,100	0,150	4,231	-0,07
K_H (mg/ml)	0,448	0,749	-	-
K_M (mg/ml)	-	-	3,52	-1,21
R^2	0,95751	0,98642	0,91314	0,96637

Tabla 2.2: Cálculo de los parámetros cinéticos obtenidos a través la cuantificación de las cadenas transferidas por HBE utilizando amilosa como sustrato. También se indica el coeficiente de correlación correspondiente a cada uno de los ajustes (R^2).

También se graficó la inversa de la velocidad inicial (V_0) en función de la inversa de la concentración de amilosa (Figura 2.17). Al recíproco de la ecuación de Michaelis-Menten (que describe el comportamiento de enzimas que no presentan cooperatividad en la unión del sustrato) se lo conoce como diagrama de Lineweaver-Burk, que se describe con la siguiente fórmula:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_0} * \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_0} \quad (5)$$

mientras que el recíproco de la ecuación de Hill queda de la siguiente manera:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M^n}{V_0} * \frac{1}{[S]^n} + \frac{1}{V_0} \quad (6)$$

Cuando la enzima tiene un comportamiento Michaeliano, el gráfico de doble recíproco da como resultado una recta, mientras que si estamos en presencia de una enzima alostérica dicho gráfico presentará una desviación de dicha linealidad (133). En la Figura 2.17 se presenta el análisis de los recíprocos correspondiente a los resultados de la Figura 2.16, incluyendo el ajuste de los datos utilizando las ecuaciones 5 y 6. Como puede apreciarse, los datos no están bien representados por un ajuste lineal. Los parámetros cinéticos obtenidos mediante este tipo de representación gráfica también se detallan en la Tabla 2.2.

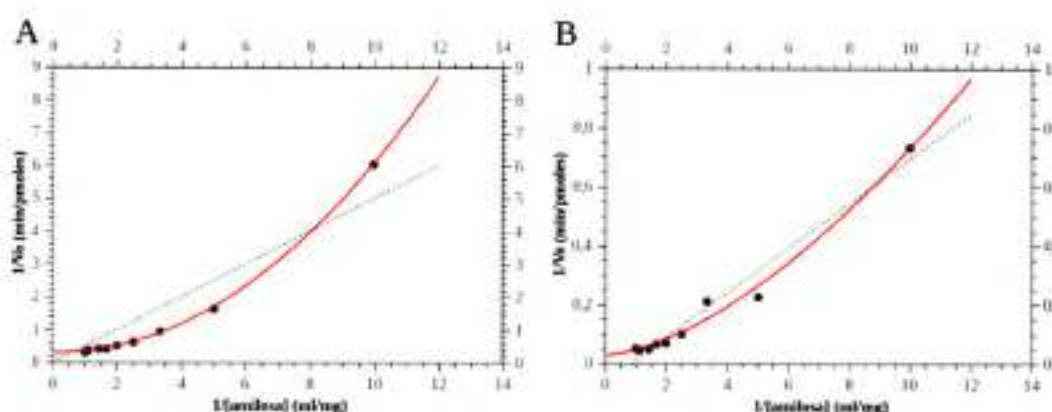


Figura 2.17: Gráfico de doble recíproco para la velocidad inicial de la transferencia de cadenas por acción de HBE a distintas concentraciones de amilosa. Los datos experimentales utilizados son los mismos que fueron presentados en la Figura 2.16. La línea continua en rojo representa el ajuste utilizando la ecuación 6 (recíproca de Hill), mientras que la línea punteada corresponde al ajuste utilizando la ecuación 5 (recíproca de Michaelis-Menten). El análisis fue realizado sobre los datos obtenidos para la cuantificación de maltoheptaosa (A) y las cadenas totales transferidas (B).

2.3.4 - Glucogenina autoglucosilada como sustrato de la HBE

Con el fin de analizar si HBE puede utilizar al maltooligosacárido generado por la glucogenina en su máximo grado de autoglucosilación para generar la primera ramificación, se realizaron ensayos con ambas enzimas en diferentes condiciones. Para identificar las ramificaciones que pudiesen generarse se emplearon dos estrategias diferentes. Una consistió en la incubación de HBE con glucogenina en su máximo estado de autoglucosilación (utilizando UDP- ^{14}C glucosa como sustrato dador), y posterior isoamilólisis para escindir la posible rama formada, lo que sería determinado

en forma indirecta por una disminución de glucogenina auto[^{14}C]glucosilada precipitable con ácido tricloroacético (TCA). En el segundo diseño experimental se midió el cambio producido por la HBE en el límite de β -amilólisis (134) del [^{14}C]oligosacárido unido a glucogenina (también en su máximo grado de [^{14}C]autoglucosilación), como consecuencia de su ramificación. La enzima β -amilasa actúa sobre extremos no reductores de cadenas lineales de glucosa, liberando maltosa a partir de la hidrólisis de enlaces α -(1 \rightarrow 4)glucosídicos. En la Figura 2.18 se muestran esquemas que describen los dos planteos experimentales. Como en el ensayo anterior, después de la β -amilólisis se cuantificó la [^{14}C]glucosa que permanece unida a glucogenina luego de precipitar con TCA.

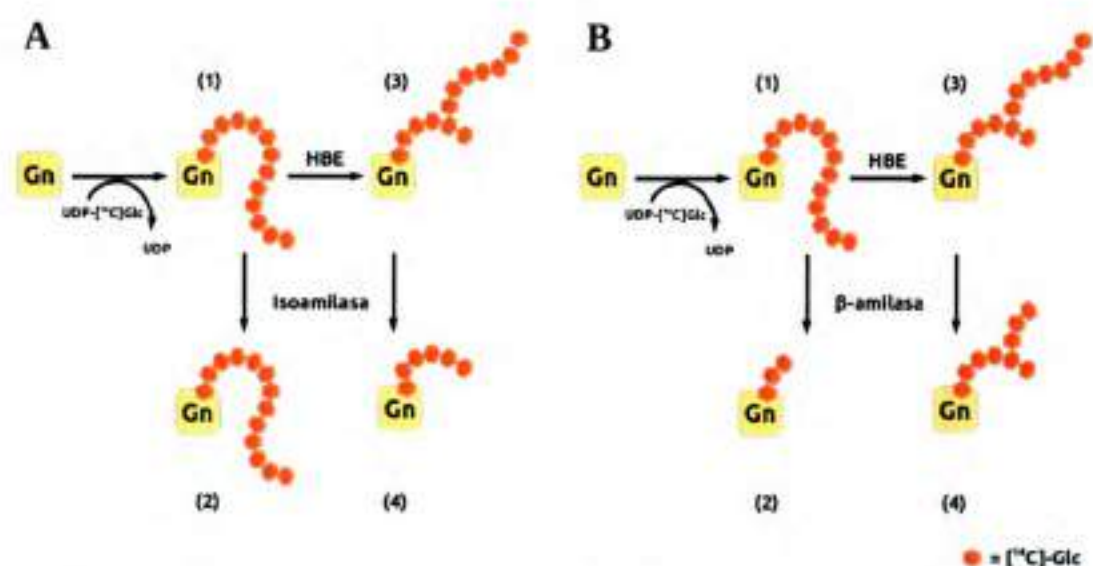


Figura 2.18: Esquemas que representan el resultado del incubado de glucogenina en su máximo estado de autoglucosilación con isoamilasa (A) o β -amilasa (B), con (3, 4) o sin (1, 2) el incubado previo con HBE, en caso de que ésta última fuese capaz de generar la primera ramificación, sin la intervención de la enzima glucógeno sintasa.

Se ensayó a glucogenina en diferentes condiciones, que incluyeron a la enzima en su estado dimérico (3 μM) y monomérico (0,03 μM), tanto la versión truncada de la glucogenina de conejo en sus formas no glucosilada y parcialmente glucosilada (RGNapo31, RGNwt31), como la completa parcialmente glucosilada (RGNwt38). Si bien la glucogenina de conejo tiene un 93 % de identidad de secuencia con la iso especie 1 de la glucogenina humana, se incluyó también en el análisis la versión truncada de esta última, sin glucosilar y parcialmente glucosilada (HGNapo31 y HGNwt31). En el



caso donde se utilizó isoamilasa para liberar las cadenas transferidas, no se observó ninguna diferencia en la cuantificación de la [^{14}C]glucosa unida a glucogenina entre las muestras que no fueron sometidas a la acción de ninguna de las enzimas y aquellas que fueron sometidas sólo a una de ellas o a ambas. Lo mismo sucedió cuando la estrategia utilizada fue la medición del cambio en el límite de β -amilólisis. A modo representativo, en la Figura 2.19-A se muestra el resultado obtenido cuando las pruebas fueron realizadas con HBE y HGNap031 a una concentración 3 μM , con posterior isoamilólisis. De la misma manera, en la Figura 2.19-B se presenta el resultado obtenido en un estudio donde se incubó HBE con RGNap031 con posterior β -amilólisis.

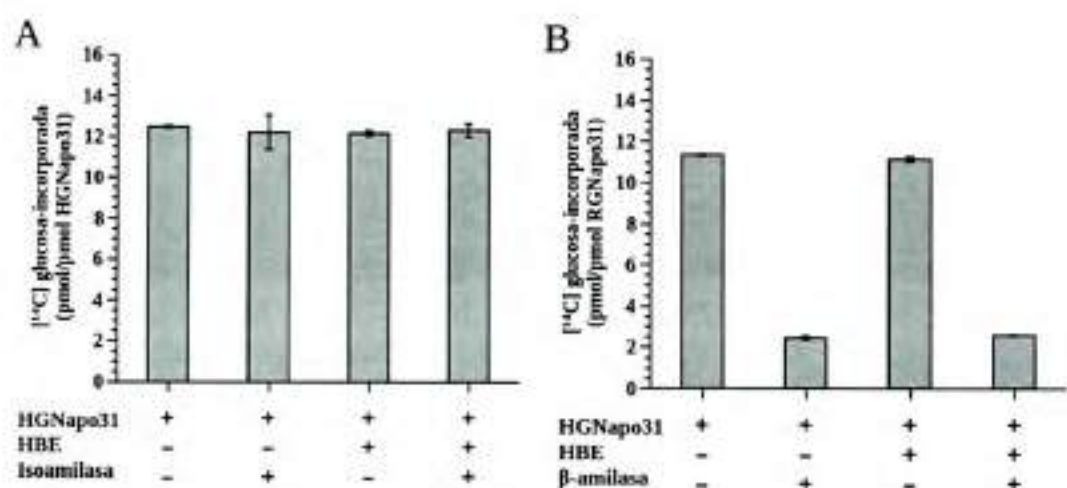


Figura 2.19: Cuantificación de la [^{14}C]glucosa asociada covalentemente a glucogenina luego de ser sometida al incubado con HBE, isoamilasa y β -amilasa, según se describe en las situaciones del esquema de la Figura 2.18, numeradas de 1 a 4. Los valores obtenidos en cada experimento representan el promedio de tres reacciones independientes, y las barras de error la desviación estándar.

2.4 – DISCUSIÓN

Sin duda el cambio en el espectro de absorción del complejo amilosa-iodo provocado por la acción de la enzima ramificante de glucógeno/almidón (123), es la técnica que más se ha utilizado en la medición de la actividad de esta enzima (81, 110-116, 118, 125, 135-137). La principal virtud de esta metodología radica en la sencillez y rapidez del procedimiento experimental. Incluso se la ha llegado a utilizar recientemente para obtener los parámetros cinéticos K_M y V_{max} de la enzima ramificante de glucógeno de *Rhodothermus obamensis* (137). Sin embargo, si se comparan las curvas espectrales de los complejos amilosa-iodo obtenidas luego de someter a dicho glucano a la acción de HBE (Figura 2.7) con aquellas obtenidas cuando se incubaba el sustrato con α -amilasa (Figura 2.8), puede notarse la gran similitud del cambio que provoca la actividad de cada una de ellas sobre la absorción del complejo amilosa-iodo. Más aún, la actividad de α -amilasa es capaz de causar un cambio en la longitud de onda de máxima absorbancia similar al observado para HBE. En el presente trabajo se utilizó la enzima α -amilasa para poner de manifiesto que el uso de esta técnica no permite discriminar entre las actividades de dichas enzimas y de alguna otra enzima amilolítica que pudiese estar presente como impureza en la muestra que se está analizando. En este caso se obtendría un error por exceso en la determinación de la actividad, haciéndose este error más importante mientras menor sea la actividad específica real de la enzima analizada. Además, la probabilidad de cometer dicho error será mayor cuando la muestra que contiene la enzima ramificante provenga de un extracto celular, incluso si se encontrara parcialmente purificada. Por lo tanto, el uso del cambio en el espectro de absorción del complejo amilosa-iodo para la medición *in vivo* de la actividad de la enzima ramificante en diferentes tipos celulares (o en diferentes condiciones), puede que no sea la metodología más recomendable. Como ya se ha mencionado más arriba, la rapidez y

sencillez de esta metodología la colocó como primera opción cuando se comenzó con las mediciones de actividad de HBE en el estudio aquí presentado, incluyendo la determinación de la temperatura y pH óptimos de trabajo. A pesar de la limitación de esta técnica para detectar la presencia de alguna enzima amilolítica en la muestra que contiene la enzima ramificante, el grado de pureza alcanzado tras la columna de afinidad y el cambio en el espectro de absorción causado por las cantidades de HBE utilizadas en los ensayos (Figuras 2.7 y 2.9), constituyeron una fuerte evidencia para concluir que se había conseguido expresar HBE recombinante activa en células Sf9, lo que definitivamente fue luego confirmado por FACE. Cabe destacar que hasta la fecha no se ha publicado ningún trabajo en el que se informe la obtención de una enzima ramificante de glucógeno de mamíferos activa.

Una vez lograda la expresión y purificación de HBE recombinante, se procedió con la identificación y cuantificación de los productos de reacción, es decir, de las cadenas transferidas por HBE sobre amilosa. Son numerosas las técnicas cromatográficas que se han utilizado en la purificación, caracterización y cuantificación de carbohidratos, como la cromatografía gaseosa, cromatografía en capa delgada (TLC) y cromatografía líquida de alta presión (HPLC) con columnas de exclusión molecular, intercambio aniónico o fase reversa. Con el fin de aumentar el límite de detección, se comenzó a emplear la derivatización de los carbohidratos con cromóforos y fluoróforos, o marcándolos radioactivamente. Algunos de los métodos más utilizados en los últimos años en la caracterización de carbohidratos son la cromatografía de exclusión molecular (SEC), la cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución con detección amperométrica de pulsos (HPAEC-PAD) y la electroforesis en geles de poliacrilamida de carbohidratos marcados con fluoróforo (PAGEFS o FACE). Los más populares en la literatura son SEC y HPAEC-PAD, aunque dependiendo del tipo de estudio que se necesite realizar, tienen sus ventajas o desventajas. El detector más comúnmente utilizado en SEC es el de índice de refracción diferencial, el cual genera una señal que es proporcional al peso molecular de los analitos (cuando se trata de oligosacáridos lineales), otorgándole un límite de detección considerablemente bajo cuando se trata de carbohidratos de bajo peso molecular, aunque permite identificar pequeñas cantidades de oligoglucanos de gran peso molecular. La desventaja de SEC es que las bandas sufren un ensanchamiento que no permite una buena resolución de las cadenas individuales (82). Por otra parte, HPAEC-PAD provee una muy buena resolución de picos, y con el detector de pulsos amperométricos (PAD) se reportaron límites de detección tan bajos como 0,6-10 pmoles



de carbohidratos (138). El problema de este tipo de detector, es que da una señal diferente para cadenas de carbohidratos lineales de diferente longitud, haciendo que la cuantificación sea semicuantitativa (139).

En el presente trabajo se utilizó FACE para la cuantificación de las ramificaciones formadas por HBE sobre amilosa, en el que, al igual que con HPAEC-PAD, se obtienen buenas resoluciones para cada pico en una mezcla de oligosacáridos, y se ha llegado a detectar hasta 0,2 pmoles de glúcidos (129). La gran ventaja de esta metodología es que la intensidad de la señal depende del número de extremos reductores libres, y no de la longitud de la cadena de los oligosacáridos. Por lo tanto en el análisis de una mezcla de oligoglucanos lineales, la intensidad de cada pico con respecto al resto es proporcional a su abundancia relativa. Consecuentemente, permite la cuantificación directa de todas las bandas identificadas, mediante el uso de una curva de calibración construida con único glúcido, ya que la intensidad registrada es proporcional al número de moles y no a la masa de las especies. Además, el equipamiento necesario para llevar a cabo este tipo de análisis es menos sofisticado y costoso que el requerido en HPAEC-PAD.

Las dimensiones de los geles que se emplearon para la electroforesis (5 cm de alto) permitió resolver oligosacáridos de entre 4 y 10 glucosas. Los resultados indican que el mínimo tamaño de la porción glucosídica que HBE puede transferir es de 6 glucosas, teniendo preferencia por la generación de ramas de 7 glucosas de longitud (Figura 2.13). El límite de detección de actividad de HBE registrada mediante FACE, queda establecido por el límite de cuantificación de los oligosacáridos por este método, siendo la menor cantidad de maltoheptaosa utilizada en la construcción de las curvas de calibración de 12,5 pmoles, por lo que cualquier señal fluorescente que origine una FTC menor a la correspondiente a esa cantidad de maltoheptaosa no es considerada. Cuando se analizó la formación de ramificaciones en función de la cantidad de HBE (Figura 2.15) en condiciones de velocidad inicial (8 minutos), la mínima cantidad de HBE a la que se pudo medir actividad fue 4 pmoles. En términos de unidades de actividad (pmoles de oligosacárido/min), la mínima cantidad de maltoheptaosa detectada fue 2 pmoles/min, y 25 pmoles/min para la cuantificación de todas las ramificaciones generadas. Teniendo en cuenta que las condiciones de velocidad inicial en esta metodología se extienden hasta los 30 minutos de reacción, llevando el tiempo de incubación con HBE a los 30 minutos, permitiría llegar a un límite de cuantificación cercano a 1,0 pmol de enzima (0,08 μ g). Obviamente, el límite de cuantificación expresado como cantidad de enzima está directamente ligado a la actividad específica

de la misma. A los fines comparativos, dada una muestra con una actividad específica determinada, la medición de actividad de la enzima ramificante en condiciones de velocidad inicial por FACE ofrece un límite de cuantificación 5 veces menor que cuando se utiliza la disminución de absorbancia a 660 nm del complejo amilosa-iodo (Figura 2.9). Cabe destacar además que, con el uso de esta técnica, la formación de oligosacáridos debida a la presencia de algún tipo de enzima amilolítica contaminante, puede ser identificada y cuantificada omitiendo en el ensayo la isoamilólisis. Esto no sería posible utilizando el cambio en el espectro de absorbancia del complejo amilosa-iodo.

Al cuantificar la fluorescencia detectada en la totalidad del área correspondiente a cada carril de una electroforesis, en el que se sembró el producto resultante de incubar amilosa con HBE y posterior isoamilólisis (Figura 2.13), lo que se está determinando es la cantidad de nuevos extremos reductores que se formaron luego de la acción conjunta de estas dos enzimas. Este procedimiento es análogo al descrito en 1948 por Park y colaboradores (122), en el cual las cadenas glucosídicas liberadas por isoamilasa (que fuesen previamente introducidas en unión α -1,6 por la enzima ramificante) son cuantificadas a partir de la determinación del poder reductor. Dicha metodología ha sido utilizada por diferentes autores para obtener parámetros cinéticos (K_M y V_{max}) para algunas enzimas ramificantes de glucógeno (112, 118, 136) y almidón (115, 81). Entonces, se realizaron curvas de saturación utilizando amilosa como sustrato, para la transferencia de maltoheptaosa y de las cadenas totales transferidas por HBE (Figura 2.16). Los resultados obtenidos por FACE se ajustaron a la cinética correspondiente a la de una enzima alostérica (Figuras 2.16 A y C). Hasta el momento todos los informes publicados acerca de enzimas ramificantes asumen que la cinética de actividad es Michaeliana (81, 112, 115, 118, 136). Sólo ha sido publicado un trabajo en el que se presentan las curvas de saturación correspondientes, donde la mínima concentración de amilosa analizada corresponde a 0,3 mg/ml (112). En el rango de concentraciones de sustrato aquí ensayadas por FACE, se demuestra que el segmento comprendido entre 0,1 y 0,3 mg/ml es muy importante en la identificación de la forma sigmoidea de la curva de saturación, característica de las enzimas alostéricas (Figura 2.16). Los resultados son más claros cuando sólo es cuantificada la fluorescencia correspondiente a la maltoheptaosa, en lugar de la totalidad de ramificaciones formadas, teniendo esta última una mayor dispersión en los datos. Probablemente esto ocurre porque la cuantificación de la fluorescencia distribuida en un área muy amplia podría tener un

mayor error asociado, debido a la difusión de los oligosacáridos durante la electroforesis.

A partir del análisis de la velocidad inicial de formación de ramificaciones de 7 glucosas y las totales en función de la cantidad de HBE, fue posible obtener la k_{cat} correspondiente para cada proceso (Figura 2.15). Los resultados obtenidos mediante esta representación son concordantes con los valores de k_{cat} que entregó el ajuste de los datos de las curvas de saturación utilizando la ecuación de Hill (ecuación 3, Tabla 2.2). Por el contrario, si se las comparan con las k_{cat} resultantes del ajuste realizado con la ecuación de Michaelis-Menten (ecuación 4), los valores son muy diferentes (Tabla 2.2). El gráfico de dobles recíprocos (ecuaciones 5 y 6; Figura 2.17) permite confirmar el comportamiento alostérico de la HBE. En esta manera de representar los datos se obtiene una recta cuando se trata de una enzima Michaeliana, o una curva cuando estamos en presencia de una enzima alostérica (133, 140, 141). El límite de cuantificación que ofrece la técnica FACE permitió realizar curvas de saturación a concentraciones de amilosa lo suficientemente bajas como para que se pudiese poner en evidencia el perfil sigmoideo de las curvas. En este trabajo no se empleó la medición del poder reductor de las ramificaciones liberadas por isoamilólisis (121, 122) para medir la actividad de HBE, y por lo tanto no se pueden comparar límites de cuantificación entre dicha técnica y FACE. Aún así, la medición a través del poder reductor de los oligosacáridos mide la aparición de un producto que absorbe radiación en el rango visible del espectro electromagnético, lo que hace suponer que el empleo de la fluorescencia (como en FACE) podría permitir tener límites de cuantificación menores.

Desde el punto de vista molecular, existen evidencias muy claras que podrían apoyar la hipótesis de que HBE sea una enzima alostérica. Las enzimas ramificantes cuentan con tres dominios, el dominio catalítico central que tiene una estructura tipo barril $(\beta/\alpha)_8$, un dominio amino-terminal compuesto por láminas β , y un dominio carboxilo-terminal también compuesto por láminas β (80). Se ha descrito que la degradación progresiva a partir del extremo amino-terminal, conduce a una pérdida en la preferencia de la longitud de la cadena transferida, con una concomitante disminución de la actividad catalítica de la enzima (82, 138). Además, mediante el alineamiento de secuencias, se ha identificado en este dominio la presencia de un "módulo de unión a carbohidratos", ampliamente distribuido entre enzimas involucradas en el metabolismo de glicanos (139). Con respecto al dominio carboxilo-terminal, se lo ha vinculado con el reconocimiento del sustrato, y se ha reportado que la ausencia parcial de este dominio

provoca una significativa disminución en la actividad de la enzima (81). Este análisis podría ser ampliado a todas las enzimas que forman parte de la familia de las α -amilasas (o GH13), o al menos a todas aquellas en las que se encuentren descritos la presencia de dominios que posean módulos de unión a carbohidratos (139).

Por lo tanto, en la literatura existen evidencias de la presencia de sitios de unión a cadenas lineales de glucosa en los tres dominios estructurales de las enzimas ramificantes. Esto resulta consistente la idea de un comportamiento alostérico, ya que existe más de un sitio de unión de sustrato, con la posibilidad de que la unión del sustrato a uno de estos sitios pudiese modificar significativamente la unión a los demás sitios. En los modelos que encontramos habitualmente en la literatura para enzimas alostéricas, la unión del sustrato a un sitio induce un cambio conformacional en la estructura de la proteína, que modifica la afinidad por el sustrato en el resto de los sitios (133, 142). En este caso en particular, la unión del sustrato al sitio de unión de uno de los dominios de la enzima podría estar aumentando considerablemente la probabilidad de que el sustrato encuentre un segundo sitio ubicado en otro dominio, a través de la restricción de los grados de libertad de la misma molécula de sustrato ya unida al primero. En el esquema de la Figura 2.20 se plantea una hipótesis acerca de cuál podría ser el mecanismo de reconocimiento del sustrato. Como se ha descrito al dominio amino-terminal como encargado del reconocimiento del sustrato, éste podría ser el que presente mayor afinidad, y por lo tanto el primero en ocuparse (Figura 2.20, B). En segundo lugar, posiblemente intervenga el dominio carboxilo-terminal en el reconocimiento del extremo no reductor (Figura 2.20, C), para que finalmente el sustrato interactúe con los sitios de unión del dominio central, aquellos inmediatos a los aminoácidos encargados de llevar a cabo la catálisis (Figura 2.20, D). El orden propuesto está basado en la idea de que una vez que el sustrato sea reconocido por el dominio catalítico la reacción de transferencia se llevará a cabo (Figura 2.20, E), por lo que si la unión del extremo no reductor ocurre antes de la unión al dominio central, será más probable que la cadena transferida posea una longitud determinada. En cambio, en el caso de que el sustrato se una antes al dominio central, la reacción de transferencia podría proceder sin que alcance a unirse al dominio carboxilo-terminal, disminuyendo la probabilidad de que la ramificación generada tenga la longitud preferida, de manera análoga a lo que sucede cuando falta parte del dominio carboxilo-terminal (81).

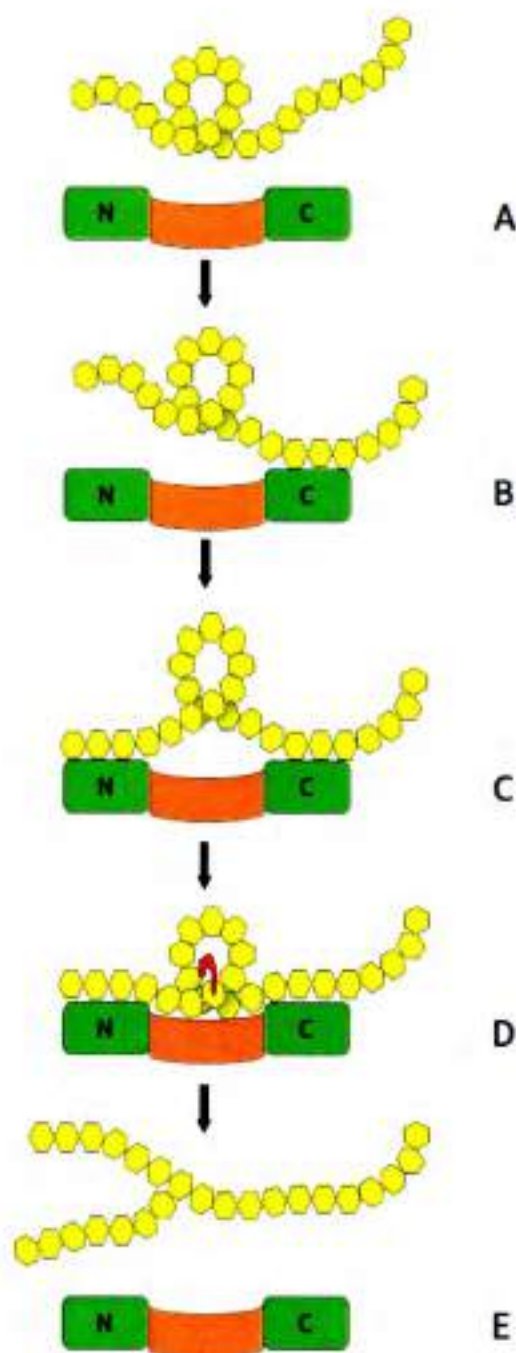


Figura 2.20: Hipótesis propuesta para la unión del sustrato a la enzima ramificante, basada en los resultados cinéticos presentados en este trabajo de tesis doctoral, que indican que esta enzima tendría un comportamiento propio de una enzima alostérica. También se tuvieron en consideración resultados publicados por otros autores que describen la función que cumplen los dominios amino- y carboxilo-terminal (representados en color verde, con las letras N y C en su interior). En color naranja se representa el dominio catalítico, y con hexágonos amarillos las moléculas de glucosa.

En el mecanismo propuesto en la Figura 2.20, se coloca a la cadena sobre la que se ejerce la actividad hidrolítica actuando también como aceptora de la ramificación. Para que se pueda llevar a cabo este proceso, se asume que la cadena de glucosas adopta la estructura helicoidal ya descrita para las ramas del glucógeno (1, 3, 148, 149). Se hizo esta suposición tomando como referencia el mecanismo de catálisis descrito para la enzima ciclodextrina glucano transferasa de *Bacillus circulans* (perteneciente a la familia de las α -amilasas), en la cual el dominio catalítico es capaz de acomodar una cadena de 7 glucosas en forma de anillo para llevar a cabo su actividad catalítica (79, 143).

Finalmente, se llevaron a cabo ensayos diseñados para evaluar la posibilidad de que HBE fuese capaz de utilizar como sustrato a una cadena de glucosa unida a glucogenina, con la máxima extensión adquirida mediante autoglucosilación, y así generar la primera ramificación del proteoglucógeno. Con ninguna de las estrategias utilizadas se pudo determinar que este evento ocurriera. Este constituye el primer ensayo en el que el producto de autoglucosilación de la glucogenina es probado como sustrato de la enzima ramificante. El resultado negativo permite descartar esa posibilidad, indicando que para la formación de la primera ramificación, la cadena de 12 a 13 glucosas es insuficiente, requiriendo mayor grado de polimerización para convertirse en sustrato de la enzima ramificante. La determinación de dicho grado de polimerización, que deberá ser alcanzado por acción de la glucógeno sintasa, es un aspecto pendiente aún por dilucidar.



2.5 – PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

2.5.1 - Medios y reactivos

Buffer TE:	Tris-HCl 10 mM (pH 8.0) y EDTA 1 mM.
Solución de Transfección A:	5 μ l del producto de la recombinación en 100 μ l de medio Grace (sin suplementos ni antibióticos).
Solución de Transfección B:	6 μ l de Cellfectin en 100 μ l de medio Grace (sin suplementos ni antibióticos).
Cellfectin:	Formulación liposómica 1:1,5 (M/M) del lípido catiónico N,N ^I ,N ^{II} ,N ^{III} -tetrametil-N,N ^I ,N ^{II} ,N ^{III} -tetrapalmitilespermina (TM-TPS) y dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), utilizada para la transfección mediada por lípidos.
Ganciclovir:	Es un análogo de nucleósido, y se utiliza para seleccionar el virus recombinante. Se intercala en la doble hebra de ADN impidiendo su replicación (144) sólo cuando se encuentra fosforilado por la timidina quinasa HSV1 (HSV1tk). El ADN viral contiene el gen que codifica para HSV1tk, el cual se pierde durante el proceso de recombinación.
Grace:	Medio de cultivo utilizado para el cultivo de células de insecto y la producción de proteína recombinante. Es empleado principalmente en la etapa de transfección de las

células. A continuación se describe la formulación del mismo:

Componentes Concentración (mg/L)

Aminoácidos

Glicina	650.0
L-Alanina	225.0
L-Arginina (hidrocloruro)	700.0
L-Asparagina	350.0
Ácido L-Aspártico	350.0
L-Cisteína	22.0
Ácido L-Glutámico	600.0
L-Glutamina	600.0
L-Histidina	2500.0
L-Isoleucina	50.0
L-Leucina	75.0
L-Lysina (hidrocloruro)	625.0
L-Fenilalanina	150.0
L-Prolina	350.0
L-Serina	550.0
L-Treonina	175.0
L-Triptofano	100.0
L-Tirosina	50.0
L-Valina	100.0
Beta-Alanina	200.0

Vitaminas

Biotina	0.01
Cloruro de Colina	0.2
D-Pantotenato de calcio	0.02
Ácido fólico	0.02
Ácido nicotínico (Niacina)	0.02
Ácido para-aminobenzoico	0.02
Hidrocloruro de piridoxina	0.02
Riboflavina	0.02
Hidrocloruro de tiamina	0.02
l-Inositol	0.02

Sales inorgánicas

Cloruro de calcio (CaCl ₂) (anhidro)	750.0
Cloruro de magnesio (MgCl ₂ ·6H ₂ O)	2280.0

Sulfato de magnesio (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	2780.0
Cloruro de potasio (KCl)	4100.0
Bicarbonato de sodio (NaHCO ₃)	350.0
Fosfato de sodio monobásico (NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O)	1013.0
Otros componentes	
Ácido alfa-cetoglutarico	370.0
D-Fructosa	400.0
D-Glucosa	700.0
Ácido fumarico	55.0
Ácido malico	670.0
Ácido succínico	60.0
Sucrosa	26680.0

- SF-900 II: Medio de cultivo libre de suero y proteínas, optimizado para el cultivo prolongado y de alta densidad de líneas celulares de *Spodoptera frugiperda* (Sf9 y Sf21), así como para la producción de proteínas recombinantes en gran escala. La formulación de este medio de cultivo no se encuentra disponible.
- Solución de amilosa: La solución madre de amilosa (tipo III de papa; esencialmente libre de amilopectina; Sigma) se preparó a 5 mg/ml en DMSO a 90° C para lograr la solubilización.
- Reactivo de iodo: Se prepara fresco en cada reacción, mezclando 1 parte de una solución stock de I₂/KI, con 1 parte de HCl 1 N, y 24 partes de H₂O.
- Solución stock de I₂/KI: 2,6 g de I₂ y 26 g de KI en 100 ml de H₂O.
- Buffer A: Buffer Tris-HCl (pH 7,5) 20 mM, NaCl 0,5 M, Imidazol 10 mM, Tritón X100 0,1 %.
- Buffer B: Buffer Tris-HCl (pH 7,5) 20 mM, NaCl 0,5 M, Imidazol 10 mM.
- Buffer C: Buffer Tris-HCl (pH 7,5) 20 mM, NaCl 0,5 M, Imidazol 200 mM.
- Buffer de transferencia: Tris-Glicina (pH 8,3) 0,01 M, Metanol 20 %.
- Solución de ANDS: ANDS 0,15 M en ácido acético 15 % (estable hasta 2 meses a -80° C).
- Solución de NaCNBH₃: NaCNBH₃ 1 M en DMSO (estable 2 meses a -80° C).

SB 5X:	Glicerol 50 %, azul de bromofenol 0,01 %.
Buffer TBS:	Buffer Tris-HCl pH 7,5 50 mM, NaCl 0,15 M.

2.5.2 – Materiales

El ADNc de la enzima ramificante humana clonado en el vector pOTB7 fue adquirido en RZPD (Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GMBH, Alemania).

Células de insecto Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) fueron gentilmente donadas por el Dr. Fernando Irazoqui (Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas, UNC – CIQUIBIC, CONICET).

Para la expresión de proteínas recombinantes en células Sf9 se adquirieron los siguientes productos de Invitrogen: ADN Baculodirect linealizado con la enzima *Bsu36* I; Cellfectin; Ganciclovir; mezcla enzimática Clonasa LR II; vector de clonado pENTR/D-TOPO; medios de cultivo Grace y SF-900 II.

Para los medios Grace y SF-900 II con antibióticos se utilizó streptomicina 100 µg/ml, anfotericina 0,25 µg/ml y penicilina 100 U/ml.

Maltotetraosa, maltopentatosa, maltohexaosa y maltoheptaosa fueron adquiridos de SUPELCO Analitical (números de catálogo 47877, 47876, 47873, 47872)

Inhibidores MG132 y Lactacistina fueron un regalo de la Dra. Marta Hallak, y la Cloroquina del Dr. Hugo Maccioni. Leupeptina y Pepstatina fueron adquiridos de Sigma.

2.5.3 - Inserción de la secuencia que codifica para HBE en el genoma viral

El sistema de expresión con baculovirus utilizado es el Baculodirect[®] de Invitrogen. Este sistema emplea la tecnología Gateway[®] para introducir el gen de interés en el ADN del virus de la poliedrosis nuclear múltiple *Autographa californica* (AcMNPV), basándose en las propiedades del bacteriófago lambda para integrarse en el genoma de *Escherichia coli*, a través de un proceso de recombinación molecular sitio específica (126, 127). El intercambio ocurre en un segmento de 15 pb, pero necesita de secuencias flanqueantes específicas (sitios att R y L) que son reconocidas por un complejo enzimático (provisto por la mezcla enzimática LR Clonase[®] II).

La secuencia que codifica para HBE fue introducida en el vector de clonado pENTR/D/DOPO (Invitrogen) utilizando las enzimas de restricción KpnI y XhoI.

2.5.4 - Transfección de células Sf9 con el baculovirus recombinante

Para la transfección se utilizó medio de cultivo sin suplementos ni antibióticos (a menos que se indique lo contrario). Se sembraron 8×10^5 células Sf9 en placas de petri de 3,5 cm con 2 ml de medio Grace, y se incubaron durante 1 hora a 27° C para permitir que se unan a la placa. En un tubo de 1,5 ml estéril se mezclaron las soluciones de transfección A y B, se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente, y luego se adicionaron a la mezcla 0,8 ml de medio Grace. Se reemplazó el medio de cultivo de las células por la mezcla de transfección y se las incubó a 27° C durante 5 horas. A continuación se retiró la mezcla de transfección de la placa y se le agregaron 2 ml de medio Grace con antibióticos y Ganciclovir, colocando una toalla de papel húmeda en la base de la placa para evitar la evaporación del medio, cubierta de papel aluminio para protegerla de la luz, y se la mantuvo en estufa a 27° C durante 96 horas. Luego se recolectó el medio de cultivo en un tubo estéril, se lo centrifugó a $3000 \times g$ durante 5 minutos para eliminar los restos sólidos, y se pasó el sobrenadante a otro tubo estéril. Este constituye el primer stock viral, denominado "P1".

2.5.5 - Amplificación del título del baculovirus recombinante

Se sembraron 8×10^5 células Sf9 en placas de petri de 3,5 cm con 2 ml de medio SF-900 II suplementado con SFB 4 %, antibióticos y Ganciclovir 0,1 mM, y se incubaron durante 1 hora a 27° C para permitir que se unan a la placa. Luego se agregaron 5 μ l de stock viral P1, colocando una toalla de papel húmeda en la base de la placa para evitar la evaporación del medio, se cubrió en papel aluminio para proteger de la luz, y se llevó a estufa a 27° C. A las 72 horas se recolectó el medio en un tubo estéril, se centrifugó a $10000 \times g$ para eliminar restos sólidos y se almacenó a 4° C (para almacenamiento por períodos prolongados se colocó a -70° C). Este procedimiento se repitió cuantas veces fue necesario hasta que se obtuvo un título viral lo suficientemente alto para producir enzima recombinante con buenos niveles de expresión. Con frecuencia es necesario reamplificar el baculovirus recombinante, debido a que en cualquiera de las condiciones de almacenamiento, con el paso del tiempo se produce una disminución del título viral.

2.5.6 - Pruebas de expresión de HBE

Para analizar la cantidad de stock viral necesario para la producción de proteína recombinante, se realizaron infecciones con diferentes volúmenes de stock viral, y se analizó la expresión de HBE a diferentes días post infección. Típicamente, se sembraron $1,5 \times 10^6$ células Sf9 en placas de poliestireno de 6 pocillos, con 2 ml de medio SF-900 II suplementado con SFB 4 % y antibióticos, y se incubaron durante 1 hora a 27° C para permitir que se unan a la placa. Luego se infectó con dos cantidades diferentes de stock viral en cada fila (1X y 2X), y se analizó a 3 tiempos diferentes de infección en cada columna (generalmente entre 3 y 7 días post infección).

Pasados los días correspondientes de infección, las células se recuperaron con el mismo medio de cultivo y se centrifugaron a 1500 x g. Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 200 μ l de buffer Tris-HCl 20 mM, NaCl 0,5 M, Tritón X100 0,1 %, y se sonicaron brevemente (2 veces durante 5 segundos; Sonifier B12, Branson Sonic Power Company). Para analizar los niveles de expresión de HBE y la cantidad que se obtiene en forma soluble, se tomaron alícuotas de 15 μ l de los extractos totales y el mismo volumen de los sobrenadantes luego de que fueran centrifugados a 12000 x g durante 5 minutos, y se agregó 7,5 μ l de SB 3X. Las muestras se sometieron a SDS-PAGE con 12% de acrilamida en el gel separador y 3% en el gel concentrador en las mismas condiciones descritas en el apartado 1.5.3 (página 40), sin aplicar ningún tipo de tinción. El control del peso molecular de la proteína recombinante se hizo posible mediante la siembra de 3 μ l de un kit de estándares de peso molecular preteñidos. Posteriormente se realizó la transferencia del material proteico a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) utilizando un sistema de transferencia semi-seco, donde el gel y la membrana de PVDF se disponen de manera horizontal entre dos placas de grafito de 12 x 17 cm que funcionan como electrodos, como se muestra en la Figura 2.21 (145).

Se sumergió la membrana de PVDF en metanol (Carlo Erba Reagents) hasta que quedó totalmente húmeda, y luego se incubó durante 10 minutos en buffer de transferencia. Los trozos de papel Whatman y los paños de esponja se humedecieron en buffer de transferencia. Como el SDS proveniente del PAGE interfiere con la transferencia a este tipo de membranas, para eliminarlo se lavó el gel de poliacrilamida 3 veces durante 5 minutos con buffer de transferencia. La electroforesis se llevó a cabo durante 1 hora a 16 Volts. Luego, se lavó la membrana de PVDF 3 veces durante 5

minutos con buffer TBS y se incubó 1 hora con solución de bloqueo conteniendo buffer TBS con 1 % de leche descremada comercial. Posteriormente la membrana fue incubada con el anticuerpo policlonal anti-GBE1 (Proteintech Group, número de catálogo 20313-1-AP) en una dilución 1/2000 en la misma solución de bloqueo a 4° C durante 14 horas. En el caso donde el reconocimiento de la HBE se realizó a través del His₆tag, se utilizó una dilución 1/1000 del anticuerpo policlonal His-probe SC-803 (Santa Mónica Biotechnology). Después de la incubación con el anticuerpo la membrana fue lavada 3 veces durante 5 minutos con buffer TBS, y posteriormente incubada con el anticuerpo secundario IRDye 800CW Goat anti-Rabbit IgG (LI-COR Biosciences; número de catálogo 926-32211) en una dilución 1/25000 en buffer de bloqueo durante 1 hora. La membrana fue nuevamente lavada 3 veces con buffer TBS, y se registró la fluorescencia correspondiente al anticuerpo secundario en el equipo Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences; modelo número 9120).

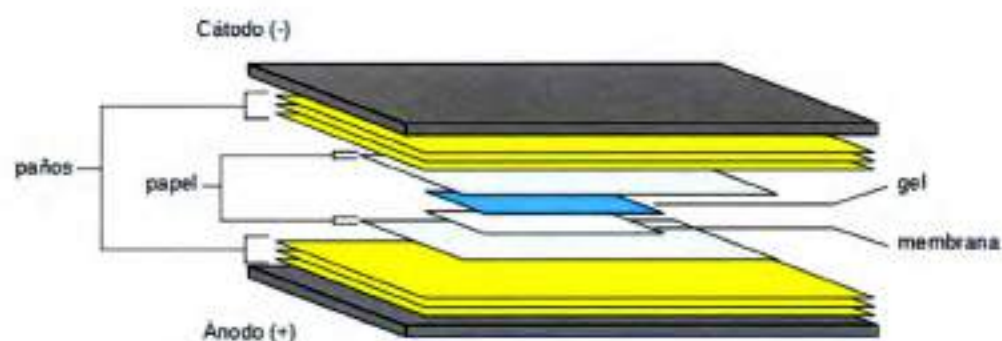


Figura 2.21: Esquema que representa el equipamiento utilizado en las transferencias en semi-seco del material proteico contenido en los geles de poliacrilamida hacia las membranas de PVDF.

2.5.7 - Pruebas de inhibición de proteólisis durante la expresión de HBE

Para comprobar si existe algún tipo de actividad proteolítica que pudiese disminuir el rendimiento en la producción de enzima recombinante, se realizaron pruebas con los inhibidores Leupeptina, Pepstatina-A, Cloroquina, MG132 y Lactacistina. Las máximas concentraciones utilizadas fueron 100 μ M, 15 μ M, 5 μ M, 1 μ M y 5 μ M, respectivamente. Los ensayos fueron realizados en placas de poliestireno de 12 pocillos, sembrando $3,2 \times 10^5$ células Sf9 con 0,8 ml de medio SF-900 II suplementado con SFB

4 % y antibióticos. Luego de haber sido incubadas durante 1 hora a 27° C para permitir que se unan a la placa, se les agregaron 20 µl de stock viral, se las envolvió en papel aluminio para protegerlas de la luz, y se las llevó a estufa a 27° C. A las 24 horas se agregó el inhibidor correspondiente a cada ensayo. Generalmente la expresión de HBE fue analizada a 3, 4, 5 y 6 días post infección, incluyendo siempre un control sin inhibidor para cada tiempo estudiado. Las células fueron procesadas como se describe en el apartado anterior, resuspendiendo el contenido de cada pocillo de las placas en 100 µl de buffer Tris-HCl 20 mM, NaCl 0,5 M, Tritón X100 0,1 % y tomando alícuotas de 20 µl para el análisis por SDS-PAGE, con posterior electrotransferencia e inmunodetección.

2.5.8 - Expresión y purificación de HBE en células de insecto Sf9

Se sembraron 5×10^6 células Sf9 en cápsulas de petri de 10 cm de diámetro con 10 ml de medio SF-900 II suplementado con SFB 4 % y antibióticos, y se incubaron durante 1 hora a 27° C para permitir que se unan a la placa. Luego se les agregaron 0,5 ml de stock viral, se cubrió con papel aluminio para protegerlas de la luz, y se las llevó a estufa a 27° C. Pasados 5 días de infección las células se resuspendieron cuidadosamente utilizando el mismo medio en el que se encontraban, fueron centrifugadas durante 10 minutos a 1500 x g y se descartó el sobrenadante. Las células recolectadas fueron resuspendidas con 0,5 ml de Buffer A por cada placa infectada y sonicadas 3 veces durante 15 segundos (todo el procedimiento se realiza en hielo). El material lisado fue luego centrifugado a 10.000 x g durante 20 minutos y se hizo pasar el sobrenadante por una columna de afinidad HisTrap FF previamente equilibrada en Buffer A, utilizando un flujo de 0,6 ml/minuto. Posteriormente se colocó la columna en el equipo de FPLC Äkta Purifier, y se procedió con la elución de la misma manera que se describe en el apartado 1.5.3. El eluato fue recolectado en alícuotas de 0,5 ml, y en función del cromatograma obtenido (Figura 2.5) se analizaron 20 µl de cada fracción por SDS-PAGE con 15% de acrilamida para la resolución y 3% para la siembra, realizando la electroforesis según los lineamientos también descriptos en el apartado 1.5.3. Se reunieron las fracciones en las que HBE se encontró con mayor grado de pureza (Figura 2.6), se concentraron y dializaron utilizando unidades de filtración para centrifuga Amicon Ultra-4, con un límite de peso molecular nominal de 30,000 Da (Merck Millipore), a 1500 x g frente a buffer Tris-HCl 20 mM (pH 7,5) con glicerol 10

%, y se almacenó a 4° C. En estas condiciones la enzima se mantiene activa y estructuralmente estable durante varios meses.

2.5.9 - Actividad medida por disminución de la absorbancia del complejo amilosa-iodo

2.5.9.1 - Actividad en función del tiempo

Se prepararon mezclas de reacción con 1mg/ml de amilosa, buffer fosfato 50 mM (pH 7,5) y 0,8 µg de HBE (0,016 µg/µl final) en un volumen final de 50 µl, que fueron incubadas a 30° C durante 0, 2, 4, 10 y 30 minutos. Al finalizar las incubaciones, se agregaron a las mezclas 950 µl de reactivo de yodo, y se hizo una curva espectral entre 400 y 700 nm. El mismo procedimiento fue llevado a cabo sobre muestras de reacción conteniendo 1,5 µg de α-amilasa (Sigma, de páncreas porcino; número de catálogo A-6255) en lugar de HBE.

2.5.9.2 - Actividad en función del pH

Mezclas de reacción conteniendo 1mg/ml de amilosa, 0,8 µg de HBE, y buffer 50 mM del pH que corresponda en un volumen final de 50 µl, fueron incubadas a 30° C durante 8 minutos. Como en el apartado anterior, se agregaron 950 µl de reactivo de yodo a las mezclas, y finalmente se midió la absorbancia a 660 nm. Los buffers utilizados en este ensayo fueron: citrato de sodio para el rango de pH 3 a 6, buffer fosfato de sodio para el rango de pH de 6 a 8, y buffer Tris-HCl para el rango de pH de 8 a 9.

2.5.9.3 - Actividad en función de la temperatura

Mezclas de reacción preparadas de la misma manera que en el apartado 2.5.9.1 fueron incubadas durante 8 minutos a 15, 25, 30 37 y 45° C. Nuevamente, se agregaron 950 µl de reactivo de yodo a las mezclas y se midió la absorbancia a 660 nm.

2.5.9.4 - Actividad en función de la concentración de HBE

En este caso las mezclas de reacción contenían 1mg/ml de amilosa, buffer fosfato 50 mM (pH 7,5) y 0,2 0,4 0,6 0,8 1 1,6 y 3,2 μg de HBE en un volumen final de 50 μl . Las mismas fueron incubadas a 30° C durante 8 minutos, y luego se les agregaron 950 μl de reactivo de yodo y se midió la absorbancia a 660 nm.

2.5.10 - Identificación de las ramificaciones generadas por HBE por electroforesis en gel de poliacrilamida asistida por fluoróforo (FACE)

La técnica FACE consiste en derivatizar carbohidratos a partir de su extremo reductor libre, con un fluoróforo que tenga un grupo amino primario, dando como resultado una base de Schiff. En los ensayos aquí descritos se utilizó el fluoróforo ANDS (Figura 2.22). Luego del tratamiento se hace una corrida electroforética en geles de poliacrilamida de alta densidad donde los carbohidratos son separados principalmente en función de su peso molecular, aunque la conformación del glúcido también influye en su movilidad. Por ejemplo, pueden ser separados celobiosa de maltosa, o glucosa de galactosa (129). Finalmente los geles son iluminados con luz de una determinada longitud de onda (entre 300 y 420 nm, dependiendo de la longitud de onda de excitación del fluoróforo), luego son fotografiados con una cámara digital, y la intensidad de las bandas correspondientes a los carbohidratos derivatizados con el fluoróforo puede ser cuantificada mediante densitometría.

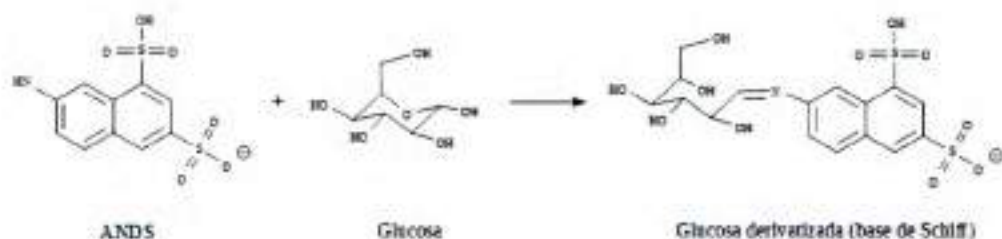


Figura 2.22: Estructura del ANDS, y reacción en la que se forma una base de Schiff con una molécula de glucosa. El producto fluorescente es la forma reducida de la base de Schiff, que se genera mediante el agregado de NaCNBH₃.

2.5.10.1 – Obtención de productos de reacción

Se diseñaron experimentos para analizar la generación de ramificaciones sobre amilosa por acción de HBE en función del tiempo y de la concentración de enzima. Para el caso de la curva de tiempo, en un volumen final de 20 μl se colocó amilosa 1 mg/ml, buffer fosfato 20 mM (pH 7,5) y 0,32 μg de HBE (0,016 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ final) a 30° C durante 0, 4, 10, 30 y 60 minutos. La reacción fue detenida incubando las muestras a 100° C durante 5 minutos. Una vez que las muestras se enfriaron, se reguló el pH con buffer acetato de sodio pH 6 (concentración final 100 mM), y luego del agregado de 8000 unidades de isoamilasa (Sigma, de *Pseudomonas sp.*), se incubaron nuevamente durante 4 horas a 37° C (en un volumen final de 25 μl). Para la derivatización con el fluoróforo de los productos de las reacciones, se adicionó a cada muestra 5 μl de ANDS 0,15 M y 5 μl de NaCNBH_3 1 M, y se las incubó durante 18 horas a 37° C. Por último, los incubados fueron llevados sequedad en evaporador centrífugo de vacío (Jouan, modelo RC 10.09), resuspendidos en 10 μl de agua destilada, y después de agregarles 2,5 μl de SB 5X se llevó a cabo la electroforesis (como se detalla en el apartado siguiente).

Para la identificación de productos en función de la concentración de enzima, se incubaron durante 8 minutos diferentes cantidades de HBE (0,08 0,16 0,32 0,64 y 1,28 μg) con amilosa 1 mg/ml, mientras que para las curvas saturación, los incubados fueron de 25 minutos y se utilizaron concentraciones de amilosa entre 0,1 y 1 mg/ml con 0,16 μg de HBE.

Para la cuantificación de los productos de reacción, paralelamente a cada experimento se realizó una curva de calibración con cantidades conocidas de maltoheptaosa. Generalmente, se incubaron 20 μl de maltoheptaosa 1 mg/ml (4 μg) con 10 μl de ANDS 0,15 mM y 10 μl de NaCNBH_3 1 M, a 37° C durante 18 horas. Luego se realizaron diluciones seriadas, de manera tal que se obtuvieran alícuotas de 10 μl con 12,5, 25, 50, 100, 150, 200 y 250 pmoles de maltoheptaosa, a las que se agregó 2,5 μl de SB 5X para realizar la electroforesis.

Los controles de identificación de oligosacáridos en incubados de amilosa sin HBE, sólo con HBE y sólo con isoamilasa, se realizaron como se detalla en la siguiente tabla:

	-HBE / -isoamilasa	+HBE / -isoamilasa	-HBE / +isoamilasa	+HBE / +isoamilasa
Amilosa 1 mg/ml	SI	SI	SI	SI
Buffer fosfato (pH 7,5) 20 mM	SI	SI	SI	SI
HBE (0,32 µg)	NO	SI	NO	SI
Buffer HBE*	SI	NO	SI	NO
2 horas a 30 °C				
Isoamilasa (8000 unidades)	NO	NO	SI	SI
Buffer isoamilasa**	SI	SI	SI	SI
4 horas a 25 °C				
* Es el buffer en el que se encuentra HBE purificada (buffer Tris-HCl 20 mM pH 7,5 con 10 % de glicerol).				
** Buffer acetato de sodio pH 6 (csp 100 mM).				

2.5.10.2 – Electroforesis, adquisición de imágenes y densitometría

Se prepararon geles de poliacrilamida según el método descrito por Laemmli (95), pero obviando el uso de SDS. Para la construcción de los geles y para la corrida electroforética se utilizó el equipo Miniprotean III Dual Slab Cell Electrophoresis System (BioRad). El gel separador contenía 19 % de acrilamida y 3% el gel concentrador, y sus dimensiones eran 5 cm de alto por 8 cm de ancho, y un espesor de 1 mm. En todas las corridas electroforéticas las muestras fueron sembradas en carriles alternados. Las corridas se realizaron a 10 mA durante 30 minutos y a 16 mA durante 3 horas aproximadamente (o hasta el momento en que el frente de corrida indicado por el azul de bromofenol sale del gel).

Inmediatamente después que termina la electroforesis se expusieron los geles a la irradiación con luz UV-B (280-320 nm) y se tomaron imágenes con una cámara digital y el filtro fotográfico Amplex Gold (Molecular Probes, número de catálogo A24772) para seleccionar sólo la radiación emitida comprendida entre 485-655 nm. La selección de la fuente lumínica y del filtro se realizó teniendo en cuenta las longitudes de onda máximas de absorción (310 nm) y de emisión (450 nm) del fluoróforo. El tiempo de exposición fue de 0,5 segundos, y en todos los casos se tomó una única fotografía abarcando tanto los geles de los productos de reacción como los de la curva de calibración correspondiente. Para la cuantificación de la fluorescencia se utilizó el programa ImajeJ (146, 147), en el que se pueden utilizar dos métodos. Uno consiste en la medición del área de cada pico correspondiente al electroferograma de cada carril (Figura 2.23-B), analizando la intensidad total dentro del área del gel seleccionada en función de un sólo eje, en este caso el eje vertical. La intensidad correspondiente a cada

banda se determina trazando una línea de base uniendo los valles adyacentes a cada pico, y midiendo el área bajo la curva. El otro método es el utilizado para cuantificar la fluorescencia en ensayos de biología celular. En este procedimiento se selecciona el área específica donde se desea medir la fluorescencia (en este caso se seleccionaron bandas). Luego, a la intensidad registrada se descuenta una fluorescencia de fondo, obtenida del promedio de las intensidades provenientes de 3 o más mediciones realizadas en diferentes campos del gel donde no hay ninguna banda. En las Figuras 2.23 A y B se muestra un ejemplo realizado sobre el carril 5 de la Figura 2.23 A, donde puede observarse la manera en que se realizan las selecciones en ambas metodologías.

Si bien las dos formas de medir la fluorescencia arrojan resultados muy similares, se optó por utilizar aquella en la que se seleccionan las bandas individuales (Figura 2.23-B) debido a que en muchas de las corridas electroforéticas algunas bandas sufren una deformación en sus extremos, impidiendo que en la cuantificación de la intensidad en función del eje vertical se logren límites bien definidos entre las bandas (notar la intensidad del valle entre las bandas de maltoheptaosa y maltooctaosa en la Figura 2.23-B). Siguiendo los lineamientos descritos por los desarrolladores, se midió la fluorescencia de cada banda. Para corregir la señal de fondo se realizaron mediciones en 3 o más regiones cercanas a cada banda y realizando un promedio de dichas medidas (intensidad media de fondo). En cada medición el programa nos da los valores del área seleccionada, la intensidad media (por unidad de área), y la densidad integrada (total), entre otras cosas. De esta manera, la fluorescencia total corregida (FTC) para cada banda se calculó de la siguiente manera:

$$\text{FTC} = \text{densidad integrada} - (\text{área de la banda} * \text{intensidad media de fondo})$$

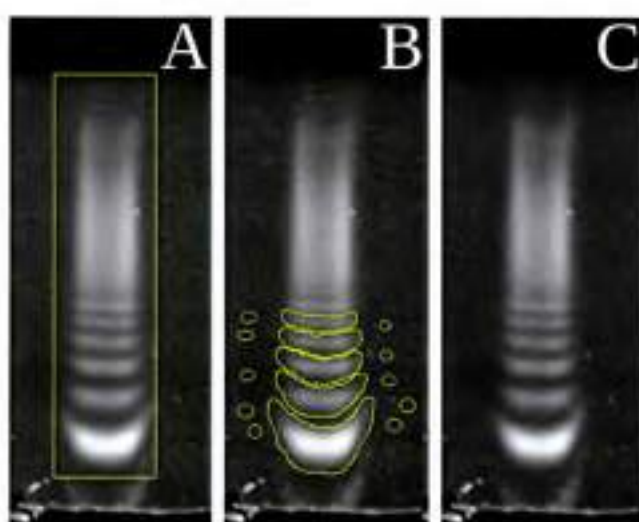


Figura 2.23: Cuantificación de las bandas obtenidas a partir de la electroforesis del producto de la acción conjunta de HBE e isoamilasa, derivatizados con ANDS. **(A)** Selección del área que contiene la fluorescencia total de un carril. **(B)** Selección de las áreas cuando se realiza la cuantificación individual de las bandas. También se realizan mediciones de la intensidad fuera de las bandas, que luego se promedian y se utilizan para descontar la fluorescencia de fondo (selecciones pequeñas a ambos lados de las bandas). **(C)** Carril sin selección.

2.5.11 - Actividad de HBE sobre la cadena glucosídica unida a glucogenina

2.5.11.1 - Liberación de la cadena transferida mediante isoamilólisis

Glucogenina humana truncada y parcialmente glucosilada (HGNwt31) en su estado dimerico ($3 \mu\text{M}$) fue autoglucosilada en su máxima capacidad, incubando a 30°C con $320 \mu\text{M}$ de UDP- ^{14}C -glucosa (20 mCi/mmol) en presencia de $0,1 \text{ M}$ MES ($\text{pH } 7,0$), MnSO_4 5 mM y BSA 1 mg/ml , en un volumen final de $5 \mu\text{l}$. Luego de detener la reacción con EDTA 10 mM , se agregaron $0,7 \mu\text{g}$ de HBE en buffer fosfato de sodio ($\text{pH } 7,5$) 100 mM y se incubó durante 2 horas a 30°C . Por último, se agregaron 8000 unidades de isoamilasa, y se incubó durante 4 horas a 37°C . La cantidad de ^{14}C -glucosa unida covalentemente a glucogenina fue cuantificada de la misma manera que se ha descrito en el apartado 1.5.5 del Capítulo 1 (página 42). Los controles con los que se comparó el resultado de este ensayo comprenden a glucogenina ^{14}C -autoglucosilada en su máxima capacidad sin y con el agregado de HBE o solamente con isoamilasa (Figura 2.17-A).

2.5.11.2 - Cambio en el límite de β -amilólisis sobre la cadena glucosídica unida a glucogenina

Glucogenina de conejo sin glucosilar (RGNapo31) fue sometida a [14 C]-autoglicosilación siguiendo el mismo protocolo detallado en el apartado anterior. Luego se adicionaron a la mezcla 0,8 μ g de HBE en buffer fosfato de sodio (pH 7,5) 100 mM y EDTA 10 mM, y se la incubó 2 horas a 30° C. Posteriormente se complementó la mezcla con 5 μ g de β -amilasa (Boehringer Mannheim GmbH) en buffer citrato de sodio (pH 5) 100 mM, se incubó a 30° C durante 1 hora, y finalmente se cuantificó la cantidad de [14 C]-glucosa unida covalentemente a glucogenina. Los controles con los que se comparó el resultado de este ensayo comprenden a glucogenina [14 C]-autoglicosilada en su máxima capacidad sin y con el agregado de HBE o con β -amilasa solamente (ver Figura 2.18).

**SIMULACIONES DE DINÁMICA MOLECULAR DEL CAMBIO
CONFORMACIONAL REQUERIDO PARA LA TRANSFERENCIA DE LA
PRIMERA GLUCOSA DE LA GLUCOGENINA**

3.1 – INTRODUCCIÓN

El último estudio cristalográfico de la glucogenina publicado (89) fue realizado con la isoforma 1 de la enzima humana truncada en su residuo 262 (HGNI Δ). Dicho trabajo es el primero en que se logra resolver la estructura de la enzima humana, obteniendo cristales en 11 condiciones diferentes, comprendiendo especies no glucosiladas y parcialmente glucosiladas, y dos mutantes una inactiva para la catálisis y la otra inactiva como aceptor de glucosas (descriptas en el capítulo 1 como T82M y Y194F, según la numeración correspondiente a la enzima de conejo). El dato más revelador del estudio, fue la presentación de la estructura de la enzima en una nueva conformación, en la cual un segmento de 30 aminoácidos (residuos 60 a 90) se desplaza hacia una posición en la que el sitio activo queda encerrado (Figura 3.1).

Este cambio estructural inducido por la unión del sustrato al sitio catalítico ya había sido descrito para otras enzimas con actividad glicosiltransferasa (150), y se lo denomina "conformación cerrada" de la enzima. Se considera que la conformación cerrada es la forma *activa* de la enzima, mientras que la abierta sería *inactiva*. En el caso de la glucogenina, cuando la especie cristalizada fue aquella que se encuentra parcialmente glucosilada, no fue posible visualizar la cadena de glucosas unida a tirosina-195 cuando se encuentra en su conformación abierta. En cambio, cuando logró ser cristalizada en su conformación cerrada, se observaron cadenas de 4 y 6 glucosas ordenadas en el dominio con plegamiento Rossmann atribuido a la interacción con el sustrato aceptor (54), permitiendo su visualización por cristalografía de rayos X. Una posible explicación sería que en la conformación cerrada, las interacciones entre los residuos metionina-75 y arginina-77 (pertenecientes al segmento de 30 aminoácidos que se desplaza sobre el sitio activo) con las glucosas unidas a la tirosina, serían imprescindibles para su correcto posicionamiento, posibilitando la transferencia de la

siguiente glucosa. Si esta hipótesis basada en la observación de datos experimentales es correcta, también podría ser válida para el caso en que tirosina-195 (equivalente a la tirosina-194 de la proteína de conejo) es la que actúa como sustrato aceptor para la incorporación de la primera glucosa. Sin embargo, en todas las estructuras cristalográficas resueltas de glucogenina, la tirosina-195 se encuentra a una distancia del UDP-glucosa demasiado grande como para que ocurra la glucosilación, siendo 12 Å la mínima distancia a la que se la ha encontrado (55). Resulta entonces evidente la necesidad de un segundo cambio conformacional que acerque a tirosina-195 al sitio activo, aunque dicha estructura aún no ha sido revelada mediante el uso de herramientas experimentales. Para el caso del dímero de glucogenina, en el Capítulo 1 se presentaron evidencias que indican que la incorporación de la primera glucosa ocurriría a través de un mecanismo intersubunidad, por lo que el movimiento de la tirosina-195 correspondiente a una subunidad se llevaría a cabo hacia el sitio de unión del UDP-glucosa situada en la otra subunidad.

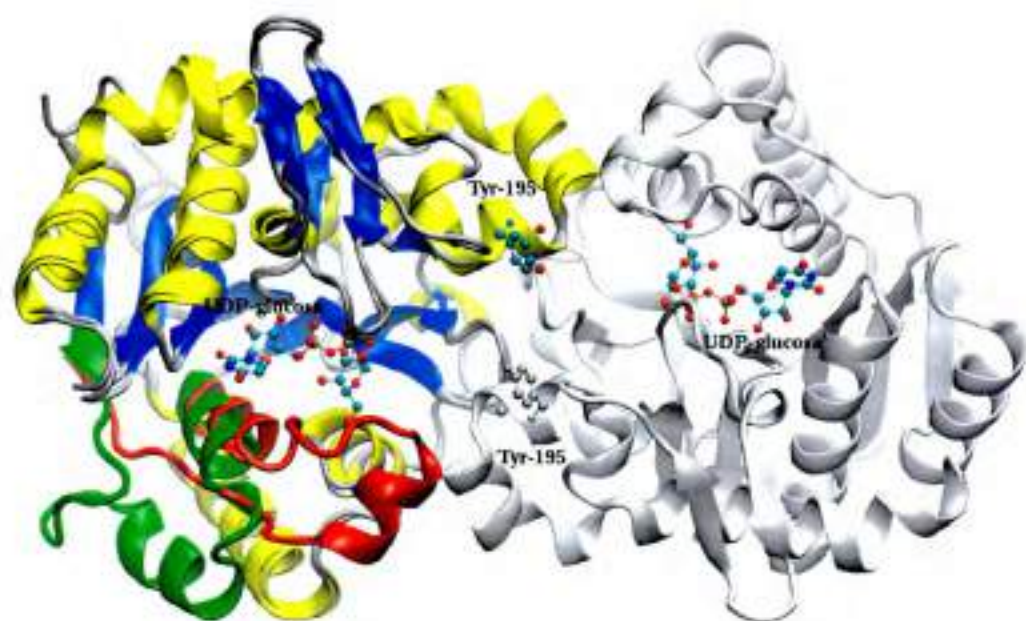


Figura 3.1: Superposición de estructuras de glucogenina en su conformación cerrada y abierta. Se representa el dímero de la conformación cerrada cristalizado con UDP-glucosa (PDB ID: 3T7O), donde una de las subunidades se coloreó según su estructura secundaria, y la otra en color gris. Para la estructura de la glucogenina en conformación cerrada (PDB ID: 3U2T) se representa el monómero, también coloreado según su estructura secundaria como la subunidad del dímero con la que se realizó la superposición. El segmento de 30 aminoácidos que cambia de posición para funcionar como "tapa" del sitio activo se coloreó en verde para el caso de la conformación abierta, y en rojo para la cerrada. También se representaron las moléculas de UDP-glucosa en cada sitio activo, y la tirosina-195 de cada subunidad, siendo coloreada en gris sólo la tirosina perteneciente a la subunidad que lleva el mismo color.

Es muy común encontrar en muchas proteínas que su estructura necesita adoptar diferentes estados conformacionales para poder cumplir con su función. El conocimiento de la variedad de configuraciones accesibles para una proteína, así como el detalle a nivel atómico de ciertos movimientos que pueden llevar a cabo, resulta fundamental para una completa interpretación de las bases moleculares que gobiernan la función que cumplen. En los últimos años, el gran crecimiento de la cantidad de estructuras de proteínas obtenidas experimentalmente, y el aumento del poder computacional disponible, han colocado a las simulaciones moleculares como una poderosa herramienta que logra conectar la estructura de las proteínas con su dinámica. Las simulaciones moleculares utilizan métodos computacionales para tratar de reproducir las interacciones entre los átomos y así comprender las propiedades de las moléculas y materiales. Dichos métodos abarcan desde cálculos de mecánica cuántica para un pequeño grupo de átomos, hasta las simulaciones de dinámica clásica “de grano grueso”, en la cual el modelo en estudio es simplificado, representando en una única partícula un grupo de átomos (151).

Las simulaciones de dinámica molecular han demostrado ser un valioso instrumento para investigar el comportamiento dinámico de macromoléculas estables a temperaturas fijas. Sin embargo, generalmente las transiciones entre diferentes estados conformacionales no tienen lugar durante los tiempos de una simulación convencional, u ocurren sólo de manera accidental o a temperaturas excepcionalmente altas. Las simulaciones de dinámica molecular guiadas (SMD, por sus siglas en inglés de “steered molecular dynamics”) representan una extensión de este tipo de metodología, en la cual se aplica una fuerza externa a un grupo de átomos para obligarlos a desplazarse a una determinada posición. Este tipo de procedimiento es ampliamente utilizado, por ejemplo, en el estudio de las interacciones responsables de la unión de un ligando a una proteína, donde se analiza la respuesta del sistema frente a la aplicación de una fuerza sobre el ligando, con el propósito producir la disociación. También se ha utilizado en el estudio a nivel atómico de grandes estiramientos reversibles que puede sufrir la estructura de algunas proteínas, imitando lo que sucede cuando se utiliza la técnica experimental de microscopía de fuerza atómica para analizar dicho proceso. En esta metodología la ecuación que describe a la fuerza aplicada es la siguiente:

$$F = k * \left[v * t - \left(\vec{r} - \vec{r}_0 \right) * \vec{n} \right] \quad (7)$$

donde k es la constante de fuerza, v es la velocidad, \vec{n} es la dirección y $\vec{r} - \vec{r}_0$ es la diferencia entre la posición del átomo (o grupo de átomos) al tiempo t con respecto a la posición inicial. Si el cambio en la posición ($\vec{r} - \vec{r}_0$) a tiempo t no acompaña al desplazamiento determinado por $v \cdot t$, entonces la fuerza ejercida será mayor. De esta manera, se puede representar la fuerza realizada en función del tiempo, o en función de la posición del átomo o molécula donde se aplica la fuerza, y así obtener un perfil de la fuerza necesaria para llevar a cabo el movimiento deseado.

3.2 – OBJETIVOS

En vista de que hasta el momento no se ha logrado obtener de manera experimental la estructura tridimensional que describe a la conformación que la glucogenina necesita adoptar para ubicar en posición de ataque a la tirosina aceptora de la primera glucosa, este capítulo está enfocado a la obtención de dicha estructura a través del uso de simulaciones de dinámica molecular guiadas, empleando las coordenadas tridimensionales correspondientes al dímero de la enzima humana en su conformación cerrada. Además, el estudio es complementado con simulaciones de dinámica molecular convencionales para evaluar la estabilidad de la estructura final obtenida. Tanto en las simulaciones guiadas como en las convencionales se analizará la aparición de nuevas interacciones que pudiesen favorecer la estabilización de la conformación de ataque.

3.3 – RESULTADOS

3.3.1 - Búsqueda del camino para el acercamiento de la tirosina-195 al centro activo

El estudio aborda la autoglucosilación inter-subunidades intradímico de la glucogenina ya que los únicos datos estructurales existentes provienen de estudios de difracción de rayos X de su forma dimerica. Para acercar la tirosina-195 de una subunidad hacia el UDP-glucosa situado en el sitio activo de la otra subunidad se emplearon simulaciones de dinámica molecular guiadas (SMD), para las que es necesario definir una coordenada de reacción, tal como el cambio en la distancia entre los centros de masa de átomos o moléculas, o el cambio en el valor de un ángulo determinado. En el sistema que aquí se estudió, fue seleccionada como coordenada de reacción la distancia entre el átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo perteneciente al residuo tirosina-195 de la subunidad *a* del dímero de glucogenina (HH-Y195*a*), y el oxígeno anomérico de la porción glucosa del UDP-glucosa de la subunidad *b* (O3b-UDPG*b*). La elección se basó en los resultados publicados por Chaikuad *et al.* en 2011, donde se presentan fuertes evidencias que apuntan a que la autoglucosilación de glucogenina seguiría un mecanismo tipo S_Ni (89). El primer paso de este mecanismo involucra la formación de un ión oxocarbenio como intermediario, facilitado por la protonación de O3b-UDPG*b* por parte del sustrato aceptor, con el posterior ataque nucleofílico del grupo hidroxilo deprotonado del sustrato aceptor hacia el carbono anomérico de la molécula de glucosa que será transferida (Figura 3.2). En las simulaciones de dinámica molecular no se realizan cálculos referidos a redistribución de cargas, ruptura y formación de enlaces, etc., imposibilitando la visualización de reacciones químicas. Sin embargo, se puede analizar la ocurrencia de estructuras que

más se asemejen al estado de transición de la reacción en estudio, denominadas "conformeros de ataque cercano", o NACs, por sus siglas en inglés de "near attack conformers" (152). Ya en 1946 Linus Pauling propuso un concepto ampliamente aceptado en la actualidad, según el cual la base de la catálisis enzimática radica en la mayor afinidad que poseen los sitios activos de las enzimas por la estructura inicial del sustrato en el estado de transición, con respecto a la afinidad por la estructura del sustrato (153). En el caso de la reacción de la glucosilación de tirosina-195, el primer evento que se llevaría a cabo es la protonación de O3b-UDPGb por parte del hidroxilo de la tirosina, por lo que se definirá como NACs en este sistema a las estructuras en las que se encuentra formado el enlace puente de hidrógeno entre HH-Y195a y O3b-UDPGb, siendo ésta la coordenada de reacción que se eligió para las simulaciones SMD, como se mencionó anteriormente. Además, se tomó un valor para el ángulo óptimo del puente de hidrógeno de entre 150° y 180° (154). En la Figura 3.3 se esquematiza la estructura definida como NAC en el sistema que aquí se estudia.

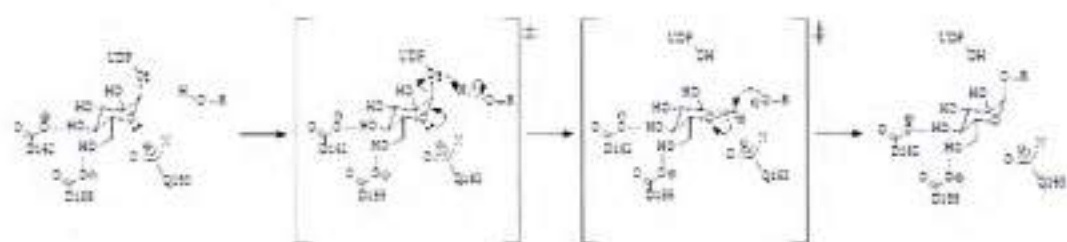


Figura 2.2: Mecanismo propuesto por Chaikwad et al. (89) para el mecanismo de autoglucosilación de glucogenina. Las líneas punteadas representan enlaces en formación o ruptura.

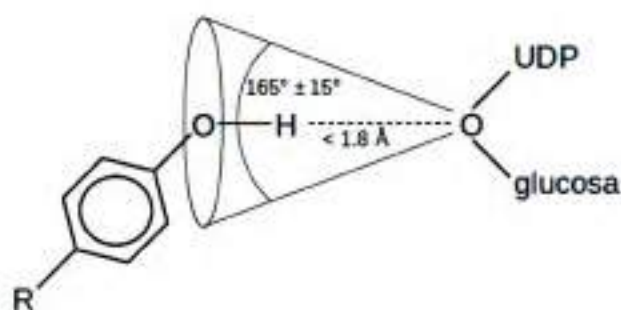


Figura 3.3: Esquema que representa los requerimientos de distancia y ángulo de acercamiento para el puente de hidrógeno formado entre HH-Y195a y O3b-UDPGb que describen la estructura del NAC.

Cuando la dirección en la que se realizó el movimiento de aproximación fue directamente hacia el O3b-UDPGb (Figura 3.4, flecha azul), no se observó una disminución de la fuerza aplicada al llevar a tirosina-195 hasta la posición del UDP-glucosa (Figura 3.5-A, marcado con **). La trayectoria que resultó conveniente para llevar a cabo el movimiento de tirosina-195, fue en cambio aquella en la que se dirige a HH-Y195 hacia el centro de dicha cavidad (Figura 3.4, flecha roja), observándose una disminución total de la fuerza aplicada una vez que se alcanzó la mínima distancia entre el HH-Y195a y el O3b-UDPGb (Figura 3.5-A, marcado con *). En la Figura 3.5 se comparan las distancias entre HH-Y195 y O3b-UDPGb en función del tiempo para las SMD realizadas en las 2 direcciones mencionadas, y sus correspondientes perfiles de la fuerza aplicada. Si bien cuando se utilizó la dirección hacia O3b-UDPGb la distancia entre HH-Y195a y O3b-UDPGb alcanzada fue menor (Figura 3.5-B), la disminución en la fuerza aplicada fue, en cambio, claramente mayor cuando la orientación empleada fue hacia el centro de la cavidad (Figura 3.5-A, marcado con *), indicando que algún evento ocurrido durante la simulación provocó que no sea necesaria la aplicación de una fuerza para que el HH-Y195a permanezca en el lugar al que ha llegado. En el apartado siguiente (3.3.2) se analizarán las bases moleculares determinantes de la diferencia observada en estos perfiles de fuerza. En base a estos resultados, se prosiguió con el estudio utilizando la orientación que dirige a tirosina-195 hacia el centro de la cavidad (Figura 3.4, flecha roja).

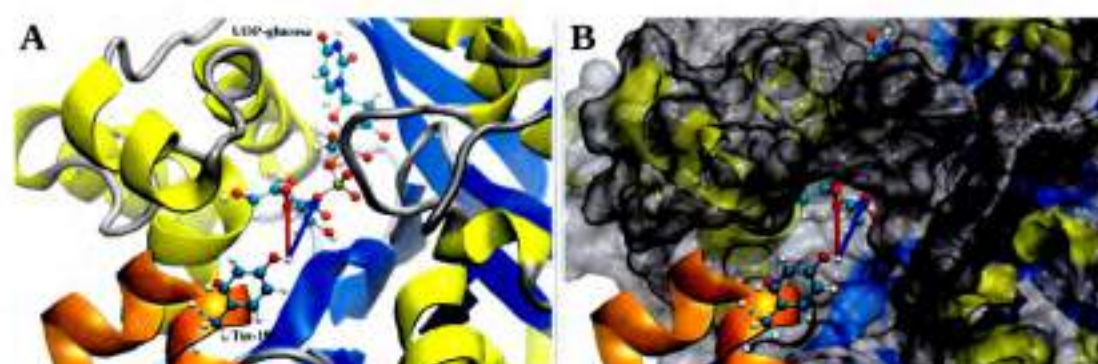


Figura 3.4: Direcciones utilizadas en la búsqueda del camino para que tirosina-195 logre colocarse en posición de ataque para la incorporación de la primera glucosa. La flecha color azul indica la dirección hacia el O3b-UDPG, y la flecha roja hacia el carbono α del residuo lisina-85b (no representado en la imagen). (A) La cadena principal de la subunidad donde se encuentra la molécula de UDP-glucosa se representa con cintas, con una coloración correspondiente a su estructura secundaria (hélice α en amarillo y láminas β en azul). La hélice- α de la subunidad que contiene la tirosina-195a sobre la que se aplica la fuerza se encuentra coloreada en naranja. (B) La imagen presentada en (A), con el agregado de una representación de la superficie (color gris con transparencia) de la subunidad hacia la que se dirige HH-Y195a, donde puede visualizarse cómo queda definida la cavidad por la que tirosina-195a puede acceder al UDP-glucosa.

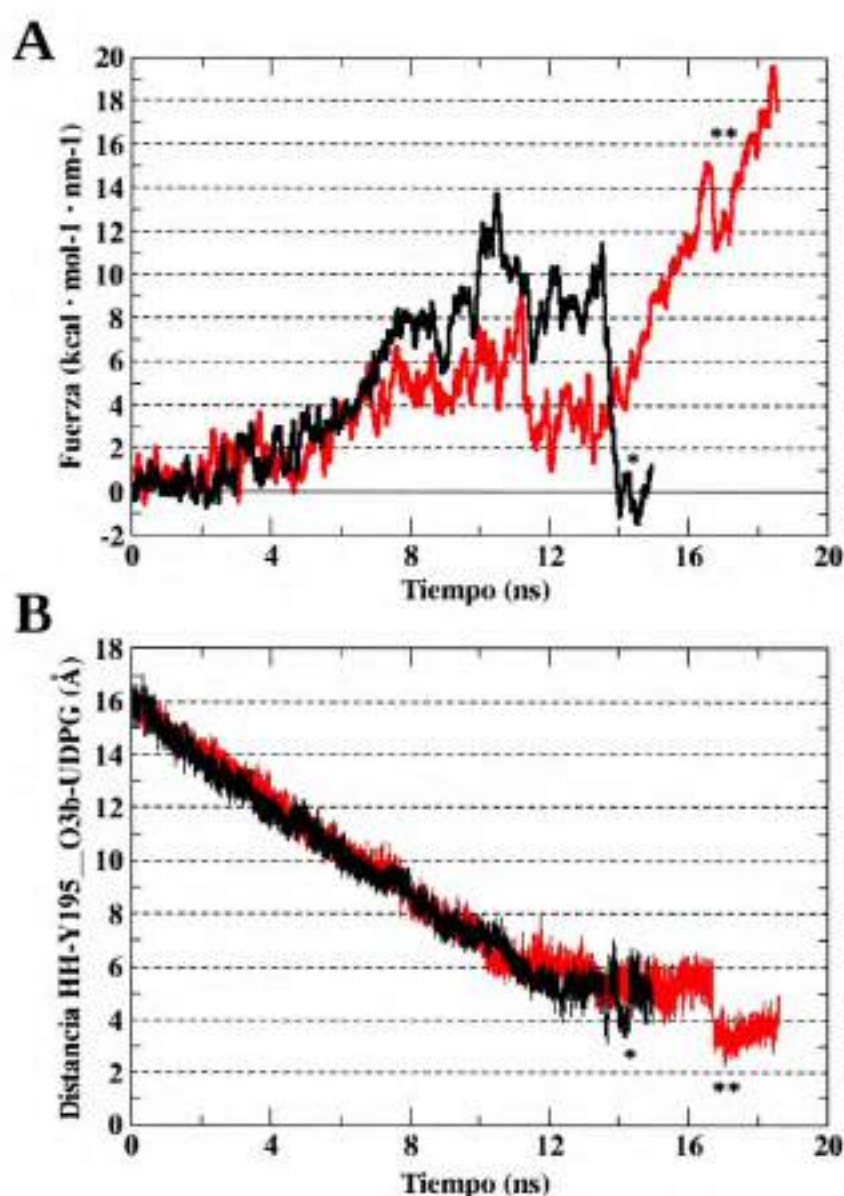


Figura 3.5: Perfil de fuerza aplicada (A) y distancia entre HH-Y195a y O3b-UDPGb (B) en función del tiempo de simulación, para las dos direcciones empleadas para realizar el desplazamiento. Con línea roja se presentan los resultados cuando se dirigió a HH-Y195a directamente hacia O3b-UDPGb, y con línea negra los correspondientes al movimiento realizado hacia el centro de la cavidad. Para ambas simulaciones SMD se utilizó una $k = 10 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{nm}^{-2}$.

En la Figura 3.6-A se encuentran representadas las fuerzas ejercidas sobre HH-Y195a en función del tiempo de simulación para dos constantes de fuerza diferentes (2 y $10 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{nm}^{-2}$), y en la Figura 3.6-B la variación en la distancia entre HH-Y195a y O3b-UDPGb correspondiente. Como puede apreciarse, la mínima distancia



entre HH-Y195a y O3b-UDPGb alcanzada en cada simulación SMD coincide con una disminución en la fuerza aplicada. Sin embargo, sólo en la SMD donde se empleó el menor valor de k , la distancia entre HH-Y195a y O3b-UDPGb llegó a tomar un valor cercano a 2 Å, en el que se considera que el enlace puente de hidrógeno se ha formado, mientras que cuando se usó $k = 10 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{nm}^{-2}$ no se logró alcanzar una distancia propia para un enlace de este tipo.

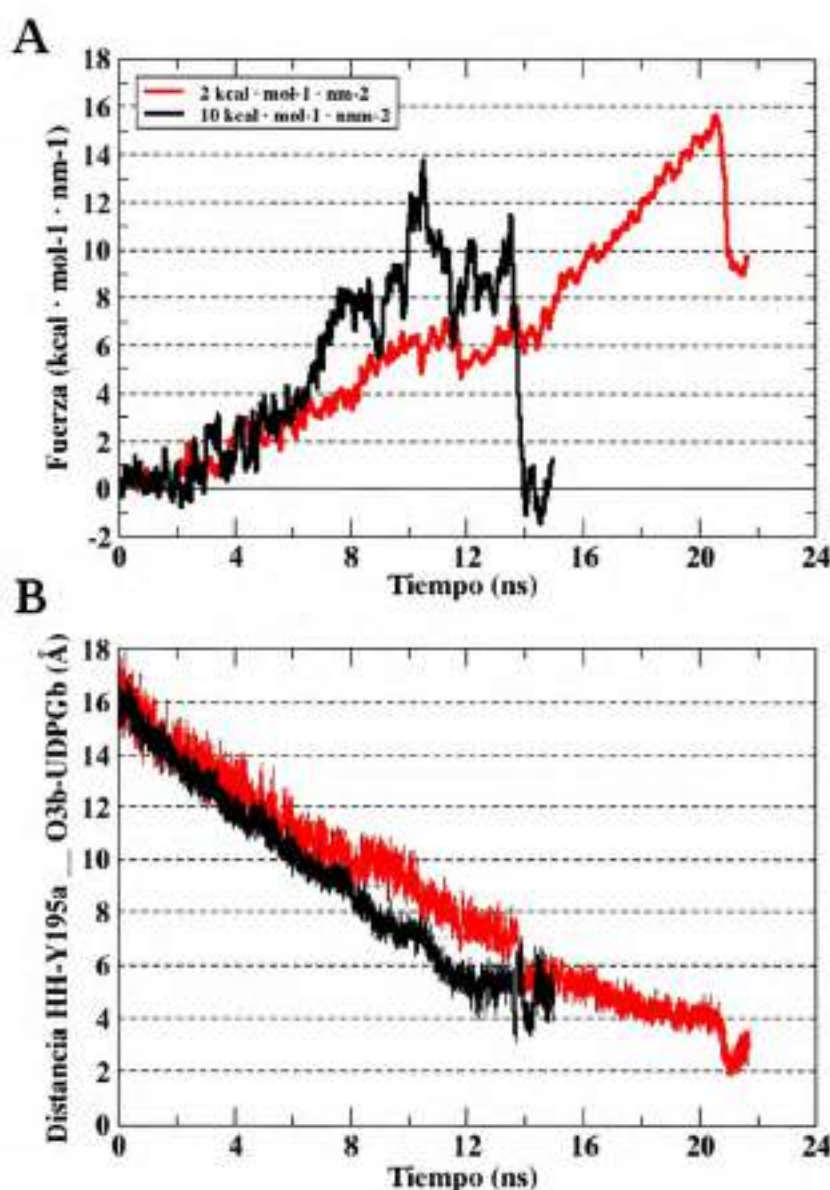


Figura 3.6: Perfil de fuerza aplicada (A) y distancia entre HH-Y195a y O3b-UDPGb (B) en función del tiempo de simulación, utilizando una $k = 2$ (línea roja) o 10 (línea negra) $\text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{nm}^{-2}$.

El hecho de que cuando menor fue la magnitud de la k utilizada, se registraran valores menores para la distancia mínima entre HH-Y195a y O3b-UDPGb puede deberse a que HH-Y195a tendría más libertad para explorar diferentes posiciones cuando la k es más pequeña, permitiendo que pueda encontrarse con O3b-UDPGb y formar un enlace puente de hidrógeno con éste. Precisamente, en el perfil correspondiente a $k = 2 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{nm}^2$ la fuerza no disminuye a los valores obtenidos cuando $k = 10 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{nm}^2$, ya que la presencia del enlace puente de hidrógeno entre HH-Y195a y O3b-UDPGb mantendría alejado a HH-Y195a de la posición a la que se le está forzando a llegar. En la Figura 3.6 también puede advertirse que mientras menor es el valor de k empleado, mayor es el tiempo necesario para que se alcance la mínima distancia entre HH-Y195a y O3b-UDPGb, debido a que HH-Y195a demora más tiempo en alcanzar la posición de referencia determinada por $v \cdot t$ (ecuación 7). Vale la pena aclarar que todas las simulaciones SMD presentadas en las Figuras 3.5 y 3.6 fueron más largas que lo representado. Sólo se graficó hasta el tiempo de simulación en que se alcanzó la mínima distancia entre HH-Y195a y O3b-UDPGb para una visualización más clara de los resultados. En los tiempos posteriores (no graficados) la posición de HH-Y195a sobrepasa la posición que ocupa el UDP-glucosa, alejándose del mismo.

3.3.2 – Interacciones estabilizantes de la conformación final

Cuando se analizaron las trayectorias correspondientes a cada SMD donde se aplicó la orientación que dirigió a tirosina-195 directamente hacia el centro de la cavidad, se identificó la formación de interacciones que acompañaron la disminución de la fuerza aplicada. De este modo, se encontró que el grupo carboxilo del residuo aspartato-125b forma un puente de hidrógeno con el hidroxilo de la serina-196a, inmediatamente adyacente a la tirosina-195a sobre la que se aplica la fuerza (Figura 3.7, A). El aspartato-125 fue previamente identificado por cristalografía de rayos X, como un aminoácido importante en la unión del extremo no reductor de una cadena de glucosas al sitio de unión del sustrato aceptor (Figura 3.8). Lo mismo sucede con las interacciones hidrofóbicas encontradas entre tirosina-195a y los aminoácidos leucina-214b y metionina-75b (Figura 3.7-B), que también están presentes cuando el sustrato aceptor es un oligosacárido (89). Por otra parte, el aminoácido arginina-77b, perteneciente al segmento que actúa como “tapa” del sitio activo, muy importante en la

estabilización de la conformación cerrada por su interacción con los grupos fosfato del UDP-glucosa, podría participar facilitando la llegada de tirosina-195a a través de la formación de enlaces puente de hidrógeno entre alguno de los átomos de hidrógeno de los grupos amino de la cadena lateral y el grupo hidroxilo de tirosina-195a (Figura 3.7-A).

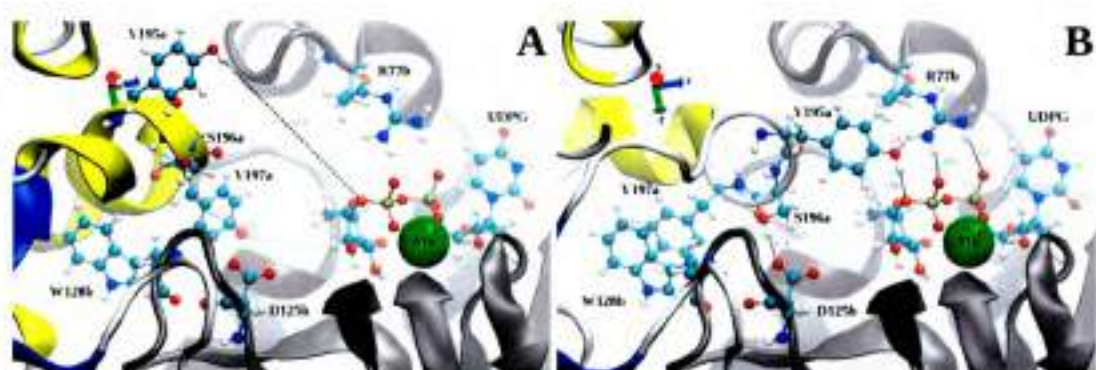


Figura 3.7: Detalle de las interacciones generadas cuando tirosina-195 alcanza una posición de ataque para la incorporación de la primera glucosa (B). Con línea punteada se indican los enlaces puente de hidrógeno formados entre HH-Y195 y O3b-UDPG, así como también aquellos encontrados entre serina-196a y aspartato-125b, tirosina-195a y arginina-77b, y los grupos fosfato del UDP-glucosa y arginina-77b. Los números en gris indican las distancias en Å. También puede observarse la disposición paralela de los anillos aromáticos de tirosina-197a y triptofano-128b. En (A) se representa la disposición de los aminoácidos antes de efectuar el movimiento. En (C) se muestra la misma situación que en (B), pero desde un ángulo que favorece la visualización de las posiciones de leucina-214b y metionina-75b con respecto a la de tirosina-195a. En el extremo superior izquierdo se colocó un indicador de la orientación de los ejes x, y, z.

Una diferencia importante con respecto a los datos experimentales en los que se encuentra una cadena de glucosas como sustrato aceptor (89) en lugar de tirosina, es que en los resultados aquí presentados tirosina-197a no interacciona con el sustrato aceptor, sino que cambió su posición dirigiéndose hacia el interior de la hélice- α que la contiene, generando una interacción hidrofóbica importante con el triptofano-128b (Figura 3.7). Incluso, cuando se utilizó una $k = 10 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{nm}^{-2}$, tirosina-197b continúa su movimiento ubicándose aún más adentro de la hélice- α que la contiene, en una zona muy rica en aminoácidos hidrofóbicos, como leucina-189a, leucina-198a, fenilalanina-201a y fenilalanina-245a (Figura 3.9).

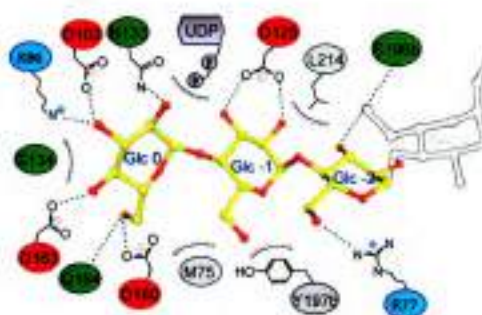


Figura 3.8: Interacciones descritas por cristalografía de rayos X entre los aminoácidos del sitio activo y una cadena de glucosas que acaba de actuar como aceptora de una molécula de glucosa ("Glc 0"). "Glc 1" es el extremo reductor del oligosacárido que sirvió como sustrato aceptor en una reacción de sustitución nucleofílica interna (S_{ni}). Imagen tomada de Chaikuad *et al.* (89).

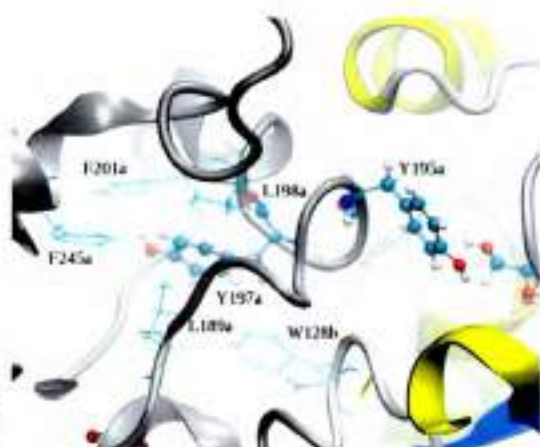


Figura 3.9: Disposición de tirosina-197a dentro de la hélice-α que la contiene. Con líneas y esferas se representan tirosina-195a y tirosina-197a, mientras que leucina-189a, leucina-198a, fenilalanina-201a y fenilalanina-245a se representan sólo con líneas

En la Figura 3.10 se presenta la evolución en función del tiempo de las distancias que definen las interacciones mencionadas, donde se puede apreciar la coincidente disminución de la fuerza aplicada con la aparición de cada una de esas interacciones. Notar que la interacción de tirosina-195a con arginina-77b es inmediatamente anterior a la formación del puente de hidrógeno que caracteriza a la estructura del NAC. El movimiento de la cadena lateral de tirosina-197 también pudo seguirse a través del cambio en el valor de los ángulos dihedros psi y phi de tirosina-197 (Figura 3.11). De esta manera es posible evidenciar el movimiento más pronunciado de la tirosina-197 cuando se utilizó una $k = 10 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{nm}^{-2}$, observándose un mayor cambio en el ángulo psi (Figura 3.11-A), mientras que cuando se toma en cuenta la distancia entre los centros de masa de los anillos aromáticos de la tirosina-197a y el triptofano-128b, lo que se observa es que en los últimos ps de cada simulación las cadenas laterales se alejan un poco (Figura 3.10-C). Cabe destacar que las interacciones hidrofóbicas (como las que describen en los gráficos C y D de la Figura 3.10) se hacen importantes cuando la distancia entre los grupos es menor a $\sim 6 \text{ \AA}$, siendo muy fuertes cuando se encuentran a una longitud de $\sim 4 \text{ \AA}$ (155).

Cuando se analizó la trayectoria correspondiente a la SMD en que se direccionó a HH-Y195a hacia el O3b-UDPGb (Figura 3.3, flecha azul) y se utilizó una $k = 10 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{nm}^{-2}$, se observó que tirosina-197a no cambió su posición hacia la región donde se encuentra el triptofano-128b. Tampoco se alcanzó a formar el enlace puente de hidrógeno entre la serina-196a y el aspartato-125b. La única similitud con respecto a lo

observado en la otra orientación utilizada, es la interacción hidrofóbica de tirosina-195a con leucina-214b (resultados no mostrados).

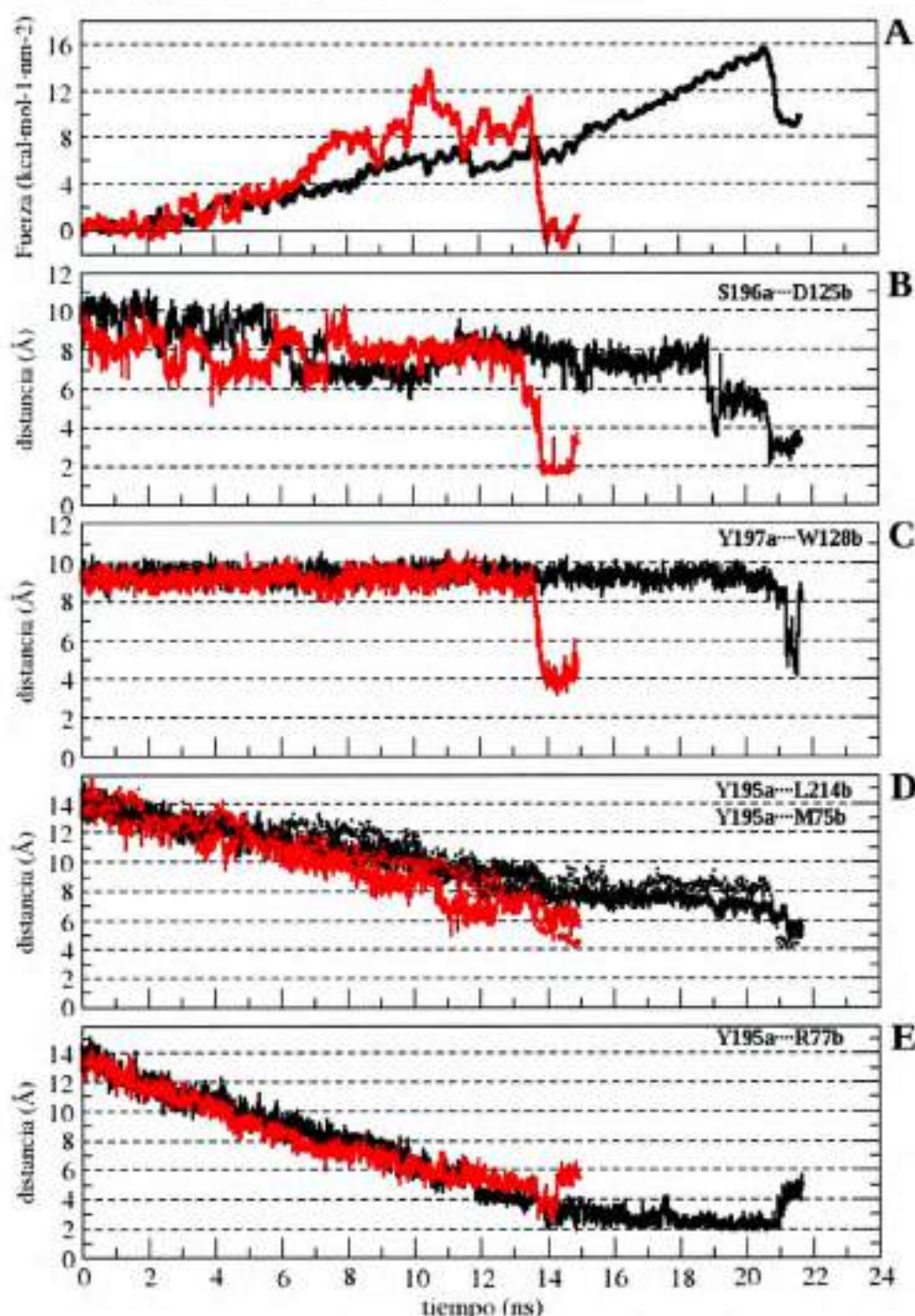


Figura 3.10: Distancias que describen las interacciones encontradas de manera concomitante con una reducción significativa de la fuerza aplicada para los 2 valores de k utilizados, 2 (línea negra) y 10 (línea roja) kcal · mol⁻¹ · nm⁻². Se registraron las distancias entre el átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo de serina-196a y uno de los oxígenos del carbonilo de aspartato-125b (B), el centro de masa de los anillos aromáticos de tirosina-197a y triptofano-128b (C), los centros de masa de las cadenas laterales de metionina-75b (línea punteada) y leucina-214b (línea continua), con el centro de masa de tirosina-195a (D), el átomo de oxígeno del grupo hidroxilo de tirosina-195a y uno de los átomos de hidrógeno de uno de los dos grupos amino de arginina-77b (E). En (A) se presentan los perfiles de fuerza aplicada correspondientes.



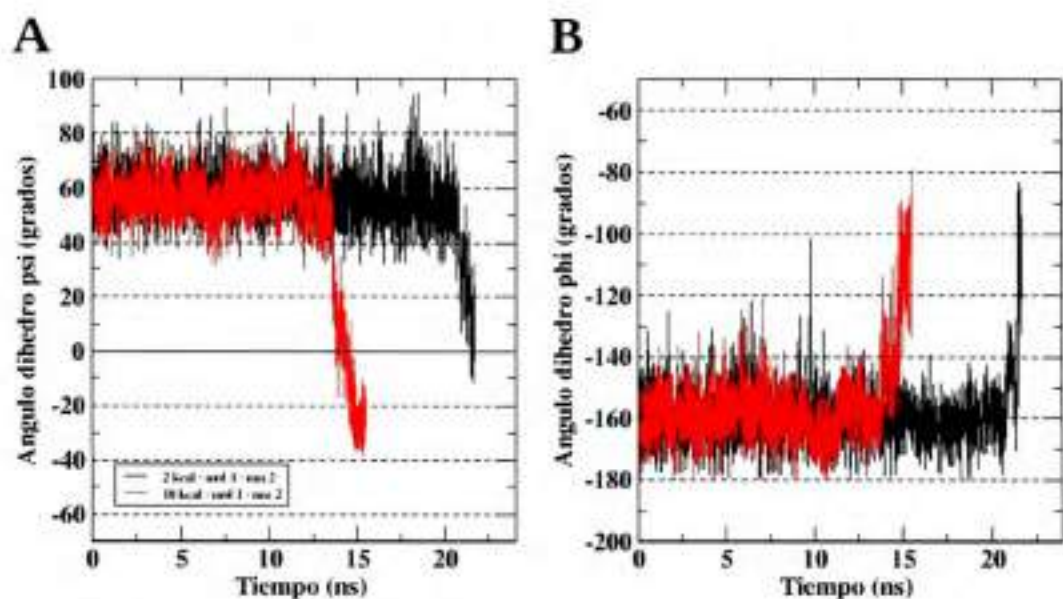


Figura 3.11: Evolución en función del tiempo de los ángulos dihedros ψ (A) y ϕ (B) de tirosina-197a para las simulaciones SMD a 2 y 10 $\text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{nm}^{-2}$.

3.3.3 - Conformaciones de ataque

Con la finalidad de evaluar la formación, estructura y tiempo de permanencia de los NACs luego de las simulaciones SMD, se realizaron simulaciones de dinámica molecular convencionales (CMD), tomando como punto de partida estructuras correspondientes a tiempos de simulación en los que hubo una marcada disminución de la fuerza. Se eligió como punto de partida para llevar a cabo una simulación CMD de 25 ns, una conformación correspondiente al tiempo de simulación de 21 ns de la SMD donde se utilizó una $k = 2 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{nm}^{-2}$, ya que en este punto se observó la formación del puente de hidrógeno que describe al NAC (Figura 3.7 B y C). En esta simulación pudo observarse que el puente de hidrógeno entre HH-Y195a y O3b-UDPGb se mantuvo durante más de 15 ns, incluso con una convergencia hacia valores menores en la distancia del enlace, así como del ángulo óptimo del enlace (Figura 3.12), hasta que aproximadamente a los 16 ns se pierde. La representación de la longitud del enlace en función del ángulo donador-H...aceptor constituye una buena manera de visualizar la coexistencia de distancias y ángulos en los enlaces puentes de hidrógeno formados (Figura 3.13). En la Figura 3.14 puede observarse que previo a la pérdida de la estructura NAC (aproximadamente a los 12 ns), se rompe tanto el enlace puente de

hidrógeno entre el aspartato-125*b* y la serina-196*a*, como la interacción hidrofóbica establecida por el apilamiento de los anillos aromáticos de tirosina-197*a* y triptofano-128*b*, evidenciable mediante el análisis de la distancia entre los centros de masa de los anillos aromáticos en función del tiempo.

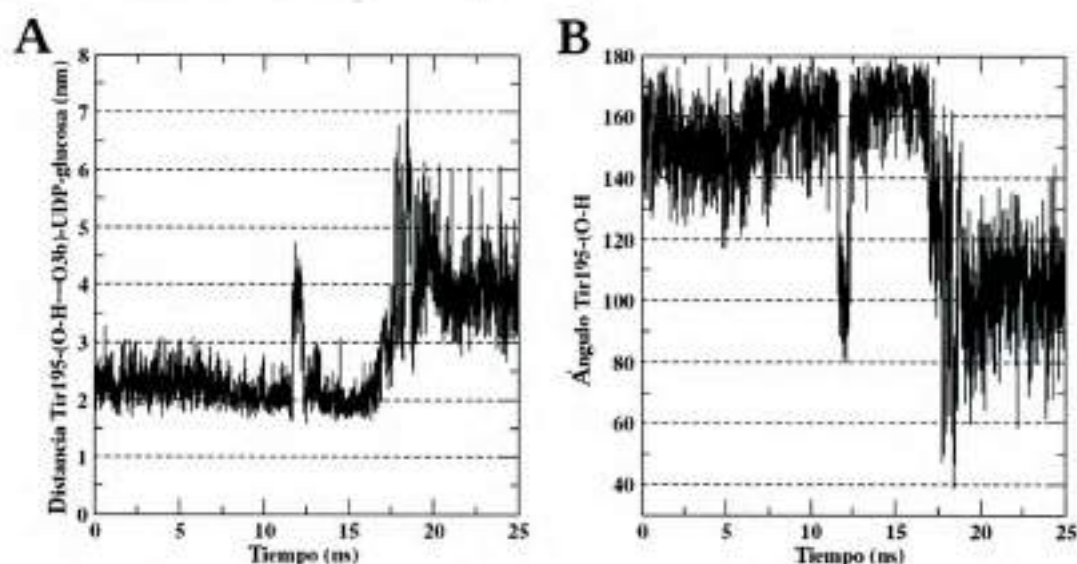


Figura 3.12: Variación de la distancia (A) y el ángulo (B) en función del tiempo para el enlace puente de hidrógeno formado entre HH-195*a* y O3*b*-UDPG durante la simulación SMD.

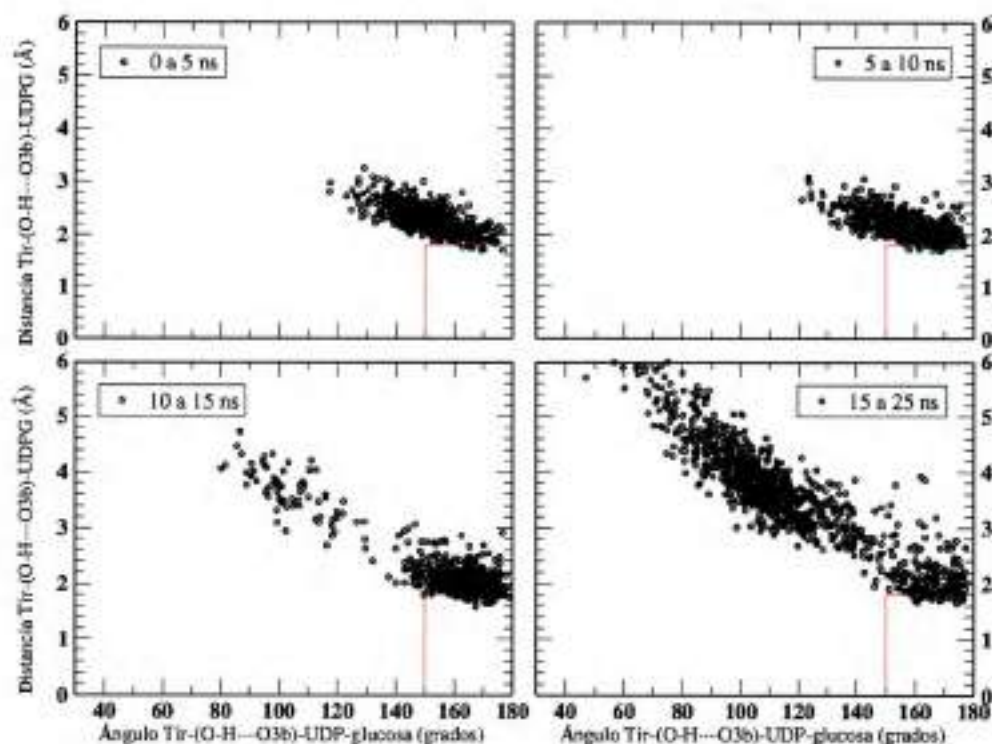


Figura 3.13: Representación de los NACs a través de la gráfica de la distancia en función del ángulo de acercamiento para el puente de hidrógeno formado entre HH-Y195*a* y O3*b*-UDPG*b* en la simulación CMD. El recuadro demarcado por las líneas rojas indica la distancia y el rango óptimo del ángulo para la formación del enlace.

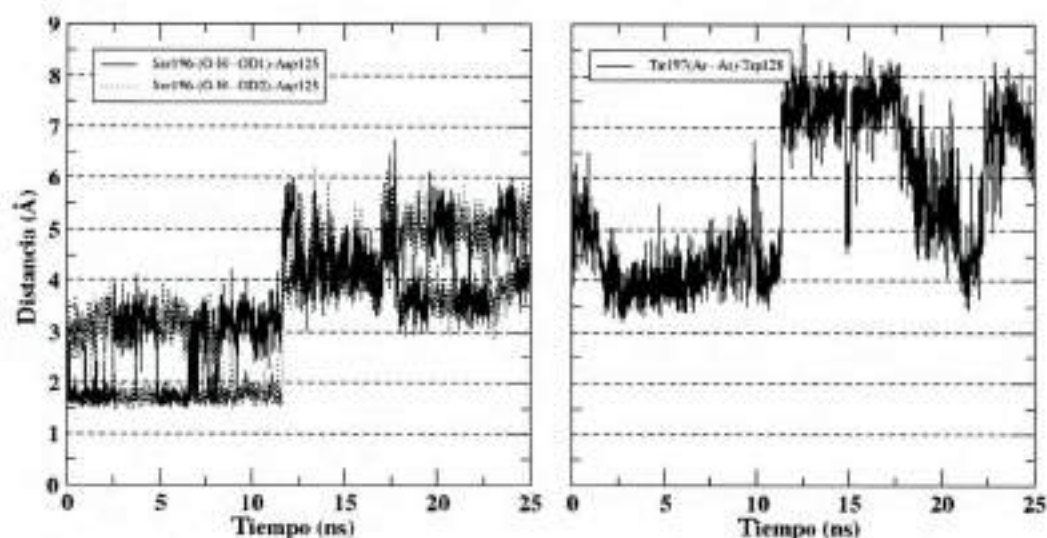


Figura 3.14: Distancia en función del tiempo para el puente de hidrógeno formado entre serina-196a y aspartato-125b (A), y entre los anillos aromáticos de tirosina-197a y de triptofano-128b (B), en la simulación CMD. En las leyendas los dos oxígenos carbonílicos del aspartato-125b fueron nombrados como OD1 y OD2, y "Ar" representa los anillos aromáticos de los aminoácidos tirosina-197a y triptofano-128b.



3.4 - DISCUSIÓN

Hasta el momento no se ha logrado obtener experimentalmente la estructura correspondiente a la conformación requerida para la incorporación de la primera glucosa en la reacción de autoglucosilación de glucogenina. En este capítulo se emplearon las simulaciones de dinámica molecular guiada (SMD) para tratar de develar que conformación podría dar cuenta de dicha reacción. Las estructuras de glucogenina disponibles para realizar este análisis han sido obtenidas por cristalografía de rayos X, en las que se la encuentra formando un dímero, y con tirosina-195 a una distancia de 12 a 20 Å de la molécula de UDP-glucosa de cualquiera de las subunidades (55, 89). En el dímero, las primeras unidades de glucosa son transferidas mediante un mecanismo intersubunidad (156), por lo que para que ocurra la glucosilación de tirosina-195 debiera haber un acercamiento de este aminoácido perteneciente a una subunidad hacia el sitio activo de la otra subunidad donde se encuentra la molécula de UDP-glucosa.

Se han descripto experimentalmente dos estados conformacionales para glucogenina, uno abierto e inactivo, y otra cerrado y activo (89), siendo la estructura cerrada la elegida para comenzar con este estudio. La estrategia del uso de SMD involucró la aplicación de una fuerza sobre el átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo de la tirosina-195 de una subunidad (HH-Y195 α), con dirección hacia la molécula de UDP-glucosa de la otra subunidad, a una velocidad de 1 Å/ns. La estructura del conformero de ataque cercano (NAC) que se buscó en este trabajo, comprende la formación del puente de hidrógeno entre HH-Y195 α del aceptor y el átomo de oxígeno anomérico de la porción glucosa del sustrato dador (O3b-UDPG β). Con el fin de lograr la formación de esta interacción, primero se utilizó una orientación que dirigió a HH-Y195 α directamente hacia el O3b-UDPG β , aunque no se obtuvieron resultados positivos. Por esto, se optó por una orientación cuya trayectoria hace pasar a tirosina-195 por el centro de la

cavidad que se forma cuando la glucogenina adopta la conformación cerrada (Figura 3.4). En este caso, se evidenció una significativa disminución de la fuerza aplicada, necesaria para trasladar a HH-Y195a a una posición cercana a la de O3b-UDPGb como para permitir la formación del puente hidrógeno (Figura 3.6). El análisis de las trayectorias de las SMD arrojó información acerca de las interacciones responsables de la mencionada caída en la fuerza necesaria para mantener a HH-Y195a en la posición requerida (Figuras 3.7 y 3.10). En algunas de las interacciones encontradas participaron los mismos aminoácidos que fueron descritos cuando el sustrato aceptor es el extremo reductor de una cadena de glucosas (Figura 3.8), como es el caso de las interacciones hidrofóbicas de tirosina-195a con metionina-75b y con leucina-214b. En el caso de la arginina-77b, cuando el sustrato aceptor es una glucosa, su cadena lateral forma puente de hidrógeno con la molécula de glucosa situada en el sitio "Glc-2" (Figura 3.8), mientras que cuando el sustrato aceptor es tirosina-195, la arginina-77b podría participar en la instancia inmediatamente previa a la formación de la estructura NAC. Por otra parte, la serina-196a y el aspartato-125b participan en la formación de puentes de hidrógeno con el sustrato aceptor cuando éste es un oligoglucano, pero formarían un importante puente de hidrógeno entre ellos cuando la reacción es la incorporación de la primera glucosa sobre tirosina-195. El rol del aspartato-125b es el que permanecería invariable, siendo en ambos casos muy importante en la estabilización del sustrato aceptor. El rol de tirosina-197a también es importante cualquiera sea el sustrato aceptor, ya sea interaccionando con la molécula de glucosa terminal de un oligoglucano, o cambiando su posición para establecer una fuerte interacción hidrofóbica con el triptofano-128b que permite la estabilización de la estructura en la que tirosina-195 forma parte del NAC.

Cuando se llevaron a cabo simulaciones convencionales (CMD) a partir de la estructura obtenida luego de la simulación SMD, el puente de hidrógeno que define al NAC se mantuvo durante un tiempo considerable (más de 15 ns). Además, durante el período de tiempo en que se mantuvo el NAC, los valores de distancia y ángulo del puente de hidrógeno entre HH-Y195a y O3b-UDPGb convergieron hacia valores óptimos (Figura 3.12 y 3.13). La subsistencia de la estructura NAC durante un tiempo considerable en la simulación CMD haría suponer que se ha encontrado la estructura que se buscaba, y consecuentemente las interacciones determinantes de que esta conformación exista.

En el presente estudio no se encontraron nuevos residuos aminoacídicos responsables de la estabilización de tirosina-195 como sustrato aceptor, sino que se describen diferentes interacciones para algunos de los aminoácidos que ya se ha demostrado experimentalmente que participan en la unión del sustrato aceptor al sitio activo de glucogenina, cuando éste es un oligoglucano (Figura 3.8). En este contexto resulta lógico pensar que los mismos residuos estén involucrados en la interacción con el sustrato aceptor, independientemente de que se trate de la tirosina-195 o el extremo no reductor de una cadena de glucosas.

Los resultados obtenidos representan la primera noción estructural acerca del cambio conformacional requerido para la incorporación de la primera glucosa sobre tirosina-195 para dar inicio a la formación del oligoglucano generado por la autoglucosilación de glucogenina. El conocimiento de las interacciones responsables de la presencia de este cambio estructural podría ser tomado como referencia para el diseño de experimentos que corroboren lo observado mediante este enfoque teórico.

3.5 - Procedimientos Experimentales

3.5.1 - Herramientas y software

Para la preparación del sistema se utilizó el programa LEaP (157, 158), y para la minimización de energía, equilibrado del sistema con un arreglo microcanónico (NVE) e isotérmico-isobárico (NPT), y las simulaciones de producción, se utilizó el programa ACEMD (159), especialmente desarrollado para el uso de unidades de procesamiento gráfico (GPU) en la producción de simulaciones de biomoléculas. El GPU utilizado fue el NVIDIA GeForce GTX 570. Para el análisis de las trayectorias se usaron los programas ptraj y cpptraj (160), y para la visualización de las estructuras y preparación de imágenes el programa VMD (161).

3.5.2 - Preparación del sistema

Las coordenadas atómicas del dímero de glucogenina humana utilizadas fueron aquellas correspondientes a la enzima en su conformación cerrada, cristalizada con UDP-glucosa y Mn^{2+} (89; PDB ID: 3T7O). Las moléculas de agua cristalográficas fueron eliminadas, y se creó una caja de solvatación utilizando el modelo de agua SPC/E (162), dejando una distancia mínima de 16,5 nm entre cualquier átomo de la proteína y el borde de la caja. El campo de fuerza utilizado para describir los parámetros de la proteína fue el ff03 de AMBER (163), mientras que para el UDP-glucosa se utilizó el GLYCAM-06 (164) con la introducción algunos parámetros descriptos especialmente para ésta molécula por Petrová *et al.* (165). Las cargas fueron neutralizadas con iones Na^+ , y se agregaron iones Na^+ y Cl^- necesarios para una concentración 0,15 M. El resultado final es un sistema consistente de 29373 moléculas de agua, con un total de

96531 átomos. Para todos los enlaces covalentes en los que se encuentran involucrados átomos de hidrógeno, se aplicó el algoritmo SHAKE (166) para restringir su longitud al valor de equilibrio. Las interacciones electrostáticas de largo alcance fueron manejadas con una implementación para GPU (167) del algoritmo PME (168). Para las interacciones de Van der Waals entre átomos no enlazados, se utilizó una distancia límite de 9 Å, con una distancia de intercambio de 7,5 Å. La temperatura se mantuvo a 293 K mediante el uso del termostato de Langevin, con una constante de amortiguación de $0,1 \text{ ps}^{-1}$. El tiempo de integración empleado fue de 2 fs.

Se realizó una minimización de la energía durante 10000 pasos, seguida de un equilibrado de 1 ns con un arreglo microcanónico (NVE), donde la posición de los átomos que componen la cadena principal de la proteína fue restringida utilizando una constante elástica de $1 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{nm}^{-2}$. Finalmente se llevó a cabo un equilibrado isotérmico-isobárico durante 6 ns, sin restricción en las posiciones, y utilizando el baróstato de Berendsen para mantener la presión a 1 atmósfera. Luego, para todas las simulaciones de producción, se utilizó un arreglo canónico (NVT).

3.5.3 - Simulaciones de dinámica molecular guiada

Se aplicó una fuerza externa sobre el átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo de la tirosina-195 (HH-Y195) de una de las subunidades del dímero de glucogenina, en dirección al centro de la cavidad ubicada entre dicho aminoácido y el UDP-glucosa. La referencia que se tomó para dirigir al HH-Y195 hacia el centro de la cavidad fue el carbono α del residuo lisina-85. La conducción de HH-Y195 fue realizada a diferentes velocidades constantes (1, 2, 4 y 25 Å/ns). También se aplicaron fuerzas de variada intensidad, a través del uso de distintas magnitudes para la constante de fuerza k (2 y 10 $\text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{nm}^{-2}$). Para todas las simulaciones se utilizó el equilibrado NPT como punto de partida, por lo que en todas ellas la posición inicial de tirosina-195 fue la misma. Luego de las diferentes SMD realizadas se llevaron a cabo sendas simulaciones de dinámica molecular convencionales (CMD), tomando como punto de partida el tiempo indicado para cada simulación SMD. En todas las simulaciones de producción se registraron las coordenadas cada 10 ps. En el caso de las simulaciones SMD las fuerzas ejercidas sobre HH-Y195 y la distancia entre HH-Y195 y O3b-UDPG fueron registradas cada 2 ps.

CONCLUSIONES

Capítulo 1

- El monómero de glucogenina exhibió la capacidad de generar por autoglucosilación un oligoglucano con la misma longitud con la que lo hace el dímero. Esto implica que glucogenina puede iniciar *in vivo* la biosíntesis *de novo* del glucógeno inmediatamente después que la enzima ha sido sintetizada, sin necesidad de que se alcance la concentración requerida para su dimerización.
- Se demostró que el mecanismo de glucosilación intrasubunidad interviene en la autoglucosilación del dímero de glucogenina. Más aún, se comprobó que dicha glucosilación intrasubunidad es imprescindible para que el dímero consiga producir una cadena de glucosas con la longitud máxima reportada.

Estos resultados dieron lugar a la siguiente publicación:

“Mechanisms of monomeric and dimeric glycogenin autoglucosylation.”

Issoglio, F. M., Carrizo, M. E., Romero, J. M., & Curtino, J. A. (2012).

Journal of Biological Chemistry, 287(3), 1955-1961.

Capítulo 2

- Se logró obtener de manera recombinante la enzima ramificante de glucógeno humana (HBE) activa, expresándola en células de insecto Sf9. Esta es la primera vez que se reporta la expresión heteróloga de una enzima ramificante de glucógeno de mamífero.
- Mediante el uso de electroforesis de carbohidratos asistida por fluoróforo (FACE) se realizó un análisis del perfil de la longitud de las ramificaciones generadas por la HBE sobre amilosa, manifestándose su preferencia por transferir maltoheptaosa.
- También se utilizó FACE en los estudios cinéticos que llevaron a proponer que la HBE se comportaría como una enzima alostérica. Esto resulta particularmente novedoso puesto que en los estudios cinéticos de otras enzimas ramificantes publicados hasta el momento se asume que tendrían un comportamiento Michaeliano. Esta hipótesis podría además hacerse extensiva a gran parte de las enzimas que pertenecen a la familia GH13, o al menos a aquellas que presenten dominios que posean módulos de unión a carbohidratos.

- El oligoglucano de la glucogenina en su máximo grado de autoglucosilación, no fue utilizado por la HBE para generar la primera ramificación de la iniciación del glucógeno, indicando que para ello glucogenina debe alcanzar un grado de glucopolimerización mayor a 13 glucosas.

Capítulo 3

- Mediante el uso de simulaciones de dinámica molecular guiada (SMD), se encontró un posible camino para el acercamiento de la tirosina-195 de una subunidad del dímero de glucogenina hacia el sitio de unión del UDP-glucosa correspondiente a la otra subunidad, que explicaría de qué manera la conformación de la enzima podría moverse, a fin de reducir la distancia que los separa para permitir la autoglucosilación.
- La estructura del conformero de ataque cercano (NAC) encontrado por SMD para la incorporación del primer residuo glucosídico a la tirosina, tuvo un tiempo de vida considerablemente bueno al realizar una dinámica molecular convencional (CMD) a partir de dicho conformero.
- En las interacciones halladas que podrían ser responsables de la estabilización del aceptor tirosina-195 en la estructura del NAC, participan los mismos aminoácidos que han sido descritos en estudios cristalográficos previos, correspondientes al caso en el que el aceptor era el extremo no reductor de un oligoglucano unido a la tirosina.
- Los resultados presentados en este capítulo representan el primer estudio en el que podría ser descrito el estado conformacional requerido para la transferencia de la primera glucosa en la autoglucosilación de glucogenina dimérica, así como los aminoácidos involucrados en la estabilización de dicha estructura.

BIBIOGRAFÍA

1. Meléndez-Hevia, E., Waddell, T.G., Shelton, E.D. (1993) Optimization of molecular design in the evolution of metabolism: the glycogen molecule. *Biochem. J.* 295, 477-483.
2. Meléndez-Hevia, E., Waddell, T.G., Raposo, R.R., Lupiáñez, J.A. (1995) Evolution of metabolism: optimization of glycogen structure. *J. Biol. Systems.* 3, 177-186.
3. Meléndez, R., Meléndez-Hevia, E., Cascante, M. (1997) How did glycogen structure evolve to satisfy the requirement for rapid mobilization of glucose? A problem of physical constraints in structure building. *J. Mol. Evol.* 45:446-455.
4. Meléndez, R., Meléndez-Hevia, E., Mas, F., Mach, J., Cascante, M. (1998) Physical constraints in the synthesis of glycogen that influence its structural homogeneity: a two-dimensional approach. *Biophys. J.* 75, 106-114.
5. Cori, C.F., Cori, G.T. (1939) The activating effect of glycogen on the enzymatic synthesis of glycogen from glucose-1-phosphate. *J. Biol. Chem.* 131, 397-398.
6. Cori, C.F., Schmidt, G., Cori, G.T. (1939) Synthesis of polysaccharide from glucose-1-phosphate in muscle extract. *Science* 89, 464-465.
7. Cori, G.-T., Larner, J. (1951) Action of amylo-1,6-glucosidase phosphorylase on glycogen amylopectin. *J. Biol. Chem.* 188, 17-29.
8. Gordon, R. B., Brown, D. H., Brown, B. I. (1972) Preparation properties of the glycogen-debranching enzyme from rabbit liver *Biochem. Biophys. Acta* 289, 97-107.
9. White, R.-C., Nelson, T.E. (1974) Re-evaluation of the subunit structure molecular weight of rabbit muscle amylo-1,6-glucosidase/4- α -glucanotransferase. *Biochem. Biophys. Acta.* 365, 274-280.
10. Taylor, C., Cox, A.J., Kernohan, J.C., Cohen, P. (1975) Debranching Enzyme from Rabbit Skeletal Muscle. Purification, Properties Physiological Role. *Eur. J. Biochem.* 51, 105-115.
11. Bates, E.-J., Heaton, G.-M., Taylor, C., Kernohan, J.C., Cohen, P. (1975) Debranching enzyme from rabbit skeletal muscle; evidence for the location of two active centres on a single polypeptide chain. *FEBS Lett.* 58, 181-185.
12. Gillard, B.K., Nelson, T.E. (1977) Amylo-1,6-glucosidase/4-alpha-glucanotransferase: use of reversible substrate model inhibitors to study the binding active sites of rabbit muscle debranching enzyme. *Biochemistry* 16, 3978-3987.

13. Leloir, L.F., Cardini, C.E. (1957) Biosynthesis of glycogen from uridine diphosphate-glucose. *J. Am. Chem. Soc.* 79, 6340-6341.
14. Cori, G.T., Cori, C.F., (1943) Crystalline muscle phosphorylase. IV. Formation of glycogen. *J. Biol. Chem.*, 161, 57.
15. Larner, J. (1953) The action of branching enzymes on outer chains of glycogen. *J. Biol. Chem.* 202, 491-503.
16. Verhue, W., Hers, H.G. (1966) A Study of the Reaction Catalysed by the Liver Branching Enzyme. *Biochem. J.* 99, 222-227.
17. Goldenberg, S.H. (1962) Specificity of uridine diphosphate glucose-glycogen glucosyltransferase. *Biochim. Biophys. Acta*- 56, 357-359.
18. Salas, E., Larner, J. (1975) Glycogen synthase can use glucose as an acceptor. *J. Biol. Chem.* 250, 1833-1877.
19. Krisman, C.R. (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 46, 1206-1212.
20. Krisman, C.R. (1973). A possible intermediate in the initiation of glycogen biosynthesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*- 210, 81-89.
21. Krisman, C.R., Barengo, R. (1975) A precursor of glycogen biosynthesis: α -1,4-glucan-protein. *Eur. J. Biochem.* 52, 117-123.
22. Barengo R, Flawia M, Krisman CR. (1975) The initiation of glycogen biosynthesis in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 53, 274-278.
23. Barengo, R., Krisman, C. R. (1978) Initiation of glycogen biosynthesis in *Escherichia coli*. Studies of the properties of the enzymes involved. *Biochim. Biophys. Acta*, 540, 190-196.
24. Tandecarz, J.S., Cardini, C. E. (1978) A two-step enzymatic formation of a glucoprotein in potato tuber. *Biochim. Biophys. Acta*, 543, 423-429.
25. Takahara, H., Matsuda, K. (1977) Biosynthesis of glycogen in *Neurospora crassa*. Existence of a glucoproteic intermediate in the initiation process. *J. Biochem.* 81, 1587-1591.
26. Curtino J.A., Maccioni H.J., Caputto R. (1979) The incorporation of glucose into alpha-1,4-glucan proteins of bovine retina membranes. *J Neurochem.* 33, 139-147.
27. Quentmeier H., Ingold E., Seitz H.U. (1987) Purification of an autocatalytic protein-glycosylating enzyme from cell suspensions of *Daucus carota* L. *Planta.* 171, 483-488.
28. Aon M.A., Curtino J.A., Evidence for the glycoprotein nature of retina glycogen,

- Eur. J. Biochem. 140 (1984) 557–566.
29. Rodriguez, I.R., Whelan, W.J. (1985) A novel glycosyl-amino acid linkage: rabbit-muscle glycogen is covalently linked to a protein via tyrosine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 132, 829–836.
 30. Lomako, J., Lomako, W.M. Whelan, W.J. (1988) A self-glucosylating protein is the primer for rabbit muscle glycogen biosynthesis. *FASEB J.* 2, 3097–3103.
 31. Pitcher, J., Smythe, C. Cohen, P. (1988) Glycogenin is the priming glucosyltransferase required for the initiation of glycogen biogenesis in rabbit skeletal muscle. *Eur. J. Biochem.* 176, 391–395.
 32. Bazán, S., Curtino, J.A. (2005). The size of the C-chain maltosaccharide of glycogen: evidence for the presence of only a single branch. *Glycobiology* 15, 14C–18C.
 33. Meléndez, R., Meléndez-Hevia, E., Canela, E.I. (1999). The fractal structure of glycogen: a clever solution to optimize cell metabolism. *Biophys. J.*, 77, 1327–1332.
 34. Roe J.H., Bailey J.M., Gray R.R., Robinson J.N. (1961) Complete Removal of Glycogen from Tissues by Extraction with Cold Trichloroacetic Acid Solution. *J. Biol. Chem.* 236, 1244–1246.
 35. Cohen P. (1978) The role of cyclic-AMP-dependent protein kinase in the regulation of glycogen metabolism in mammalian skeletal muscle. *Curr. Top. Cell Regul.* 14, 117–196.
 36. Kennedy, L.D., Kirkman, B.R., Lomako, J., Rodriguez, I.R., Whelan, W. J. (1985). The biogenesis of rabbit-muscle glycogen. *En Membranes muscle*, 65–84. ICSU Press / IRL Press, Oxford.
 37. Aon, M. A., Curtino, J. A. (1985) Protein-bound glycogen is linked to tyrosine residues. *Biochem. J.*, 229, 269–272.
 38. Campbell, D.G., Cohen, P. (1989) The amino acid sequence of rabbit skeletal muscle glycogenin. *Eur. J. Biochem.* 185, 119–125.
 39. Smythe, C., Caudwell, F. B., Ferguson, M., Cohen, P. (1988) Isolation structural analysis of a peptide containing the novel tyrosyl-glucose linkage in glycogenin. *EMBO J.* 7, 2681–2686.
 40. Pitcher, J., Smythe, C., Campbell, D.G., Cohen, P. (1988) Identification of the 38-kDa subunit of rabbit skeletal muscle glycogen synthase as glycogenin. *Eur. J. Biochem.* 169, 497–502.

41. Cao, Y., Mahrenholz, A.M., DePaoli-Roach, A.A., Roach, P. J. (1993). Characterization of rabbit skeletal muscle glycogenin. Tyrosine 194 is essential for function. *Journal of Biological Chemistry*, 268, 14687-14693.
42. Viskupic, E., Cao, Y., Zhang, W., Cheung, C., DePaoli-Roach, A. A. Roach, P. J. (1992). Rabbit skeletal muscle glycogenin. Molecular cloning production of fully functional protein in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 267, 25759-25763.
43. Skurat, A.V., Cao, Y., Roach, P.J. (1993). Glucose control of rabbit skeletal muscle glycogenin expressed in COS cells. *Journal of Biological Chemistry*. 268, 14701-14707.
44. Skurat, A.V., Lim, S.S., Roach, P.J. (1997). Glycogen biogenesis in rat 1 fibroblasts expressing rabbit muscle glycogenin. *European Journal of Biochemistry*, 245, 147-155.
45. Lomako, J., Lomako, W. M., Whelan, W. J. (1992). The substrate specificity of isoamylase the preparation of apo-glycogenin. *Carbohydrate research*, 227, 331-338.
46. Alonso, M.D., Lomako, J., Lomako, W.M., Whelan, W.J., Preiss, J. (1994). Properties of carbohydrate-free recombinant glycogenin expressed in an *Escherichia coli* mutant lacking UDP-glucose pyrophosphorylase activity. *FEBS lett.*, 352, 222-226.
47. Barbetti, F., Rocchi, M., Bossolasco, M., Cordera, R., Sbraccia, P., Finelli, P., Consalez, G. G. (1996). The human skeletal muscle glycogenin gene: cDNA, tissue expression chromosomal localization. *Biochemical biophysical research communications*, 220, 72.
48. Lomako, J., Mazuruk, K., Lomako, W.M., Alonso, M.D., Whelan, W.J., Rodriguez, I.R. (1996). The human intron-containing gene for glycogenin maps to chromosome 3, band q24. *Genomics*, 33, 519-522.
49. Alonso, M.D., Lomako, J., Lomako, W.M., Whelan, W.J. (1995) Catalytic activities of glycogenin additional to autocatalytic self-glucosylation. *J. Biol Chem.*, 270, 15315-15319.
50. Carrizo M.E., Miozzo M.C., Goldraij A., Curtino J.A. Purification of rabbit skeletal muscle proteoglycogen: studies on the glucosyltransferase activity of polysaccharide-free -bound glycogenin, *Glycobiology* 7 (1997) 571-578.
51. Hurley, T. D., Stout, S., Miner, E., Zhou, J., Roach, P. J. (2005) Requirements for catalysis in mammalian glycogenin. *J. Biol. Chem.* 280, 23892-23899.

52. Coutinho PM, Deleury E, Davies GJ, Henrissat B. (2003) An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases *J. Mol. Biol.* 328, 307-317.
53. Campbell JA, Davies GJ, Bulone V, Henrissat B (1997) A classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* 326, 929-939.
54. Lairson L.L., Henrissat B., Davies G.J., Withers S.G. (2008) Glycosyltransferases: structures, functions, mechanisms. *Annu Rev Biochem.* 77, 521-555.
55. Gibbons, B.J., Roach, P. J., Hurley, T. D. (2002) Crystal structure of the autocatalytic initiator of glycogen biosynthesis, glycogenin. *J. Mol. Biol.* 319, 463– 477.
56. Unligil, U.M., Zhou, S., Yuwaraj, S., Sarkar, M., Schachter, H. Rini, J. M. (2000) X-ray crystal structure of rabbit N-acetylglucosaminyltransferase I: catalytic mechanism a new protein superfamily. *EMBO J.* 19, 5269 –5280.
57. Persson, K., Ly, H. D., Diekelmann, M., Wakarchuk, W. W., Withers, S. G. Strynadka, N. C. J. (2001) Crystal structure of the retaining galactosyltransferase LgtC from *Neisseria meningitidis* in complex with donor acceptor sugar analogs. *Nat. Struct. Biol.* 8, 166-175.
58. Lairson L.L., Chiu C.P.C., Ly H.D., He S., Wakarchuk W.W., Strynadka Natalie C. J., Withers S.G. (2004) Intermediate Trapping on a Mutant Retaining α -Galactosyltransferase Identifies an Unexpected Aspartate Residue. *J. Biol. Chem.* 279, 28339-28344.
59. Tvaroska I. (2004) Molecular modeling insights into the catalytic mechanism of the retaining galactosyltransferase LgtC. *Carbohydr. Res.* 339, 1007-14
60. Zhang, Y., Swaminathan, J., Deshpande, A., Biox, E. Natesh, R., Xie, Z., Acharya, K. R. Brew, K. (2003) Roles of individual enzyme-substrate interactions by alpha-1,3-galactosyltransferase in catalysis specificity. *Biochemistry* 42, 13512–13521.
61. Roach, P.J. Skurat, A.V. (1997) Self-glycosylating initiator proteins their role in glycogen biosynthesis. *Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.* 57, 289 –316.
62. Lomako, J., Lomako, W.M., Whelan, W.J. (2004). Glycogenin: the primer for mammalian yeast glycogen synthesis. *Biochim. Biophys. Acta.* 1673, 45-55.
63. Lomako J., Lomako W.M., Whelan W.J., Substrate specificity of the

- autocatalytic protein that primes glycogen synthesis, *FEBS Lett.* 264 (1990) 13–16.
64. Manzella S.M., Rodén L., Meezan E. A biphasic radiometric assay of glycogenin using the hydrophobic acceptor n-dodecyl- β -D-maltoside, *Anal. Biochem.* 216 (1994) 383–391.
 65. Cao Y., Steinrauf L.K., Roach P.J., Mechanism of glycogenin self-glycosylation, *Arch. Biochem. Biophys.* 319 (1995) 293–298.
 66. Hawker, J.S., Ozburn, J.L., Ozaki, H., Greenberg, E., Preiss, J. (1974). Interaction of spinach leaf adenosine diphosphate glucose α -1, 4-glucan α -4-glucosyl transferase α -1, 4-glucan, α -1, 4-glucan-6-glycosyl transferase in synthesis of branched α -glucan. *Archives of biochemistry biophysics*, 160(2), 530-551.
 67. Baecker, P.A., Greenberg, E., Preiss, J. (1986). Biosynthesis of bacterial glycogen. Primary structure of *Escherichia coli* 1, 4- α -D-glucan: 1, 4- α -D-glucan 6- α -D-(1, 4- α -D-glucano)-transferase as deduced from the nucleotide sequence of the *glgB* gene. *Journal of Biological Chemistry*, 261(19), 8738-8743.
 68. Jespersen, H.M., MacGregor, E.A., Sierks, M.R., Svensson, B. (1991). Comparison of the domain-level organization of starch hydrolases related enzymes. *Biochem. J.* 280, 51-55.
 69. Nakajima, R., Imanaka, T., Aiba, S. (1986). Comparison of amino acid sequences of eleven different α -amylases. *Applied microbiology biotechnology*, 23(5), 355-360.
 70. Baba, T., Kimura, K., Mizuno, K., Etoh, H., Ishida, Y., Shida, O., Arai, Y. (1991). Sequence conservation of the catalytic regions of anylyolytic enzymes in maize branching enzyme-I. *Biochemical biophysical research communications*, 181(1), 87-94.
 71. MacGregor, E. A. (1988). α -Amylase structure activity. *Journal of protein chemistry*, 7(4), 399-415.
 72. Svensson, B. (1988). Regional distant sequence homology between amylases, α -glucosidases transglucanosylases. *FEBS letters*, 230(1), 72-76.
 73. Matsuura, Y., Kusunoki, M., Harada, W., Kakudo, M. (1984). Structure possible catalytic residues of Taka-amylase A. *Journal of biochemistry*, 95(3), 697-702.
 74. Amemura, A., Chakraborty, R., Fujita, M., Noumi, T., Futai, M. (1988). Cloning nucleotide sequence of the isoamylase gene from *Pseudomonas amyloclavata*

75. Binder, F., Huber, O., Böck, A. (1986). Cyclodextrin-glycosyltransferase from *Klebsiella pneumoniae* M5a1: cloning, nucleotide sequence expression. *Gene*, 47(2), 269-277.
76. Kuriki, T., Takata, H., Okada, S., Imanaka, T. (1991). Analysis of the active center of *Bacillus stearothermophilus* neopullulanase. *Journal of bacteriology*, 173(19), 6147-6152.
77. Takata, H., Kuriki, T., Okada, S., Takesada, Y., Iizuka, M., Minamiura, N., Imanaka, T. (1992). Action of neopullulanase. Neopullulanase catalyzes both hydrolysis transglycosylation at α -(1 \rightarrow 4)- and α -(1 \rightarrow 6)-glucosidic linkages. *Journal of Biological Chemistry*, 267(26), 18447-18452.
78. Henrissat, B. (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.*, 280, 309-316.
79. Uitdehaag, J.C., Mosi, R., Kalk, K.H., van der Veen, B.A., Dijkhuizen, L., Withers, S.G., Dijkstra, B.W. (1999). X-ray structures along the reaction pathway of cyclodextrin glycosyltransferase elucidate catalysis in the α -amylase family. *Nature Structural Molecular Biology*, 6(5), 432-436.
80. Abad, M.C., Binderup, K., Rios-Steiner, J., Arni, R.K., Preiss, J., Geiger, J.H. (2002). The X-ray Crystallographic Structure of *Escherichia coli* Branching Enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 277(44), 42164-42170.
81. Hong, S., Preiss, J. (2000). Localization of C-terminal domains required for the maximal activity or for determination of substrate preference of maize branching enzymes. *Archives of biochemistry biophysics*, 378(2), 349-355.
82. Devillers, C.H., Piper, M.E., Ballicora, M.A., Preiss, J. (2003). Characterization of the branching patterns of glycogen branching enzyme truncated on the N-terminus. *Archives of biochemistry biophysics*, 418(1), 34-38.
83. Brown, B.I., Brown, D.H. (1966). Lack of an alpha-1, 4-glucan: alpha-1, 4-glucan 6-glycosyl transferase in a case of type IV glycogenosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 56(2), 725.
84. DiMauro, S., Servidei, S., Tsujino, S. (1997). Disorders of carbohydrate metabolism: glycogen storage diseases. *The molecular genetic basis of neurological disease*. 2nd ed. Boston: Butterworth Heinemann, 201-205.
85. Guerra, A.S., Van Diggelen, O.P., Carneiro, F., Tsou, R.M., Simões, S., Santos, N.T. (1986). A juvenile variant of glycogenosis IV (Andersen disease). *European*

journal of pediatrics, 145(3), 179-181.

86. Tang, T.T., Segura, A.D., Chen, Y.T., Ricci, L.M., Franciosi, R.A., Splaingard, M.L., Lubinsky, M.S. (1994). Neonatal hypotonia cardiomyopathy secondary to type IV glycogenosis. *Acta neuropathologica*, 87 (5), 531-536.
87. Reusche, E., Aksu, F., Goebel, H.H., Shin, Y.S., Yokota, T., Reichmann, H. (1992). A mild juvenile variant of type IV glycogenosis. *Brain Development*, 14(1), 36-43.
88. Kuriki, T., Imanaka, T. (1999). The concept of the α -amylase family: structural similarity common catalytic mechanism. *Journal of bioscience bioengineering*, 87(5), 557-565.
89. Chaikuad A., Froese D.S., Berridge G., von Delft F., Oppermann U., Yue W.W. (2011) Conformational plasticity of glycogenin its maltosaccharide substrate during glycogen biogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 108, 21028-21033.
90. Lin, A., Mu, J., Yang, J., Roach, P.J. (1999) Self-glucosylation of glycogenin, the initiator of glycogen biosynthesis, involves an intersubunit reaction. *Arch. Biochem. Biophys.* 363, 163-170.
91. Bazán, S., Issoglio, F.M., Carrizo, M.E., Curtino J.A. (2008) The intramolecular autoglucosylation of monomeric glycogenin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 371, 328 -332.
92. Moslemi, A.R., Lindberg, C., Nilsson, J., Tajsharghi, H., Andersson, B., Oldfors, A. (2010) Glycogenin-1 deficiency inactivated priming of glycogen synthesis. *N. Engl. J. Med.* 362, 1203-1210.
93. Carrizo M.E., Romero J.M., Issoglio F.M., Curtino J.A. Structural biochemical insight into glycogenin inactivation by the glycogenosis-causing T82M mutation. *FEBS Lett.* 586 (2012) 254-257.
94. Hurley, T.D., Walls, C., Bennett, J.R., Roach, P.J., Wang, M. (2006) Direct detection of glycogenin reaction products during glycogen initiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 348, 374 -378.
95. Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
96. Leslie, A.G.W. (1992) Joint CCP4/ESF-EACMB Newsletter on Protein Crystallography, No. 26, 27-33.
97. Evans, P. (2006) Scaling assessment of data quality. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 62, 72- 82.



98. Winn, M.D., Ballard, C.C., Cowtan, K.D., Dodson, E.J., Emsley, P., Evans, P.R., Keegan, R.M., Krissinel, E.B., Leslie, A.G., McCoy, A., McNicholas, S.J., Murshudov, G.N., Pannu, N.S., Potterton, E.A., Powell, H.R., Read, R.J., Vagin, A., Wilson, K.S. (2011) Overview of the CCP4 suite current developments. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 67, 235–242.
99. Murshudov, G.N., Vagin, A.A., Dodson, E.J. (1997) Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 53, 240–255.
100. Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W.G., Cowtan, K. (2010) Features development of Coot. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 66, 486–501).
101. Carrizo, M.E., Miozzo, M.C., Goldraj, A., Curtino, J.A. (1997) Purification of rabbit skeletal muscle proteoglycogen: studies on the glucosyltransferase activity of polysaccharide-free -bound glycogenin. *Glycobiology* 7, 571–578.
102. Choudhary, C., Kumar, C., Gnad, F., Nielsen, M.L., Rehman, M., Walther, T.C., ... Mann, M. (2009). Lysine acetylation targets protein complexes co-regulates major cellular functions. *Science*, 325(5942), 834-840.
103. Kouzarides, T. (2000). Acetylation: a regulatory modification to rival phosphorylation?. *The EMBO journal*, 19(6), 1176-1179.
104. Yang, X.J. (2004). Lysine acetylation the bromodomain: a new partnership for signaling. *Bioessays*, 26(10), 1076-1087.
105. Rush, J., Moritz, A., Lee, K.A., Guo, A., Goss, V.L., Spek, E.J., ... Comb, M.J. (2005). Immunoaffinity profiling of tyrosine phosphorylation in cancer cells. *Nature biotechnology*, 23(1), 94-101.
106. Fischer, E., Krebs, E. (1955). Conversion of phosphorylase b to phosphorylase a in muscle extracts. *The Journal of biological chemistry*, 216(1), 121.
107. Sutherland Jr, E. W., Wosilait, W. (1955). Inactivation activation of liver phosphorylase. *Nature*, 175(4447), 169-170.
108. Zhang, T., Wang, S., Lin, Y., Xu, W., Ye, D., Xiong, Y., ... Guan, K. L. (2012). Acetylation negatively regulates glycogen phosphorylase by recruiting protein phosphatase 1. *Cell metabolism*, 15(1), 75-87.
109. Wilson, W.A., Skurat, A.V., Probst, B., de Paoli-Roach, A., Roach, P.J., Rutter, J. (2005). Control of mammalian glycogen synthase by PAS kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(46), 16596-16601.



110. Boyer, C., Preiss, J. (1977). Biosynthesis of bacterial glycogen. Purification properties of the *Escherichia coli* B α -1, 4-glucan: α -1, 4-glucan 6-glycosyltransferase. *Biochemistry*, 16(16), 3693-3699.
111. Takata, H., Takaha, T., Kuriki, T., Okada, S., Takagi, M., Imanaka, T. (1994). Properties active center of the thermostable branching enzyme from *Bacillus stearothermophilus*. *Applied environmental microbiology*, 60(9), 3096-3104.
112. Mikkelsen, R., Binderup, K., Preiss, J. (2001). Tyrosine Residue 300 Is Important for Activity Stability of Branching Enzyme from *Escherichia coli*. *Archives of biochemistry biophysics*, 385(2), 372-377.
113. Lee, B.H., Yoo, Y.H., Ryu, J.H., Kim, T.J., Yoo, S.H. (2008). Heterologous expression characterization of glycogen branching enzyme from *Synechocystis* sp. PCC6803. *Journal of microbiology biotechnology*, 18(8), 1386-1392.
114. Garg, S.K., Alam, M.S., Kishan, K.V., Agrawal, P. (2007). Expression characterization of α -(1, 4)-glucan branching enzyme Rv1326c of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Protein expression purification*, 51(2), 198-208.
115. Kuriki, T., Stewart, D.C., Preiss, J. (1997). Construction of chimeric enzymes out of maize endosperm branching enzymes I II: activity properties. *Journal of Biological Chemistry*, 272(46), 28999-29004.
116. Vu, N.T., Shimada, H., Kakuta, Y., Nakashima, T., Ida, H., Omori, T., ... Kimura, M. (2008). Biochemical crystallographic characterization of the starch branching enzyme I (BEI) from *Oryza sativa* L. *Bioscience, biotechnology, biochemistry*, 72(11), 2858-2866.
117. Pal, K., Kumar, S., Sharma, S., Garg, S.K., Alam, M.S., Xu, H.E., ... Swaminathan, K. (2010). Crystal Structure of Full-length *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv Glycogen Branching Enzyme INSIGHTS OF N-TERMINAL β -SANDWICH IN SUBSTRATE SPECIFICITY ENZYMATIC ACTIVITY. *Journal of Biological Chemistry*, 285(27), 20897-20903.
118. Palomo, M., Pijning, T., Booiman, T., Dobruchowska, J.M., van der Vlist, J., Kralj, S., ... Leemhuis, H. (2011). *Thermus thermophilus* Glycoside Hydrolase Family 57 Branching Enzyme CRYSTAL STRUCTURE, MECHANISM OF ACTION, PRODUCTS FORMED. *Journal of biological chemistry*, 286(5), 3520-3530.
119. Noguchi, J., Chaen, K., Vu, N.T., Akasaka, T., Shimada, H., Nakashima, T., ...

- Kimura, M. (2011). Crystal structure of the branching enzyme I (BEI) from *Oryza sativa* L with implications for catalysis substrate binding. *Glycobiology*, 21(8), 1108-1116.
120. Chaen, K., Noguchi, J., Omori, T., Kakuta, Y., Kimura, M. (2012). Crystal structure of the rice branching enzyme I (BEI) in complex with maltopentaose. *Biochemical biophysical research communications*, 424(3), 508-511.
121. Takeda Y., Guan H.P., Preiss J. (1993) Branching of amylose by the branching isoenzymes of maize endosperm. *Carbohydr Res* 240, 253-263.
122. Park, J.T., Johnson, M.J. (1949). A submicrodetermination of glucose. *Journal of Biological Chemistry*, 181, 149-151.
123. Krisman, C.R. (1962). A method for the colorimetric estimation of glycogen with iodine. *Analytical biochemistry*, 4(1), 17-23.
124. Bailey J.M., Whelan W.J. (1961) Physical properties of starch. Relationship between iodine stain chain length. *J. Biol. Chem.* 236, 969-973.
125. Boyer C.D., Preiss J. (1978) Multiple forms of (1,4)- α -D-glucan,(1,4)- α -D-glucan-6-glycosyltransferase from developing *Zea mays* L. kernels. *Carbohydr Res* 61: 321-334.
126. Landy, A. (1989) Dynamic, Structural, Regulatory Aspects of Lambda Site-specific Recombination. *Ann. Rev. Biochem.* 58, 913-949.
127. Ptashne, M. (1992) A Genetic Switch: Phage (Lambda) Higher Organisms, Cell Press, Cambridge, MA.
128. Amersham Biosciences (2002) Purification of (His)6-tagged proteins using HiTrap Chelating HP columns charged with different metal ions. Application Note 18-1145-18 AA: 1-8.
129. Jackson, P. (1990). The use of polyacrylamide-gel electrophoresis for the high-resolution separation of reducing saccharides labelled with the fluorophore 8-aminonaphthalene-1, 3, 6-trisulphonic acid. Detection of picomolar quantities by an imaging system based on a cooled charge-coupled device. *Biochem. J.* 270, 705-713.
130. Michaelis, L., Menten, M. L. (1913). Die kinetik der invertinwirkung. *Biochem. Z.* 49(333-369), 352.
131. Goutelle, S., Maurin, M., Rougier, F., Barbaut, X., Bourguignon, L., Ducher, M., Maire, P. (2008). The Hill equation: a review of its capabilities in pharmacological modelling. *Fundamental clinical pharmacology*, 22(6), 633-



132. Hill, A.V. (1910). The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves. *J physiol*, 40(4), iv-vii.
133. Hammes, G.G., Wu, C.W. (1974). Kinetics of allosteric enzymes. *Annual review of biophysics bioengineering*, 3(1), 1-33.
134. Gunja, Z.H., Manners, D.J., Maung, K. (1961). Studies on carbohydrate-metabolizing enzymes. 7. Yeast isoamylase. *Biochemical Journal*, 81(2), 392.
135. Guan, H.P., Preiss, J. (1993). Differentiation of the properties of the branching isozymes from maize (*Zea mays*). *Plant Physiology*, 102(4), 1269-1273.
136. Binderup, K., Mikkelsen, R., Preiss, J. (2000). Limited Proteolysis of Branching Enzyme from *Escherichia coli*. *Archives of biochemistry biophysics*, 377(2), 366-371.
137. Roussel, X., Lancelon-Pin, C., Viksø-Nielsen, A., Rolland-Sabaté, A., Grimaud, F., Potocki-Véronèse, G., ... D'Hulst, C. (2013). Characterization of substrate product specificity of the purified recombinant glycogen branching enzyme of *Rhodothermus obamensis*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1830(1), 2167-2177.
138. Hilden, I., Leggio, L.L., Larsen, S., Poulsen, P. (2000). Characterization crystallization of an active N-terminally truncated form of the *Escherichia coli* glycogen branching enzyme. *European Journal of Biochemistry*, 267(8), 2150-2155.
139. Machovič, M., Janeček, Š. (2006). The evolution of putative starch-binding domains. *FEBS letters*, 580(27), 6349-6356.
140. Frieden, C. (1967). Treatment of enzyme kinetic data II. The multisite case: comparison of allosteric models a possible new mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 242(18), 4045-4052.
141. Levitzki, A., Koshland, D.E. (1969). Negative cooperativity in regulatory enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 62(4), 1121-1128.
142. Ricard, J., Cornish-Bowden, A. (1987). Co-operative allosteric enzymes: 20 years on. *European Journal of Biochemistry*, 166(2), 255-272.
143. Davies, G.J., Wilson, K.S. (1999). Trapped in the act of catalysis. *Nature Structural Molecular Biology*, 6(5), 406-408.
144. Rubsam, L.A., Boucher, P.D., Murphy, P.J., KuKuruga, M., Shewach, D.S. (1999) Cytotoxicity Accumulation of Ganciclovir Triphosphate in Bystander



- Cells Cocultured with Herpes Simplex Virus Type 1 Thymidine Kinase-expressing Human Glioblastoma Cells. *Cancer Research* 59, 669-675.
145. Matsudaira, P. (1987). Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 262(21), 10035-10038.
 146. Rasband, W.S., ImageJ, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2014.
 147. Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K.W. "NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis". *Nature Methods* 9, 671-675, 2012.
 148. Goldsmith, E., Sprang, S., Fletterick, R. (1982). Structure of maltoheptaose by difference Fourier methods a model for glycogen. *Journal of molecular biology*, 156(2), 411-427.
 149. Roach, P.J., Depaoli-Roach, A.A., Hurley, T.D., Tagliabracci, V.S. (2012). Glycogen its metabolism: some new developments old themes. *Biochemical Journal*, 441, 763-787.
 150. Qasba, P.K., Ramakrishnan, B., Boeggeman, E. (2005). Substrate-induced conformational changes in glycosyltransferases. *Trends in biochemical sciences*, 30(1), 53-62.
 151. Müller, M., Katsov, K., Schick, M. (2006). Biological synthetic membranes: what can be learned from a coarse-grained description?. *Physics Reports*, 434(5), 113-176.
 152. Bruice, T.C. (2002). A view at the millennium: the efficiency of enzymatic catalysis. *Accounts of chemical research*, 35(3), 139-148.
 153. Pauling, L. (1946). Molecular architecture biological reactions. *Chemical engineering news*, 24(10), 1375-1377.
 154. Gorbitz, C.H. (1989). Hydrogen-bond distances angles in the structures of amino acids peptides. *Acta Crystallographica Section B: Structural Science*, 45(4), 390-395.
 155. Smith D.E, Haymet A.D.J. (1993). Free energy, entropy, and internal energy of hydrophobic interactions: Computer simulations. *The journal of chemical physics*, 98(8), 6445-6454.
 156. Issoglio, F.M., Carrizo, M.E., Romero, J.M., Curtino, J.A. (2012). Mechanisms of monomeric dimeric glycogenin autoglycosylation. *Journal of Biological Chemistry*, 287(3), 1955-1961.



157. Schafmeister, C.E.A.F., Ross, W.S., & Romanovski, V. LEAP; University of California: San Francisco, (1995).
158. Pearlman, D.A., Case, D.A., Caldwell, J.W., Ross, W.S., Cheatham III, T.E., DeBolt, S., ... Kollman, P. (1995). AMBER, a package of computer programs for applying molecular mechanics, normal mode analysis, molecular dynamics free energy calculations to simulate the structural energetic properties of molecules. *Computer Physics Communications*, 91(1), 1-41.
159. Harvey M.J., Giupponi G., Fabritiis G.D. (2009) Acemd: Accelerating biomolecular dynamics in the microsecond time scale. *J Chem Theory Comput* 5(6):1632–1639.
160. Roe, D.R., Cheatham III, T.E. (2013). PTRAJ CPPTRAJ: software for processing analysis of molecular dynamics trajectory data. *Journal of Chemical Theory Computation*, 9(7), 3084-3095.
161. Humphrey W., Dalke A., Schulten K. (1996) VMD: Visual molecular dynamics. *J Mol Graph* 14(1):33–38, 27–28.
162. Berendsen, H.J.C., Grigera, J.R., Straatsma, T.P. (1987). The missing term in effective pair potentials. *Journal of Physical Chemistry*, 91(24), 6269-6271.
163. Duan Y, et al. (2003) A point-charge force field for molecular mechanics simulations of proteins based on condensed-phase quantum mechanical calculations. *J Comput Chem* 24(16):1999–2012.
164. Kirschner, K.N., Yongye, A.B., Tschampel, S.M., González-Outeiriño, J., Daniels, C.R., Foley, B.L., Woods, R.J. (2008). GLYCAM06: a generalizable biomolecular force field. *Carbohydrates. Journal of computational chemistry*, 29(4), 622-655.
165. Petrova, P., Koc̃a, J., Imberty, A. (1999). Potential energy hypersurfaces of nucleotide sugars: ab initio calculations, force-field parametrization, exploration of the flexibility. *Journal of the American Chemical Society*, 121(23), 5535-5547.
166. Ryckaert J.P., Ciccotti G., Berendsen H.J.C. (1977) Numerical integration of the Cartesian equations of motion of a system with constraints: Molecular dynamics of n-alkanes. *J Comput Phys* 23:327–341.
167. Harvey M., De Fabritiis G. (2009) An implementation of the smooth particle mesh Ewald method on gpu hardware. *J Chem Theory Comput* 5(9):2371–2377.
168. Essmann U., Perera L., Berkowitz M.L., Darden T. (1995) A smooth particle



mesh Ewald method. *J Chem Phys* 103:8577-9593.

R-T

574.19245

I

13763



***13763**

Esta página está disponible en los siguientes idiomas:



Abstract Licencia Creative Commons

**Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0
Internacional (CC BY-NC-SA 4.0)**

Este es un resumen legible por humanos de (y no un sustituto) de la licencia .

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

Adaptar — remezclar, transformar y construir a partir del material

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:



Atribución — Usted debe dar crédito de manera adecuada , brindar un enlace a la licencia, e indicar si se han realizado cambios . Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con propósitos comerciales .



CompartirIgual — Si remezcla, transforma o crea a partir del material, debe distribuir su contribución bajo la misma licencia del original.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una excepción o limitación aplicable .

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como publicidad, privacidad o derechos morales pueden limitar la forma en que utilizan el material.