

Tesis Doctoral

Relaciones entre estructura y función en la glucógeno sintetasa de *Escherichia coli*

Yep Rodríguez, Alejandra

2004

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

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

This document is part of the Master's and Doctoral Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Yep Rodríguez, Alejandra. (2004). Relaciones entre estructura y función en la glucógeno sintetasa de *Escherichia coli*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n3769_YepRodriguez

Cita tipo Chicago:

Yep Rodríguez, Alejandra. "Relaciones entre estructura y función en la glucógeno sintetasa de *Escherichia coli*". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2004. http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n3769_YepRodriguez

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

FCE Y N BIRINTERA

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

**Relaciones entre estructura
y función en la glucógeno
sintetasa de *Escherichia coli***

Alejandra Yep Rodríguez

director Dr. Jack Preiss

co-director Dr. Fernando Goldbaum

consejero de estudios Dr. Juan Carlos Calvo

3769

Tesis presentada para optar por el título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires

2004

University of Buenos Aires
School of Exact and Natural Sciences
Department of Biological Chemistry

**Structure-function
relationships in the
Escherichia coli
glycogen synthase**

author

Alejandra Yep Rodríguez

director

Dr. Jack Preiss

co-director

Dr. Fernando Goldbaum

studies advisor

Dr. Juan Carlos Calvo

Thesis presented to obtain the degree of
Philosophy Doctor from the University of Buenos Aires

Agradecimientos

Al Dr. Jack Preiss, por su dirección, por su confianza en mí para llevar a cabo este trabajo, y por su constante apoyo.

Al Dr. Fernando Goldbaum, por co-dirigir esta tesis y por ayudarme a la distancia.

Al Dr. Juan Carlos Calvo, mi consejero de estudios, por su invaluable ayuda.

A la Universidad de Buenos Aires, a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, y al Departamento de Química Biológica por mi formación y por haberme dado la oportunidad de cursar la carrera de Doctorado. Al personal administrativo del departamento de Química Biológica por su amabilidad y excelente disposición.

Al Department of Biochemistry and Molecular Biology de la Michigan State University, investigadores, estudiantes de doctorado y personal administrativo, por incorporarme y hacer agradable mi estadía en este lugar.

Al Dr. Miguel Ballicora, por su ayuda en cada paso de la tesis, por todos los experimentos sugeridos, porque las conversaciones con él han sido invaluableles y han influido enormemente en todos los aspectos de mi formación.

Al Dr. Alberto Iglesias, por su lectura crítica de esta tesis, y por todas las interesantes discusiones sobre ciencia y literatura.

A la Dra. Mirta Sivak, por toda su ayuda en los meses previos y posteriores a mi llegada a los EE.UU. y por hacerme la vida más fácil en esos momentos complicados.

A Clarisa, por su amistad, por ser la mejor compañera de trabajo que se pueda pedir, por toda su ayuda a lo largo de la tesis, por las charlas compartidas sobre experimentos, por hacer tan divertidas las horas pasadas en el laboratorio.

A Claire, la francesa más argentina que he conocido, por su colaboración en todo momento.

A toda la gente fantástica que conocí en Michigan State University, gracias por la amistad, las charlas y los buenos momentos compartidos.

A todos los amigos que, a pesar de la distancia, siempre estuvieron cerca.

A mis padres Antonio y Enma, a ellos les debo muchísimo. Su cariño, su confianza y su ejemplo me han alentado en todo momento.

A mi familia, mis tíos Ligia y Jacobo, quienes han sido como otros padres para mí, a mis hermanos Roberto y Eugenio y mis sobrinos Alejo, Ramiro, Lucía y Malena.

A Javier, el amor de mi vida, por estar siempre a mi lado, por quererme, por acompañarme en todo momento, por soportarme, por aconsejarme y por toda su invaluable ayuda a lo largo de esta tesis.

Parte de los resultados presentados en esta tesis han sido dados a conocer en las siguientes publicaciones.

- Yep A, Ballicora, MA, Sivak MN y Preiss J (2004). Identification and characterization of a critical region in the glycogen synthase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **279**:8359-8367.
- Yep A, Ballicora MA y Preiss J (2004). The active site of the *Escherichia coli* glycogen synthase is similar to the active site of retaining GT-B glycosyltransferases. *Biochem Biophys Res Comm* **316**:960-966.

Abreviaturas

AceA	manosiltransferasa
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADP	adenosina difosfato
ADP-Glc	ADP-glucosa
AMP	adenosina monofosfato
ARN	ácido ribonucleico
ATP	adenosina trifosfato
bicina	N,N-bis(2-hidroxietil)glicina
BSA	albúmina sérica bovina
cAMP	adenosina monofosfato cíclica
CAZy	<i>Carbohydrate-active enzymes</i>
DM1	doble mutante 1 (C7S-C379S)
DM2	doble mutante 2 (C7S-C408S)
DM3	doble mutante 3 (C379S-C408S)
DO	densidad óptica
DTNB	ácido 5-5'-ditiobis(2-dinitrobenzoico)
DTT	ditiotreitól
EDAC	1-etil-3-(3-dimetil-aminopropil)carbodiimida
EDTA	ácido etilen diamino tetraacético
GBSS	almidón sintetasa unida a gránulos
GH	glicosilhidrolasa
Glc	glucosa
Glc1P	glucosa 1-fosfato
Glc6P	glucosa 6-fosfato
GS	glucógeno sintetasa
GT	glicosiltransferasa
GT-A	tipo A de plegamiento tridimensional de las glicosiltransferasas
GT-B	tipo B de plegamiento tridimensional de las glicosiltransferasas
IAA	ácido iodoacético
IAM	iodoacetamida
IgG	inmunoglobulina G
IPTG	isopropil β -D-tiogalactopiranosido
IUBMB	<i>International Union of Biochemistry and Molecular Biology</i>
kDa	kilodalton
LB	caldo de cultivo de Luria-Bertani
MalP	maltodextrina fosforilasa
MurG	undecaprenildifosfo-muramoilpentapéptido β -N-acetilglucosaminiltransferasa
NADP ⁺	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma reducida)
NMR	Resonancia magnética nuclear
OtsA	trehalosa-6-fosfato sintetasa
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
rpm	revoluciones por minuto
SDS	dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
SS	almidón sintetasa
TEA	trietanolamina
TM	triple mutante (C7S-C39S-C408S)
UDP	uridina difosfato
UDP-Glc	UDP-glucosa

Glosario de palabras extranjeras

<i>buffer</i>	Solución iónica que amortigua cambios en el pH
<i>fold</i>	Plegamiento espacial de una proteína
<i>loop</i>	Tipo de estructura secundaria no definida, que en general conecta dos regiones de estructura secundaria definida, como hojas plegadas β o α -hélices
<i>primer</i>	Oligonucleótido que sirve como cebador de la reacción de la polimerasa de DNA
<i>threading</i>	Procedimiento analítico que consiste en enhebrar la secuencia de aminoácidos de una estructura desconocida en una estructura tridimensional predefinida, para verificar su compatibilidad. También se lo conoce como "reconocimiento de <i>fold</i> ".
<i>Western blot</i>	Técnica de inmunodetección de proteínas luego de su transferencia a una membrana adecuada

Índice

	página
Resumen	1
Introducción	
Hidratos de carbono de reserva	3
La función del glucógeno y el almidón	6
Glucógeno bacteriano	6
Almidón en plantas	7
Glucógeno en animales	7
Síntesis de glucógeno y almidón	8
Metabolismo del glucógeno en bacterias	8
Síntesis de almidón en plantas y algas	13
Síntesis de glucógeno en eucariotas	16
Glicosiltransferasas: clasificación de las glucógeno/almidón sintetetasas	18
Características bioquímicas de las GS bacterianas y almidón sintetetasas	24
Objetivos	28
Resultados y discusión	
Expresión y purificación de la GS silvestre de <i>E. coli</i>	29
Estudio de las Cys presentes en la GS de <i>E. coli</i>	31
Caracterización cinética de las enzimas mutantes de Cys	32
Inactivación de la GS de <i>E. coli</i> por DTNB	36
Protección de la modificación con DTNB	38
Inactivación de la GS de <i>E. coli</i> por IAA	41
Inhibición por GlcIP y AMP	44
Conservación de los residuos de Cys	48
Caracterización de la región que flanquea a la Cys ³⁷⁹	50
Caracterización cinética de las mutantes en la posición 377	51
Restitución de la actividad por modificación química de la mutante E377C	53
Co-sedimentación con glucógeno	55
Caracterización cinética de las mutantes S374A y Q383A	56
Modelo de homología de la GS de <i>E. coli</i>	60
Estudio de los residuos del sitio activo de la GS de <i>E. coli</i>	63
Estructura de la GS de <i>E. coli</i> y su relación con otras GT	66
Generación de un nuevo modelo de homología de la GS de <i>E. coli</i>	69
Estudio del sitio de unión de la ADP-Glc	77
Estudios del sitio de unión del aceptor en la GS de <i>E. coli</i>	88
Conclusiones	98
Materiales y Métodos	
Reactivos	103
Cepas bacterianas y medios de cultivo	103

Cuantificación de proteínas	103
SDS-PAGE, <i>Western blot</i> y secuenciación	103
Construcción de los plásmidos	104
Mutagénesis sitio-dirigida	104
Ensayo de actividad de la glucógeno sintetasa	106
Glucógeno como aceptor	106
Oligosacáridos como aceptores	106
Expresión y purificación de las enzimas	107
Modificación con DTNB	107
Inhibición con DTNB	108
Inhibición con IAA	108
Cromatografía en papel	108
Caracterización cinética	108
Modificación química con IAA	109
Co-sedimentación con glucógeno	109
Expresión y purificación de las enzimas con un His-Tag®	109
Predicción de estructura y modelado	112
Proteólisis limitada de la GS	112
Referencias bibliográficas	114

Resumen

La glucógeno sintetasa (GS) de *Escherichia coli* es una glicosiltransferasa que transfiere glucosas desde la ADP-glucosa (ADP-Glc) hacia el extremo no reductor del glucógeno, reteniendo la configuración anomérica. En el presente trabajo, se identificó mediante técnicas de modificación química y mutagénesis sitio-dirigida una zona conservada entre las GS bacterianas y almidón sintetetasas involucrada en catálisis y unión de sustratos. Posteriormente, se generó un modelo de homología de la GS de *E. coli* basándose en la estructura de otras tres glicosiltransferasas con un mismo tipo de *fold* GT-B. La comparación entre las estructuras de las glicosiltransferasas cristalizadas y el modelo de homología llevó a la identificación de un grupo de residuos conservados compartiendo una misma topología. Las mutaciones E377A, D137A, R300A, K305A y H161A disminuyeron la actividad específica 10000, 8100, 2600, 1200 y 710 veces, respectivamente. Ninguna de las mutaciones aumentó el $S_{0.5}$ para el glucógeno, y sólo H161A y R300A mostraron $S_{0.5}$ aumentados para la ADP-Glc en 11 y 8 veces, respectivamente. Estos residuos resultaron esenciales para la catálisis enzimática, validando el modelo que muestra una importante similitud en el sitio activo de GS de *E. coli* y otras glicosiltransferasas con un *fold* GT-B cristalizadas hasta la fecha. Asimismo, se identificaron con técnicas de modelado y se estudiaron otros residuos conservados que tienen una participación potencial en la unión de la ADP-Glc y el glucógeno. Esta es la primera vez que se estudia detalladamente el sitio activo de una GS bacteriana.

Palabras clave: glucógeno, glucógeno sintetasa, *glgA*, glicosiltransferasa, almidón, GT-B

Abstract

The *Escherichia coli* glycogen synthase (GS) is a retaining glycosyltransferase that transfers glucose residues from ADP-glucose to the non-reducing end of glycogen. In the present work, a conserved region among bacterial GS and starch synthases involved in catalysis and substrate binding was identified using chemical modification and site-directed mutagenesis. Afterwards, a homology model of the *E. coli* GS was generated based on the structure of three other glycosyltransferases displaying the same GT-B fold. The comparison between the structures of the crystallized glycosyltransferases and the homology model identified a group of conserved residues with the same topology. Mutations E377A, D137A, R300A, K305A, and H161A decreased the specific activity 10000-, 8100-, 2600-, 1200- and 710-fold, respectively. None of these mutations increased the $S_{0.5}$ for glycogen, and only H161A and R300A displayed an 11- and 8-fold higher $S_{0.5}$ for ADP-Glc, respectively. These residues were essential for enzymatic catalysis, validating the model that shows a strong similarity in the active site of the *E. coli* glycogen synthase and the other retaining GT-B glycosyltransferases crystallized to date. Moreover, other conserved residues were identified with modeling techniques and studied, and they are potential participants in ADP-Glc and glycogen binding. This is the first time that the active site of a bacterial GS is studied in detail.

Keywords: glycogen, glycogen synthase, *glgA*, glycosyltransferase, starch, GT-B

Introducción

En la naturaleza se encuentran cuatro tipos principales de biomoléculas: proteínas, ácidos nucleicos, lípidos e hidratos de carbono. Estos últimos constituyen el grupo de compuestos más abundante de la tierra, y se caracterizan por ser aldehídos o cetonas con múltiples grupos hidroxilos, y por estar presentes en todos los organismos vivos bajo diversas formas como mono, oligo y polisacáridos. Los hidratos de carbono cumplen funciones estructurales, de reserva de energía, y funcionan como combustible metabólico e intermediarios principales en múltiples vías del metabolismo del carbono (1).

Los monosacáridos consisten en una unidad monomérica del polihidroxialdehído o polihidroxicetona. Los más abundantes son las hexosas D-glucosa y la D-fructosa. En el interior de la célula, los azúcares fosfato, son una clase importante de derivados de los monosacáridos. Los disacáridos están compuestos por dos azúcares unidos por un enlace glicosídico, siendo los más abundantes la sacarosa (glucosa- α -1,2-fructosa), la maltosa (glucosa- α -1,2-glucosa) y la lactosa (galactosa- β -1,4-glucosa). Los oligosacáridos están formados por cadenas relativamente cortas de monosacáridos, y algunos de ellos se encuentran unidos a proteínas o lípidos. Los polisacáridos consisten en largas moléculas lineales o ramificadas compuestas por un número y composición variable de unidades de monosacárido. Pueden ser divididos en polisacáridos estructurales y de reserva, y en homopolisacáridos (formados por un solo componente de unidad monomérica) y heteropolisacáridos (más de un tipo de residuo de monosacárido). Los homopolisacáridos más abundantes son el glucógeno y el almidón, que cumplen funciones de reserva de energía dentro de la célula; la celulosa, y la quitina, ambos con funciones estructurales en pared de células vegetales y de artrópodos, respectivamente. El heteropolisacárido peptidoglicano, formado por unidades repetitivas de *N*-acetilglucosamina y ácido *N*-acetilmurámico, es un componente de la pared celular bacteriana, mientras que otros heteropolisacáridos como el ácido hialurónico proveen sostén y adhesión a células y tejidos animales (1, 2).

Hidratos de carbono de reserva

La biosíntesis de α -1,4-poliglucanos es un proceso mediante el cual los organismos vivos acumulan reservas energéticas para ser utilizadas cuando la energía y los esqueletos carbonados no se encuentran disponibles en el medio ambiente. El proceso consiste en la polimerización del exceso de glucosa para almacenarla bajo la forma de glucanos de elevado

peso molecular (polisacáridos de glucosa). La ventaja principal de usar polisacáridos como reserva es que, a causa de su alto peso molecular y otras propiedades físicas, tienen un efecto reducido sobre la presión osmótica interna de la célula. Otra ventaja esta dada por la gran cantidad de uniones de la amilopectina y el glucógeno (cadenas de glucosas α -1,4 unidas a la molécula principal por uniones α -1,6), que generan una organización de la molécula que facilita la acción de las enzimas que los degradan, las cuales pueden actuar tanto en los extremos no reductores como en las uniones internas. Las enzimas degradativas, tanto amilasas como fosforilasas, pueden actuar simultáneamente en varias ramas, acelerando la conversión de grandes polímeros en glucosa. La estructura del glucógeno y la optimización de la misma para su función metabólica han sido objeto de estudios evolutivos (3, 4). La utilización de poliglucanos como reserva energética se encuentra ampliamente dispersa en la naturaleza, desde el glucógeno bacteriano, almidón en eucariotas fotosintéticos y glucógeno en el resto de los eucariotas, con escasas excepciones, entre ellas ciertos organismos parasitarios.

El glucógeno es un polímero de glucosas de muy alto peso molecular (10^7 - 10^9) compuesto por cadenas lineales de 10-14 glucosas con uniones α -1,4 entrelazadas por uniones glucosídicas α -1,6, formando una estructura ramificada. La estructura del glucógeno de origen animal ha sido descrita y analizada en distintas oportunidades (5, 6). Se sabe mucho menos acerca de las estructuras del glucógeno bacteriano o fúngico, pero los datos disponibles indican que, en una forma general, las estructuras de estos últimos son similares a la del glucógeno de mamíferos (6). El glucógeno almacenado en el músculo está organizado en partículas β , esféricas, de 1500 a 4000 nm de diámetro; mientras que en el hígado está dispuesto en partículas α o rosetas, que parecen ser agregados de las de tipo β . Una partícula β puede contener hasta 6×10^4 residuos de glucosa, unidos en cadenas rectas α -1,4 enlazadas cada 8-10 residuos por una unión α -1,6. La localización del glucógeno en células de mamífero se da bajo la forma de gránulos citoplasmáticos (5).

Si bien la estructura del glucógeno bacteriano y el glucógeno de mamífero son relativamente similares, esta similitud no se extiende al mecanismo biosintético ni a la molécula dadora de glucosas para la extensión del polímero. Esto lleva a importantes diferencias en el mecanismo de regulación: en mamíferos (no así en bacterias ni en plantas) el control del camino biosintético involucra la modificación covalente de una enzima (7).

El almidón es una mezcla de amilosa y amilopectina (8). La amilosa es relativamente pequeña (alrededor de 1000 residuos), y es mayoritariamente un polímero lineal con uniones α -1,4, si bien contiene ocasionalmente ramificaciones α -1,6. La amilopectina es una molécula de mucho mayor tamaño, con un grado de polimerización de 10^4 - 10^5 residuos, y posee frecuentes puntos de ramificación (5-6 %). El almidón se sintetiza como gránulos semicristalinos con diversos tipos polimórficos y grados de cristalinidad. La organización del gránulo de almidón es muy compleja y depende en gran medida de su origen botánico. Los aspectos físicos y químicos de la estructura del gránulo de almidón han sido discutidos ampliamente (9, 10). La acumulación de gránulos de almidón ocurre mayoritariamente en dos tipos de plástidos vegetales. En las células fotosintéticas de hojas el polisacárido se localiza en el cloroplasto, donde sirve como reservorio temporario de carbono y energía; mientras que en los tejidos no fotosintéticos el almacenamiento del almidón es a largo plazo y tiene lugar en amiloplastos, las organelas especializadas para tal fin (11).

Carl y Gerti Cori sintetizaron un poliglucano *in vitro* por primera vez en 1939, utilizando la enzima fosforilasa y glucosa-1-P (Glc1P) (12). Por algún tiempo ésta fue la ruta aceptada para la biosíntesis de poliglucanos. Sin embargo, a partir de los 1950, surgieron evidencias que sugerían la existencia de un camino biosintético diferente al analizar los pacientes que poseían una rara enfermedad relacionada con la acumulación de glucógeno, conocida actualmente como la “enfermedad de McArdle”. Esta enfermedad está causada por la deficiencia de la glucógeno fosforilasa en músculo esquelético, y los pacientes padecen fuertes calambres y dolores musculares ocasionados por no poder utilizar el glucógeno como fuente de energía muscular. La observación microscópica de células de músculo de estos pacientes mostró la acumulación de gran cantidad de polisacárido en ellas, por lo que resultó evidente que la síntesis no podía ocurrir a través de la glucógeno fosforilasa. Así, estos individuos pueden sintetizar glucógeno, pero no pueden degradarlo debido a la deficiencia en la glucógeno fosforilasa (13). Esto llevó a la conclusión de que las vías de síntesis y degradación del glucógeno deberían ser distintas y, con el descubrimiento de la glucógeno sintetasa (GS) en 1957 (14), quedó claro que se trata de distintos caminos metabólicos que involucran enzimas diferentes. A partir de entonces, la regulación de la síntesis del glucógeno en mamíferos ha sido objeto de intenso estudio, no sólo por parte de aquellos

investigadores que buscan entender la síntesis de glucógeno en sí misma, sino que también es un modelo para estudiar el efecto de la acción hormonal sobre la regulación celular.

La función del glucógeno y el almidón

Glucógeno bacteriano. El glucógeno se encuentra en diversas bacterias, y generalmente es acumulado en situaciones ambientales que limitan el crecimiento y que ofrecen un exceso relativo de carbono. Se ha informado que la acumulación de glucógeno ocurre en la fase estacionaria del ciclo de crecimiento como una respuesta a las limitaciones en el suministro de nitrógeno, azufre o fósforo (15). El glucógeno no es indispensable para el crecimiento bacteriano, y mutantes deficientes en su síntesis crecen tan bien como la cepa silvestre. Bajo condiciones desfavorables y sin una fuente alternativa de carbono, el glucógeno es probablemente utilizado para preservar la integridad celular. Las poblaciones bacterianas requieren energía para mantenerse bajo condiciones latentes (sin crecimiento), y esto es definido como “energía de mantenimiento”. Esta es la energía requerida para procesos que preserven la movilidad y el pH intracelular, la respuesta quimiotáctica, el recambio de proteínas y ARN, y la regulación osmótica. En medios deficientes en carbono, *Escherichia coli* y *Enterobacter aerogenes* conteniendo glucógeno no degradan su ARN y proteínas, mientras que las bacterias deficientes en glucógeno liberan NH₃ a partir de la degradación de sus componentes conteniendo nitrógeno (16). Células de *E. aerogenes*, *E. coli* y *Streptococcus mitis* conteniendo glucógeno también sobreviven mejor que organismos sin el mismo (17). Cepas de *Streptococcus mutans* (principal agente etiológico de las caries dentales en humanos) incapaces de acumular glucógeno presentan una cariogenicidad disminuida, mientras que una cepa con mayores niveles de polisacárido acumulado (respecto a la silvestre) es significativamente hipercariogénica (18). Otra función para el glucógeno ha sido sugerida en especies de *Clostridia*, organismos que acumulan glucógeno hasta un 60% de su peso seco antes o durante la iniciación de la esporulación y que, durante la formación de la spora, lo degradan rápidamente. Las cepas deficientes en glucógeno son malas formadoras de esporas, sugiriendo que el polímero sirve como fuente de carbono y energía para la formación y la maduración de la spora (19). También en cepas de *Streptomyces* y *Myxococcus* ha sido probada la importancia de las reservas de glucógeno para la esporulación (20, 21). Sin embargo, en cepas de *Clostridium cellulolyticum*, no se encontró correlación alguna entre acumulación o

movilización de glucógeno y esporulación (22). Aunque estos estudios sugieren que el glucógeno juega un papel en la supervivencia bacteriana, se requiere mayor estudio para poder definir clara y universalmente su función.

Almidón en plantas. El almidón se encuentra presente en casi todas las plantas verdes y en muchos tipos de tejidos y órganos vegetales, como hojas, raíces, tallos, frutos, granos y brotes. El almidón desaparece de las hojas expuestas a baja intensidad de luz o dejadas en la oscuridad por largos periodos (24-48 h), como se ha documentado desde el siglo XIX (23). La iluminación de las hojas con luz brillante causa nuevamente la formación de gránulos de almidón en el cloroplasto. Esto puede verse por tinción de la hoja con yodo (24), o con microscopio óptico o electrónico (25). La fijación de carbono durante la fotosíntesis conduce a la formación de almidón, el cual es degradado en la oscuridad. Los productos de la degradación del almidón son usados como fuente de energía y convertidos en sacarosa, la cual es transportada a otros órganos de la planta. La biosíntesis y degradación del almidón en la hoja son procesos dinámicos, y el contenido del polisacárido fluctúa durante el día (26).

En los frutos, órganos de almacenamiento o semillas, la síntesis del almidón ocurre durante el desarrollo y maduración del tejido (II). La degradación del almidón en éstos ocurre al momento del brote o la germinación de la semilla o tubérculo, o al madurar el fruto, cuando es usado como fuente de carbono y energía. Por lo tanto, los procesos degradativos pueden ser separados temporalmente de los de síntesis en los tejidos de reserva. En cereales, la localización principal de la síntesis y acumulación del polisacárido es en el endosperma, donde los gránulos del mismo se localizan dentro del amiloplasto. Los patrones de acumulación de almidón durante el desarrollo del tejido son propios de la especie y están relacionados con los patrones únicos de diferenciación de los órganos (27).

Glucógeno en animales. El glucógeno es una importante fuente de energía en las células animales. En el ser humano, por ejemplo, el polímero representa un 1% del peso húmedo del músculo esquelético y el 5% del hígado. La acumulación de glucosa bajo la forma de glucógeno es importante para la homeostasis de los mamíferos, y las reservas de glucógeno en el músculo esquelético y el hígado cumplen funciones específicas.

El glucógeno hepático es acumulado cuando hay un exceso de glucosa disponible en la dieta y es usado para mantener un nivel constante de glucosa en sangre; el mismo raramente aporta energía al hígado en si mismo. Un hombre de 70 kg usa aproximadamente 180

g de glucosa por día para aquellos tejidos que sólo pueden utilizar hidratos de carbono como fuente de energía, y casi la mitad de esta glucosa deriva del glucógeno hepático. Por lo tanto, la síntesis y movilización del glucógeno hepático es dictada por los niveles de glucosa en sangre y es controlada por las hormonas que regulan el metabolismo de la glucosa, principalmente glucagon, insulina y glucocorticoides. En todos los otros tejidos extrahepáticos de mamíferos, por el contrario, las reservas de glucógeno son utilizadas para funciones específicas del tejido.

Si bien el contenido de glucógeno del músculo esquelético es elevado, no se encuentra disponible como fuente de glucosa sanguínea. Durante el ejercicio, se forma lactato en el músculo esquelético por glucólisis. Durante el descanso, el cetósido es convertido en glucosa por el hígado y el riñón a través de gluconeogénesis, siendo así la fuente del 10-20% de la glucosa en sangre. El glucógeno muscular sirve principalmente como reservorio y fuente de energía, utilizable para la contracción muscular. El reabastecimiento ocurre cuando la dieta genera un aumento concomitante de la glucosa sanguínea (hiperglucemia) e insulina.

Síntesis de glucógeno y almidón

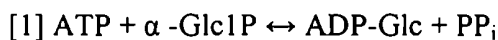
Después del descubrimiento de la UDP-glucosa (UDP-Glc) y otros nucleótido azúcares por Leloir y colaboradores (28, 29), se observó que las fracciones celulares particuladas de diversas fuentes, tanto procariotas como eucariotas, podían llevar a cabo transferencias glicosídicas desde aquellos a los correspondientes aceptores. En general, los nucleótido azúcares pueden ser formados a partir de azúcares fosfato y nucleósidos trifosfato, y son herramientas esenciales para la interconversión de monosacáridos y el anabolismo. La síntesis de polisacáridos puede ser dividida en varios pasos a) la síntesis de la molécula dadora a partir de azúcares 1-fosfato, b) la transferencia de una unidad glucosídica a partir del nucleótido azúcar hacia el iniciador de la síntesis del glucano y c) la reorganización del polisacárido.

Metabolismo del glucógeno en bacterias. La acumulación de glucógeno no se encuentra restringida a una clase en particular de bacteria, y está presente tanto en Gram negativas como Gram positivas, e incluso en arqueobacterias. En 1964 se estableció claramente que el dador de glucosas para la síntesis de glucógeno en mamíferos era la UDP-Glc (30) mientras que para la síntesis de almidón en plantas era la ADP-glucosa (ADP-Glc) (31). Se mostró

también que varias mutantes de *E. coli* deficientes en la UDP-Glc pirofosforilasa acumulaban cantidades normales de glucógeno durante el crecimiento en medio limitado en nitrógeno (32). Entonces, la UDP-Glc no podía ser el dador para la síntesis del glucógeno bacteriano. En 1964 se reportó que los extractos de varias bacterias contenían grandes cantidades de ADP-Glc: α -1,4-D-glucano-4- α -glucosiltransferasa, también conocida como la glucógeno sintetasa (GS) bacteriana (31). Estos mismos extractos bacterianos también contenían ADP-Glc pirofosforilasa, la enzima responsable de la síntesis de ADP-Glc, como se había encontrado previamente en plantas.

En bacterias, la presencia de glucógeno se encuentra como mínimo asociada con una ADP-Glc pirofosforilasa, una GS, una glucógeno fosforilasa, una enzima ramificante y una enzima desramificante. En *E. coli*, estas enzimas están organizadas en dos operones vecinos (15). Estas son las actividades propias del la vía central del metabolismo del glucógeno. Fuera de este camino central se encuentran las enzimas de las vías de utilización de maltooligosacáridos, que también pueden ser consideradas relevantes para el metabolismo del glucógeno. Durante el catabolismo del glucógeno, de hecho, se producen forzosamente maltooligosacáridos debido a la acción de la enzima desramificante. Estos maltooligosacáridos pueden ser procesados a través de una combinación de α -1,4 glucosiltransferasas, maltodextrina fosforilasas y glucosidasas.

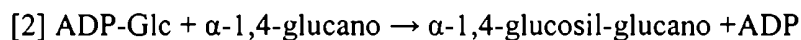
El primer paso exclusivo de la vía de síntesis de glucógeno es la producción de ADP-Glc por la ADP-Glc pirofosforilasa (EC 2.7.7.27) codificada por el gen *glgC* de *E. coli* (reacción [1]), la cual genera ADP-Glc y pirofosfato inorgánico (PP_i) a partir de ATP y Glc1P. Sobre esta enzima recae la regulación la síntesis del glucógeno bacteriano.



Las ADP-Glc bacterianas son enzimas tetraméricas reguladas a través de inhibición y activación alostéricas. Si bien los efectores alostéricos varían con la fuente, comparten la característica de ser intermediarios en los principales caminos de asimilación de carbono. Las enzimas de bacterias heterotróficas son activadas por metabolitos de los caminos glucolíticos, como la fructosa 6-fosfato, la fructosa 1,6-bisfosfato o piruvato, e inhibidas por AMP, ADP y/o P_i. En general, los activadores de las ADP-Glc pirofosforilasas son metabolitos claves

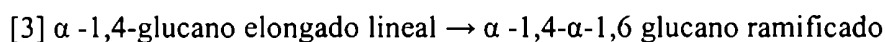
que representan señales de alto contenido de carbono y energía dentro de la célula. Lo contrario ocurre para los inhibidores, que son intermediarios de bajos niveles de energía metabólica. Estas propiedades regulatorias de las ADP-Glc pirofosforilasas, junto con el hecho de que el ATP es uno de los sustratos de la enzima, hacen que la síntesis de polisacáridos de reserva en bacterias sea máxima cuando el carbono y la energía celulares están en exceso, y viceversa. Las ADP-Glc de bacterias y cianobacterias son homotetraméricas, con la excepción de las del género *Bacillus* (y tal vez todas las firmicutes) que son heterotetrámeros. Las ADP-Glc bacterianas de Gram negativas han sido estudiadas extensamente, y su regulación, la predicción de su estructura terciaria y sus principales residuos catalíticos se encuentran bien documentados (para una revisión reciente, ver ref. 33).

El paso siguiente en la síntesis del glucógeno bacteriano consiste en la transferencia, mediada por la GS, de la glucosa activada al extremo no reductor de una cadena creciente de glucosas unidas por enlaces α -1,4 (reacción [2]).



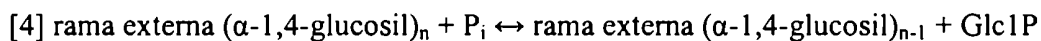
La GS bacteriana (EC 2.4.1.21) es una enzima que, a diferencia de las GS eucariotas, no presenta modificaciones post-traduccionales o evidencia de regulación alguna. Si bien *E. coli* contiene solamente un gen de GS (*glgA*), en genomas de cianobacterias se han encontrado dos genes. Por mucho tiempo se buscó el iniciador para la síntesis de glucógeno bacteriano y nunca se encontró una enzima similar a la glucogenina de mamíferos (34). Recientemente, se ha aportado evidencia de que la GS bacteriana podría no necesitar de iniciador alguno, sino que la reacción de síntesis comenzaría con una autoglicosilación de la propia enzima (35).

Aproximadamente un 10% de los enlaces en el glucógeno bacteriano son α -1,6. Para generar estas ramificaciones es necesaria la acción de la enzima ramificante (EC 2.4.1.18, reacción [3]), que hidroliza un enlace α -1,4 en un glucano preexistente y transfiere un segmento de cadena a una posición α -1,6.



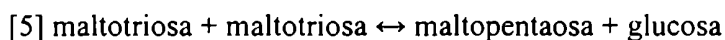
Tanto *E. coli* como las cianobacterias parecen contener un solo gen que codifique una enzima ramificante de glucógeno (*glgB*).

El catabolismo del glucógeno requiere de la acción concertada de un mínimo de cuatro enzimas: la glucógeno fosforilasa, la enzima desramificante de glucógeno, la amilomaltasa y la maltodextrina fosforilasa (MalP). La glucógeno fosforilasa transfiere ortofosfato inorgánico (P_i) al C1 de la glucosa del extremo no reductor de una rama externa, generando Glc1P (reacción [4]). Si bien esta reacción es fuertemente reversible, las concentraciones intracelulares de sustratos y productos favorecen la fosforólisis *in vivo*.

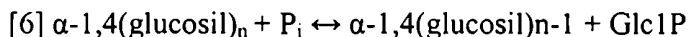


Se estima que la glucógeno fosforilasa es la principal enzima responsable del catabolismo del glucógeno en bacterias. La misma es activada por interacción con componentes del sistema de transporte de azúcar fosfotransferasas (36, 37). Ninguna de las glucano fosforilasas conocidas hasta el momento es capaz de atravesar la barrera de las ramificaciones α -1,6. Por lo tanto, el catabolismo del glucógeno requiere de la presencia simultánea de una enzima desramificante específica, que ha sido denominada a partir del gen que la codifica: *glgX*. La forma de acción de la enzima desramificante GlgX aún no está completamente esclarecida, pero sería altamente específica para hidrolizar significativamente sólo aquellas ramas externas (cadenas externas de 4 glucosas de longitud) que ya han sido digeridas al máximo por la glucógeno fosforilasa (38).

La mayoría de las α -1,4 glucano fosforilasas no puede digerir cadenas más cortas que cinco residuos de glucosa, lo cual genera una mayoría de ramas exteriores de 4 glucosas de longitud, las cuales serían desramificadas por la GlgX. Esto produciría maltotetraosa, la cual necesita ser metabolizada en glucosa. La acción de α -1,4 glucanotransferasas, del tipo de la amilomaltasa, genera series de maltooligosacáridos de longitudes crecientes, con formación concomitante de glucosa, como se encuentra ejemplificado en la reacción [5] (ver ref. (39) para una revisión).



A su vez, esta serie de maltooligosacáridos de longitudes crecientes puede ser digerido por la acción de la MalP (reacción [6]), que reconoce cadenas lineales de cinco o más glucosas como sustrato.



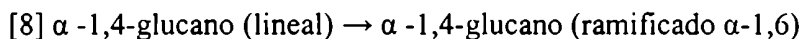
En resumen, prácticamente todas las bacterias que acumulan glucógeno estudiadas hasta el momento lo hacen utilizando el camino de síntesis detallado anteriormente, que utiliza como dador de glucosas a la ADP-Glc. Se han aislado cepas mutantes de *E. coli* y *Salmonella typhimurium* deficientes en glucógeno, y se ha demostrado que tienen afectadas la GS, o la ADP-Glc pirofosforilasa, o ambas (revisado en refs. (15, 40)). Una de las posibles excepciones a la utilización de ADP-Glc como dador de glucosas para la síntesis del glucógeno bacteriano puede ser *Prevotella bryantii*, una de las bacterias más comunes del tracto ruminal. *P. bryantii* acumula grandes cantidades de glucógeno cuando crece en condiciones de exceso de glucosa y nitrógeno limitado (41, 42). Sin embargo, no se ha encontrado actividad de ADP-Glc pirofosforilasa en cultivos de esta bacteria y sí se han detectado niveles elevados de actividad de UDP-Glc pirofosforilasa. La GS de esta bacteria transfiere glucosas desde la UDP-Glc al glucógeno, y esta actividad no parece ser afectada por la presencia de exceso de ADP-Glc en el medio, si bien todos los ensayos se llevaron a cabo utilizando extractos celulares (43). En otras bacterias de la cavidad oral pertenecientes al género *Prevotella*, *P. intermedia* y *P. nigrescens*, que acumulan glucógeno cuando crecen en medio con glucosa, tampoco se detectó actividad de ADP-Glc pirofosforilasa y sí de UDP-Glc pirofosforilasa. Sin embargo, en este trabajo no se comparó la actividad de la glucógeno sintetasa con UDP-Glc y ADP-Glc como sustratos (44). También se ha sugerido que en la bacteria de la microflora oral *Actinomyces naeslundii* la síntesis de glucógeno ocurre a través de la vía de la UDP-Glc, pero los resultados no son concluyentes (45).

Por otra parte, aún no está aclarado completamente si las arqueobacterias utilizan exclusivamente ADP-Glc como el principal dador de glucosas. Existe evidencia de que la GS de *Thermococcus hydrothermalis* posee similar afinidad por ADP-Glc y UDP-Glc y puede usar estos dos sustratos para la síntesis de glucógeno, si bien la V_{\max} alcanzada es 10 veces superior con ADP-Glc (46). También ha sido informado que la GS de *Pyrococcus abyssi*

puede utilizar indistintamente ADP-Glc o UDP-Glc como sustratos, pero los datos de actividad específica con cada uno de los potenciales sustratos no han sido detallados (47). Frecuentemente se asume en la literatura que las GS de arqueobacterias son promiscuas y pueden utilizar indistintamente ADP-Glc o UDP-Glc como molécula dadora de glucosas (47, 48). Sin embargo, uno de los trabajos comúnmente citados para reforzar esta hipótesis en realidad no compara distintos sustratos, sino que mide la actividad de la GS sólo en presencia de UDP-Glc (49). Si bien es cierto que las GS de arqueobacterias parecen tener una especificidad de sustrato más tolerante, aún no existen resultados concluyentes al respecto.

Síntesis de almidón en plantas y algas. Existen dos tipos de almidón que, si bien comparan muchas características, presentan ciertas diferencias entre ellos. En primer lugar se encuentra el almidón de las algas verdes y las plantas superiores. Estos organismos siempre acumulan almidón dentro de los plástidos y lo hacen a partir de ADP-Glc. Este polisacárido difiere en sus proporciones de amilosa y amilopectina entre distintos organismos y tejidos. En segundo lugar, encontramos el almidón de tipo *floridean* que se encuentra en el citoplasma de organismos que poseen rodoplastos (algas rojas o especies relacionadas con ellas por endosimbiosis secundaria) (revisado en 50). Aún no está completamente esclarecido si el almidón tipo *floridean* es sintetizado a partir de ADP-Glc, UDP-Glc u otro sustrato. En el alga roja *Gracilaria gracilis* se demostró la ocurrencia de la ADP-Glc pirofosforilasa que estaría involucrada en la síntesis de almidón de tipo *floridean* (51). Sin embargo, en el alga roja *Gracilaria tenuistipitata* se aisló un almidón sintetasa que parece utilizar selectivamente UDP-Glc (52). El polisacárido de las algas rojas se caracteriza por su aparente falta de amilosa, excepto en algunas especies unicelulares (53). El almidón de tipo *floridean* es muy parecido estructuralmente a la amilopectina, y sus características estructurales son similares a este polisacárido de plantas superiores. Las algas rojas utilizan el almidón como principal acúmulo de hidratos de carbono, y el volumen acumulado puede llegar hasta el 80% del volumen celular (54). La compartimentalización inusual del polisacárido en las algas rojas es lo que plantea más preguntas acerca de la posibilidad de que su camino biosintético sea más parecido al del glucógeno en mamíferos que al del polisacárido bacteriano o de plantas. Durante esta tesis, cuando se utiliza el término almidón sin aclaración alguna, es en referencia al polisacárido acumulado por algas verdes y plantas superiores.

Las reacciones que conducen a la síntesis de almidón son esencialmente similares a aquellas correspondientes a la síntesis de glucógeno en bacterias, pero el producto final es físicamente diferente. La síntesis comienza con la misma reacción [1] catalizada por la ADP-Glc pirofosforilasa (ver más arriba). Al igual que sus contrapartes bacterianas, las ADP-Glc pirofosforilasas de plantas se encuentran reguladas alostéricamente, la mayoría de ellas activadas por 3-fosfoglicerato e inhibidas por P_i (7). También ha sido demostrado que en plantas superiores la actividad de la enzima puede ser regulada por su estado reductor (55-57). Para una revisión reciente de las propiedades de las ADP-Glc pirofosforilasas de plantas, ver (58).



La reacción [7] es catalizada por la almidón sintetasa (EC 2.4.1.21), y se trata de la misma reacción catalizada por la GS bacteriana (reacción [2]). Ha sido demostrada la existencia de múltiples isoenzimas de almidón sintetasa y enzimas ramificantes en plantas y algas verdes (59). Pueden identificarse dos grandes grupos: el primero contiene a las almidón sintetasa unidas a gránulo (GBSS, *granule bound starch synthases*), que son requeridas para la síntesis de amilosa y se encuentran esencialmente dentro de la matriz del gránulo de almidón. El segundo grupo contiene a las almidón sintetasa restantes (SS, *starch synthase*), cuya distribución entre las fracciones de gránulo y estroma puede variar según la especie, tejido y estadio de desarrollo (8). El análisis de los genomas de *Arabidopsis thaliana* y del arroz muestra cinco genes principales: GBSS, SSI, SSII, SSIII y SSIV. En monocotiledóneas hay evidencias que sugieren que la clase SSII divergió, probablemente en un evento de duplicación de genes, para contener dos clases de secuencias designadas como SSIIa y SSIIb (60). Existen pruebas de que se encuentran dos tipos de genes de GBSS, uno de ellos expresado en endosperma y el segundo en otros tejidos (61).

Las isoenzimas parecen cumplir papeles diferentes en la síntesis de los dos polímeros del almidón, la amilosa y la amilopectina. Por ejemplo, en diferentes plantas (arroz, cebada, trigo, arveja, papa, maíz) y también en *Chlamydomonas reinhardtii*, la GBSS está involu-

crada en la síntesis de amilosa (revisado en ref. 62). Mutantes defectivas en esta enzima, conocidas como mutantes *waxy*, generan gránulos de almidón que sólo tienen amilopectina (revisado en ref. 9). Este fenotipo sugiere que la síntesis de amilosa no es indispensable para la biogénesis normal del gránulo de almidón.

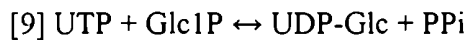
La reacción [7] fue reportada por Leloir y col. con UDP-Glc (14) como el dador glucosídico, pero se demostró más tarde que la ADP-Glc era más eficiente en términos de valores de velocidad máxima y afinidad aparente. Las SS son específicas para ADP-Glc, pero las GBSS presentan cierta actividad con UDP-Glc como sustrato, si bien sigue siendo mucho mejor la observada con ADP-Glc. No obstante, está en duda la posibilidad del uso de UDP-Glc como sustrato *in vivo*, dada la ausencia de este metabolito en plástidos, y otras razones discutidas en (63).

La reacción [8] es catalizada por la enzima ramificante, siendo similar a lo que ocurre en bacterias (ecuación [3]). La diferencia radica en que la amilopectina presenta ramas laterales más largas y menor número de ramificaciones que el glucógeno (20-24 unidades de glucosa por rama y 5% de uniones α -1,6; y 10-13 unidades de glucosa por rama y 10% de uniones α -1,6, respectivamente). Es por lo tanto esperable que las correspondientes enzimas ramificantes presenten distintas especificidades con respecto a la transferencia de ramas, o que la interacción de las enzimas que ramifican el polímero en vegetales con las almidón sintetasas sea diferente de la interacción entre la enzima ramificante de glucógeno y las GS bacterianas. Hay por lo menos dos clases de enzimas ramificantes en plantas y su expresión es diferencial según el estadio del desarrollo y el tejido (8). En plantas existen dos tipos de enzimas desramificantes, las pululaninas y las isoamilasas. Ambas enzimas son responsables por la hidrólisis directa de enlaces α -1,6 (8).

La naturaleza del iniciador para la síntesis del almidón es aún una cuestión sin resolver. Los intentos de encontrar una proteína de características similares a la glucogenina, llevaron a la identificación de la proteína autoglucosilante denominada amilogenina, que utiliza UDP-Glc (64, 65). Sin embargo, la naturaleza completamente diferente de la unión glucosídica glucano-proteína, junto con la localización extraplástidica de la proteína, y su capacidad de utilizar otros azúcares además de la glucosa ponen seriamente en duda su participación en la iniciación de la síntesis de almidón. Por otra parte, y a diferencia de los genomas bacterianos, en el genoma de *Arabidopsis* se encuentran otras secuencias más relacionadas con la

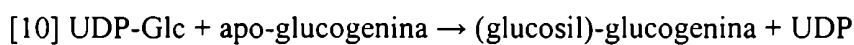
glucogenina fúngica y de mamíferos que la amilogenina. La existencia de una proteína con esta función no puede ser completamente descartada.

Síntesis de glucógeno en eucariotas. La síntesis del glucosil-nucleótido dador para el anabolismo del glucógeno en eucariotas, UDP-Glc (reacción [9]), es catalizada por la enzima UDP-Glc pirofosforilasa (EC 2.7.7.9).



El equilibrio de la reacción es cercano a 1 pero en la dirección de síntesis de UDP-Glc el otro producto, pirofosfato, es inmediatamente degradado por la pirofosfatasa inorgánica. Por lo tanto, la formación de UDP-Glc es prácticamente irreversible en células de mamífero.

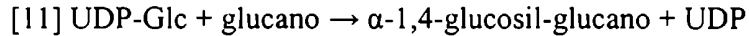
A diferencia de la síntesis de glucógeno bacteriano o de almidón, la síntesis del nucleótido azúcar no se encuentra regulada. Uno de los motivos se debería a que, en la síntesis de glucógeno en mamíferos, este no es un paso único del camino metabólico, sino que la UDP-Glc es utilizada para la síntesis de otros nucleótido azúcares (como la UDP-galactosa o el UDP-glucuronato), y para la glucosilación de muchos constituyentes celulares. La regulación de la síntesis de glucógeno recae entonces sobre la GS, lo cual es consistente con el concepto de que el principal paso regulatorio de un camino biosintético ocurre en el primer paso único de esa vía metabólica.



Estudios iniciados en la década de 1970 llevaron a la identificación de la glucogenina (EC 2.4.1.186), una proteína implicada en la fase de iniciación de la síntesis *de novo* de glucógeno en mamíferos (66, 67). La glucogenina se autoglucosila de acuerdo con la reacción [10], generando un oligosacárido compuesto por residuos de glucosa con uniones glicosídicas del tipo α -1,4, el cual sirve como iniciador para la elongación catalizada por la GS. La mayor parte de los trabajos de caracterización de la glucogenina han sido llevados a cabo en la enzima humana, pero los genes que codifican para proteínas del tipo de la glucogenina se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza. Por ejemplo, la levadura *Saccharomyces*

cerevisiae posee dos de estos genes, *GLG1* y *GLG2*, que codifican para proteínas autogluco-silantes necesarias para la síntesis de glucógeno en este organismo (68).

Como enzima, la glucogenina posee ciertas características inusuales, dado que actúa como el catalizador, el sustrato y el producto de una reacción en la cual hay catálisis verdadera, ya que se polimerizan varias moléculas de glucosa. Las glucogeninas estudiadas hasta el momento comparten la propiedad de catalizar la transferencia de una glucosa desde la UDP-Glc, en una reacción dependiente de Mn^{2+} , para formar un oligosacárido de 8 a 20 unidades unido a un residuo de Tyr en la propia glucogenina. La glucogenina funciona como homodímero, con cada subunidad catalizando la transferencia de los restos de glucosa hacia la otra subunidad (69, 70).



La síntesis de glucógeno en mamíferos está fuertemente regulada en el paso [11], catalizado por la GS eucariota (EC 2.4.1.11), tanto por fosforilación como por activación alostérica. El mecanismo regulatorio de la GS humana ha sido estudiado en profundidad (revisado en refs. 71-74), porque no sólo fue un ejemplo temprano de fosforilación covalente reversible, sino uno de los primeros ejemplos de un blanco intracelular de acción de la insulina. La GS de mamíferos está regulada por fosforilación/defosforilación mediada por quinasas y fosfatasas de proteínas. La GS defosforilada es activa, mientras que se inactiva por fosforilación. Al menos nueve residuos de Ser que actúan como sitios de fosforilación han sido descritos en la enzima de músculo de conejo (75). Por otra parte, también existe una activación alostérica mediada por glucosa 6-fosfato (74).

Por otra parte, la glucógeno fosforilasa (EC 2.4.1.1), responsable de la degradación del glucógeno (reacción [12]), también es regulada por ciclos de fosforilación y defosforilación (74). En este caso la fosforilación ocurre en un sitio único, y genera cambios estructurales extensos que alteran la interacción de la macromolécula con el sustrato y los ligandos, generando una forma más activa denominada fosforilasa α . El glucógeno se une a la fosforilasa α no sólo en el sitio catalítico, sino también en un “sitio de almacenamiento”, que puede anclar a la proteína al glucógeno y de esta forma tenerla disponible para actuar en forma rápida. La glucógeno fosforilasa no sólo es regulada por fosforilación, sino que también está sujeta a

regulación alostérica. El AMP funciona como activador alostérico de la enzima de músculo y su unión cooperativa es favorecida después de la fosforilación. El ATP y la Glc6P actúan como inhibidores compitiendo con el AMP. La isoforma hepática posee propiedades similares, excepto que el AMP es un activador mucho menos efectivo, el ATP y la Glc6P no compiten con él, y la unión de AMP no es cooperativa.

[12] α -1,4-glucano (lineal) \rightarrow α -1,4-glucano (ramificado α -1,6)

Cuando hay elevada demanda de ATP (baja concentración de ATP y Glc6P, y alta concentración de AMP), la glucógeno fosforilasa se encuentra estimulada mientras que la GS esta inhibida, y se favorece la degradación de glucógeno. Cuando hay altos niveles de ATP y Glc6P, ocurre lo inverso, y se favorece la síntesis de glucógeno. Superpuesto con este control alostérico se encuentra el control por fosforilación/defosforilación de ambas enzimas. Las quinasas y fosfatasa que catalizan estas modificaciones son parte de cascadas de amplificación de señal disparadas por las hormonas glucagón, insulina y adrenalina, así como por $[Ca^{2+}]$. El glucagón y la adrenalina estimulan la degradación del glucógeno estimulando a la adenilato ciclasa para aumentar los niveles intracelulares de adenosina monofosfato cíclico (cAMP). El cAMP activa a la proteína quinasa dependiente de cAMP, la cual activa a la fosforilasa quinasa y causa la fosforilación tanto de la glucógeno fosforilasa como de la GS. La fosforilación activa a la glucógeno fosforilasa, pero inactiva a la GS (revisado en (71, 72, 74).

Glicosiltransferasas: clasificación de las glucógeno/almidón sintetasas

La transferencia de grupos glicosídicos es una de las reacciones bioquímicas que reviste mayor importancia, al menos desde el punto de vista cuantitativo. Alrededor de dos tercios del carbono que existe en la biosfera se encuentran bajo la forma de hidratos de carbono, mayoritariamente celulosa y hemicelulosa, pero también quitina, almidón, glucógeno y componentes de la pared celular microbiana. Además, la glicosilación de proteínas es intermedia en múltiples eventos regulatorios cruciales (76).

Las glicosiltransferasas (GT) transfieren un grupo glicosídico desde una molécula dadora activada hacia una molécula aceptora específica, formando una unión glicosídica. Las posibles clases de molécula dador incluyen comúnmente nucleótido difosfo azúcares, nucleótido monofosfo azúcares y azúcares fosfato. La molécula aceptora, si bien es altamente específica de una GT particular, puede abarcar un amplio rango de macromoléculas como proteínas, lípidos, u otro hidrato de carbono, y numerosas clases de compuestos de bajo peso molecular. La reacción de transferencia de un grupo glicosídico es una sustitución nucleofílica en el carbono anomérico, y es altamente específica con respecto a la configuración anomérica del residuo glicosídico en el sitio de la adición (76).

La superfamilia de las glicosilhidrolasas (GH), las enzimas que hidrolizan las uniones glicosídicas, ha sido estudiada con mucho detalle y el conocimiento en cuanto a estructuras y mecanismos de acción de estas enzimas es muy superior al que se tiene de las GT (revisado en 77). Hace más de una década, se inició una clasificación de las GH que refleja las características estructurales de las enzimas, algo que la clasificación de la *Internacional Union of Biochemistry and Molecular Biology* (IUBMB) (78), basada en la especificidad de las moléculas dadora y aceptora y en la especificidad de producto, no consideraba (79). En contraste con la nomenclatura de la IUBMB, la nueva clasificación fue diseñada para integrar tanto las características estructurales como mecánicas de estas enzimas. El sistema, basado en similitudes de secuencia aminoacídica (y por lo tanto, considerando similitudes estructurales), muchas veces agrupa enzimas con diferente especificidad de sustrato en una misma familia multiespecífica. Por otra parte, como la estructura tridimensional se encuentra mejor conservada que la secuencia, muchas familias pueden ser agrupadas en clanes que comparten el plegado tridimensional (o *fold*) y el mecanismo de reacción (80).

Las GT han sido clasificadas de tres maneras diferentes, según (i) la similitud de secuencia, (ii) la configuración anomérica del producto, y (iii) la estructura tridimensional de la proteína (Tabla 1). La superfamilia de las GT ha sido dividida en 73 familias (GT1 a GT73) basándose en similitud de secuencia con uno o más miembros fundadores con actividad enzimática demostrada experimentalmente. En forma análoga a la clasificación de las GH, esta división de la superfamilia sigue un sistema jerárquico de familias, clanes y *folds*. Se han descrito para las GT dos grandes tipos posibles de reacciones, con retención o con inversión de la configuración anomérica, dependiendo de ésta en la molécula del azúcar da-

dor es la misma o diferente de aquella del producto (Figura 1). Para estos dos tipos de reacciones se han propuesto dos posibles mecanismos principales, basándose en ciertas analogías con el grupo más estudiado de las glicosidasas (76, 81). En el mecanismo con inversión de la configuración, se piensa que el aceptor realiza un ataque nucleofílico en el C1 del azúcar dador cambiando su configuración anomérica (82). Los detalles del mecanismo que opera con retención de la configuración son menos claros, pero se ha propuesto que ocurre una sustitución nucleofílica a través de un mecanismo de doble desplazamiento (83, 84). Por analogía con el mecanismo de las GH, esto involucraría la formación de una glucosil-enzima intermedia, liberación de nucleótido difosfato, y subsiguiente ataque de la glucosil-enzima por el aceptor, con retención de la configuración del azúcar transferido. Sin embargo, la existencia de dicho intermediario nunca ha sido demostrada para ninguna GT y la validez de esta analogía mecanística con las GH aún permanece sin comprobar. Recientemente se ha propuesto un mecanismo concertado sin la formación de intermediarios covalentes (84).

Tipo	Factor que evalúa	Categorías
i) Estructura primaria	similitud	familias GT1-73
ii) Reacción química	configuración anomérica	retiene, invierte
iii) Estructura terciaria	<i>fold</i>	GT-A, GT-B

Tabla 1: Clasificación de las GT.

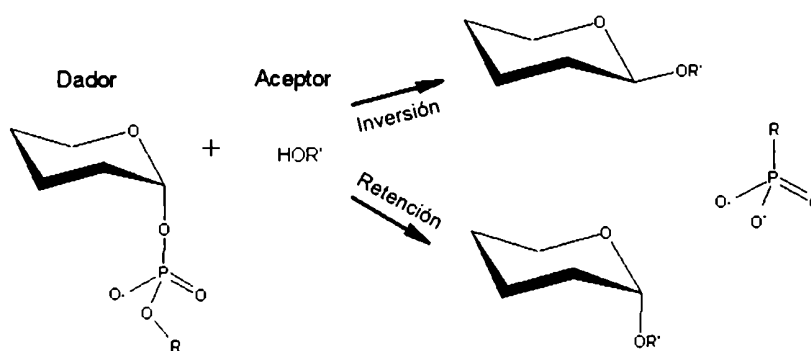


Figura 1: Esquema de los mecanismos con inversión y retención de la configuración.

Finalmente, las GT pueden ser agrupadas de acuerdo a su plegamiento tridimensional en GT-A y GT-B. Las familias que parecen no pertenecer a ninguno de estos dos *fold*s están agrupadas tentativamente en un tercero, llamado GT-C (85). Sin embargo, recientes estructuras resueltas, así como la aplicación de métodos de detección de similitud de secuencia más sensibles, como HCA (*hydrophobic cluster analysis*, o análisis de las regiones hidrofóbicas) (86) o PSI-BLAST (87), parecen indicar que todas las GT se dividirían solamente en los dos tipos de *fold* mencionados inicialmente. El plegado GT-A puede ser considerado como formado por dos dominios colindantes estrechamente asociados del tipo $\beta/\alpha/\beta$ que tienden a formar un plano continuo de al menos 8 hojas plegadas β , y que es por lo tanto descrito a menudo como un único dominio de tipo Rossmann (Figura 2). El *fold* GT-B consiste en dos dominios virtualmente duplicados, cada uno de ellos con una estructura del tipo $\beta/\alpha/\beta$ muy similar al *fold* Rossmann (Figura 2). Estos dos dominios están asociados en forma mucho menos estrecha. De hecho, se enfrentan uno con otro y cambian de orientación relativa en forma asociada con la unión de los ligandos (83).

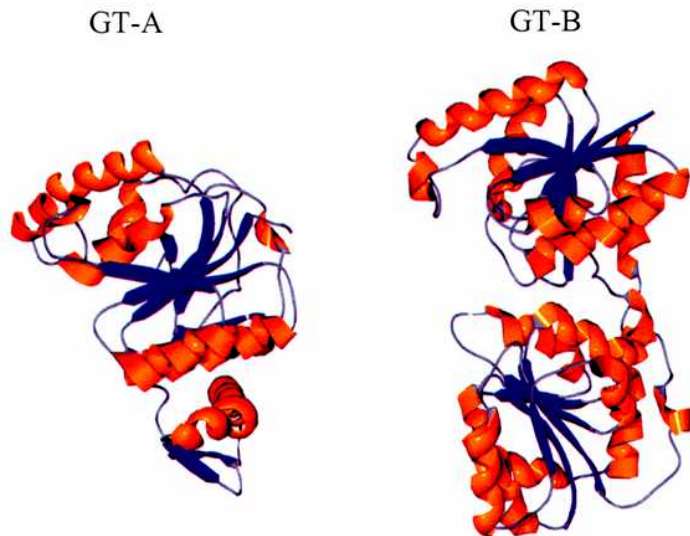


Figura 2: Ejemplos de estructuras de glicosiltransferasas con un *fold* GT-A y GT-B. Como ejemplo de *fold* GT-A, se muestra la glucogenina de conejo (familia GT8, código de PDB 1ll0) y con un *fold* GT-B, la MurG de *E. coli* (familia GT28, código de PDB 1nlm)

La base de datos CAZy (Carbohydrate-Active Enzymes, <http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/index.html>) mantiene actualizada la división de la superfamilia de las GT que utilizan nucleósido difosfo azúcares, nucleósido monofosfo azúcares y azúcares fosfato (EC 2.4.1.x).

En cada familia se espera una conservación de la estructura tridimensional, en analogía con lo que ocurre en la superfamilia de las GH (83).

La comparación entre las superfamilias de las GH y las GT muestra dos importantes diferencias. En primer lugar, la reciente elucidación de varias estructuras tridimensionales de GT de diferentes familias parece señalar la presencia de sólo dos topologías diferentes, en marcado contraste con la inmensa diversidad de *fold*s utilizados por las GH (77). Por otra parte, dentro de cada *fold* diferente de las GH hay una conservación estricta del mecanismo catalítico. Esto no ocurre así entre las GT, donde los dos grandes *fold*s GT-A y GT-B agrupan clanes de GT tanto que invierten como que retienen la configuración (83).

Las GT con un *fold* GT-A comparten dos grupos carboxilatos, si bien con variaciones en la secuencia, que coordinan el metal y la ribosa, conocidos como el motivo DxD (88). Las enzimas GT-A también comparten otro Asp o Glu estructuralmente equivalente, que actúa como la base catalítica. Más allá de esta limitada similitud catalítica, no se han observado otras características obviamente conservadas. Entre las GT con *fold* GT-B se han encontrado aún menos motivos de secuencia conservados. Hasta ahora, entre las GT que unen nucleótidos, se ha observado que la unión ocurre en el dominio N-terminal de las GT-A o en el dominio C-terminal de las GT-B, con las moléculasceptoras uniéndose al dominio opuesto. Claramente, el tipo de *fold* no controla el resultado estereoquímico de la reacción, dado que en muchas ocasiones el mismo *fold* es compartido por GT que operan con inversión o con retención de la configuración.

A pesar de la similitud en el plegamiento espacial entre las GT-A y las GT-B y de su parentesco funcional, que puede llevar inicialmente a pensar en duplicación durante la evolución, estos dos grupos parecen no estar relacionados. El *fold* GT-A es muchas veces descrito como un dominio único de tipo Rossmann. Sin embargo, mientras los dominios del *fold* GT-B presentan una topología de hojas plegadas β muy común, la topología del *fold* GT-A parece ser única, si bien no exclusiva de las glicosiltransferasas dado que también se la encuentra en NDP-azúcar pirofosforilasas (85). La suma de diferencias estructurales y funcionales entre ambos grupos junto con la falta de similitud de secuencia tanto global como local, sugiere que estos dos grupos evolucionaron hacia su similar función molecular en forma independiente o, al menos, que su último ancestro común es extremadamente antiguo e imposible de reconstruir sobre la base de las secuencias (85).

La GS de *E. coli* pertenece a la familia GT5, y es una glucosiltransferasa que opera con retención de la configuración anomérica de la molécula de glucosa. Dentro de la familia GT5 se encuentran agrupadas todas las GS bacterianas y de arqueobacterias junto con las almidón sintetasas de algas y plantas. Mediante diversas metodologías, se ha predicho que la estructura tridimensional de la familia GT5 adoptaría un *fold* GT-B (88-90). Dentro de las 73 familias en las cuales se encuentran divididas las GT, sólo siete comprenden GT que retienen la configuración del sustrato y que poseen (o ha sido predicho que posean) un *fold* GT-B. Estas familias: GT3, que incluye a las GS eucariotas; GT4, que comprende a las sacarosa sintetasas (SuSy), sacarosa-fosfato sintetasas (SPS) y manosiltransferasas, entre otras; GT5 de las GS bacterianas y las almidón sintetasas; GT20, que abarca a las trehalosa-6-fosfato sintetasas; GT35, que incluye a las glucógeno, almidón y maltodextrina fosforilasas; GT32 de manosiltransferasas y acetilglucosaminil transferasas y GT44, que comprende a ciertas UDP-Glc glucosiltransferasas. Existen miembros cuya estructura cristalina se encuentra disponible en las familias GT20 (84) y GT35 (91, 92) y, muy recientemente, de la familia GT5 (93).

Las GS bacterianas y las GS eucariotas se encuentran clasificadas en dos familias diferentes y, a primera vista, no parecen compartir homología de secuencia alguna. Las GS bacterianas son monoméricas, no reguladas, y su masa molecular se encuentra en el rango de 48-55 kDa, mientras que las GS eucariotas son enzimas tetraméricas, con una masa molecular de 70-90 kDa por subunidad, y se encuentran reguladas alostéricamente y por fosforilación/defosforilación. Sin embargo, el análisis más detallado de las secuencias, las predicciones de estructura secundaria y los análisis de *threading* han llevado a algunos autores a sugerir que ambas familias están relacionadas estructuralmente y que las GS eucariotas adquirieron nuevos dominios para poder cumplir con los requisitos regulatorios (48, 90).

Características bioquímicas de las GS bacterianas y almidón sintetasas

La existencia de una ADP-Glc: glucógeno transglucosilasa fue descrita por primera vez en extractos crudos de *Arthrobacter* en 1964 (94). Posteriormente, se analizaron los extractos crudos de diversas bacterias, encontrándose en todos ellos esta actividad de transferencia de glucosas al glucógeno. En todos los casos el mejor dador de glucosas resultó ser la ADP-Glc, comparado con UDP-Glc y TDP-Glc (31). Las enzimas de *Arthrobacter* y de *E. coli* fueron purificadas parcialmente, confirmando la utilización de ADP-Glc como dador glucosídico (95, 96). La GS bacteriana fue purificada a homogeneidad en 1976 a partir de extractos de *E. coli B*, y sus propiedades cinéticas fueron estudiadas en detalle (97). La reacción catalizada por la GS es reversible, pero el equilibrio está marcadamente inclinado hacia la síntesis de glucógeno (97). Posteriormente, se observó que la enzima purificada de *E. coli* era capaz de llevar a cabo la reacción de síntesis sin necesidad de un glucano iniciador (98). Recientemente, se presentó evidencia de que la iniciación de la síntesis de glucógeno en *Agrobacterium tumefaciens* no requiere de la presencia de glucanos cebadores (35). En ese trabajo también se propone que la GS de bacterias construiría su propio glucano iniciador transfiriendo residuos de glucosa desde la ADP-Glc hacia un aminoácido (o aminoácidos) en la propia GS, contrariamente a lo que ocurre en la síntesis de glucógeno en mamíferos o levaduras, donde son necesarias dos proteínas para la formación de un glucano lineal α -1,4 (35). Sin embargo, el o los residuos involucrados en la autoglucosilación de la GS bacteriana aún no han sido identificados.

Diversos estudios de las propiedades físicas y cinéticas de la GS de *E. coli* (31, 97, 99, 100) y almidón sintetasas de una variedad de fuentes (101-103), indicaron que el agregado de agentes tioles o de EDTA eran necesarios para estabilizar la actividad enzimática. La naturaleza de este requerimiento en términos de residuos catalíticamente esenciales se llevó a cabo en la GS de músculo esquelético de conejo (104, 105). Los resultados con la enzima de conejo mostraron la existencia de tres o cuatro residuos sulfhidrilos por subunidad de 90 kDa podían ser modificados por reactivos específicos de tioles y afectar la actividad catalítica de la enzima. Uno de esos trabajos informaba que la presencia de Glc6P protegía a la GS de la inactivación con glutatión oxidado (104). En la enzima de *E. coli* se llevó a cabo un estudio sobre el efecto de la modificación de grupos sulfhidrilos con agentes como el ácido iodoacético (IAA) y el ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (DTNB) (106). El DTNB (tam-

bién conocido como reactivo de Ellman) posee la capacidad de formar puentes disulfuro mixtos con las Cys, y ha sido utilizado en diversas ocasiones para identificar la participación de este aminoácido en catálisis o unión de sustratos en distintas enzimas (107-111). La reacción del DTNB con los grupos sulfhidrilo de las proteínas produce la liberación de ácido 2-nitro-5-mercaptobenzoico, el cual posee un coeficiente de extinción molar de $13000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 412 nm. Esto otorga la posibilidad de seguir el transcurso de la reacción por espectrofotometría. Esta reacción puede ser revertida mediante el agregado de un agente reductor como el ditioneitol (DTT). El IAA reacciona muy rápidamente con las Cys para dar el correspondiente carboximetil derivado, y su uso también se encuentra muy difundido (112-114).

El estudio llevado a cabo por Holmes y col. (106) en la GS de *E. coli* reportó la presencia de dos residuos sulfhidrilos reactivos al DTNB y al IAA, respectivamente, uno de ellos protegido por la presencia de ADP-Glc y otro protegido por el glucógeno. Sin embargo, los residuos de la enzima que están involucrados en la inhibición por DTNB y IAA no fueron identificados. La secuencia de aminoácidos de la GS de *E. coli* fue deducida por primera vez en 1986 a partir de la secuencia nucleotídica del gen *glgA* (115) pero no se hicieron más estudios tendientes a identificar estos residuos de Cys.

Existen estudios que intentaron elucidar posibles residuos involucrados en unión a sustratos, tanto en la GS bacteriana como en almidón sintetasas de plantas. En los trabajos sobre la GS de *E. coli*, los autores utilizaron modificación química y posterior digestión con proteasas para identificar a la Lys¹⁵ como un residuo importante para la interacción con la ADP-Glc de la GS de *E. coli* (116), mostrando que la ADP-Glc y el ADP protegen a la Lys¹⁵ en la GS de *E. coli* de la reacción con adenosina difosfopiridoxal. Posteriormente, emplearon mutagénesis sitio-dirigida para reemplazar la Lys y las dos Gly del motivo conservado K¹⁵TGGL por distintos residuos. Cuando se reemplazó a la Lys¹⁵ por Arg, Gln o Glu, se observaron aumentos en la $S_{0.5}$ de la ADPGlc de 7, 32 y 46 veces, respectivamente (117). El reemplazo del par de Gly por Ala generó cambios menores en la afinidad por la ADP-Glc, pero una disminución de tres órdenes de magnitud en la eficiencia catalítica. Luego del análisis cinético de las mutantes, los autores concluyen que Lys¹⁵ interacciona con la ADP-Glc a través de su grupo ϵ -amino, y probablemente con el grupo fosfato adyacente a la glucosa, y

que los dos residuos de Gly participan en la catálisis promoviendo cambios conformacionales en el sitio activo, o bien estabilizando el estado de transición (117).

Sin embargo, incluso la mutante K15Q resultó inactivada por adenosina difosfopiridoxal, si bien a concentraciones superiores a aquellas requeridas para inactivar a la enzima de tipo silvestre (118). También en este caso la ADP-Glc y el ADP otorgaron efectos protectores sobre la inactivación, sugiriendo que el reactivo se dirigía al sitio de unión de la ADP-Glc en la enzima mutante. El análisis de secuencia del péptido marcado reveló que el residuo marcado era la Lys²⁷⁷. El reemplazo de Lys²⁷⁷ por Gln generó una disminución de 140 veces en el k_{cat} de la GS con cambios superficiales en los valores de $S_{0.5}$ para la ADP-Glc y el glucógeno. Los autores concluyen entonces que Lys²⁷⁷ podría ser un residuo catalítico en la GS de *E. coli* (118).

En la almidón sintetasa SSIIa de endosperma de maíz se realizaron experimentos de modificación de Arg con el reactivo fenilglioxal (119). El fenilglioxal inactivó a la almidón sintetasa, y esta inactivación fue protegida por el sustrato ADP-Glc, sugiriendo que una Arg podría estar involucrada en la unión del sustrato a la enzima (119). Sin embargo, al realizar mutagénesis sitio-dirigida sobre 8 residuos de Arg diferentes, los autores no detectaron cambios importantes en la afinidad de la almidón sintetasa por la ADP-Glc. Las Arg estudiadas en este trabajo no están conservadas entre las almidón sintetetas ni entre las GS bacterianas.

En otro estudio de la almidón sintetasa de maíz SSIIb-2, se utilizó la modificación química con 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC), el cual modifica aminoácidos ácidos, y se obtuvo una inhibición dependiente del tiempo y la concentración del reactivo (120). También en este caso la ADP-Glc protegió a la enzima de la inactivación. Como estos resultados sugieren la existencia de un residuo de Asp o Glu importante para la actividad de la enzima, los autores mutaron cuatro Glu y ocho Asp conservados entre las almidón sintetetas. Los resultados de la mutagénesis sitio-dirigida identificaron tres aminoácidos importantes para la actividad de la almidón sintetasa. El reemplazo del Asp²¹ por Asn generó una enzima que exhibió un 4% de la actividad y una afinidad por la ADP-Glc 10 veces inferior comparado con la enzima silvestre, mientras que el cambio más conservador D21E resultó en una V_{max} de un 11% de la actividad de la enzima silvestre, sin cambios en la afinidad por los sustratos. Cuando analizaron las mutantes D139N y E391Q, los autores no pudieron detectar actividad de síntesis de almidón. Con el reemplazo de Asp¹³⁹ por Glu, observaron

disminución en la V_{\max} sin cambios en las afinidades aparentes por ambos sustratos, mientras que la mutante E391D mostró menor V_{\max} , y aumentos en la afinidad aparente por ADP-Glc, glucógeno y amilopectina (120).

En síntesis, todos estos trabajos, si bien identificaron residuos que podrían ser de potencial importancia en la catálisis enzimática o en la unión de sustratos, algunos no eran concluyentes, o la verdadera naturaleza de los residuos catalíticos y de unión a sustratos de las GS bacterianas y las almidón sintetasas permanecía por esclarecer. Por otra parte, y a pesar del creciente volumen de secuencias y datos estructurales, la transferencia de grupos glicosídicos con retención neta de la configuración es un área que presenta muchos desafíos para la investigación. En esta tesis se presentan resultados que identifican grupos de residuos involucrados en catálisis y unión de sustratos en la GS de *E. coli*, y se los ubica en el contexto más general de las GT que retienen la configuración del sustrato.

Objetivos

El trabajo de la presente tesis estuvo orientado a estudiar las relaciones entre la estructura y la función de la glucógeno sintetasa bacteriana, en particular a identificar regiones de unión a los sustratos y posibles residuos catalíticos.

Los objetivos específicos que guiaron el desarrollo del trabajo experimental fueron los siguientes:

- Identificación y caracterización de los residuos involucrados en la inhibición de la enzima de *E. coli* por agentes que reaccionan con grupos sulfhidrilos.
- Identificación de residuos conservados entre las GS bacterianas y las almidón sintetasas de plantas y análisis de los mismos por mutagénesis sitio-dirigida.
- Generación de un modelo de la GS de *E. coli*.
- Estudio de los aminoácidos involucrados en la catálisis en la GS de *E. coli* y su posible extrapolación a otras GS y almidón sintetasas.
- Estudio de posibles sitios de unión de sustratos en la GS de *E. coli*.

Resultados y discusión

Expresión y purificación de la GS silvestre de *E. coli*

El gen *glgA* que codifica para la GS de *E. coli* fue subclonado a partir del plásmido pEXa (GS en el vector de expresión pET-23d, Sivak M. N., resultados no publicados). Para dicho subclonado se utilizó el vector de expresión pET-24a (Novagen), lo cual derivó en el plásmido denominado pAY1. Con el fin de verificar la fidelidad del proceso, se secuenció el inserto completo. La secuencia del gen *glgA* en esta construcción no presentó ninguna diferencia con la registrada en el proyecto genoma de la bacteria *E. coli* (121). Sin embargo, se encontraron 18 diferencias con el primer reporte de clonado (115). La secuencia de ADN de la GS de *E. coli* consta de 1431 pares de bases que codifican para una secuencia proteica de 477 aminoácidos. La enzima en su forma activa es monomérica, si bien se ha informado su presencia bajo la forma de dímero, trímero o tetrámero activos (97). El monómero presenta una masa molecular de aproximadamente 50 kDa (97).

La expresión de la GS silvestre recombinante en células de *E. coli* fue llevada a cabo como se describe en Materiales y Métodos. En este sistema, la enzima recombinante se obtuvo en forma típica en los extractos crudos con una actividad específica de 70-100 U/mg. En la Tabla 2 se puede observar la actividad específica de la GS expresada en este sistema, comparada con otros utilizados con anterioridad y con la actividad endógena de las células BL21. La actividad fue al menos 6000 veces superior a la detectable en el extracto crudo de las células BL21(DE3) transformadas sólo con el vector pET-24a y sometidas al mismo protocolo de inducción. Asimismo, resultó superior a la actividad obtenida en extractos crudos con otros sistemas de expresión utilizados anteriormente (116). Por estos motivos, se decidió utilizar este sistema de expresión para llevar a cabo los estudios estructurales y cinéticos de la GS de *E. coli*.

	JM109 pEGS*	BL21(DE3) pEXA	BL21(DE3) pET-24a	BL21(DE3) pAY1
Actividad específica en extractos crudos (U/mg)	9	20-25	0.012	70-100

* Datos extraídos de (116).

Tabla 2: Comparación entre diferentes sistemas de expresión de la GS de *E. coli*

Una de las dificultades observadas en purificaciones anteriores de la GS de *E. coli* es que es necesario un tratamiento con amilasa para degradar el glucógeno, ya que una gran proporción de la enzima se encuentra unida a él (97, 116). Al mantener las células por debajo de una densidad óptica a 600 nm (DO) se evitó que llegaran a la fase estacionaria, y por lo tanto la síntesis de glucógeno se mantuvo en el mínimo. De esta forma, fue posible suprimir el paso de incubación con amilasa y posterior ultracentrifugación.

Los resultados del proceso de purificación se resumen en la Tabla 3. La combinación de estos protocolos de expresión y purificación permitió obtener aproximadamente 2 mg de proteína recombinante habiendo partido de 6-7 g de células. Debido a los elevados niveles de expresión, la enzima obtenida se purificó sólo 8 veces, y alcanzó una actividad específica de 570 U/mg, la cual es levemente superior a purificaciones previas de la enzima recombinante (116) y está en el mismo rango que purificaciones a homogeneidad reportadas a partir de extractos crudos de células de *E. coli* B (97).

Etapa	Proteína total (mg)	Actividad (U)	Actividad específica (U/mg)	Rendimiento (%)	Purificación (veces)
Extracto crudo	102.3	7320	70	100	1.0
(NH ₄) ₂ SO ₄ corte 0-25%	11.0	5060	460	69	6.5
Mono Q	1.7	1000	570	13	8.0

Tabla 3: Purificación de la GS silvestre recombinante de *E. coli*. La purificación comenzó a partir de un cultivo de 1 litro de células BL21(DE3) (DO ≈ 0.6, 6.5 g de células) transformadas con el plásmido pAY1. Los datos de la columna MonoQ corresponden únicamente a las fracciones más puras combinadas.

Para verificar el grado de pureza de la enzima se llevó a cabo una electroforesis en condiciones desnaturizantes. En la Figura 3 se muestra un SDS-PAGE de alícuotas de los distintos pasos de purificación de la GS recombinante de *E. coli*. En el fraccionamiento con sulfato de amonio (25% de saturación) se pierde un 90% de la proteína total, y se observa en el SDS-PAGE que sólo permanece una banda contaminante importante, y que la enzima alcanza una pureza de aproximadamente un 60%. Después de la columna de intercambio aniónico MonoQ se agruparon únicamente aquellas fracciones más puras. De esta manera, si

bien se sacrifica rendimiento, se obtiene proteína de la pureza adecuada para los estudios subsiguientes en muy pocos pasos de purificación. La proteína obtenida de estas fracciones es la que corresponde a la calle 5, que muestra que la GS migra como una única banda proteica de masa molecular de 50 kDa, aproximadamente. Siguiendo este criterio, se podría decir que la GS de *E. coli* posee una pureza superior al 95%. La enzima purificada de esta manera y concentrada por encima de 1 mg/ml resultó estable a -80 °C, al menos por 24 meses, y extremadamente resistente a ciclos de congelado y descongelado.

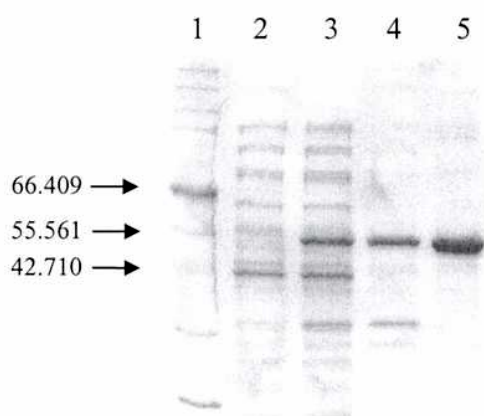


Figura 3: SDS-PAGE mostrando distintos pasos de purificación de la GS silvestre de *E. coli*. Calle 1, marcador de pesos moleculares; calle 2, extracto crudo de las células BL21(DE3) transformadas con el vector pET-24a (proteína total: 5 µg); calle 3, extracto crudo de las células BL21(DE3) transformadas con el plásmido pAY1 (5 µg); calle 4, precipitado 25% sulfato de amonio (3 µg); calle 5, fracciones de MonoQ combinadas (2 µg). El marcador de pesos moleculares es BroadRange®, de New England BioLabs.

Estudio de las Cys presentes en la GS de *E. coli*

Trabajos previos (106) demostraron que la GS de *E. coli* es inactivada por ácido 5-5'ditiobis(2-dinitrobenzoico) (DTNB) y ácido iodoacético (IAA), ambos reactivos que modifican residuos de Cys, y que esta inactivación podía ser prevenida por la presencia de sustratos en el medio. Sin embargo, el o los residuos específicos que son modificados no fueron identificados.

La secuencia de aminoácidos de la GS presenta tres Cys: Cys⁷, Cys³⁷⁹ y Cys⁴⁰⁸. Con el objetivo de analizar cuáles de estos tres residuos es responsable por la inactivación por modificación química, se utilizó una estrategia de mutagénesis para reemplazar las Cys de la GS por Ser, en todas las combinaciones posibles. La mutagénesis sitio-dirigida fue llevada a cabo sobre el plásmido pAY1 como se encuentra descrito en Materiales y Métodos y luego

verificada por secuenciación del ADN que codifica para cada una de las enzimas mutadas. Las mutantes obtenidas fueron: C7S, C379S, C408S, DM1 (C7S-C379S), DM2 (C7S-C408S), DM3 (C379S-C408S) y TM (C7S-C379S-C408S) (ver para un resumen de las mutantes de Cys). Las enzimas mutadas fueron sobreexpresadas y purificadas siguiendo el mismo protocolo utilizado para la enzima silvestre. Mediante el análisis con *Western blot* se determinó que la expresión de las proteínas mutantes fue similar a la de la GS recombinante silvestre (datos no mostrados). Todas ellas fueron purificadas hasta homogeneidad electroforética, como fue determinado mediante SDS-PAGE (datos no mostrados).

	Posición		
	7	379	408
Silvestre	Cys	Cys	Cys
C7S	Ser	Cys	Cys
C379S	Cys	Ser	Cys
C408S	Cys	Cys	Ser
DM1	Ser	Ser	Cys
DM2	Ser	Cys	Ser
DM3	Cys	Ser	Ser
TM	Ser	Ser	Ser

Tabla 4: Nomenclatura de las mutantes de Cys en las distintas combinaciones utilizadas.

Caracterización cinética de las enzimas mutantes de Cys

La GS silvestre y las variantes mutadas fueron purificadas a homogeneidad y analizadas para comparar sus parámetros cinéticos. Los resultados se resumen en la Tabla 5. Cuando se determinó el $S_{0.5}$ para la ADP-Glc utilizando la enzima silvestre, éste arrojó un resultado de 11 μM . Este dato corrobora los valores publicados con anterioridad (97), que situaban el $S_{0.5}$ para ADP-Glc de la enzima silvestre de *E. coli* purificada a partir de la fuente natural en 35 μM . Los $S_{0.5}$ para las mutantes C7S y C408S no fueron significativamente diferentes, 15 y 13 μM respectivamente. Por otra parte, los valores del $S_{0.5}$ de ADP-Glc de las mutantes C379S y TM aumentaron 38 y 56 veces respectivamente. Las actividades específicas de las mutantes C7S y C408S se ubicaron en el rango de 40-60% de la V_{max} de la enzima silvestre, mientras que las mutantes C379S y TM presentaron una actividad específica 6 y 12.5 veces menor, respectivamente.

En la Figura 4 se muestran las curvas de saturación de ADP-Glc para la enzima silvestre y la mutante C379S. La mutante muestra una afinidad disminuida por el sustrato

ADP-Glc y una menor V_{max} . Estas curvas son representativas de las cinco curvas independientes usadas para calcular los $S_{0.5}$ para las diferentes mutantes.

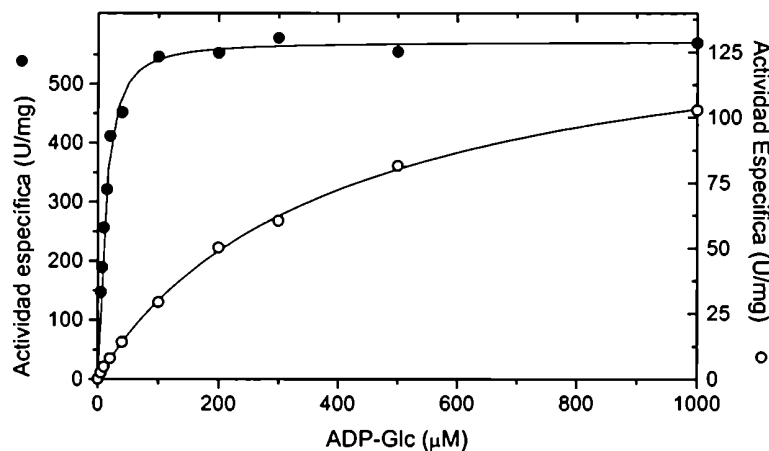


Figura 4: Curvas de saturación de ADP-Glc para la GS silvestre de *E. coli* (●) y la mutante C379S (○).

La DM2 mostró un $S_{0.5}$ para ADP-Glc de 18 μM y su actividad específica estuvo en el mismo rango que la GS silvestre. Por otra parte, DM1 y DM3 mostraron un $S_{0.5}$ en el mismo orden que la TM, casi 60 veces mayor al de la enzima silvestre. DM2 retuvo aproximadamente el 90% de la actividad enzimática de la enzima silvestre, mientras que DM1 y DM3 presentaron una actividad del 22-24%.

El análisis cinético de las enzimas mutantes de Cys a Ser reveló la importancia de la Cys³⁷⁹ comparada con los otros dos residuos homólogos. El reemplazo de la Cys³⁷⁹ por Ser disminuyó 38 veces la afinidad aparente de la enzima por la ADP-Glc, mientras que la misma mutación en la Cys⁷ o la Cys⁴⁰⁸ no generó cambios significativos (Tabla 5). Este efecto no sólo fue específico del residuo Cys³⁷⁹, sino que también resultó específico para el sustrato ADP-Glc, porque el $S_{0.5}$ del glucógeno no fue significativamente alterado en ninguna de estas mutantes. Todas las mutantes simples (C7S, C379S, C408S) mostraron alteraciones leves en la eficiencia catalítica. Estas mutantes presentaron disminuciones de 2.4, 4.7 y 1.6 veces respectivamente, en relación a la actividad específica de la enzima silvestre. Después de analizar estos resultados, decidimos reemplazar a la Cys³⁷⁹ por otros aminoácidos para estudiar el efecto de ubicar diferentes grupos en esta posición sobre las propiedades cinéticas de la enzima. Encontramos que las mutaciones C379A y C379T mostraron una afinidad aparente por

la ADP-Glc 77 y 123 veces menor que la enzima silvestre, respectivamente (Tabla 5). Estos aumentos significativos en el $S_{0.5}$ de la ADP-Glc indican que la Cys³⁷⁹ estaría involucrada en la interacción con la ADP-Glc, o bien contribuyendo con la arquitectura correcta de su sitio de unión. Por otra parte, no parece que este residuo tenga un papel evidente en la unión al glucógeno, dado que ninguna de las mutaciones simples generó aumentos en el $S_{0.5}$ del glucógeno superiores a las 1.8 veces. Incluso la doble mutante DM1 y la TM mostraron leves cambios en el sentido opuesto. Es posible que estas mutaciones causen sutiles perturbaciones en la estructura que se ven reflejadas en esos cambios menores en la cinética.

La V_{max} de la mutante C379S es sólo 5 veces menor que la de la enzima silvestre, y esto no resulta suficiente para asignarle a este residuo un papel específico en catálisis. El reemplazo de la Cys³⁷⁹ por Ala afectó principalmente la afinidad por la ADP-Glc, dado que el $S_{0.5}$ se incrementó 77 veces, mientras que la V_{max} disminuyó sólo 4 veces. Sin embargo, otras mutaciones en este sitio generaron mayores efectos en la eficiencia catalítica. Cuando se reemplazó la Cys³⁷⁹ por Thr, el efecto sobre el $S_{0.5}$ de la ADP-Glc fue incluso superior (123 veces mayor) pero la actividad específica fue sólo un 0.3% de aquella de la enzima silvestre. Es posible que este cambio sea causado por un efecto estérico, porque la diferencia entre Ser y Thr es solamente un grupo metilo. De hecho, cuando un grupo aún más voluminoso, como el Asp, reemplazó a la Cys³⁷⁹, la actividad de la enzima disminuyó más de 4 órdenes de magnitud (Tabla 5). No se detectó actividad superior a los controles negativos en la mutante C379D purificada a homogeneidad, por lo cual no fue posible analizar otros parámetros cinéticos. Al mutar la Cys³⁷⁹ por Leu se generó una forma inactiva e inestable que fue proteolizada en la célula, generando un polipéptido de 41 kDa (Figura 5). Probablemente, la introducción de un grupo hidrofóbico y voluminoso en esta posición imposibilite el plegado correcto de la proteína, exponiéndola a la acción de proteasas. Como conclusión general, el reemplazo de la Cys³⁷⁹ por residuos de tamaño menor o similar (como Ala y Ser) disminuyó la afinidad de la enzima por la ADP-Glc, y el reemplazo por grupos más voluminosos (Thr, Asp y Leu) afectó severamente la catálisis.

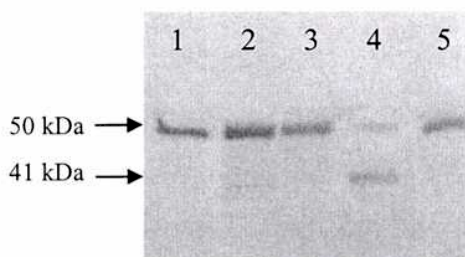


Figura 5: *Western blot* mostrando extractos crudos de células BL21(DE3) expresando distintas mutantes de la GS de *E. coli*. Calle 1, GS silvestre; calle 2, C379A; calle 3, C379T; calle 4, C379L; calle 5, C379D.

Glucógeno sintetasa	ADP-Glc		Glucógeno			V_{max}		
	$S_{0.5}$ (μ M)	disminución (veces)	$S_{0.5}$ (mg/ml)	n_H	disminución (veces)		Relativo (mutante/ silvestre)	
Enzima silvestre	11 \pm 2	1.18 \pm 0.20	1.0	0.95 \pm 0.10	0.82 \pm 0.04	1.00	570 \pm 37	1.00
C7S	15 \pm 4	1.02 \pm 0.12	1.4	1.72 \pm 0.18	0.86 \pm 0.04	1.81	237 \pm 8	0.42
C379S	420 \pm 15	1.36 \pm 0.15	38	1.10 \pm 0.15	1.36 \pm 0.20	1.16	120 \pm 30	0.17
C408S	13 \pm 3	1.21 \pm 0.27	1.2	1.30 \pm 0.30	1.31 \pm 0.26	1.37	365 \pm 5	0.64
TM (C7S-C379S-C408S)	620 \pm 65	1.42 \pm 0.19	56	0.15 \pm 0.02	1.11 \pm 0.20	0.16	46 \pm 4	0.08
DM1 (C7S-C379S)	610 \pm 71	0.83 \pm 0.07	55	0.15 \pm 0.02	0.82 \pm 0.10	0.16	135 \pm 12	0.24
DM2 (C7S-C408S)	18 \pm 2	0.98 \pm 0.06	1.6	1.65 \pm 0.14	0.84 \pm 0.03	1.74	500 \pm 10	0.88
DM3 (C379S-C408S)	630 \pm 39	1.20 \pm 0.16	57	1.50 \pm 0.60	0.70 \pm 0.10	1.58	126 \pm 13	0.22
C379A	850 \pm 32	0.95 \pm 0.15	77	0.22 \pm 0.03	1.11 \pm 0.16	0.23	130 \pm 9	0.23
C379T	1350 \pm 76	0.70 \pm 0.02	123	ND *	ND		1.5 \pm 0.2	0.003
C379D	ND	ND		ND	ND		< 0.01	< 0.0001

*ND = no determinado

Tabla 5: Parámetros cinéticos de la GS silvestre de *E. coli* y las mutantes de Cys. Los datos son el promedio de dos a cinco experimentos independientes con el error expresado \pm desvío estándar.

Inactivación de la GS de *E. coli* por DTNB

Se midió la actividad de las mutantes simples Cys⁷, Cys³⁷⁹ y Cys⁴⁰⁸ a Ser en presencia de distintas concentraciones de DTNB. En la Tabla 6 se muestran las concentraciones del DTNB que inactivan al 50% de la enzima ($I_{0.5}$) para cada mutante. La enzima silvestre fue afectada severamente por el DTNB, con un $I_{0.5}$ de 1.2 μM . El $I_{0.5}$ para las mutantes C7S y C408S fue de 7.8 y 7.0 μM , respectivamente. Por otra parte, el $I_{0.5}$ para las mutantes C379S y la triple mutante (TM) aumentó a 130 y 1200 μM , respectivamente (Tabla 6). El reemplazo de Cys³⁷⁹ por Ser fue el que confirió a la enzima mayor resistencia a la inactivación con DTNB. En forma concordante, la TM (que incluye a la mutación de la Cys³⁷⁹ por Ser) es también extremadamente resistente a la inactivación por este reactivo. Sin embargo, estos resultados también sugieren que el DTNB a altas concentraciones puede interferir con la reacción de síntesis de glucógeno, dado que incluso la TM, que no posee ningún residuo de Cys, resultó inactivada en esas condiciones.

Glucógeno sintetasa	$I_{0.5}$ DTNB (μM)
Enzima	1.2 \pm 0.1
C7S	7.8 \pm 2.8
C379S	128 \pm 32
C408S	7.0 \pm 1.1
TM (C7S-C379S-C408S)	1200 \pm 130

Tabla 6: Inactivación de la síntesis de glucógeno en presencia de diferentes concentraciones de DTNB. Los resultados son el promedio de dos experimentos independientes y el error es la diferencia entre ellos.

La modificación con DTNB de Cys individuales fue estudiada a continuación en las dobles mutantes, con sólo una Cys presente a la vez. Para reducir al máximo posibles efectos inespecíficos como los mencionados anteriormente, estos estudios se dividieron en dos etapas, separando así la modificación química con el DTNB del análisis de actividad enzimática. Las enzimas fueron incubadas con DTNB y, a diferentes tiempos, se tomaron alícuotas para determinar la actividad. En este paso el DTNB se diluyó 100 veces, con lo cual fue mínima la cantidad del reactivo que se acarreo a la mezcla de reacción. Con esta estrategia, la

enzima silvestre resultó inactivada rápidamente por el DTNB, mientras que la TM no fue afectada. Como control, tanto la enzima silvestre como las distintas mutantes fueron incubadas en las mismas condiciones en ausencia de DTNB, para verificar su estabilidad durante el experimento (datos no mostrados). En la Figura 6 se muestran las curvas de inactivación de la GS silvestre y las tres dobles mutantes. La enzima silvestre mostró un $t_{0.5}$ de inactivación en presencia de DTNB 10 μM de menos de un minuto a 0 °C (Figura 6) mientras que la TM permaneció activa incluso después de 20 min de incubación (datos no mostrados). La DM2 fue inactivada siguiendo el mismo patrón de la enzima silvestre, pero la DM1 y la DM3 resultaron insensibles al tratamiento con DTNB. Como DM2 tiene presente sólo Cys³⁷⁹, éste debe ser el residuo responsable por la inactivación con DTNB. La presencia de ADP-Glc 1 mM en la mezcla de incubación previno la inactivación mediada por DTNB tanto de la enzima silvestre como de la DM2 (Figura 6). Por otra parte, el agregado de glucógeno de hígado de conejo hasta 2.5 mg/ml no protegió a la GS en forma significativa. Esta inactivación por DTNB parece ser reversible, dado que después de una incubación de 20 min, el tratamiento con DTT 5 mM generó una recuperación en la actividad de la DM2 y de la enzima silvestre de un 95 y 70% respectivamente (datos no mostrados). Esto indica que, en las condiciones de este experimento, el DTNB afecta la actividad enzimática sólo a través de su capacidad para modificar covalentemente grupos sulfhidrilos. Así, estos resultados sugieren que cuando la Cys³⁷⁹ no se encuentra presente (reemplazada por Ser), en cualquiera de las combinaciones posibles, la enzima ya no puede ser inactivada por DTNB. Por otra parte, la ADP-Glc previno la inactivación de la enzima silvestre y de la DM2, las cuales tienen a Cys³⁷⁹ en su secuencia, mientras que el glucógeno no tuvo efecto alguno sobre dicha inactivación.

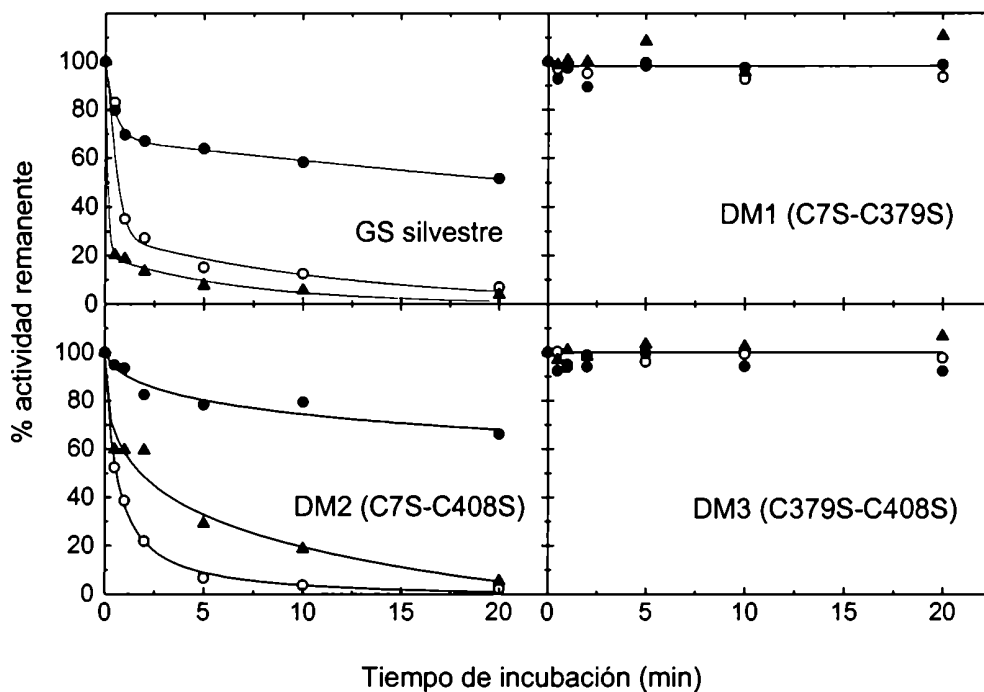


Figura 6: Inactivación de la GS por incubación con DTNB. La actividad remanente de las distintas enzimas fue ensayada luego de diferentes tiempos de incubación con DTNB $10 \mu\text{M}$ a 0°C como se describe en Materiales y Métodos. —○— control, —●— ADP-Glc 1 mM , —▲— glucógeno de hígado de conejo 2.5 mg/ml en la mezcla de incubación.

Protección de la modificación con DTNB

Los experimentos mencionados hasta ahora demuestran que el DTNB inactiva a la enzima si y sólo si Cys^{379} está presente. Para verificar que la inactivación ocurre debido a la modificación química de este residuo particular, se siguió espectrofotométricamente la reducción de DNTB en presencia de diferentes mutantes de la GS. Posteriormente, se calcularon las primeras derivadas del espectro del DTNB para aumentar de esta forma la sensibilidad. Los resultados se pueden observar en la Figura 7. Como control positivo, una solución de Cys $10 \mu\text{M}$ alteró el espectro del DTNB, haciendo que aparezca un pico negativo a 445 nm . Se obtuvo un cambio similar en el espectro cuando se agregó la GS silvestre $10 \mu\text{M}$, mostrando que sólo un grupo sulfhidrilo por molécula de enzima reacciona con el DTNB. En

la Figura 8 se puede observar el transcurso de la reacción del DTNB con la enzima silvestre a lo largo del tiempo. La presencia de ADP-Glc en el medio impidió este cambio en el espectro, indicando que este sustrato protege a la enzima de la modificación por DTNB (Figura 7). Como control negativo se utilizó a la mutante sin Cys TM, que no produjo ningún cambio en el espectro del DTNB, tanto en presencia como en ausencia de ADP-Glc. Las dobles mutantes DM1, DM2 y DM3 fueron analizadas para confirmar cuál de las Cys era la responsable por los cambios espectrales del DTNB. DM2, que tiene sólo Cys³⁷⁹ en su secuencia, fue la única de las dobles mutantes que reaccionó con el DTNB como la enzima silvestre (Figura 7). La presencia de ADP-Glc en el medio también previno la reacción del DTNB con la DM2. Cuando se utilizó a la GS silvestre previamente desnaturalizada con cloruro de guanidina 6 M, se observó la modificación de tres grupos sulfhidrilos por molécula de GS, lo cual no fue impedido por la presencia de ADP-Glc en el medio (datos no mostrados). La reacción del DTNB con la GS silvestre o la DM2 no fue prevenida por el agregado de maltoheptaosa (que también puede funcionar como sustrato de la GS) al medio de incubación hasta concentraciones de 20 mM (datos no mostrados). No se utilizó glucógeno en estos experimentos debido al aumento de turbidez en el medio que interfiere con el registro de la absorbancia.

La inactivación de la GS por DTNB está correlacionada con la modificación de un grupo sulfhidrilo por molécula de enzima silvestre (Figura 8). El hecho de que las otras dos Cys sólo reaccionen con DTNB cuando la enzima fue desnaturalizada previamente con cloruro de guanidinio 6 M sugiere que las Cys⁷ y Cys⁴⁰⁸ probablemente no se encuentran expuestas en la estructura tridimensional de la enzima. La única doble mutante con un grupo sulfhidrilo reactivo al DTNB es la DM2 (Figura 7). Por lo tanto, la Cys³⁷⁹ debe ser el único residuo reactivo a la modificación con DTNB en la GS silvestre. La ADP-Glc previno la modificación y la consecuente inactivación de la enzima, sugiriendo fuertemente que este residuo se encuentra localizado en o cerca del sitio de unión del sustrato.

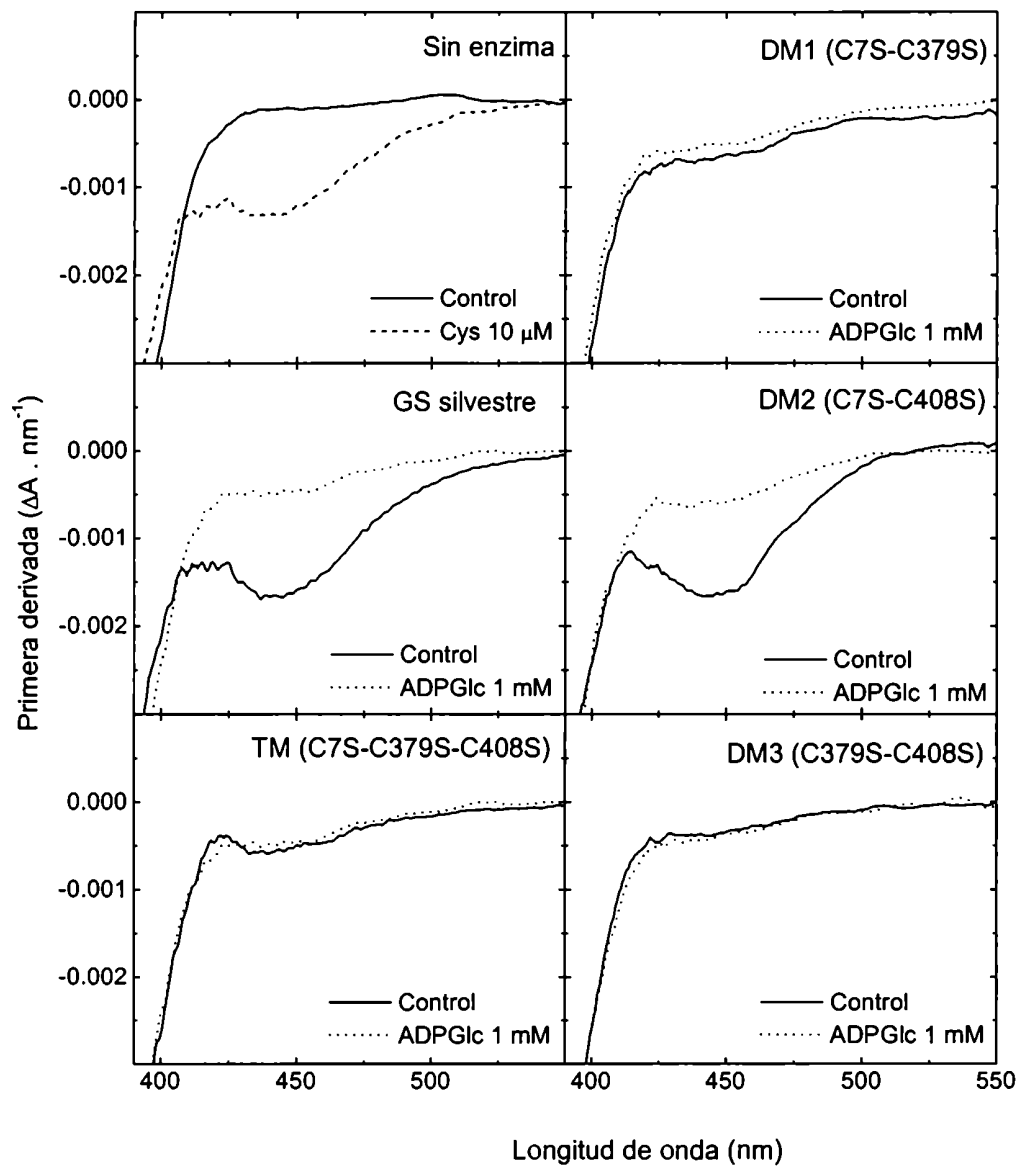


Figura 7: Primera derivada del espectro visible del DTNB en presencia de diferentes mutantes de la GS de *E. coli*. Los espectros fueron registrados y la reacción llevada a cabo como se describe en Materiales y Métodos. Todos los espectros fueron registrados en presencia de DTNB $40 \mu\text{M}$ con la enzima indicada, en ausencia (control) o en presencia de ADP-Glc 1 mM .

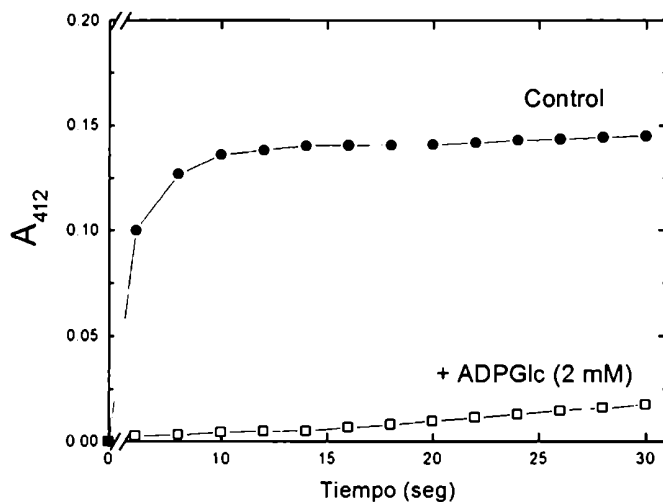


Figura 8: Curso de la modificación de grupos sulfhidrilos en la GS silvestre de *E. coli*. Se incubó la GS silvestre de *E. coli* con DTNB a temperatura ambiente y se registró el aumento de la absorbancia $A_{412\text{ nm}}$ a lo largo del tiempo.

Inactivación de la GS de *E. coli* por IAA

Holmes y col. reportaron que la GS silvestre de *E. coli* es inactivada por IAA (106), pero sin llegar a determinar qué residuo era el responsable por dicha inactivación. Con el objetivo de verificar si el IAA también inactiva a la enzima debido a la modificación química de la Cys³⁷⁹, llevamos a cabo una serie de experimentos sobre la GS de *E. coli*. Estos experimentos se realizaron sobre las dobles mutantes de Cys, para analizar directamente el efecto del inhibidor sobre residuos individuales. Como controles se utilizaron la enzima silvestre y la triple mutante TM. En la Tabla 7 se muestran los $I_{0.5}$ correspondientes a la enzima silvestre y las dobles mutantes de Cys. Si bien el IAA inhibe a la enzima silvestre, lo hace con una potencia significativamente menor que la del DTNB. El $I_{0.5}$ del IAA para la enzima silvestre es de 0.41 mM, comparado con 1.2 μM para el DTNB. La actividad de la TM no se ve afectada por la presencia del IAA en el medio de reacción hasta concentraciones de 10 mM. La DM1 se comporta de igual manera que la TM, es decir que su actividad no se afecta, al menos dentro del rango de concentraciones de IAA utilizadas en este experimento.

Enzima	$I_{0.5}$ IAA (mM)
GS silvestre	0.41 ± 0.01
DM1	$>>10^*$
DM2	0.46 ± 0.03
DM3	P [§]
TM	$>>10^*$

Tabla 7: $I_{0.5}$ correspondientes a la inactivación de las enzimas con IAA. La reacción fue llevada a cabo como se describe en Materiales y Métodos.

* No se registró inhibición de la actividad enzimática hasta una concentración de IAA de 10 mM en las condiciones utilizadas en este ensayo.

§ P: Inhibición parcial. La enzima DM3 se inhibe parcialmente, llegando a un 55% de actividad a una concentración de IAA de 10 mM.

En la Figura 9 se muestra el curso de la inactivación con IAA a lo largo del tiempo para las distintas mutantes. Al igual que en los experimentos con DTNB, la enzima es inhibida cuando la Cys³⁷⁹ se encuentra presente, tanto en la enzima silvestre como en la DM2. Asimismo, la inhibición causada por reacción del IAA con este residuo es prevenible mediante la presencia de ADP-Glc, pero no del glucógeno, en el medio. Estos datos están de acuerdo con la posibilidad de que la Cys³⁷⁹ se encuentre cercana a, o forme parte del sitio de unión de la ADP-Glc. Sin embargo, la DM3, que posee sólo la Cys⁷ en su secuencia, también resultó inhibida parcialmente por el IAA, en una menor proporción que la enzima silvestre o la DM2. Esta inhibición presentó la particularidad de que pudo ser protegida por la presencia de glucógeno en el medio, pero no por ADP-Glc (Figura 9).

En la Tabla 8 se indican los porcentajes de actividad remanente de la GS silvestre y las DM luego de agregar IAA 5 mM y distintos sustratos al medio de incubación. La inhibición por IAA de la GS silvestre y la DM2 es protegida por la presencia de ADP-Glc, pero no por otros sustratos como el glucógeno o la maltoheptaosa. La incubación de la DM3 con IAA 5 mM por 20 min generó una pérdida del 30% de la actividad de la enzima. Esta inactivación parcial pudo ser prevenida por la presencia de glucógeno en el medio de incubación, pero no por ADP-Glc, maltosa o maltoheptaosa solas. No obstante, se observó una protección incompleta cuando se combinan la ADP-Glc con la maltoheptaosa (Tabla 8). Estos resultados sugieren que el acceso del IAA a la Cys⁷ podría verse bloqueado cuando la enzima se encuentra unida al sustrato glucógeno. Utilizando IAA marcado radiactivamente, se había determinado que la pérdida de actividad de la GS silvestre de *E. coli* por incubación con IAA correlaciona con la incorporación de tres moléculas de IAA por molécula de enzima (106). Por lo tanto, es probable que este reactivo también modifique a la Cys⁴⁰⁸, pero que esto no

afecte a la actividad enzimática. El DTNB, por el contrario, reacciona únicamente con la Cys³⁷⁹ (Figura 7 y Figura 8). Estos experimentos y su relación con la estructura tridimensional de la GS de *E. coli* serán discutidos en detalle más adelante.

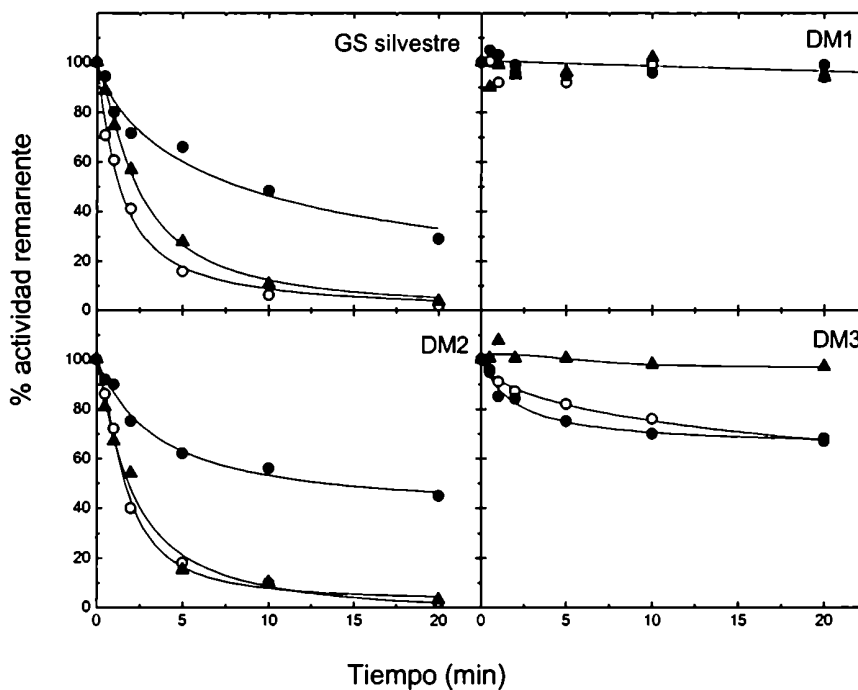


Figura 9: Inactivación de la GS por incubación con IAA. La actividad remanente de las distintas enzimas (WT, DM1, DM2 y DM3) fue ensayada luego de diferentes tiempos de incubación en presencia de IAA 5 mM a 25 °C como se describe en Materiales y Métodos. -○- control, -●-ADP-Glc 1 mM, -▲- glucógeno de hígado de conejo 2.5 mg/ml en la mezcla de incubación.

	GS silvestre	DM1 (C7S C379S)	DM2 (C7S C408S)	DM3 (C379S C408S)
Control sin IAA	100*	100*	100*	100*
Control	3 ± 1	97 ± 2	2 ± 1	62 ± 5
ADP-Glc	50 ± 3	95 ± 3	45 ± 4	60 ± 5
Glucógeno	3 ± 2	92 ± 2	2 ± 1	98 ± 2
Maltosa	2 ± 1	95 ± 3	3 ± 1	64 ± 3
Maltosa + ADP-Glc	51 ± 5	94 ± 4	42 ± 2	63 ± 6
Maltoheptaosa	3 ± 1	92 ± 4	2 ± 1	64 ± 4
Maltoheptaosa + ADP-Glc	54 ± 4	93 ± 3	44 ± 1	80 ± 6

* Representa la actividad de la enzima respectiva luego de 10 min de incubación a 25 °C en *buffer* a pH 8.0 en ausencia de sustratos o inhibidores.

Tabla 8: Actividad remanente de la GS silvestre y las DM en presencia de distintos sustratos luego de incubación con IAA. Las diferentes enzimas fueron incubadas a 25 °C en la oscuridad en presencia de IAA 5 mM. Luego de 10 min de incubación, la reacción se detuvo con el agregado de β-mercaptoetanol, y se midió la actividad remanente. Los valores absolutos de actividad se muestran en la Tabla 5.

Inhibición por Glc1P y AMP

El análisis de las curvas de saturación de sustrato de las mutantes de Cys purificadas indicó que la Cys³⁷⁹ está involucrada, directa o indirectamente, en la interacción de la enzima con la ADP-Glc. Para investigar más en detalle qué porción de la molécula de ADP-Glc interviene en esta interacción, estudiamos la afinidad de la enzima silvestre y la mutante C379A por la Glc1P y el AMP. Tanto la Glc1P como el AMP pueden ser considerados porciones de la molécula del sustrato ADP-Glc (Figura 10). Un efecto diferencial sobre la afinidad por estas moléculas indicaría qué parte de la ADP-Glc está involucrada en la interacción estudiada.

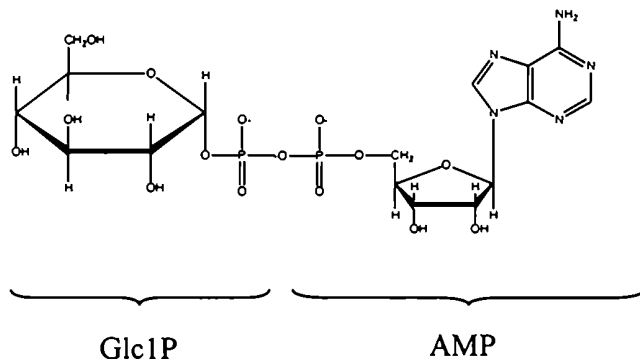


Figura 10: Estructura química de la ADP-Glc. La Glc1P y el AMP representan dos partes de la molécula de ADP-Glc, y funcionan ambos como inhibidores competitivos de la GS de *E. coli*.

Se ensayó la posibilidad de que la Glc1P y el AMP actuaran como inhibidores de la GS, compitiendo con la ADP-Glc. Para comprobar esta hipótesis, se realizaron curvas de saturación de ADP-Glc en presencia de concentraciones variables de cada uno de estos compuestos. En la Figura 11 se presentan las curvas de saturación de sustrato, las cuales alcanzan valores de V_{\max} similares, mientras que el $S_{0.5}$ para la ADP-Glc aumenta a medida que aumenta la concentración del inhibidor. Esto es lo esperable para un inhibidor que compite con el sustrato por el mismo sitio de unión. Luego, el $S_{0.5}$ de la ADP-Glc calculado se representó gráficamente en función de la concentración de inhibidor utilizada (Figura 12) y se realizó un ajuste lineal. De este gráfico se calcularon las K_i correspondientes a cada inhibidor. Tanto la Glc1P como el AMP actuaron como inhibidores de la GS silvestre compitiendo con el sustrato ADP-Glc con una K_i de 1.15 y 0.17 mM, respectivamente. Cuando el mismo parámetro fue calculado para la mutante C379A, la K_i para el AMP se incrementó de 2.8 veces, mientras que la K_i para la Glc1P aumentó 75 veces respecto de la de la enzima silvestre (Figura 12).

En nuestros estudios, tanto el AMP como la Glc1P actuaron como inhibidores de la GS compitiendo con la ADP-Glc. Esta conducta es la esperada para compuestos que se unen al sitio de unión de sustrato pero que no participan en la reacción catalítica. El reemplazo de Cys³⁷⁹ por Ala apenas modificó la K_i correspondiente al AMP, indicando que este residuo no es crítico para la unión del nucleótido monofosfato a la enzima. Sin embargo, la mutación C379A afectó severamente la afinidad por la Glc1P, y en la misma magnitud en la cual se afectó la afinidad aparente por la ADP-Glc (75 y 77 veces menos que la enzima silvestre, respectivamente) (Figura 12). Por otra parte, la presencia de Glc1P 10 mM protegió a la enzima de la inactivación por DTNB, mientras que el AMP no ejerció protección en el rango de 1-50 mM testeado (datos no mostrados). Estos resultados indican que la Cys³⁷⁹ es importante para la interacción de la enzima con la porción fosfoglucosa de la ADP-Glc, y no con la porción nucleotídica.

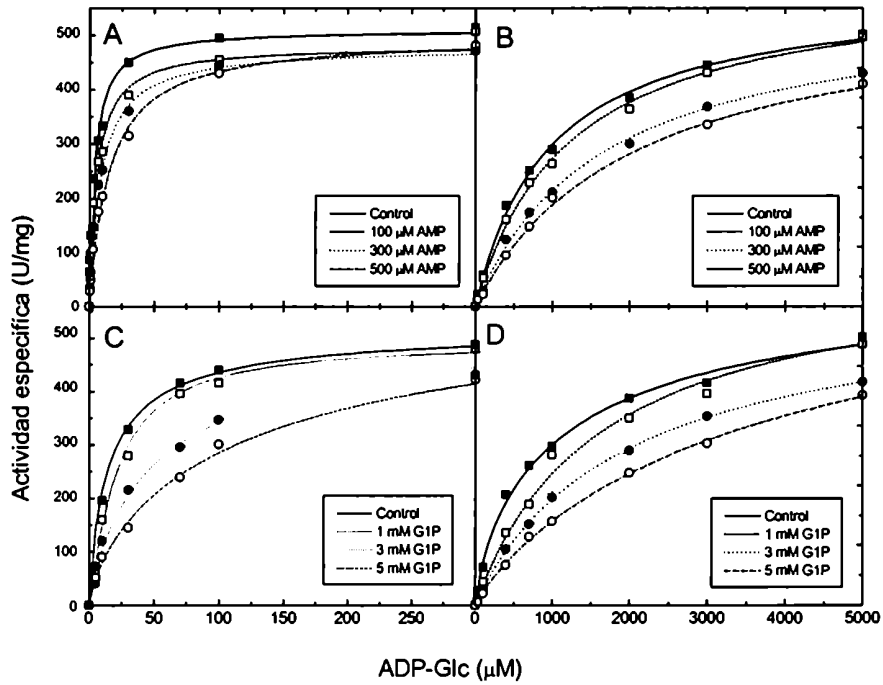


Figura 11: Curvas de saturación de ADP-Glc en presencia de diferentes concentraciones de AMP o Glc1P. Las curvas de saturación de ADP-Glc se registraron para la GS silvestre y para la mutante C379A. Las curvas control fueron obtenidas en ausencia del inhibidor.

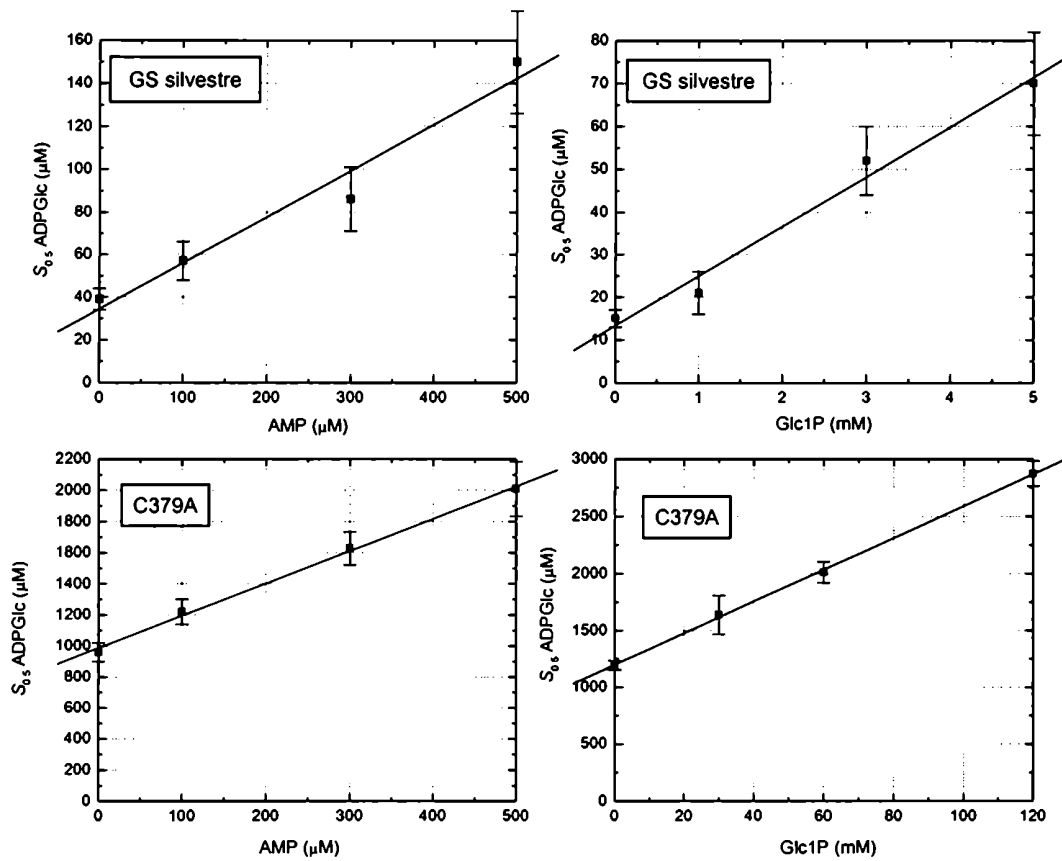


Figura 12: $S_{0.5}$ de la ADP-Glc graficado en función de la concentración de inhibidor. De la extrapolación de la regresión lineal hasta el 0 del eje de ordenadas se estima la constante de inhibición (K_i).

Inhibidor	WT		C379A		Incremento (veces)
	K_i (mM)		K_i (mM)		
Glc1P	1.15	\pm 0.17	86	\pm 6	75
AMP	0.17	\pm 0.01	0.476	\pm 0.025	2.8

Tabla 9: Inhibición de la GS silvestre y la mutante C379A con Glc1P y AMP

Conservación de los residuos de Cys

En la Tabla 10 se muestra una comparación de secuencias de GS bacterianas y almidón sintetasas de plantas representativas de diversos orígenes, en las regiones que flanquean a los tres residuos de Cys estudiados. Se puede observar que Cys⁷ y Cys⁴⁰⁸ no están conservadas, pero Cys⁷ se encuentra cercana a una región altamente conservada, K¹⁵TGGL en la secuencia de la enzima de *E. coli*. Esta región ha sido estudiada anteriormente, y la Lys¹⁵ ha sido involucrada en la unión de la ADP-Glc a la GS (116, 117). La Cys³⁷⁹, por el contrario, es un residuo conservado en un 100% de las GS bacterianas y las almidón sintetasas secuenciadas hasta la fecha. Asimismo, se encuentra localizado en una región altamente conservada, que sería un *loop* según las predicciones de estructura secundaria (Tabla 10).

La región que rodea a la Cys³⁷⁹ se encuentra altamente conservada no sólo entre las GS bacterianas y las almidón sintetasas, sino también entre las GS de organismos eucariotas. La Cys³⁷⁹ en particular es reemplazada por un Trp en las secuencias de mamíferos, pero la secuencia general del *loop* se encuentra conservada. En la Tabla 11 se alinearon las secuencias consenso para esta región correspondientes a GS de bacterias, arqueobacterias y eucariotas, y almidón sintetasas de plantas.

N° Acceso	Bacterianas	LB	BB	BBB	BBBB	BBBBB	BBBBBB	BBBBBBB	BBBBBBBB	BBBBBBBBB	BBBBBBBBBB	BBBBBBBBBBB	BBBBBBBBBBBB	BBBBBBBBBBBBB	BBBBBBBBBBBBBB	BBBBBBBBBBBBBBB	BBBBBBBBBBBBBBBB	BBBBBBBBBBBBBBBBB	BBBBBBBBBBBBBBBBBB	BBBBBBBBBBBBBBBBBBB
PO8323	(477) <i>Escherichia coli</i>	(1)	(369)	(369)	(369)	(369)	(369)	(369)	(369)	(369)	(369)	(369)	(369)	(369)	(369)	(369)	(369)	(369)	(369)	(369)
P39670	(480) <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	(1)	(368)	(368)	(368)	(368)	(368)	(368)	(368)	(368)	(368)	(368)	(368)	(368)	(368)	(368)	(368)	(368)	(368)	(368)
O08328	(485) <i>Geobacillus stearothermophilus</i>	(1)	(370)	(370)	(370)	(370)	(370)	(370)	(370)	(370)	(370)	(370)	(370)	(370)	(370)	(370)	(370)	(370)	(370)	(370)
Q985P2	(481) <i>Mesorhizobium loti</i>	(1)	(368)	(368)	(368)	(368)	(368)	(368)	(368)	(368)	(368)	(368)	(368)	(368)	(368)	(368)	(368)	(368)	(368)	(368)
Q8YVU5	(472) <i>Anabaena sp.</i>	(1)	(378)	(378)	(378)	(378)	(378)	(378)	(378)	(378)	(378)	(378)	(378)	(378)	(378)	(378)	(378)	(378)	(378)	(378)
Q8XPA1	(482) <i>Clostridium perfringens</i>	(7)	(376)	(376)	(376)	(376)	(376)	(376)	(376)	(376)	(376)	(376)	(376)	(376)	(376)	(376)	(376)	(376)	(376)	(376)
Q97Q85	(477) <i>Streptococcus pneumoniae</i>	(1)	(370)	(370)	(370)	(370)	(370)	(370)	(370)	(370)	(370)	(370)	(370)	(370)	(370)	(370)	(370)	(370)	(370)	(370)
Q9KRB6	(484) <i>Vibrio cholerae</i>	(4)	(376)	(376)	(376)	(376)	(376)	(376)	(376)	(376)	(376)	(376)	(376)	(376)	(376)	(376)	(376)	(376)	(376)	(376)
Plantas (soluble)																				
CAB69545	(649) <i>Zea mays</i>	(142)	(533)	(533)	(533)	(533)	(533)	(533)	(533)	(533)	(533)	(533)	(533)	(533)	(533)	(533)	(533)	(533)	(533)	(533)
BAA07396	(626) <i>Oryza sativa</i>	(134)	(525)	(525)	(525)	(525)	(525)	(525)	(525)	(525)	(525)	(525)	(525)	(525)	(525)	(525)	(525)	(525)	(525)	(525)
Plantas (unidas a gránulo)																				
S07314	(605) <i>Zea mays</i>	(77)	(473)	(473)	(473)	(473)	(473)	(473)	(473)	(473)	(473)	(473)	(473)	(473)	(473)	(473)	(473)	(473)	(473)	(473)
AAN77103	(609) <i>Oryza sativa</i>	(83)	(477)	(477)	(477)	(477)	(477)	(477)	(477)	(477)	(477)	(477)	(477)	(477)	(477)	(477)	(477)	(477)	(477)	(477)
AC006424	(610) <i>Arabidopsis thaliana</i>	(84)	(478)	(478)	(478)	(478)	(478)	(478)	(478)	(478)	(478)	(478)	(478)	(478)	(478)	(478)	(478)	(478)	(478)	(478)
AAL77109	(603) <i>Hordeum vulgare</i>	(76)	(471)	(471)	(471)	(471)	(471)	(471)	(471)	(471)	(471)	(471)	(471)	(471)	(471)	(471)	(471)	(471)	(471)	(471)
CAA41359	(607) <i>Solanum tuberosum</i>	(81)	(475)	(475)	(475)	(475)	(475)	(475)	(475)	(475)	(475)	(475)	(475)	(475)	(475)	(475)	(475)	(475)	(475)	(475)

Tabla 10: Comparación de secuencias de aminoácidos de las regiones que flanquean a los tres residuos de Cys. Los residuos que aparecen en color rojo se encuentran absolutamente conservados. El número que precede a la fuente es el número de aminoácidos de la proteína, mientras que el número que precede a la secuencia representa el número del primer residuo alineado de cada proteína. La predicción de la estructura secundaria de la enzima de *E. coli* para cada uno de los fragmentos se encuentra en la parte superior de la tabla. B: hoja plegada beta, L: *loop*, A: alfa hélice.

Grupo taxonómico	Secuencia consenso
GS Bacteria	[P/A] SX X EX C G [I/L] XQ
Almidón sintetasas	[P/T] SX F EP C G L XQ
GS Arquea	P SX [F/W] EP [F/C] G [I/L] XX
GS Eucariotas	[P/A] SY Y EP W G Y TP

Tabla 11: Secuencias consenso (100%) correspondientes a la región que flanquea a la Cys³⁷⁹. Los residuos conservados en los cuatro grupos están en color rojo, mientras que los residuos conservados entre las GS bacterianas y las almidón sintetasas están en color verde.

Caracterización de la región que flanquea a la Cys³⁷⁹

La estructura secundaria de fragmento S³⁷⁴RFPCGLTQ³⁸³ es considerada como *loop* por varios programas de predicción de estructura secundaria (PHD, PSI-PRED, SS-Pro). Estos programas clasifican a la GS de *E. coli* como una proteína α/β . Ha sido observado con anterioridad que en las enzimas con estructuras α/β la estructura del sitio activo suele estar conformada por residuos localizados en los *loops* entre cada hoja plegada β y la α -hélice sub-siguiente (122). En particular, este hecho ha sido observado dentro de la familia de las GT (90). La región comprendida entre los residuos 373 y 380 en la GS de *E. coli* está predicha como un *loop* entre una hoja plegada β y una α -hélice (90). Considerando que encontramos que la Cys³⁷⁹ es importante para la interacción de la enzima con la ADP-Glc, y que otros aminoácidos en esta región están altamente conservados, nuestra hipótesis fue que este *loop* putativo se encuentra cerca del sitio de unión del sustrato ADP-Glc, y que podría tener otros papeles importantes en la actividad de la enzima. Decidimos, por consiguiente, caracterizar el papel funcional de otros residuos en esta misma área mediante mutagénesis sitio-dirigida. El grupo lateral de cada uno de los residuos absolutamente conservados entre las GS bacterianas y las almidón sintetasas en esa porción de la GS de *E. coli* (Tabla 11) fue reemplazado por Ala y las enzimas mutantes obtenidas fueron caracterizadas cinéticamente. Los residuos estudiados fueron Ser³⁷⁴, Glu³⁷⁷, Cys³⁷⁹ y Gln³⁸³. La Gly³⁸⁰ también se encuentra absolutamente conservada, pero decidimos no generar mutantes de este residuo particular porque es probable que su conservación en todas las GS y almidón sintetasas se deba a propósitos exclusivamente estructurales, o bien las interacciones sean a través del esqueleto carbonado de la estructura proteica.

Caracterización cinética de las mutantes en la posición 377

El sistema de expresión utilizado con la GS silvestre y las mutantes de Cys garantiza que la enzima endógena representa menos del 0.02% de la enzima recombinante expresada. Sin embargo, aun ese 0.02% de actividad proveniente de la enzima endógena puede interferir cuando la/s mutación/es generan una especie enzimática con actividad específica varios órdenes de magnitud menor que la de la enzima silvestre. Para superar este inconveniente, las GS mutantes con muy baja actividad específica fueron expresadas en células BL21(DE3) de *E. coli*, utilizando la construcción pAY3, que aprovecha el sistema His-Tag[®] (Novagen) al agregar un etiquetado de 6 histidinas en el extremo C-terminal de la secuencia enzimática (ver detalles en la sección Materiales y Métodos). Los parámetros cinéticos de la GS silvestre con una His-Tag[®] en su extremo C-terminal fueron muy similares a los de la enzima silvestre, y se encuentran resumidos en la Tabla 12. La enzima exhibió una V_{\max} de 500 U/mg, en el mismo orden que la GS silvestre (570 U/mg), y las afinidades aparentes por ambos sustratos también se mantuvieron en el mismo rango. Las enzimas mutantes fueron ensayadas como se describió en Materiales y Métodos para comparar sus parámetros cinéticos con los de la enzima silvestre. La actividad específica de la mutante E377A purificada fue cuatro órdenes de magnitud inferior a la de la GS silvestre (0.05 U/mg). Un efecto aún mayor fue observado para la mutante E377Q (Tabla 12). A pesar de este dramático efecto sobre la eficiencia catalítica, la afinidad aparente por los sustratos de las mutantes E377A y E377Q no se alteró en forma significativa. Ambas mutantes mostraron $S_{0.5}$ para ADP-Glc en el mismo rango que la enzima silvestre, 70 y 61 μM , respectivamente. La actividad específica de la mutante E377D disminuyó 57 veces, pero esta mutante mostró cierta alteración en la afinidad aparente por la ADP-Glc, ya que el $S_{0.5}$ para este sustrato aumentó 83 veces. Si bien la actividad específica de la mutante E377D resultó significativamente menor a la de la enzima silvestre (57 veces menor), es aún una actividad considerable en comparación a la de las mutantes E377A y E377Q, destacando la importancia de poseer una carga negativa en la posición 377. La afinidad aparente por el glucógeno es mayor en estas mutantes con baja actividad específica, lo cual puede ser un efecto causado por la gran disminución en la eficiencia catalítica.

	V_{\max}			ADP-Glc			Glucógeno		
	U/mg	Disminución (veces)	$S_{0.5}$ (μM)	n_H	$S_{0.5}$ ($\mu\text{g/ml}$)	n_H			
GS silvestre His·Tag®	500 ± 65	1	18 ± 3	0.9	770 ± 180	1.0			
E377A His·Tag®	0.05 ± 0.01	10000	70 ± 30	1.1	27 ± 2	1.0			
E377Q His·Tag®	0.020 ± 0.001	25000	61 ± 12	0.9	14 ± 2	1.0			
E377D	10 ± 1	57	1500 ± 300	0.9	26 ± 5	1.0			

Tabla 12: Parámetros cinéticos de la GS silvestre de *E. coli* y las mutantes del Glu³⁷⁷ con una His·Tag®. Las enzimas fueron ensayadas como se indica en Materiales y Métodos, con una ADP[¹⁴C]Glc de actividad específica de 1500 o 5000 dpm/nmol.

Restitución de la actividad por modificación química de la mutante E377C

Para verificar si la presencia de una carga negativa en la posición 377 podía restaurar la actividad enzimática de una mutante inactiva, se reemplazó el residuo Glu³⁷⁷ por una Cys, la cual es reactiva a la carboximetilación con IAA. Esta estrategia permitiría un rescate de la actividad enzimática por incubación con IAA, demostrando la importancia de una carga negativa en dicha posición (Figura 13 A). Para evitar la interferencia con otros residuos de Cys, y dado que ya había sido demostrado que la GS se inactiva por reacción del IAA con la Cys³⁷⁹, este experimento se llevó a cabo con la TM. Los parámetros cinéticos de la TM están detallados en la Tabla 5. La enzima sin Cys es activa, pero su actividad es 12 veces menor que la actividad de la GS silvestre. A pesar de esto, se trata de una actividad significativa de 46 U/mg, muy superior a las mutantes E377A o E377Q. El reemplazo del Glu³⁷⁷ por Cys generó, como era esperable, una enzima con una actividad específica extremadamente baja, 2300 veces menor que la actividad de la TM y 25000 veces menor que la de la GS silvestre (Tabla 13). La enzima purificada TM-E377C (C7S, C379S, E377C, C408S) fue incubada con IAA 1 mM, y a diferentes tiempos se tomaron alícuotas para la medición de actividad enzimática de acuerdo a lo establecido en Materiales y Métodos. Con este tratamiento la mutante TM-E377C la actividad fue rescatada hasta alcanzar el mismo nivel que la TM (Figura 13 B). Por otra parte, la incubación con iodoacetamida (IAM) no aumentó la actividad de la mutante TM-E377A. Este control indica que un grupo carboxilo (pero no un grupo carboxiamido) en esta posición puede restituir la actividad de la TM-E377C. Asimismo, la incubación de la TM con IAA no modificó su nivel de actividad. El agregado a la mezcla de incubación de ADP-Glc (Figura 13 B) o ADP (dato no mostrado) previno la restauración de la actividad por el IAA. Por el contrario, el agregado de glucógeno no impidió dicha restauración de la actividad (Figura 13 B). Por último, la incubación con ácido iodopropiónico no elevó los niveles de actividad de la TM-E377C. Los parámetros cinéticos de la enzima TM-E377C carboximetilada se encontraron en el mismo rango que los de la TM (Tabla 13).

Los experimentos anteriores habían mostrado que la presencia de una carga negativa en la posición 377 era imprescindible para la actividad de la GS. Esto fue confirmado al restablecer la actividad catalítica de la mutante TM-E377C por carboximetilación. Este experimento de reactivación química también indica que es extremadamente improbable que las mutantes

del Glu³⁷⁷ hayan perdido actividad a causa de la generación de formas enzimáticas inactivas por problemas en el plegamiento.

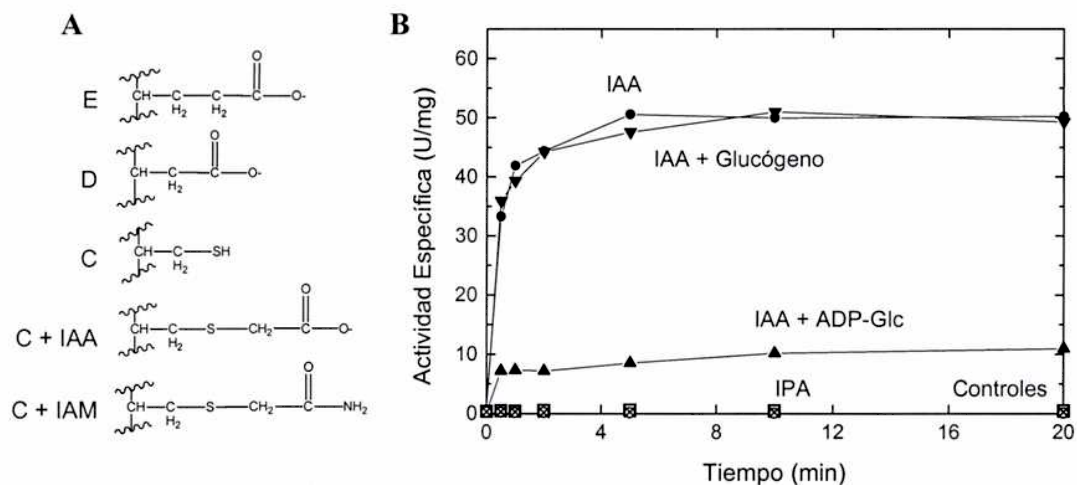


Figura 13: A) Estructura de las cadenas laterales de los aminoácidos Glu, Asp y Cys, y la Cys modificada por IAA o IAM. B) Modificación química de la mutante TM-E377C con ácido iodoacético (IAA). La mezcla de reacción es la descrita en Materiales y Métodos, conteniendo 0.1 mg de enzima en buffer a 0 °C. -○- control; -□- 1 mM iodoacetamida; -●- 1 mM IAA; -▼- 1 mM IAA + 2 mg/ml glucógeno de hígado de conejo; -▲- IAA 1 mM + ADP-Glc 10 mM, -×- 1 mM ácido iodopropiónico.

	V_{max}		disminución (veces)	ADP-Glc		Glucógeno	
	U/mg			$S_{0.5}$ (μM)	n_H	$S_{0.5}$ (μg/ml)	n_H
TM	46	± 2	1	620	± 65 1.4	150	± 20 1.1
TM-E377C	0.02	± 0.01	2300	213	± 74 1.1	24	± 2 1.0
TM-E377C + IAA	50	± 2	0.92	810	± 50 0.9	70	± 15 1.3

Tabla 13: Parámetros cinéticos de mutantes de la GS de *E. coli*. La mutante TM-E377C fue modificada por incubación con IAA por 10 min previamente a las determinaciones de actividad, como se describe en la sección Materiales y Métodos.

Co-sedimentación con glucógeno

Para determinar si las enzimas mutantes con actividad específica extremadamente baja (4 órdenes de magnitud menor que la silvestre) retenían su capacidad de unirse al sustrato glucógeno, se ultracentrifugaron las enzimas en presencia de 10 mg/ml de glucógeno de hígado de conejo. En estas condiciones, la enzima silvestre se encuentra en forma mayoritaria en el precipitado, como se observa en la Figura 14. Sólo un 2% (aproximadamente) se encontró en el sobrenadante, como se determinó con ensayos de actividad enzimática (Tabla 14). Como control, cuando se la centrifugó en ausencia de glucógeno, la enzima silvestre permaneció en su totalidad en el sobrenadante. Las mutantes virtualmente inactivas E377A, E377Q y TM-E377C siguieron el mismo patrón de co-sedimentación con glucógeno de la enzima silvestre. Como control negativo se utilizó la ADP-Glc pirofosforilasa de *E. coli*, que no se une al glucógeno y no co-sedimenta con él. Estos resultados indican que la falta de actividad de las mutantes del residuo Glu³⁷⁷ no se debe a problemas en el plegamiento tridimensional de la proteína.

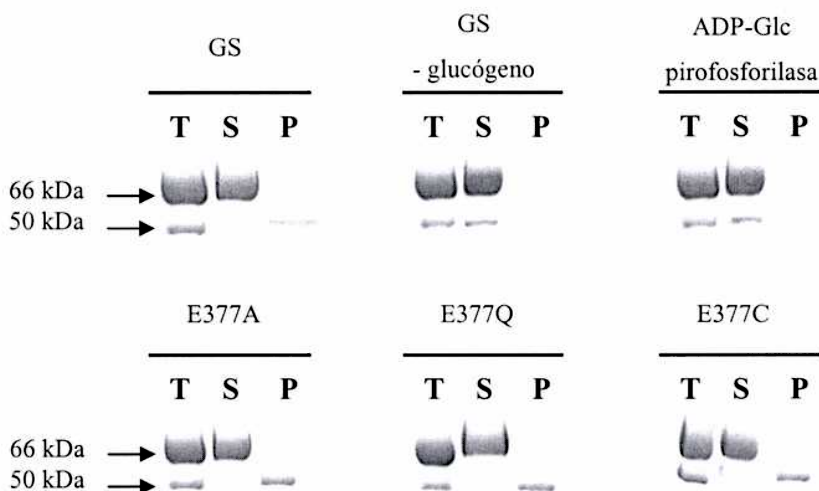


Figura 14: Co-sedimentación de las distintas variantes enzimáticas con glucógeno. El SDS-PAGE fue corrido como se describe en Materiales y Métodos. T, muestra total antes de la ultracentrifugación; S, sobrenadante; P, precipitado de la ultracentrifugación. Las mutantes y la enzima silvestre fueron incubadas con glucógeno 10 mg/ml y luego ultracentrifugadas. Se sembró la GS o la enzima control (1 µg por calle). La banda superior de 66 kDa corresponde a la BSA incluida en la mezcla de incubación.

	Actividad (U)		
	Total	Sobrenadante	Precipitado
control	5.1	5.00	0.02
+ glucógeno	5.1	0.01	5.05

Tabla 14: Actividad de la GS silvestre en sobrenadante y precipitado luego de la ultracentrifugación en presencia y ausencia de glucógeno. Control: 10 μg de GS silvestre, + glucógeno: 10 μg de GS silvestre, glucógeno 10 mg/ml, ambos tubos con un volumen final de 1 ml fueron incubados y ultracentrifugados como se describe en la sección Materiales y Métodos.

Caracterización cinética de las mutantes S374A y Q383A

Las mutantes purificadas S374A y Q383A fueron analizadas cinéticamente, y los resultados se muestran en la Tabla 15. La mutante S374A no mostró diferencias significativas con la enzima silvestre. La actividad específica resultó comparable, y las afinidades aparentes por ambos sustratos se encontraron en el mismo rango que las de la enzima silvestre. La actividad específica de la mutante Q383A disminuyó 23 veces. La interacción de esta mutante con los sustratos no parece estar afectada. La afinidad aparente por la ADP-Glc permaneció sin cambios, mientras que la del glucógeno resultó dos órdenes de magnitud superior.

La Ser³⁷⁴ se encuentra absolutamente conservada no sólo entre las glucógeno sintetasa bacterianas y las almidón sintetetasas, sino también entre las glucógeno sintetetasas de mamíferos y hongos. Sin embargo, el reemplazo de la Ser³⁷⁴ por Ala no cambió significativamente las propiedades cinéticas de la enzima. A pesar de su estricta conservación, este residuo no desempeña un papel esencial en el mecanismo de reacción. Por otra parte, el reemplazo de la Gln³⁸³ generó una enzima que no presentó decremento en la afinidad aparente por los sustratos, pero con una disminución de 23 veces en la V_{max} . Esta Gln parece contribuir a la eficiencia catalítica, pero no se puede asignarle un papel esencial. Es posible también que este residuo sea necesario por algún motivo estructural.

	V_{max}			ADP-Glc		Glucógeno	
	U/mg	Disminución* (veces)		$S_{0.5}$ (μ M)	n_H	$S_{0.5}$ (μ g/ml)	n_H
S374A	490 \pm 10	1.1		18 \pm 1	1	600 \pm 47	1
Q383A	25 \pm 1	23		26 \pm 2	1	6 \pm 1	1

* Relativo a la enzima silvestre (Tabla 12)

Tabla 15: Parámetros cinéticos de las mutantes de la glucógeno sintetasa S374A y Q383A.

La importancia de un residuo con carga negativa para la actividad de la GS ha sido sugerida también en la GS humana (123). En ese estudio, los autores generaron una mutante del Glu⁵¹⁰ (homólogo del Glu³⁷⁷ de la enzima de *E. coli*) por Ala en una fusión recombinante de la GS de músculo humano con la *green fluorescent protein* (GFP), y observaron una reducción de la actividad enzimática de 97 a 12 mU/mg. En ese trabajo no fue posible determinar con certeza la magnitud de la pérdida de eficiencia catalítica a causa de la elevada actividad endógena presente en los extractos crudos de células COS-1 (12 mU/mg).

En las almidón sintetetasas este *loop* putativo tiene residuos conservados homólogos a la Ser³⁷⁴, Glu³⁷⁷, Cys³⁷⁹ y Gln³⁸³. En un estudio de mutagénesis de residuos ácidos utilizando la almidón sintetasa de maíz SSIIB-2 se encontró que una mutación del Glu³⁹¹ (homólogo del Glu³⁷⁷) a Gln generaba pérdida de actividad enzimática en extractos crudos. La enzima mutante fue purificada, pero no se pudo detectar actividad ni medir afinidades por los sustratos (120). Se purificó entonces la mutante E391D, la cual resultó activa, si bien mostrando una actividad específica 7 veces menor que la enzima silvestre. Esta mutante, además, mostró una afinidad aparente por ADP-Glc casi 9 veces menor, y una afinidad por el glucógeno y la amilopectina también inferior. Si bien estos resultados no fueron profundizados, y estaban enmarcados en un estudio mas global de los residuos ácidos de la almidón sintetasa, están en completo acuerdo con los datos obtenidos al estudiar el Glu³⁷⁷ homólogo en la GS de *E. coli*. También en este caso la mutación por Asp generó una enzima activa y con menor afinidad por la ADP-Glc (Tabla 12).

Para poder asignar un papel catalítico a un residuo determinado mediante mutagénesis sitio-dirigida es necesario cumplir con ciertos requerimientos. Primeramente, se espera que la reducción en actividad específica o k_{cat} sea de varios órdenes de magnitud. Por esta razón es necesario purificar la mutante en un sistema sin posibilidad de interferencia de la actividad endógena. En este caso, este problema se evitó purificando la enzima recombinante con una cola de histidinas en su extremo C-terminal mediante una columna de afinidad. En segundo lugar, debería existir evidencia de que la capacidad de la enzima de unir cada uno de los sustratos no ha sido severamente alterada. En el caso de la GS, la afinidad aparente por los sustratos no se vio disminuida, y la enzimas mutantes en la posición 377 co-precipitan con el glucógeno siguiendo el mismo patrón de la enzima silvestre. Finalmente, se debe descartar la posibilidad de que la mutante se exprese como una forma con defectos en el plegamiento, es decir que el residuo original no posea un papel estructural en la enzima más que un papel catalítico. A pesar de que un residuo negativo (muy probablemente el homólogo del Glu³⁷⁷) ha sido mostrado como importante para la catálisis en distintas enzimas de la familia de las GS eucariotas (123) y de las almidón sintetasas (120), el presente trabajo es la primera vez que los requisitos mencionados anteriormente son cumplidos para poder asignar un papel catalítico a un Glu en las GT que usan nucleótidos azúcar como moléculas dadoras.

MacGregor (90) examinó detalladamente las secuencias de aminoácidos de proteínas pertenecientes a las familias GT3, 4 y 5, e identificó potenciales residuos participantes de los sitios activos. Basándose en datos de predicción de estructura secundaria y *threading*, el trabajo sugiere que las tres familias compartirían el mismo tipo de estructura terciaria, que es la correspondiente a la undecaprenildifosfo-muramoilpentapéptido β -N-acetilglucosaminiltransferasa (MurG) de *E. coli*, la cual presenta un *fold* GT-B (124, 125). En trabajos anteriores se había sugerido que miembros de la familia 4 podían presentar una estructura terciaria similar a la que adopta MurG (82, 126), y también se habían notado similitudes entre las familias GT3, 4 y 5 (126-128). Por otra parte, Wrabl y Grishin habían predicho un *fold* de tipo GT-B para los miembros de las familias GT3, 4 y 5 (88). En la Figura 15 se puede observar un esquema de la sucesión de α -hélices y hojas plegadas β típica de las enzimas con un GT-B *fold* adaptado de (90). Muchas de las enzimas poseen α -hélices u hojas plegadas β adicionales, y no todas las enzimas cristalizadas poseen siempre una hélice después de una hoja plegada. Existen varios aminoácidos compartidos entre estas tres familias que MacGregor destaca. En el dominio N-

terminal, dos Gly vecinas en el comienzo de la hélice IH1 se encuentran en todos los miembros de las familias GT3, 4 y 5, y son las correspondientes al motivo conservado en la familia GT5, K¹⁵XGGL. Después de la hoja plegada IE4 se encuentra un Asp conservado que ha sido involucrado en unión de la molécula aceptora en fosforilasas (91). Un Glu en el *loop* que sigue a la hoja plegada IE1, involucrado en la unión de la molécula aceptora en fosforilasas (129), se encuentra en todos los miembros de las familias 3 y 5 pero no en las sacarosa sintetasas, donde se encuentra reemplazado por una His. Es necesario recordar que una diferencia importante entre las familias GT3/5 y la familia 4 es que, mientras las primeras utilizan siempre cadenas de glucanos con enlaces α -1,4 como molécula aceptora, las sacarosa sintetasas requieren fructosa o fructosa-6-fosfato. Es por lo tanto esperable encontrar diferencias importantes en los sitios de unión de las respectivas moléculas aceptoras. En el dominio C-terminal, MacGregor identifica una Arg y Lys conservadas inmediatamente después de la hoja plegada IIE1, involucradas en la unión de los fosfatos en las fosforilasas (130) y un Glu antes de la hélice IIH4, el cual corresponde al Glu³⁷⁷ de la GS de *E. coli*.

Con el objetivo de obtener una representación tridimensional de los datos bioquímicos obtenidos hasta el momento, se decidió construir un modelo de homología de la GS de *E. coli*.

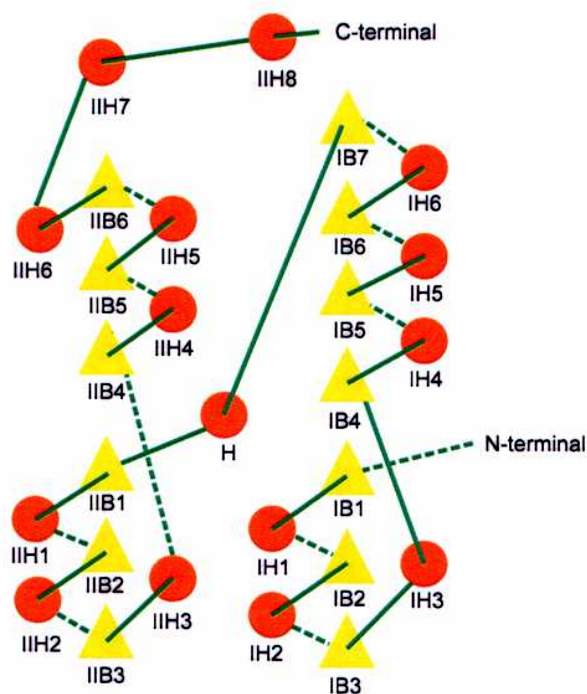
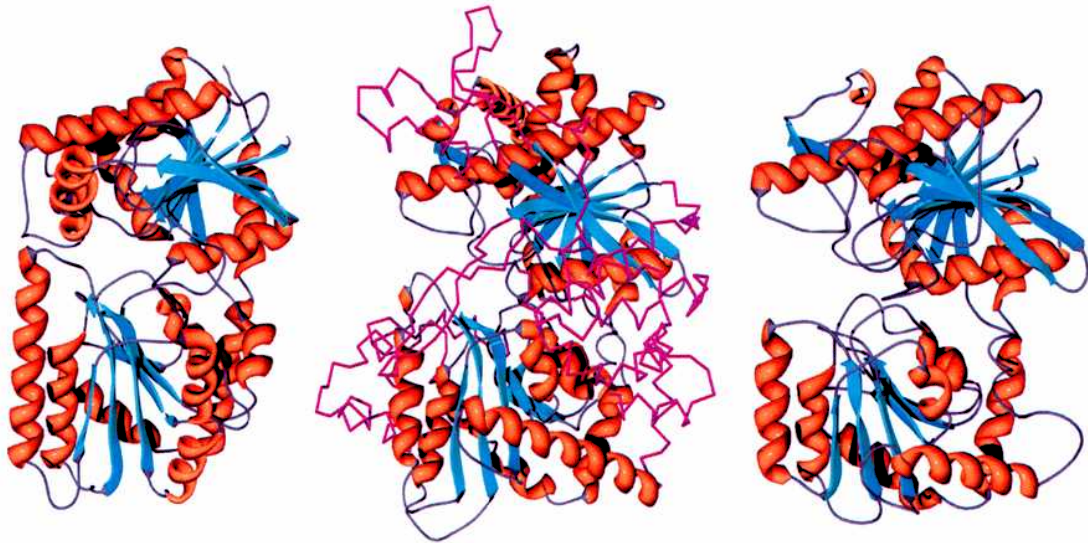


Figura 15: Esquema topológico representando la estructura secundaria de las GT con un *fold* GT-B. La nomenclatura de las hélices y las hojas plegadas corresponde a MacGregor {MacGregor, 2002 #145}. Las α -hélices se encuentran marcadas como círculos de color y están numeradas desde el extremo N-terminal de cada dominio como IH1, IH2... en el dominio N-terminal y IIH1, IIH2... en el extremo C-terminal. Las hojas plegadas β están representadas por triángulos de color y están numeradas en forma similar como IB1, IB2... y IIB1, IIB2... en los dominios N- y C-terminal, respectivamente. La hélice en la zona que une ambos dominios se muestran como H.

Modelo de homología de la GS de *E. coli*

Se realizó un modelo de homología de la GS de *E. coli* basándose en las coordenadas de las estructuras cristalinas de la maltodextrina fosforilasa de *E. coli* (MalP, código de PDB 1c4o), la trehalosa-6-fosfato sintetasa de *E. coli* (OtsA, código de PDB 1gz5) y la undecaprenildifosfo-muramoilpentapéptido β -N-acetilglucosaminiltransferasa de *E. coli* (MurG, código de PDB 1nlm). Estas tres enzimas presentan un *fold* de tipo GT-B. MalP utiliza P_i para liberar una glucosa del extremo no reductor de la maltodextrina bajo la forma de Glc1P. Se trata de la misma reacción de una glucógeno fosforilasa, pero MalP es específica para cadenas glucosídicas más cortas (5 a 20 residuos de glucosa). Es considerada una GT porque, en la reacción inversa, agrega una glucosa al extremo no reductor de la maltodextrina desde la Glc1P. OtsA sintetiza el disacárido no reductor trehalosa-6-fosfato a partir de los sustratos UDP-Glc y Glc6P. La reacción catalizada por MurG es la formación de la unión glucosídica entre el *N*-acetil muramoil pentapéptido y la *N*-acetil glucosamina en la biosíntesis de la pared celular bacteriana. MurG pertenece a la familia GT28 de GT que invierten la configuración del sustrato. A pesar de esto, MurG presenta similitudes locales de secuencia con la familia GT4 de GT que retienen la configuración (82). Asimismo, las predicciones de estructura terciaria de las familias GT3, GT4 y GT5 utilizando los servidores de Internet SAM-T99, 3D-PSSM y GenTHREADER arrojaron valores altamente significativos para MurG (82, 90, 126).

El modelo terminado se muestra en la Figura 16. Las proteínas utilizadas como molde se seleccionaron porque, a pesar de su baja identidad con la GS de *E. coli* (~12%), presentaban el mismo *fold* GT-B en las predicciones hechas por *threading*. El nivel de confianza de estas predicciones fue muy alto: el valor E (que representa el número esperado de falsos resultados por secuencia analizada) fue 4×10^{-4} , 2×10^{-3} , y 10^{-3} para OtsA, MurG y MalP, respectivamente, usando el programa GenTHREADER (131). A causa de la baja identidad, es de extrema importancia el hecho de haber empleado varios moldes en paralelo. Con este propósito, se aprovecharon las características del programa Modeller 6v2 para emplear la parte más adecuada de cada proteína molde.



Trehalosa-6-fosfato sintetasa

Maltodextrina fosforilasa

Modelo de la GS de *E. coli*

Figura 16: Comparación de las estructuras de OtsA, MalP y la GS de *E. coli*. Las representaciones de OtsA y MalP se construyeron basadas en las coordenadas disponibles en el PDB, números de acceso 1gz5 y 1e4o, respectivamente. La representación de la GS es el modelo de homología obtenido como se describe en la sección Materiales y Métodos. En la estructura de MalP, las inserciones se encuentran en color rosado, mostrando solamente el esqueleto carbonado.

Se comparó el sitio activo de la enzima modelada con las GT que retienen la configuración del sustrato y presentan un *fold* de tipo GT-B, y cuya estructura cristalina se encuentra disponible. Cuando se superpuso el modelo con las estructuras cristalinas de MalP y OtsA, encontramos una serie de residuos conservados que comparten la misma topología (Figura 17). Estos residuos son Gly¹⁸, Asp¹³⁷, His¹⁶¹, Arg³⁰⁰, Lys³⁰⁵ y Glu³⁷⁷ (la numeración es la correspondiente a la GS de *E. coli*), y se encuentran conservados en todos los miembros de las familias 20 (trehalosa-6-fosfato sintetetas) y 35 (glucógeno y maltodextrina fosforilasas), y están involucrados en interacciones con los sustratos en las estructuras cristalinas de MalP y OtsA (84, 92). Los residuos Glu⁹ y Asn²⁴⁶ también se encuentran conservados en la familia GT35 pero no en la GT20. Todos estos residuos están absolutamente conservados dentro de los miembros de la familia GT5.

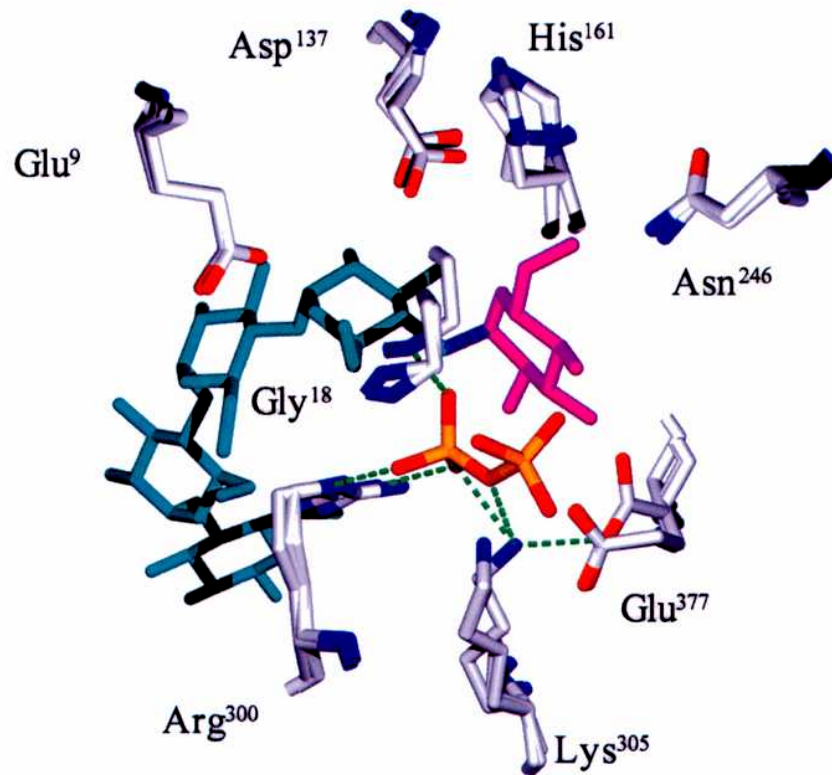


Figura 17: Representación del sitio activo de la GS de *E. coli*, superpuesta con los residuos homólogos en OtsA y MalP. También se encuentra superpuesta la molécula de maltopentaosa unida a la MalP. La glucosa que es liberada como Glc1P luego de la fosforilación se encuentra pintada de color rosado. En la GS, esta glucosa correspondería a la glucosa proveniente de la ADP-Glc que ha sido aceptada por el glucógeno. Los dos fosfatos mostrados corresponden a los fosfatos α y β de la UDP-Glc que está en complejo con la OtsA. Las líneas verdes punteadas muestran las interacciones entre estos fosfatos y residuos de la OtsA. La numeración es la correspondiente a los residuos de la GS de *E. coli*. El residuo Glu³⁷⁷ se superpone ligeramente mejor con el Glu⁶³⁸ de la MalP que con el Asp³⁶¹ de OtsA. Por este motivo, la Lys²⁶⁸ de OtsA (homóloga a la Lys³⁰⁵) se encuentra ligeramente desviada hacia la derecha. Los residuos Glu⁹ y Asn²⁴⁶ se muestran superpuestos únicamente con los residuos homólogos en MalP debido a que no se encuentran conservados en OtsA.

Estudio de los residuos del sitio activo de la GS de *E. coli*

La presencia de este conjunto de residuos en la GS y su predicha similitud estructural con aquellos presentes en el sitio activo de otras GT que retienen la configuración del sustrato sugiere que podrían ser importantes en catálisis. De hecho, ya hemos mostrado la importancia del residuo Glu³⁷⁷, y su caracterización como residuo catalítico. Un grupo de residuos catalíticos compartiendo el mismo arreglo tridimensional en común sugeriría asimismo un mecanismo catalítico común. Con el objetivo de comprobar esta hipótesis, y simultáneamente confirmar el modelo, realizamos mutagénesis sitio-dirigida de este conjunto de residuos. Generamos mutantes sobre el gen *glgA* de *E. coli* subclonado en el plásmido pAY3, reemplazando por Ala cada uno de los residuos mencionados. Dichas enzimas mutantes fueron sobreexpresadas y purificadas a homogeneidad siguiendo los protocolos descritos en la sección Materiales y Métodos. Una vez más, esta estrategia no fue empleada con el residuo Gly¹⁸, dado que no posee una cadena lateral, y en la estructura cristalina de la OtsA se puede observar que interactúa con el fosfato β del UDP a través del esqueleto carbonado.

Los parámetros cinéticos de las enzimas mutantes purificadas fueron determinados y los resultados se resumen en la Tabla 16. Todos los residuos mutados resultaron de importancia en catálisis, dado que el reemplazo por Ala de cualquiera de ellos generó una disminución de varios órdenes de magnitud en la actividad específica de la GS. Cuando se reemplazó el Asp¹³⁷, la actividad disminuyó 8140 veces. El reemplazo de la Arg³⁰⁰ o Lys³⁰⁵ por Ala generó enzimas con una actividad específica 2590 y 1240 veces menor, respectivamente. Finalmente, el reemplazo de la His¹⁶¹ produjo un descenso en la actividad específica de 710 veces. El residuo más crítico fue el Glu³⁷⁷, que cuando fue reemplazado por Ala generó una enzima con actividad específica cuatro órdenes de magnitud menor. Se descartó la posibilidad de que las mutaciones generaran variantes con plegado incorrecto, y que esa fuera la causa de la baja actividad específica, porque las afinidades aparentes de las enzimas por los sustratos no fueron alteradas severamente. La afinidad aparente por la ADP-Glc permaneció en el mismo rango que la enzima silvestre para las mutantes D137A y K305A, pero aumentó 11 y 8 veces respectivamente para las mutantes H161A y R300A. La afinidad aparente por el glucógeno no se vio disminuida por ninguna de estas mutaciones.

	Actividad específica			ADP-Glc			Glucógeno		
	V_{\max} (U/mg)		disminución (veces)	$S_{0.5}$ (μ M)		n_{11}	$S_{0.5}$ (μ g/ml)		n_{11}
GS	500	\pm 65	1	18	\pm 3	0.9	770	\pm 180	1.0
D137A	0.07	\pm 0.01	8140	21	\pm 4	1.1	91	\pm 10	1.2
H161A	0.8	\pm 0.1	710	200	\pm 16	1.0	52	\pm 8	0.8
R300A	0.22	\pm 0.02	2590	150	\pm 15	1.0	71	\pm 15	0.9
K305A	0.46	\pm 0.05	1240	32	\pm 5	1.0	39	\pm 8	0.9
E377A*	0.05	\pm 0.01	10000	70	\pm 20	1.1	27	\pm 2	1.0

* extraídos de la Tabla 12

Tabla 16: Parámetros cinéticos de la enzima silvestre y las mutantes. Los resultados son el promedio de tres o más experimentos independientes \pm desvío estándar. GS es la GS silvestre de *E. coli*.

En la Tabla 17 se detalla un alineamiento de las regiones que rodean a cada uno de estos residuos para la GS de *E. coli* y miembros de las familias GT3, GT4, GT5, GT20 y GT35. Dentro de cada una de las familias, el residuo señalado se encuentra absolutamente conservado. Primero se realizó un alineamiento cuidadoso de las secuencias dentro de cada familia, descartando todas las secuencias parciales y las enzimas putativas. A partir de ese alineamiento se pudo determinar cuáles eran los residuos conservados dentro de cada familia. Luego se realizó una predicción de estructura secundaria de miembros representativos de cada familia, utilizando el servidor de Internet PSI-PRED. Finalmente se alinearon los miembros de distintas familias, teniendo en cuenta las predicciones de estructura secundaria y, cuando estaban disponibles, los datos bioquímicos acerca de residuos particulares.

Estructura de la GS de *E. coli* y su relación con otras GT

La caracterización cinética de las mutantes individuales reveló la importancia de los residuos reemplazados por Ala. En todos los casos, las mutaciones disminuyeron la eficiencia catalítica en tres órdenes de magnitud o más, con un efecto mucho menor sobre las afinidades aparentes por los sustratos. Estos resultados indican que estos residuos tienen un papel crítico en la reacción catalítica. Por comparación con la estructura de MalP, era esperable que la Arg³⁰⁰, Lys³⁰⁵ y Glu³⁷⁷ fueran importantes en catálisis más que en unión de los sustratos. Los resultados obtenidos luego de reemplazar Arg⁵⁶⁹ por Gln o Lys⁵⁷⁴ por Arg en MalP fueron descensos drásticos en la eficiencia catalítica con cambios menores en las afinidades aparentes de los sustratos. En esta enzima, se postuló que estos residuos homólogos están involucrados en una red de cargas que mantiene una protonación balanceada en los fosfatos y estabiliza al estado de transición.

Inversamente, por inspección simple del modelo de homología de la GS de *E. coli* y las estructuras de OtsA y MalP, no era evidente que el Asp¹³⁷ o la His¹⁶¹ participaran en la reacción química. El modelo predice que Asp¹³⁷ interacciona con el O2 y O3 de la glucosa del extremo no reductor del glucógeno (aceptor). También predice que His¹⁶¹ forma un puente de hidrógeno con el O6 de la glucosa en la ADP-Glc (dador). Sin embargo, el reemplazo de His¹⁶¹ por Ala causó una disminución en la afinidad aparente por la ADP-Glc de un orden de magnitud, mientras la V_{\max} disminuyó 710 veces y la mutante D137A mostro una V_{\max} disminuida en 8100 veces. Esto indica que la función principal del Asp¹³⁷ y la His¹⁶¹ no es contribuir a disminuir la energía de unión de los sustratos.

Más probablemente, el papel principal de los residuos Asp¹³⁷ e His¹⁶¹, más que participar en la unión de los sustratos, sea colocar los sustratos en una posición correcta para la reacción y bloquearlos en esa posición, evitando cualquier tipo de desalineación en el sitio activo y movilidad en el estado estacionario. El posicionamiento correcto aceleraría por lo tanto la transformación química. Este fenómeno no es nuevo en este tipo de enzimas. De hecho, los resultados obtenidos con la mutante D137A concuerdan con los resultados informados para la mutación homóloga D308A en MalP. En ese caso, la k_{cat} disminuyó 141 y 153 veces en los sentidos de degradación y síntesis, respectivamente, mientras que los $S_{0.5}$ para los sustratos no se vieron modificados. En MalP se postuló que el Glu⁶³⁷ (homólogo al Glu³⁷⁷ de la GS de *E. coli*) posee un papel dual en el posicionamiento correcto del dador glucosídico, además de su

participación en la red de cargas. En las fosforilasas cristalizadas, este Glu interacciona con los O2 y O3 del producto Glc1P, y participa localizando el ligando glucosídico en la posición correcta para la catálisis. En la GS de *E. coli*, es probable que en papel del Glu³⁷⁷ no se limite solamente a su interacción con la Lys³⁰⁵. El efecto de la mutación E377A sobre la catálisis es incluso más importante que el de la mutación K305A, por un orden de magnitud (ver Tabla 16). La importancia del posicionamiento correcto de los sustratos para una eficiencia catalítica óptima ha sido enfatizada recientemente en una revisión (132).

Estos resultados derivados de experimentos de mutagénesis sitio-dirigida están en concordancia con la estructura de la OtsA, representante de la familia GT20. No hay datos bioquímicos disponibles acerca de ninguno de los residuos conservados en OtsA, pero la estructura cristalina proporciona información muy útil. OtsA fue cristalizada en el 2002, y las similitudes con la estructura de la MalP ya han sido destacadas (84). En la estructura cristalina en complejo con UDP y Glc6P se pueden observar las interacciones de residuos particulares con los ligandos. El Asp¹³⁰ (homólogo al Asp¹³⁷ de *E. coli*) interacciona con O2 y O3 de la Glc6P (la molécula aceptora). Los residuos Gly²², Arg²⁶² y Lys²⁶⁷ interaccionan con el fosfato distal del UDP, el cual estaría unido a la glucosa en el sustrato dador. His¹⁵⁴ estaría involucrada en la unión de la UDP-Glc a través del O6 del azúcar dador. Glu³⁷⁷ es reemplazado por Asp³⁶¹ en OtsA, manteniendo la carga negativa en esa posición, donde es necesaria para interaccionar con el O3 del azúcar dador y la Lys²⁶⁷.

Los residuos Asp¹³⁷, His¹⁶¹, Arg³⁰⁰ y Lys³⁰⁵, además del Glu³⁷⁷, son esenciales para la actividad de la GS de *E. coli*, de acuerdo a los resultados presentados hasta el momento. La importancia de este arreglo de residuos no sólo valida al modelo de homología, sino que también indica que la GS comparte la arquitectura de sus principales residuos involucrados en catálisis con la OtsA y la MalP. Esto sugiere fuertemente que la GS no sólo tiene una estructura tridimensional similar, sino también un mecanismo de reacción similar al de OtsA y MalP.

Además de las familias GT20 (OtsA) y GT35 (MalP) es interesante comparar estos resultados con otras familias de GT que retienen la configuración del sustrato y que tienen predicho un *fold* del tipo GT-B, pero de las cuales no existe aún una estructura cristalina resuelta. De acuerdo con trabajos anteriores (85), estas familias serían GT3, GT4, GT5, GT44 y GT32.

La familia GT3 abarca a las GS eucariotas, que utilizan la UDP-Glc como sustrato dador. Algunas regiones de las GS dependientes de UDP-Glc no son sencillas de alinear con las GS dependientes de ADP-Glc, para poder hacer comparaciones estructurales claras. Sin em-

bargo, es posible encontrar residuos homólogos a Gly¹⁸, Asp¹³⁷, His¹⁶¹, Arg³⁰⁰, Lys³⁰⁴ y Glu³⁷⁷ presentes en la familia GT3 (Tabla 16). Con este fin, es necesario asumir varias inserciones en la estructura de la familia GT3. MacGregor (90) ya había encontrado que ingresando la secuencia completa de la GS humana de músculo esquelético en programas como GenTHREADER no se obtenía similitud significativa con ninguna estructura conocida. Sin embargo, luego de eliminar de la secuencia aproximadamente 100 residuos en la zona central (residuos 373 a 468) y otros 100 residuos en el extremo C-terminal, se obtenían elevados niveles de similitud con MurG y una epimerasa que también presenta un *fold* de tipo GT-B (133). No existen trabajos que estudien estos residuos en GS eucariotas, con excepción del ya mencionado Glu⁵¹⁰ (homólogo del Glu³⁷⁷) en la GS humana (123).

La manosiltransferasa AceA, miembro de la familia GT4, ha sido estudiada y se ha predicho que su estructura tridimensional adoptaría un *fold* GT-B (126). El reemplazo de los residuos Lys²¹¹ y Glu²⁸⁷ por Ala (equivalentes a los residuos Lys³⁰⁵ y Glu³⁷⁷ en la GS de *E. coli*, ver Tabla 17) se reflejó en una pérdida completa de actividad tanto *in vivo* como *in vitro*. Por otra parte, la actividad de las mutantes D109A y H127A parcialmente purificadas (homólogas a D137A y H161A en la GS) no pudo ser detectada *in vitro*, pero dieron resultados positivos en un ensayo de complementación *in vivo* (126). Los residuos homólogos a Gly¹⁸ y Arg³⁰⁰ también están presentes en la secuencia y absolutamente conservados dentro de la familia GT4. Esta similitud, junto con la comparación de la predicción de estructura secundaria para AceA con las estructuras cristalinas de OtsA y MalP y el modelo de homología de la GS, indican que las manosiltransferasas de la familia GT4 también comparten esta misma arquitectura de su sitio activo.

Otros miembros importantes de la familia GT4 son las sacarosa sintetasas, las cuales catalizan la conversión reversible de sacarosa y UDP en UDP-Glc y fructosa. No hay disponibles en la literatura estudios que involucren residuos específicos, por lo cual no es posible hacer comparaciones con los resultados obtenidos con la GS de *E. coli*. Sin embargo, luego de realizar un alineamiento múltiple de todas las secuencias disponibles en las bases de datos de sacarosa sintetasas y sacarosa fosfato sintetasas, es posible encontrar conservado este mismo arreglo de seis residuos del sitio activo de la GS.

Las almidón sintetasas son los parientes funcionales más cercanos de las GS bacterianas y se encuentran clasificadas junto con ellas en la familia GT5. En un estudio de los residuos Asp y Glu conservados en la almidón sintetasa IIb de maíz (120), los residuos equivalen-

tes al Asp¹³⁷ y al Glu³⁷⁷ (Asp¹³⁹ y Glu³⁹⁷) fueron reemplazados por Asn/Glu y Gln/Asp, respectivamente. Las mutantes D139N y E397Q no mostraron actividad detectable en extractos crudos de células de *E. coli* sobreexpresando las enzimas mutantes. La mutante E391D mostró una disminución de la V_{\max} al 30% de la actividad de la enzima silvestre y la afinidad aparente por ambos sustratos resultó mas baja (120). Los resultados de este trabajo coinciden con los expuestos en relación al Asp¹³⁷ y Glu³⁷⁷ en la GS de *E. coli*.

En un estudio previo de la clasificación de las GT, las familias GT32 y GT44 fueron analizadas y se predijo su estructura terciaria como GT-B (85). No obstante, no queda claro que pertenezcan a esta categoría. Los programas GenTHREADER y Superfamily no encontraron parentesco alguno con enzimas con un *fold* del tipo GT-B entre las enzimas pertenecientes a las familias GT32 y GT44. No aparece ninguna estructura con un valor de E inferior a 0.17, lo cual es un nivel de confianza extremadamente bajo, y aún estas estructuras no poseen un *fold* GT-B. Además, las predicciones de estructura secundaria no concuerdan en la progresión de α -hélices y hojas plegadas β que se encuentran en las enzimas con un *fold* GT-B. Por este motivo, no fue posible encontrar homología alguna con los residuos estudiados en este trabajo.

Las GS bacterianas poseen un conjunto de residuos esenciales conservados presentes también en las maltodextrinas y glucógeno fosforilasas, las trehalosa-6-fosfato sintetasas, las GS dependientes de UDP-Glc, las α -manosiltransferasas de la familia GT4 y las sacarosa sintetasas. A pesar del hecho de que las glucógeno y maltodextrina fosforilasas, y la OtsA han sido cristalizadas (y, recientemente, una GS bacteriana (93)), la naturaleza del mecanismo de reacción y del estado de transición para estas enzimas no está esclarecido. Sin embargo, la correlación de residuos críticos en las mismas posiciones relativas, junto con el hecho de que la química de la reacción es común a todas estas familias de enzimas, indican la existencia de un mecanismo común. Aparentemente, este tipo de arquitectura del sitio activo sería compartida entre todas las GT con un *fold* GT-B que retienen la configuración del sustrato conocidas hasta la fecha.

Generación de un nuevo modelo de homología de la GS de *E. coli*

Recientemente ha sido resuelta la primer estructura cristalina de un miembro de la familia GT5, la estructura de la GS de *Agrobacterium tumefaciens* (93). La estructura de la proteína fue resuelta tanto sola como en presencia del producto ADP con una resolución de 2.3

Å. En la Figura 18 se encuentra representada la estructura de la GS de *A. tumefaciens* en presencia de ADP, reproducida a partir de las coordenadas depositadas en el PDB con el código 1rzu. La estructura está formada por dos dominios, cada uno de ellos con un *fold* de tipo Rossmann, como predecían los programas de *threading*, con una profunda fisura entre ellos que incluye al centro catalítico. El corazón del dominio N-terminal está formado por una serie de hojas plegadas β predominantemente paralelas, flanqueadas por varias α -hélices. El dominio C-terminal muestra un plegamiento tridimensional muy similar, con la última hélice cruzando sobre el dominio N-terminal, una característica típica del *fold* GT-B (88).

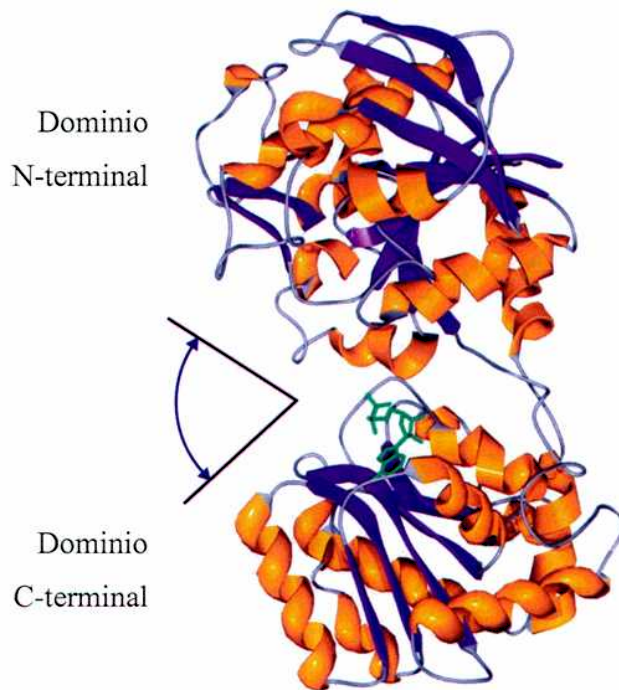


Figura 18: Representación de la estructura cristalina de la GS de *A. tumefaciens* (código de PDB 1rzu (93)). La doble flecha de color azul marca la hendidura entre los dos dominios. La molécula de ADP unida al dominio C-terminal se muestra en color verde.

La hendidura amplia y profunda entre los dos dominios sugiere que la enzima fue cristalizada en un estado “abierto”, relajado y probablemente inactivo. Los autores postulan la posibilidad de un movimiento de cierre, apoyados por la superposición de los dominios N- y C-terminal de otras enzimas con un *fold* GT-B (93). Las comparaciones muestran que sería necesaria una rotación de los dominios de 20-25° para llegar al estado “cerrado” o activo, lo cual hipotéticamente acercaría residuos críticos conservados para poder formar el centro activo funcionalmente competente. Los autores modelan el estado “cerrado” de la enzima generando una rotación entre dominios de 24°, lo cual optimiza las superposiciones de los dominios de la GS de *A. tumefaciens* con los de la MalP, y someten al modelo a una minimización de energía (93).

Cierta flexibilidad en la bisagra entre ambos dominios ha sido vista con anterioridad en este tipo de estructura, como es el caso de la ADN β -glucosiltransferasa del fago T4 (perteneciente a la familia GT63 que invierte la configuración estereoisomérica del sustrato), donde se produce una transición a una forma cerrada luego de la unión de los sustratos (134, 135). Si bien la GS abierta posee la capacidad de unir ADP, Buschiazzi y col. encontraron que, al sumergir el cristal de la GS de *A. tumefaciens* en una solución de ADP-Glc, o con ADP y maltodextrinas, se produce la disolución del cristal, sugiriendo que la unión de los sustratos promueve esta transición conformacional (93). Este mismo efecto había sido observado en la MalP al sumergir cristales nativos de esta enzima en una solución de oligosacáridos (136).

La GS de *A. tumefaciens* presenta un 45% de identidad con la GS de *E. coli*, lo que la convierte en un muy buen molde para modelar la enzima de *E. coli*. Sin embargo, un modelo basado en la estructura de la GS de *A. tumefaciens* también tendría la desventaja de no proveer información completa sobre la enzima en su forma activa, dado que ha sido resuelta únicamente sola o en presencia de ADP, mientras que el modelo de la GS basado en las estructuras de OtsA, MalP y MurG representa la forma cerrada unida a sustratos. Como la estructura resuelta de la GS de *A. tumefaciens* se encuentra en su forma ‘abierta’ o inactiva debido a la ausencia de los sustratos, para modelar la GS de *E. coli* se utilizaron en forma simultánea las estructuras de MalP (la cual se encuentra en su forma activa o ‘cerrada’ debido a la presencia de maltopentaosa en el cristal) y los dos dominios de la GS de *A. tumefaciens* por separado. A causa de la relativamente alta similitud de secuencia que hay entre ellas, es lógico suponer que un alineamiento cuidadoso de la GS de *E. coli* con la GS de *A. tumefaciens* será muy preciso. Para evitar que la estructura de la GS de *A. tumefaciens* aporte al modelo la información sobre las posiciones relativas entre ambos dominios (estructura “abierta”) se dividió a la secuencia de la GS de *A. tumefaciens* en sus dos dominios y se consideraron como dos proteínas separadas: desde el aminoácido 1 al 246, y del 247 al 477 (Figura 19 A). De esta manera, la estructura de MalP aporta información sobre la estructura global y las posiciones de los dominios, mientras que la estructura de la GS de *A. tumefaciens* aporta información más precisa sobre estructura local en cada uno de los dominios. Primero se realizó un alineamiento entre la secuencia de MalP y cada dominio por separado de la GS de *A. tumefaciens*. Este alineamiento fue verificado generando modelos de la GS de *A. tumefaciens* y comparándolos con las coordenadas de la estructura cristalina resuelta. El alineamiento se refinó en varios pasos sucesivos repetidos, generando en cada uno de ellos un nuevo modelo, comparando las coordenadas de

este modelo con las coordenadas de la estructura cristalina y realizando las modificaciones necesarias en el alineamiento. De esta manera, al obtener el mejor modelo posible de *A. tumefaciens*, se estaba obteniendo el mejor alineamiento posible de su secuencia con la secuencia de la MalP. Cuando el modelo de la GS de *A. tumefaciens* basado en la estructura de MalP arrojó resultados satisfactorios, se incorporó la secuencia general de la GS de *E. coli* en el alineamiento. El alineamiento entre la GS de *E. coli* y la GS de *A. tumefaciens* se refinó manualmente, teniendo en cuenta conservación en la familia GT5 y datos bioquímicos sobre residuos particulares.

El modelo final se observa en la Figura 19 B, y resultó muy similar al modelo realizado anteriormente con base en las estructuras de OtsA, MalP y MurG. El r.m.s.d. (*root mean square distance*, la raíz cuadrada de la distancia promedio entre los residuos de las dos estructuras al cuadrado) es una medida de similitud estructural, y el promedio entre ambos modelos es de 1.51 Å. La posición de todos los residuos del sitio activo estudiados en esta tesis se mantiene invariable en ambos modelos. Las escasas diferencias se encuentran en zonas donde la identidad de secuencia con las proteínas moldes para el primer modelo era escasa o nula.

Con el objeto de verificar la calidad de este modelo de homología, se enviaron las coordenadas al servidor SAVS (<http://shannon.mbi.ucla.edu/Services/SV/>), que a su vez las somete a varios programas de estimación de calidad de estructuras tridimensionales, entre ellos el Verify_3D. El método utilizado por el programa Verify_3D mide la compatibilidad de un modelo de una proteína (tanto un modelo de homología como una estructura de rayos X o de resonancia magnética nuclear) con su secuencia, utilizando un perfil tridimensional (3D). La posición de cada residuo en el modelo 3D se caracteriza por su entorno, y está representada por 20 números. Estos números son los valores 3D-1D que arroja el programa, y representan las preferencias estadísticas de cada uno de los 20 aminoácidos por un dado entorno. El entorno de cada residuo está definido por tres parámetros: el área del residuo que se encuentra enterrada dentro de la estructura, la fracción de la cadena lateral que está cubierta por átomos polares (O y N) y la estructura secundaria local. La Figura 19 C muestra el modelo de la GS de *E. coli* coloreado de acuerdo a estos valores 3D-1D. Los residuos coloreados en rojo son aquellos cuya probabilidad estadística de estar en un entorno como éste es baja para una estructura correcta (valor inferior a 0.2). Para este modelo de la GS de *E. coli*, los aminoácidos en esta situación representan menos del 4% de los residuos de la proteína. Los valores 3D-1D promediados que se ven graficados en la Figura 19 D representan el promedio de los valores 3D-1D

para una ventana de 21 residuos, y los valores para los primeros y los últimos nueve residuos carecen de significado (137). Estos valores no pueden ser menores a 0.0 en una estructura correctamente plegada, y en este caso todos superan el valor de 0.08. El valor S es la suma de todos los valores 3D-1D para la secuencia de aminoácidos de la proteína. Para una proteína de 477 aminoácidos, este valor debería caer entre 100 y 200 (137), y en este caso es de 188, lo cual es un indicador de un modelo de buena calidad.

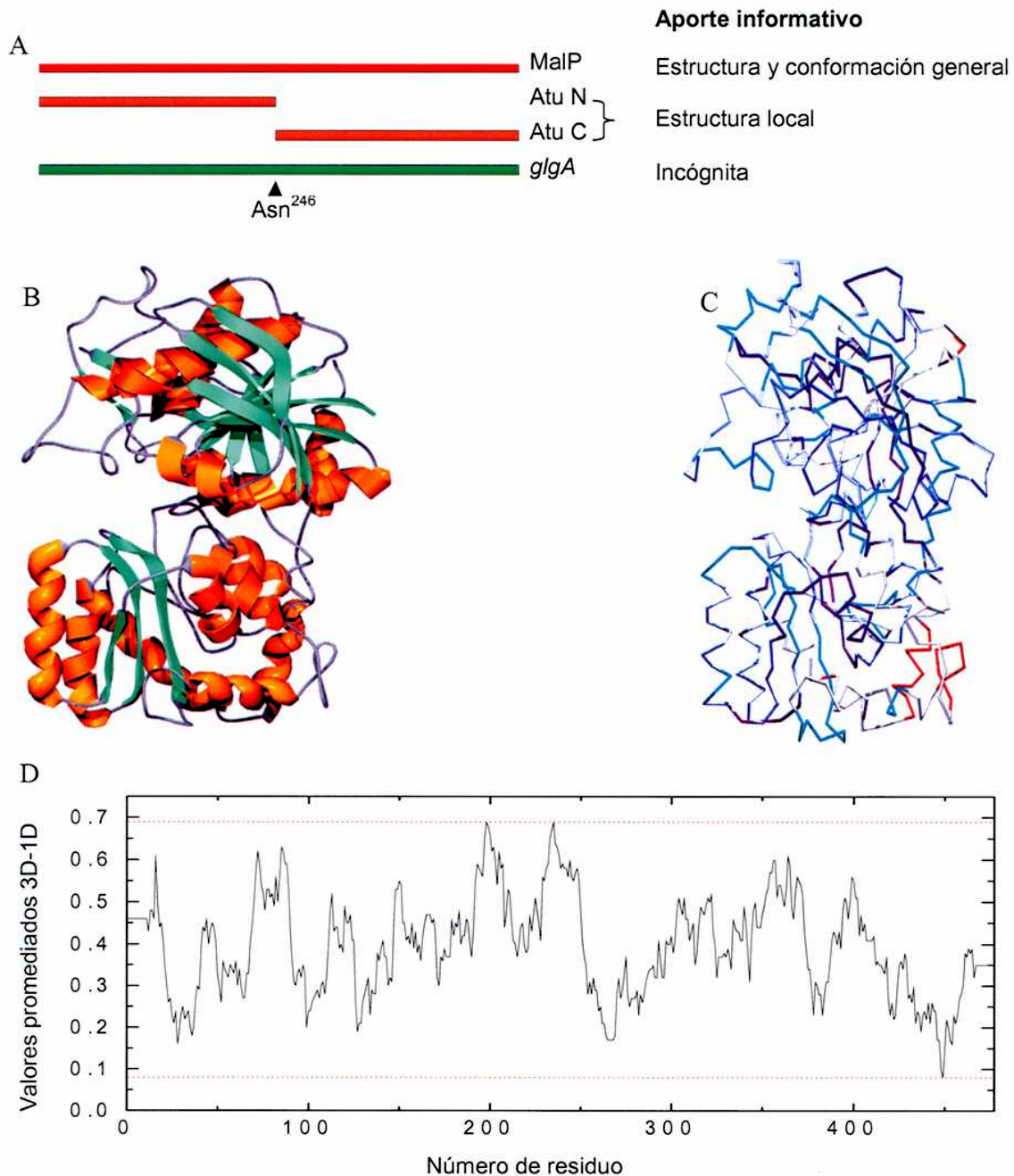


Figura 19: A) Esquema del alineamiento de las secuencias de MalP y la GS de *A. tumefaciens* con la secuencia de la GS de *E. coli*. Atu N y Atu C son los dominios N (aminoácidos 1 a 246) y C (aminoácidos 247 a 477) de la GS de *A. tumefaciens*, respectivamente. *glgA* es la secuencia de la GS de *E. coli*. B) Resultado de correr el modelo en el programa Verify_3D. Los valores por debajo de 0.0 son inaceptables en una estructura correctamente plegada. C) Modelo de homología de la GS de *E. coli* realizado en base a las estructuras resueltas de MalP y la GS de *A. tumefaciens*. D) Representación del esqueleto carbonado del modelo de homología de la GS de *E. coli*. En diversos tonos de violeta y celeste se observan las zonas donde la estructura es más confiable y en rojo las menos confiables, según el programa Verify_3D.

En la Figura 20 se muestra la comparación entre las estructuras de la GS de *A. tumefaciens* (abierta), un modelo de la GS de *E. coli* realizado únicamente en base a las coordenadas de la GS de *A. tumefaciens* (abierto) y el modelo de la GS de *E. coli* realizado en base a las coordenadas de MalP y la GS de *A. tumefaciens* (cerrada). La figura ilustra la gran diferencia en las posiciones relativas entre los dos dominios.

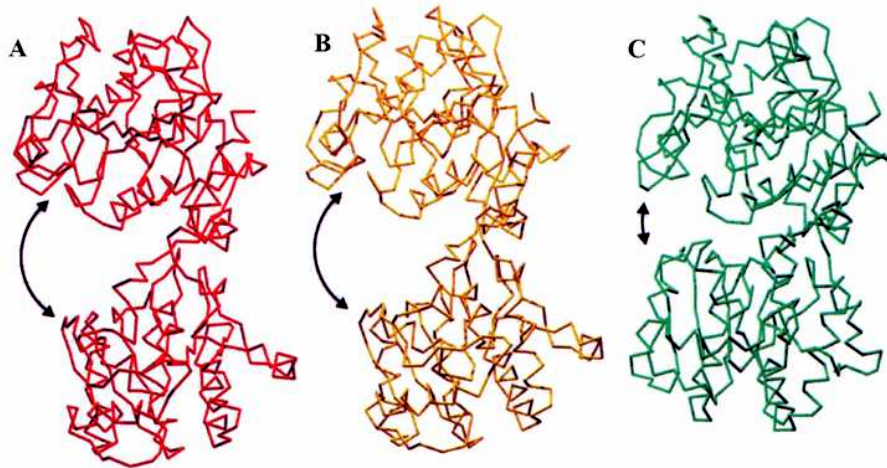


Figura 20: A) Estructura de la GS de *A. tumefaciens* en complejo con ADP (la molécula de ADP ha sido omitida en la representación). B) Modelo de homología de la GS de *E. coli* basado en las coordenadas de la GS de *A. tumefaciens*. C) Modelo de homología de la GS de *E. coli* basado en las coordenadas de MalP y la GS de *A. tumefaciens*.

Con el objetivo de analizar la existencia de zonas poco confiables en el modelo de homología, se generaron doce modelos diferentes a partir del mismo alineamiento. El programa Modeller puede obtener diversos modelos al agregar ligeras variaciones al azar en la estructura de la proteína molde y minimizar la energía. Superponiendo los modelos, se pueden identificar regiones que presentan una orientación aleatoria y diferenciarlas de las regiones invariables. En la Figura 21 se muestra una representación de doce de esos modelos superpuestos. La mayor parte del esqueleto carbonado no sufrió alteraciones en los distintos modelos. La zona de la abertura donde convergen los *loops* que albergan los residuos descriptos hasta el momento involucrados en catálisis se mantiene invariable, y la parte central de α -hélices y hojas plegadas β de ambos dominios tampoco parece alterarse de modelo a modelo. Básicamente, se pueden observar tres zonas más variables, que se representan en color rojo en la Figura 21, numeradas del 1 al 3. La zona marcada como región 1 corresponde a un *loop* ex-

puesto del dominio N-terminal, y la región variable parecen ser solamente los tres residuos el giro más externo del loop. La región 2 comprende el *loop* entre los residuos 258 y 266, y en esa zona MalP posee un *loop* más corto, por lo cual el alineamiento no puede hacerse, mientras que la GS de *A. tumefaciens* posee un *loop* más largo, dado que la hélice IIIH1 parece empezar más tarde en esta estructura. La última zona corresponde al *loop* comprendido por los residuos 409 y 415, después de la hoja plegada IIB6 (Figura 15).

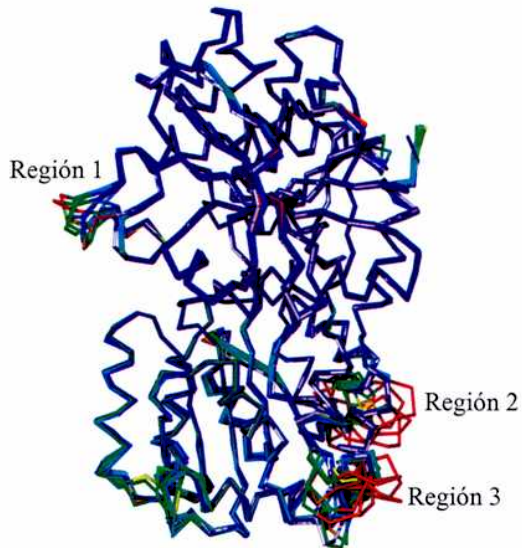


Figura 21: Representación de 12 modelos superpuestos de la GS de *E. coli* basados en las estructuras tridimensionales de MalP y la GS de *A. tumefaciens* (códigos de PDB 1rz5 y 1rzu, respectivamente). Los modelos superpuestos están coloreados de acuerdo al r.m.s.d. entre ellos, el color azul representa r.m.s.d. cercanos a cero, mientras que en rojo están representadas las zonas con un r.m.s.d. superior a 3 Å.

Ninguna de las zonas marcadas como altamente variables entre distintos modelos se encuentra en la cercanía de las regiones involucradas en unión de sustratos, sino que todas ellas se ubican en *loops* en la superficie externa de la proteína.

Estudio del sitio de unión de la ADP-Glc

En el modelo de la GS de *E. coli* basado en las estructuras de MalP y la GS de *A. tumefaciens* se pueden estudiar las posibles interacciones de la enzima con las moléculas de ADP (proveniente de la estructura de la GS de *A. tumefaciens*) y la maltopentaosa (proveniente de la estructura de la MalP). Para simplificar la nomenclatura, se utilizó la de Davies y col., donde los monómeros son numerados desde el extremo no reductor hacia el extremo reductor, y el lugar donde ocurre la reacción es entre los sub-sitios -1 y +1 (138). El esquema de dicha nomenclatura se muestra en la Figura 22.

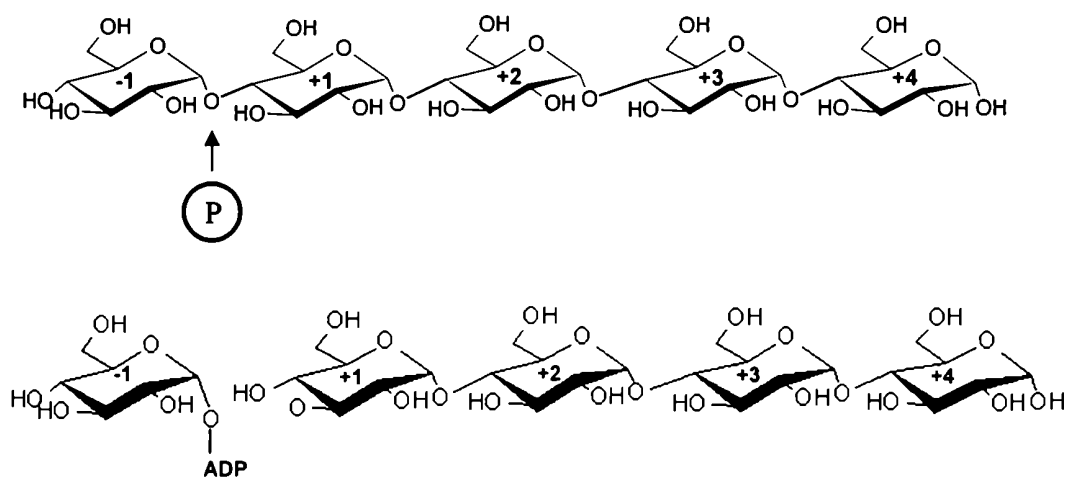


Figura 22: Esquema de los cinco residuos de glucosa en la maltopentaosa unida en la estructura de MalP. La reacción de fosforólisis ocurre entre los sub-sitios -1 y +1. Al modelar la maltopentaosa en la estructura de la GS, la posición -1 corresponde a la glucosa proveniente de la ADP-Glc que ha sido aceptada por la maltotetraosa.

El primer residuo de glucosa de la maltopentaosa se encuentra en la posición -1, es decir, se trata de la glucosa que ya ha sido aceptada por la maltotetraosa desde la Glc1P en la reacción de síntesis de la MalP o bien la glucosa que va a ser fosforolizada en la reacción inversa. En el modelo de la GS, esa glucosa equivale a la glucosa aceptada por la maltotetraosa desde la ADP-Glc. En la Figura 23 se observa el ADP proveniente de la estructura de la GS de *A. tumefaciens*, la glucosa en posición -1 de la maltopentaosa en el modelo de homología de la GS de *E. coli*, y los residuos de la GS de *E. coli* estudiados en relación al sitio de unión de la ADP-Glc. La Lys¹⁵ ya fue estudiada con anterioridad e involucrada en la unión de este sustrato (116, 117).

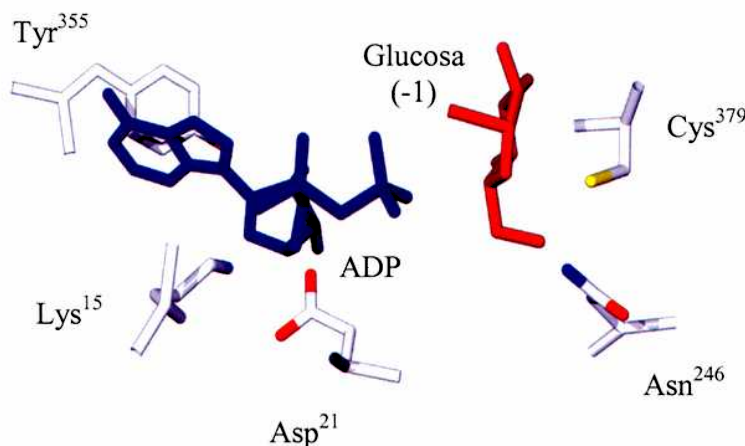


Figura 23: Representación de aminoácidos en el sitio de unión de la ADP-Glc en el modelo de la GS de *E. coli*. En color azul esta representada la molécula de ADP unida a la estructura de la GS de *A. tumefaciens*. En color rojo está representada la primera molécula de glucosa de la maltopentaosa unida a la estructura de MalP (posición -1). Para simplificar la figura, se han omitido los residuos Gly¹⁸, His¹⁶¹, Arg³⁰⁰, Lys³⁰⁵ y Glu³⁷⁷, que también interaccionarían con la ADP-Glc. La representación de la interacción de estos residuos con el sustrato se muestra en la Figura 17.

Los residuos representados en la Figura 23 están conservados dentro de la familia GT5, con excepción de la Tyr³⁵⁵ que puede ser Tyr o Phe, y en parte de las almidón sintetasas está reemplazada por otros aminoácidos. En la Tabla 18 se muestra un alineamiento múltiple en la región que rodea a cada uno de los aminoácidos entre diversas fuentes representativas de la familia GT5. El Asp²¹ se encuentra reemplazado por un Glu en ciertos miembros de las arqueobacterias, pero en toda la familia GT5 se mantiene un residuo ácido en esa posición. Algunos de estos residuos también se encuentran conservados en otras familias de GT, como la Asn²⁴⁶ en la familia GT35. Sin embargo, como los miembros de la familia GT5 son las únicas GT que utilizan ADP-Glc como dador glucosídico, las posibles comparaciones en el sitio de unión del sustrato entre miembros de distintas familias se encuentran limitadas.

La Cys³⁷⁹ varía levemente su posición entre los diversos modelos de homología de la GS de *E. coli* generados, posiblemente debido a que no existe un residuo homólogo en las proteínas molde. Dependiendo del modelo, aparece formando puentes de hidrógeno con el O4 o el O6 de la glucosa que proviene de la molécula dadora, y con la Asn²⁴⁶, la cual a su vez también formaría un puente de hidrógeno con el O6 de la glucosa en la ADP-Glc. Esto es consistente con los datos cinéticos que muestran un aumento en el $S_{0.5}$ para la ADP-Glc cuando este residuo es reemplazado por Ser o Ala, y con el hecho de que la ADP-Glc protege a este re-

siduo de la modificación química con DTNB o IAA (Tabla 5, Figura 6 y Figura 7). También está de acuerdo con los datos de inhibición competitiva con AMP y Glc1P en la enzima silvestre y la mutante C379A, que mostraron que la Cys³⁷⁹ interacciona con la ADP-Glc a través de la porción fosfoglucona de la misma (Figura 11, Figura 12 y Tabla 9).

GS	K ¹⁵ TGGLAD ²¹ VIGAL	GVLN ²⁴⁶ GVDEK	VQIGY ³⁵⁵ HEAF
Atu	K ¹⁵ TGGLAD ²¹ VVGAL	GIVN ²⁴⁶ GIDAD	VAIGY ³⁵⁴ NEPL
Bsu	K ¹⁵ SGGLAD ²¹ VAGAL	GILN ²⁴⁷ GIDDT	AYIGF ³⁵⁷ DEPL
AraSSI	K ⁷⁹ TGGLGD ⁸⁵ VCGSL	GITN ³³⁵ GINVD	GWVGF ⁴⁴⁴ NVPI
OrySSII	K ³³³ TGGLGD ³³⁹ VAGAL	GIVN ⁵⁷³ GIDYR	GWVGF ⁶⁸⁷ SVKM
GBSSI	K ⁹¹ TGGLGD ⁹⁷ VLGGL	GIVN ³⁴⁷ GMDVS	AVVRF ⁴⁵⁸ NAPL

Tabla 18: Comparación de secuencias de aminoácidos en las regiones que flanquean a los residuos posiblemente involucrados en interacciones con la ADP-Glc de la GS de *E. coli* y otros miembros de la familia GT5. Un alineamiento para la región que incluye a la Cys³⁷⁹ se encuentra en la Tabla 10. Las abreviaturas corresponden a las siguientes fuentes: GS, GS de *E. coli*; Atu, GS de *A. tumefaciens*; Bsu, GS de *Bacillus subtilis*; AraSSI, almidón sintetasa soluble SSI de *A. thaliana*; OrySSII, almidón sintetasa soluble SSII de *Oryza sativa*; GBSSI, almidón sintetasa unida a gránulo GBSSI de *Triticum aestivum*.

Para comenzar a estudiar la posibilidad de que los otros residuos mostrados en la Figura 23 interaccionen con el sustrato ADP-Glc, se reemplazó cada uno de ellos en forma separada por Ala en la construcción pAY3, y las correspondientes enzimas mutantes fueron purificadas a homogeneidad para estudiar sus propiedades cinéticas. Los resultados de esta mutagénesis sitio-dirigida se resumen en la Tabla 19.

	Actividad específica			ADP-Glc			Glucógeno				
	V_{max} (U/mg)	disminución (veces)		$S_{0.5}$ (μ M)	aumento (veces)		$S_{0.5}$ (μ g/ml)				
GS	500	±	65	1	11	±	3	1	770	±	180
D21A	40	±	1	12	200	±	25	18	243	±	25
N246A	240	±	20	2.1	500	±	90	45	376	±	33
Y355A	206	±	17	2.4	342	±	40	31	567	±	42
C379A [†]	130	±	9	3.8	850	±	32	77	220	±	30

[†] Datos extraídos de Tabla 5

Tabla 19: Propiedades cinéticas de mutantes de la GS de *E. coli*.

Los residuos analizados por mutagénesis sitio-dirigida en esta sección de la tesis están probablemente involucrados en la unión de la ADP-Glc, dado que el reemplazo de cualquiera de ellos por Ala provocó una disminución en la afinidad aparente de la enzima por la ADP-Glc (Tabla 19). Las mutaciones generaron aumentos en los $S_{0.5}$ para ADP-Glc que van de las 18 a las 77 veces, sin disminuir la afinidad por el glucógeno. La actividad específica de las enzimas mutantes no sufrió cambios importantes, con excepción de D21A, la cual exhibió una V_{\max} 12 veces menor que la de la enzima silvestre. Todos estos residuos aparecieron interaccionando con este sustrato en los dos modelos de homología de la GS de *E. coli*, y los equivalentes a la Asn²⁴⁶ y a la Tyr³⁵⁵ están involucrados en esta interacción en la estructura cristalina de la GS de *A. tumefaciens* en complejo con ADP (93).

En la Figura 24 se representan las variaciones del parámetro $k_{\text{cat}}/S_{0.5}$ en las distintas mutantes para cada uno de los sustratos, comparadas con la enzima silvestre. Se observa que, mientras este parámetro se mantiene con variaciones menores entre la enzima silvestre y las mutantes para el glucógeno, para la ADP-Glc las disminuciones se encuentran entre 1.5 y 2 órdenes de magnitud, indicando que el efecto principal de estas mutaciones es sobre la afinidad por este último sustrato.

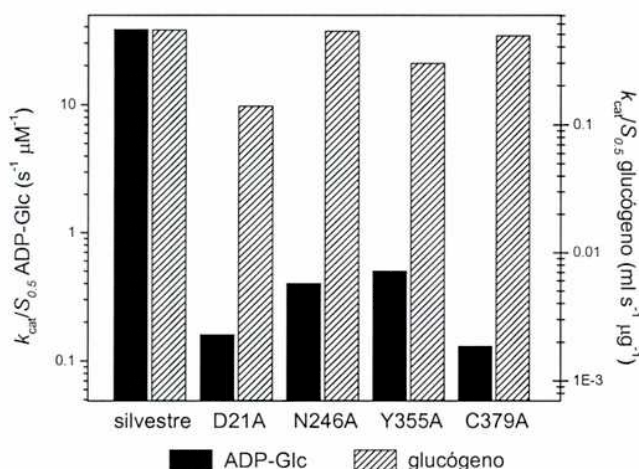


Figura 24: Representación de los valores de $k_{\text{cat}}/S_{0.5}$ de las distintas mutantes para la ADP-Glc y el glucógeno.

Existen muy pocos datos bioquímicos disponibles acerca del sitio de unión del nucleótido azúcar en GT con un *fold* GT-B. El único residuo descrito hasta el momento como participante del sitio de unión de la ADP-Glc en GS bacterianas es la Lys¹⁵, la cual forma parte del motivo conservado K¹⁵XGGL, y ha sido estudiada por Furukawa y col. en la GS de *E. coli* (116, 117). El reemplazo de Lys¹⁵ por Gln o Glu generó aumentos en el $S_{0.5}$ para ADP-Glc de 32 y 46 veces, respectivamente (117).

Por otra parte, si bien existen datos estructurales disponibles, éstos no son completamente esclarecedores. En la estructura cristalina de la GS de *A. tumefaciens* se pueden ver las interacciones del ADP sólo con residuos pertenecientes al dominio C-terminal. Las interacciones del dominio N-terminal con el sustrato, y las de la proteína en general con la porción glucosídica de la ADP-Glc, son sugeridas en base al modelo de la enzima cerrada generado en base a la estructura de MalP (93).

Resulta interesante buscar los residuos análogos a los estudiados en la estructura de la OtsA, la única de las GT que retienen la configuración del sustrato con *fold* GT-B que ha sido cristalizada en presencia de un nucleótido azúcar. La estructura fue resuelta recientemente en complejo con UDP-Glc y 1-deoxi-Glc6P (139) mientras que anteriormente había sido resuelta en presencia de UDP y Glc6P (84). Lamentablemente, esta nueva estructura no reveló la densidad electrónica para la Glc6P en el sitio del aceptor, pero sí ofrece una muy buena resolución (2 Å) para el sitio de unión de la molécula dadora. La cadena lateral de la His¹⁵⁴ forma un puente de hidrógeno con el hidroxilo O6 de la glucosa, en una interacción idéntica a la observada en las glucógeno y maltodextrina fosforilasas entre el residuo de His equivalente y el O6 de la molécula de Glc1P (91, 92). Esta interacción involucra a la His¹⁶¹ en el modelo de la GS de *E. coli*, y las consecuencias de realizar mutagénesis sitio-dirigida en esta posición han sido discutidas anteriormente. Sin embargo, como fue discutido con anterioridad, si bien la mutación H161A generó un aumento de aproximadamente 11 veces en el $S_{0.5}$ de la ADP-Glc, el principal efecto de esta mutación fue la disminución de la V_{max} en 710 veces (Tabla 16).

El O6 también interacciona con la cadena lateral de la Gln¹⁸⁵ en OtsA. El equivalente estructural de esta Gln en el modelo de la GS de *E. coli* es la Val²¹¹, un residuo absolutamente conservado en la familia GT5 (Figura 25). Sin embargo, el reemplazo de este residuo por Ala no modificó la actividad específica ni la afinidad por los sustratos (datos no mostrados). En las fosforilasas, esta interacción no ocurre con el equivalente estructural de la Gln¹⁸⁵, sino con una Asn que proviene de una parte diferente de la molécula, localizada en el largo *loop* que conecta ambos dominios (posterior a IB7 en la Figura 15). Esto es lo mismo que ocurre en el modelo de la GS de *E. coli*, donde esa interacción con el O6 de la parte glucosídica de la ADP-Glc se da aparentemente con la Asn²⁴⁶ (Figura 25). La mutación N246A generó una disminución de 45 veces en la afinidad aparente por la ADP-Glc, y una V_{max} 2 veces menor que la de la enzima silvestre (Tabla 19).

En la estructura de la OtsA, el O3 está involucrado en una interacción con el Asp³⁶¹, localizado en el *loop* entre IIB4 y IIH4 (Figura 15), y estructural y químicamente equivalente a la interacción de este O3 con un Glu en las fosforilasas, y con el Glu³⁷⁷ en la GS de *E. coli*, todos ellos situados en un *loop* equivalente entre las estructuras o modelo respectivos. La estructura cristalina de la OtsA también muestra una serie de interacciones del O3 y O4 con varios grupos amido que forman parte del esqueleto carbonado (139). Las consecuencias de reemplazar al Glu³⁷⁷ por Ala en la GS de *E. coli* también han sido discutidas con anterioridad y se observan principalmente en catálisis (Tabla 15).

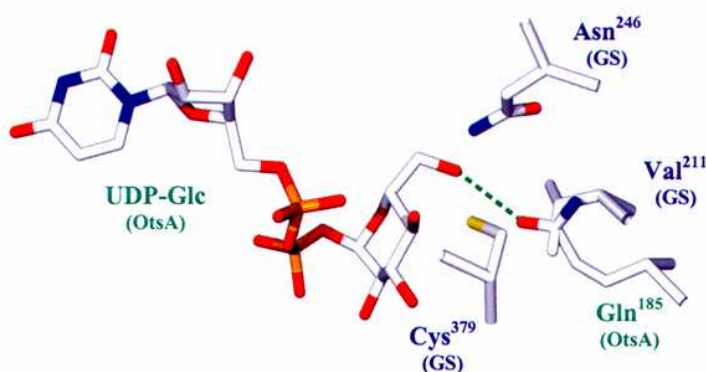


Figura 25: Representación de las interacciones con la glucosa del nucleótido azúcar en la estructura de OtsA y el modelo de homología de la GS de *E. coli*. La molécula de UDP-Glc proviene de la estructura de OtsA en complejo con UDP-Glc y 1-deoxi-Glc6P (código de PDB 1uqu)

Las interacciones principales con los fosfatos en la estructura de OtsA se dan a través de los residuos Gly²², Arg²⁶² y la Lys²⁶⁷, los equivalentes estructurales de la Gly¹⁸, Arg³⁰⁰ y Lys³⁰⁵ en la GS de *E. coli*, los cuales ya han sido discutidos en la presente tesis. Este conjunto de residuos parece repetirse de forma invariante en la interacción de la enzima con los fosfatos en las glucosiltransferasas con *fold* GT-B que retienen la configuración de sustratos.

Dos residuos aparecen interactuando con la ribosa en la estructura de OtsA: la Gly²¹, equivalente a la Gly¹⁷ y también altamente conservada (las dos Gly del motivo KXGGL), y el Glu³⁶⁹. El Glu³⁶⁹ forma parte de un motivo al que se hace referencia en la literatura como GPGTF (por *glycogen phosphorylase/glycosyl transferase*) (88). Este motivo, también referido en muchos trabajos como el motivo E-X₇-E (82), consiste en un residuo conservado D/E/K localizado en el medio de la hélice IIH4 (posición 1) y un D/E conservado en el *loop* entre la hoja plegada IIB4 y la hélice IIH4 (posición 2) (Figura 15). La posición 2 corresponde al

Glu³⁷⁷ en la GS de *E. coli*, su conservación ha sido destacada y su importancia en catálisis ha sido sugerida o demostrada en distintas familias de GT con un *fold* GT-B, como la GT3 (123), GT4 (126), GT35 (140) y GT5 (esta tesis y (120)). Muchas GT con un *fold* GT-B, independientemente de si su mecanismo opera con retención o inversión de la configuración, poseen un residuo ácido en la posición 1. Ejemplos de esto son MurG (125), la β -glucosiltransferasa del fago T4 (141), y OtsA (84). En estas estructuras, el residuo ácido de la posición 1 ha sido implicado en interacciones con el anillo de ribosa en una molécula de UDP-Glc. En la OtsA, la posición 1 del motivo GPGTF corresponde al Glu³⁶⁹, el cual forma dos puentes de hidrógeno con los O2 y O3 de la ribosa. Las glucógeno y maltodextrina fosforilasas presentan un residuo conservado de Lys en esta posición, a la que se encuentra unido covalentemente el cofactor piridoxal fosfato, el cual está involucrado en catálisis. En la familia GT5 no se encuentra un residuo ácido en esta posición, sino una Tyr. Esta Tyr (posición 385 en la GS de *E. coli*) se encuentra cercana al O2 y el O3 de la ribosa. Sin embargo, no se observan interacciones entre este residuo y el ADP en la estructura cristalina de la GS de *A. tumefaciens* (93). Por otra parte, este residuo no se encuentra conservado dentro de la familia GT5, y puede ser reemplazado por una gran variedad de cadenas laterales. El reemplazo de la Tyr³⁸⁵ por Ala en la GS de *E. coli* no generó cambios significativos en los parámetros cinéticos comparados con los de la enzima silvestre (datos no mostrados). Resulta interesante ver que, en el modelo de la GS de *E. coli*, otro aminoácido que proviene del dominio N-terminal parece estar también involucrado en la interacción con la ribosa (Figura 26). Este residuo es el Asp²¹, el cual se encuentra situado en el comienzo de la hélice IH1 (nomenclatura de la Figura 15). Esta hélice se acerca al dominio C-terminal en forma simultánea con el acercamiento de la Gly¹⁸ para interactuar con el fosfato distal. Las familias GT3 y GT4 no poseen un residuo conservado en la posición del Asp²¹, pero en ambas está presente el motivo E-X₇-E.

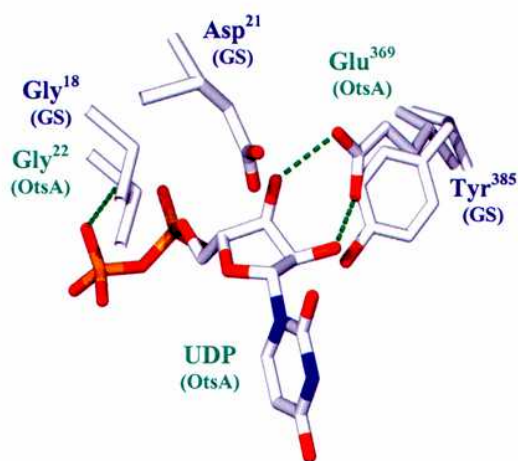


Figura 26: Representación de las interacciones con la ribosa en la estructura de OtsA y el modelo de homología de la GS de *E. coli*. La molécula de UDP proviene de la estructura de OtsA, código de PDB 1gz5.

Los resultados de reemplazar el residuo Asp²¹ en la GS de *E. coli* por Ala son consistentes con este modelo. La enzima mutante D21A presenta una disminución en la afinidad por la ADP-Glc de 18 veces, junto con una disminución en la actividad específica de 20 veces (Tabla 19). Además, este residuo se encuentra conservado en la familia GT5 (Tabla 18). En un estudio de modificación química de la almidón sintetasa de maíz Iib-2 con EDAC (que modifica residuos acídicos) se observó que este reactivo inactivó a la enzima en forma dependiente de la concentración y tiempo de incubación. La ADP-Glc protegió completamente a la almidón sintetasa de dicha inactivación, sugiriendo que al menos un Asp o un Glu participa en la unión de dicho sustrato. En los subsiguientes estudios de mutagénesis de residuos ácidos conservados, los autores identificaron tres residuos conservados importantes para la actividad enzimática: Asp²¹, Asp¹³⁹ y Glu³⁹¹ (equivalentes a Asp²¹, Asp¹³⁷ y Glu³⁷⁷ en la GS de *E. coli*). La mutante D21N mostró un descenso de 27 veces en la V_{\max} y un aumento de 10 veces en el $S_{0.5}$ de la ADP-Glc, mientras que la mutante D21E presentó una V_{\max} 8 veces menor sin mayores cambios en la afinidad por la ADP-Glc (120). Los autores sugieren en base a estos datos, y por la cercanía de este residuo con la Lys¹⁵, que el Asp²¹ podría estar interaccionando con el anillo de adenina. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos con la GS de *E. coli*, si bien en este caso no se estudió el reemplazo del Asp²¹ por otros residuos más allá de Ala, y los datos de modelado sugieren que este residuo podría interaccionar con el O2 u O3 de la ribosa, o ambos.

Las interacciones de la GS de *A. tumefaciens* con la ribosa del ADP que se pueden inferir de la estructura cristalina y del modelo de la estructura cerrada son entre el O2 y esqueleto carbonado, y entre la Lys¹⁵ y el oxígeno endocíclico. En la estructura de la OtsA, la Gly²¹, equivalente a la Gly¹⁷ en la GS de *E. coli*, que también está conservada en las familias de GT

como parte del motivo KXGGL, es la que aparece interaccionando con el O del ciclo de la ribosa (142).

Las interacciones con la base nitrogenada no parecen ser muy específicas en las GT cristalizadas. En el caso de OtsA, donde la base nitrogenada es el uracilo, la especificidad está dada por interacciones del O4 y el N3 con el amido y el carbonilo de la cadena principal de un residuo de Phe. No parece haber ninguna interacción de la enzima con el O2, con lo cual los autores sugieren que se podría modelar el GDP en lugar de UDP con el N1 y el O6 de la guanina tomando el lugar del N3 y O4 del uracilo (84). En la estructura de la GS de *A. tumefaciens* el heterociclo de la adenina es estabilizado por una interacción hidrofóbica con una Tyr paralela al anillo (correspondiente a la Tyr³⁵⁵ en la GS de *E. coli*), e interacciones adicionales de van der Waals con dos Ser no conservadas. El resto de las interacciones son débiles puentes de hidrógeno entre los átomos N1 y N6 del heterociclo de la adenina y los grupos carbonilo y amido en el esqueleto carbonado de los residuos adyacentes a la Tyr (93). El efecto de reemplazar la Tyr³⁵⁵ por Ala es un aumento de 31 veces en el $S_{0.5}$ para la ADP-Glc, y una disminución de 2.4 veces en la V_{\max} comparado con la enzima silvestre, lo cual sugiere que participa en la unión del sustrato. Si la Tyr³⁵⁵ se encuentra estabilizando al anillo de adenina mediante una interacción hidrofóbica, es posible que el reemplazo por otras cadenas laterales aumente aún más este efecto.

Un análisis de los complejos cristalizados proteína-ligando en enzimas que unen adenina, bajo la forma de ATP, CoA, NAD, NADP o FAD, reveló una geometría común para la unión de esta base nitrogenada (143). Las características principales del motivo son que únicamente utiliza (a) interacciones polares con el esqueleto carbonado, las cuales no dependen de la secuencia proteica o de las propiedades particulares de las cadenas laterales de los aminoácidos involucrados, y (b) interacciones hidrofóbicas no específicas. Probablemente por estas razones este motivo es utilizado por diferentes proteínas con funciones muy diversas para unir ligandos conteniendo un grupo adenilato. Una de las características de la región de reconocimiento de adenina identificada por los autores en trabajos anteriores (144), es la existencia de tres residuos de un *loop* (el “*loop* de unión a adenina”). Este *loop* forma dos puentes de hidrógeno clave con el nitrógeno N1 y el grupo NH₂ del anillo de la adenina a través del esqueleto carbonado. Existen dos configuraciones posibles para este *loop*. La “directa” involucra al grupo carbonilo del primer residuo y al grupo amido NH del tercer residuo del *loop*. El segundo residuo es casi siempre un anillo aromático, que se coloca en forma paralela al anillo de la adenina.

La configuración “inversa” involucra solamente a este residuo aromático que, además de las interacciones hidrofóbicas, interacciona por puentes de hidrógeno a través de sus propios grupos amido y carbonilo. En la estructura de la GS de *A. tumefaciens* se repite este motivo, con los residuos 353, 354 y 355 en las posiciones 1, 2 y 3 del “loop de unión a adenina” en su configuración “directa”, respectivamente (ver ref. 93). También en el modelo de la GS de *E. coli* parece repetirse el mismo motivo, involucrando en este caso a los residuos Gly³⁵⁴, Tyr³⁵⁵ y Asn³⁵⁶. Es muy difícil de probar, utilizando técnicas de mutagénesis sitio-dirigida, la existencia de una interacción entre el esqueleto carbonado y el anillo de adenina y, en caso de existir, si la interacción ocurre a través de los grupos carbonilo y amido de la propia Tyr³⁵⁵ o si la proveen los residuos contiguos.

En la Figura 27 se puede ver un esquema mostrando todas las posibles interacciones discutidas hasta el momento entre la GS de *E. coli* y la molécula de ADP-Glc en el modelo. Los residuos representados en color rojo están involucrados en una interacción similar en la estructura cristalina de la GS de *A. tumefaciens*, mientras que las interacciones de los residuos representados en color azul aparecen en el modelo de homología de la GS de *E. coli* y no son visibles en la estructura de la GS de *A. tumefaciens*, si bien algunas de ellas pueden deducirse del modelado de la estructura cerrada. Las interacciones del Asp²¹ y la Cys³⁷⁹ no se muestran debido a que existe cierta variación entre los distintos modelos generados con respecto a la porción de la molécula involucrada. En el caso del Asp²¹ no está definido si la interacción es con el O2 de la ribosa, el O3, o ambos, mientras que la Cys³⁷⁹ podría interaccionar con el O4 o el O6 de la glucosa. Los datos experimentales presentados en esta tesis aportan validez a este modelo del sitio de unión de la ADP-Glc. Con excepción de los aminoácidos que interaccionan con el sustrato a través del esqueleto carbonado, los residuos esquematizados en la Figura 27 han sido estudiados por mutagénesis sitio-dirigida, y la posibilidad de su participación ya sea en catálisis o en unión de la ADP-Glc se encuentra reforzada por los datos bioquímicos obtenidos.

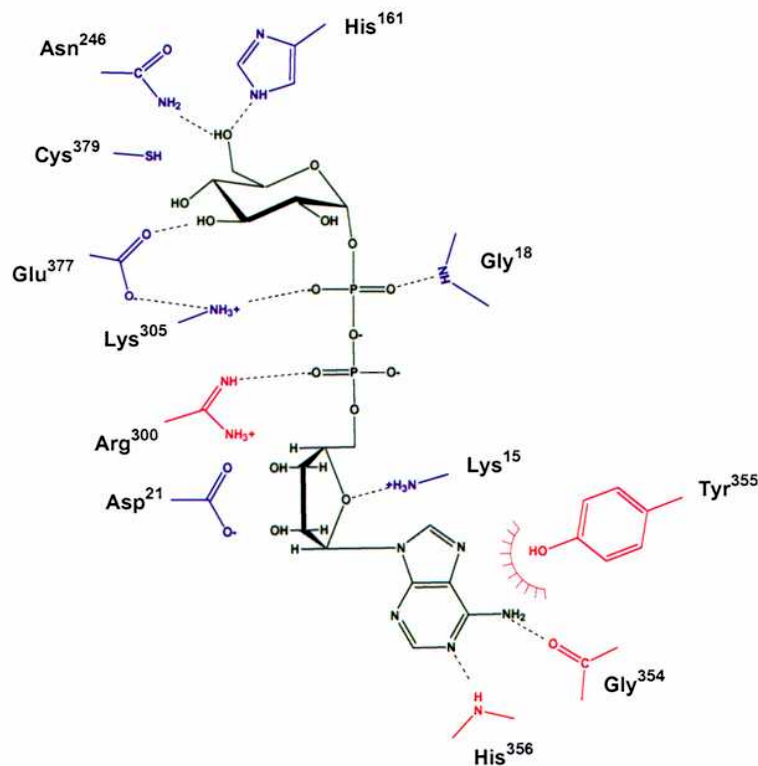


Figura 27: Representación esquemática del posible sitio de unión de la ADP-Glc en el modelo de la GS de *E. coli*. En color rojo se encuentran aquellos residuos cuya interacción con la ADP-Glc se puede observar en la estructura de la GS de *A. tumefaciens*. En color azul están representados los residuos cuyas interacciones con el sustrato se deducen del modelo de homología, y que se encuentran apoyadas por los datos bioquímicos presentados en esta tesis.

Se ha informado que ciertas GS pertenecientes a arqueobacterias son más promiscuas con respecto al nucleótido azúcar, pudiendo sintetizar glucógeno tanto a partir de ADP-Glc como de UDP-Glc (46). También ha sido observada síntesis de glucógeno a partir de UDP-Glc, y no a partir de ADP-Glc, en la bacteria ruminal *P. bryantii* (43). Mediante estudios utilizando Glc1P marcada radiativamente los autores muestran que la Glc1P es convertida en UDP-Glc y éste sirve como precursor inmediato para la síntesis de glucógeno. Por otra parte, los autores no detectan actividad de ADP-Glc pirofosforilasa en los cultivos de *P. bryantii* (43). Estas GS bacterianas que poseen hipotéticamente la capacidad de utilizar ambos nucleótidos azúcar, o una que utilice exclusivamente UDP-Glc serían de especial interés para el estudio de los residuos que determinan especificidad de sustrato. En particular, si los resultados en el organismo *P. bryantii* se confirman, el camino metabólico de síntesis de glucógeno

en su totalidad sería de gran interés, dado que parece ser diferente al de las bacterias descritas hasta el momento.

Estudio del sitio de unión del aceptor en la GS de *E. coli*

Con el objeto de intentar identificar áreas de la proteína involucradas en unión a sustratos, se realizó una proteólisis parcial de la GS de *E. coli* en ausencia y presencia de los mismos. La GS de *E. coli* pura fue incubada con proteinasa K (PK), tripsina, quimotripsina, subtilisina y elastasa en ausencia y presencia de sustratos. En la Figura 28 se observan los resultados de la digestión con proteasas. El patrón de corte de la tripsina, quimotripsina, subtilisina y elastasa no se vieron modificados por la presencia de los sustratos. Sin embargo, la digestión de la GS de *E. coli* con proteinasa K generó una en tres fragmentos. No se observaron modificaciones cuando la digestión se realizó en presencia de ADP-Glc hasta una concentración de 50 mM. Sin embargo, cuando se incubó con proteinasa K en presencia de 5 mg/ml de glucógeno, se observó protección en uno de los cortes y uno de los fragmentos no fue generado. Este fragmento fue electrotransferido a una membrana de PVDF y enviado a secuenciación a partir de su extremo N-terminal. El resultado fue la determinación de la secuencia AYTDN que sitúa al corte con proteinasa K entre Phe¹⁰¹ y Ala¹⁰².

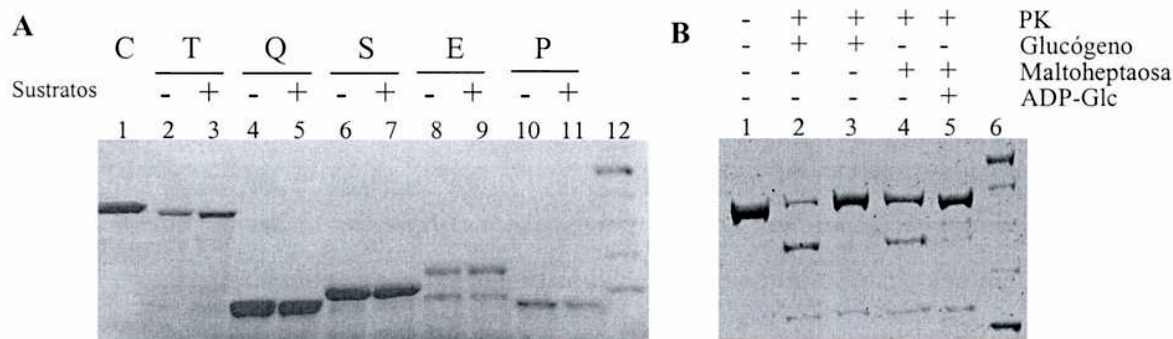


Figura 28: SDS-PAGE. A) 5 µg de la GS de *E. coli* fueron incubados con distintas proteasas en las condiciones indicadas en Materiales y Métodos, en presencia o ausencia de sustratos, y los fragmentos separados por electroforesis en gel de poliacrilamida. Las muestras 3, 5, 7, 9 y 11 fueron incubadas con las proteasas en presencia de ADP-Glc 10 mM y glucógeno de hígado de conejo 10 mg/ml. 1, control; 2 y 3, tripsina; 4 y 5, quimotripsina; 6 y 7, subtilisina; 8 y 9, elastasa; 10 y 11, papaina; 12, marcador de pesos moleculares. B) 5 µg de la GS de *E. coli* fueron incubados con PK. 1, control; 2, PK; 3, PK + glucógeno de hígado de conejo 10 mg/ml; 4, PK + maltoheptaosa 10 mM; 5, PK + maltoheptaosa 10 mM + ADP-Glc 10 mM; 6, marcador de pesos moleculares.

Los resultados de esta digestión sugirieron que Ala¹⁰² se encuentra en una zona cercana al sitio de unión de la molécula de glucógeno, y que el polímero impide el ataque de la proteinasa K sobre la GS al cubrir el sitio de corte. Una vez construido el modelo de homología de la GS de *E. coli* se pudo localizar la posición tridimensional del residuo Ala¹⁰² (Figura 29). La digestión por proteinasa K se produce en un *loop* expuesto al solvente en el dominio N-terminal que está situado sobre la hendidura que separa ambos dominios. En la Figura 29 se puede observar en color negro a la molécula de maltopentaosa modelada a partir de la maltopentaosa unida a MalP. La molécula aceptora se une principalmente al dominio N-terminal, y es explicable que la maltoheptaosa proteja al *loop* que incluye a la Ala¹⁰² sólo parcialmente, mientras que el glucógeno protege totalmente.

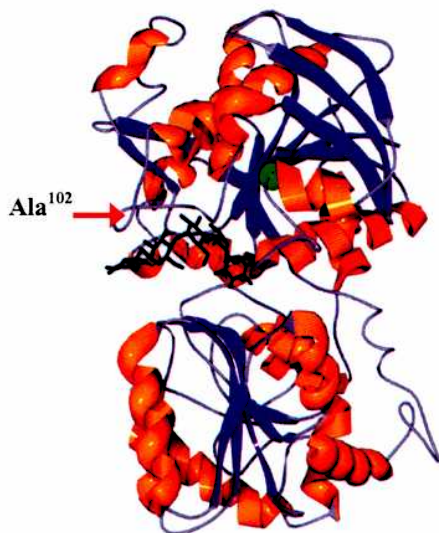


Figura 29: Modelo de homología de la GS de *E. coli* basado en las estructuras de MalP y la GS de *A. tumefaciens*. La figura incluye la maltopentaosa unida en la estructura cristalina de MalP en color negro. Se observa marcado el sitio de corte de la proteinasa K que es protegido por la presencia de glucógeno. La ubicación de la Cys⁷, que es protegida por el glucógeno de la reacción con IAA, esta representada en verde.

En la Figura 29 también se puede observar, representada por una esfera de color verde, la posición que ocupa en la estructura tridimensional el residuo Cys⁷. Este residuo fue protegido de la modificación con IAA por la presencia de glucógeno (Figura 9 y Tabla 8). La Cys⁷ se encuentra incluida en el interior del dominio N-terminal, lo cual explica que no sea accesible a la modificación por DTNB, incluso en ausencia de sustratos (Figura 7 y Figura 8).

En el modelo de la GS de *E. coli* se pueden analizar los residuos que posiblemente interaccionan con cada una de las moléculas de maltopentaosa. Estos residuos definen un túnel de entrada para el oligosacárido en la GS, la que probablemente se una también a la rama externa del glucógeno en la misma forma. En la Figura 30 se muestra una representación de la

superficie molecular del modelo de homología de la GS de *E. coli*, donde es posible ver el túnel de entrada del oligosacárido, determinado por la hendidura entre dominios. Es interesante notar que, independientemente de la longitud del polisacárido, los aminoácidos que conforman este túnel interactúan solamente con los primeros cuatro residuos de glucosa, por lo cual la preferencia de la GS por el glucógeno sobre las maltodextrinas tiene que estar definida por otros residuos, posiblemente en la superficie externa de la molécula.

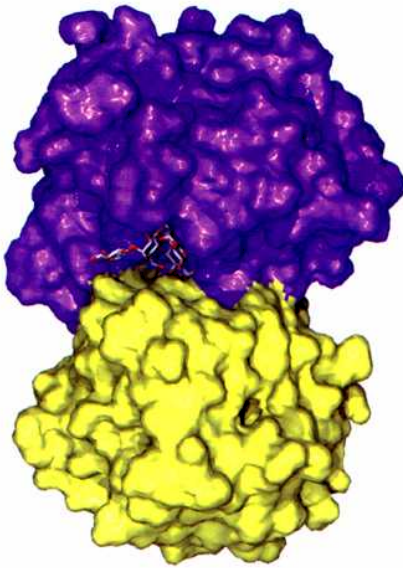


Figura 30: Representación de la superficie molecular en el modelo de homología de la GS de *E. coli* mostrando el túnel de entrada del oligosacárido aceptador. El dominio N-terminal está representado en color violeta y el dominio C-terminal en color amarillo.

Superponiendo el modelo con la estructura de MalP, se pueden identificar aquellos residuos que conforman el sitio de unión del polisacárido. En el sitio +1 (primer residuo de glucosa del aceptador) se puede superponer también la estructura de OtsA en complejo con UDP y Glc6P. La Glc6P se superpone casi exactamente con el sitio +1 de la maltopentaosa unida a la estructura de MalP, y si bien las moléculas aceptoras son de naturaleza muy diferente, es posible encontrar varias semejanzas entre las tres estructuras.

Dada la gran similitud destacada hasta ahora entre ambas estructuras, es de esperar que las GS y las fosforilasas compartan también características en el sitio de unión de la molécula aceptora, ya que en ambos casos se trata de un polisacárido de glucosas. En la Figura 31 se pueden observar una superposición de las estructuras de MalP y OtsA con el modelo de homología de la GS de *E. coli*, mostrando exclusivamente aquellos residuos que en las estructuras aparecen interactuando con la glucosa en posición +1 de la molécula aceptora.

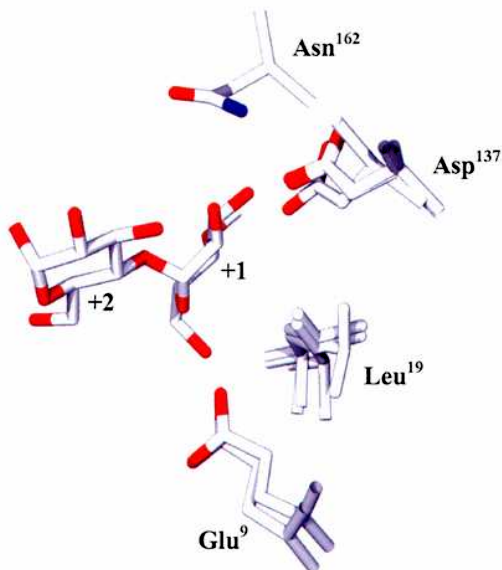


Figura 31: Representación de los residuos que aparecen interactuando con la glucosa +1 de la molécula aceptora en el modelo de la GS de *E. coli* y las estructuras de OtsA y MalP. Las moléculas de glucosa marcadas como +1 y +2 son el primer y segundo monómero de la molécula aceptora en MalP y la GS.

Estas interacciones son muy similares, en particular entre el modelo y la estructura de MalP. En primer lugar, se observa la interacción del Asp¹³⁷ con el O3, que está presente no sólo en MalP (Asp³⁰⁹) sino también en OtsA (Asp¹³⁰), en esta última con el O3 de la molécula de Glc6P. Este residuo forma parte del sitio activo en las tres enzimas, y cuando fue reemplazado por Ala en la GS de *E. coli*, la enzima mutante mostró una V_{\max} casi cuatro órdenes de magnitud menor (Tabla 16). Además, este residuo ácido se encuentra conservado en las familias GT4, GT5, GT20, GT35 y GT3, en esta última reemplazado por Glu.

En segundo lugar aparece el residuo Glu⁹, superpuesto en la figura con el Glu⁶⁷ de MalP. En la estructura de la fosforilasa este aminoácido forma un puente de hidrógeno con el O6 en la posición +1 de la molécula aceptora, y se trata de un residuo absolutamente conservado en las familias GT5, GT35 y GT3. En el modelo de la GS, el residuo equivalente Glu⁹ se coloca en la misma posición, y podría cumplir la misma función (Figura 31). No se encuentra presente un homólogo de este residuo en la estructura de OtsA, donde en la posición equivalente se encuentra la Arg⁹ (conservada en la familia GT20). Sin embargo, es posible encontrar una función común a ambos residuos. Uno de los cambios más significativos que sufre la estructura de OtsA después de la unión de los sustratos es que este evento acerca los dos dominios, a través de la interacción de la Gly²² en el dominio N-terminal con el fosfato distal de la UDP-Glc unida al dominio C-terminal (dominio de unión de la molécula dadora) (84). El *loop* que contiene a la Gly²² (el *loop* entre IB1 y IH1 en la Figura 15) se encuentra situado en posiciones muy diferentes en las estructuras en presencia o ausencia de la molécula aceptora. En

ausencia del aceptor Glc6P este *loop* se encuentra retraído, estabilizado en esa posición por interacciones mediadas por el esqueleto carbonado con otras porciones de la proteína, mientras que en presencia de la molécula aceptora, se acerca y permite la interacción de la Arg⁹ con el fosfato de la Glc6P. Para que este cambio conformacional tenga lugar, son necesarios movimientos en el esqueleto carbonado de más de 10 Å para algunos residuos (84). Algo similar ocurriría en la estructura de la GS de *E. coli*, cuando el *loop* equivalente se acerca al dominio C-terminal, la Gly¹⁸ interacciona con el fosfato distal de la ADP-Glc y el Glu⁹ con el O6 de la primer glucosa de la molécula aceptora. La Arg⁹ se encuentra espacialmente en el mismo lugar que el Glu⁹ en el modelo de la GS de *E. coli*, y ambos residuos interaccionan con la molécula aceptora correspondiente en posiciones análogas (fosfato en la Glc6P y O6 en la glucosa aceptora, respectivamente). Este residuo representaría entonces un papel importante en la especificidad por la molécula aceptora en estas glicosiltransferasas.

Otro residuo aparentemente importante en la unión de la glucosa en posición +1 en el modelo de la estructura de la GS es la Leu perteneciente al motivo conservado en la familia GT5 K¹⁵XGGL, la cual se encuentra en posición paralela al anillo glucosídico, supuestamente estabilizándolo mediante interacciones hidrofóbicas. En la estructura de MalP, la Leu correspondiente (Leu¹¹⁵) se encuentra situada en forma muy similar, y además interacciona con la glucosa a través de un puente de hidrógeno entre el O6 y el grupo amido de su esqueleto carbonado. Una Leu análoga se encuentra tomando parte en la misma interacción en el modelo de la estructura cerrada de la GS de *A. tumefaciens* (93), y en OtsA la Leu²³ se ubica paralela al anillo de la Glc6P en una posición similar (Figura 31). En todas estas estructuras, este residuo corresponde a la Leu en el motivo GGL, el cual se encuentra conservado en las familias GT5, 20 y 35, mientras que es reemplazado por GGI en GT3 (Tabla 17).

Finalmente, el O2 de la molécula de glucosa +1 parece interaccionar en el modelo con un residuo de Asn. Este residuo (Asn¹⁶²) se encuentra conservado en la familia GT5 y es vecino de la His¹⁶¹ del sitio activo de la GS. La Asn¹⁶² no posee una contraparte en la OtsA, y se encuentra reemplazada por una Thr en MalP.

El Glu⁹ y la Asn¹⁶² fueron reemplazados por Ala y las enzimas mutantes purificadas a homogeneidad con el objeto de estudiar sus propiedades cinéticas. Cuando se midieron los $S_{0.5}$ para el glucógeno de las mutantes, no se observaron aumentos importantes. El cambio más notorio en las propiedades cinéticas de la mutante E9A resultó una disminución de 135 veces en la actividad específica (Tabla 20). Este resultado parece sugerir una vez más la importancia

de un correcto posicionamiento de las moléculas aceptora y dadora en la catálisis de la GS, dado que no era esperable un cambio tan importante en la V_{\max} simplemente a partir de las observaciones estructurales. Por otra parte, es posible que al ser el glucógeno una molécula voluminosa, se una a la enzima a través de múltiples sitios e interacciones inespecíficas y que una mutación puntual no genere un efecto de aumento en el $S_{0.5}$. La mutante N162A, por el contrario, no mostró cambios en la actividad específica, y exhibió una afinidad levemente menor por el glucógeno (Tabla 20). Por este motivo es importante medir los parámetros cinéticos sobre aceptores de bajo peso molecular.

El desafío que se presentó entonces fue el diseño de un método para la determinación de constantes de afinidad de la GS para maltooligosacáridos. El método finalmente elegido consiste en una cromatografía descendente en papel DEAE, utilizando agua como solvente. Una vez detenida la reacción por incubación 1 min a 100 °C, la mezcla fue sembrada en el papel DEAE y se llevó a cabo la cromatografía. La ADP-[14 C]Glc permanece en el punto de siembra debido a sus cargas negativas, mientras que los oligosacáridos, que son neutros, migran con el frente de corrida (el protocolo completo se encuentra detallado en la sección Materiales y Métodos). El método no permite diferenciar entre los distintos productos que podrían generarse. Por este motivo, las reacciones fueron también sembradas en papel Whatman y sometidas a cromatografía descendente utilizando butanol:piridina:agua 9:6:1 como solvente, y se observó que, en todos los casos, el producto mayoritario formado (>95%) fue el maltooligosacárido inmediatamente superior. Es decir, cuando se utilizó maltosa como sustrato, el 96% del producto fue maltotriosa y un 4% maltotetraosa (datos no mostrados).

Utilizando este método, se midieron los $S_{0.5}$ de la GS silvestre y las mutantes para maltosa y maltotriosa. La enzima silvestre mostró una afinidad por la maltosa de 10 mM, mientras que la afinidad aparente por la maltotriosa fue de 11 mM. La mutación E9A generó aumentos en las afinidades aparentes por estos sustratos, pero solamente de 1.5 veces para la maltosa y 6.5 veces para la maltotriosa Tabla 20. Por otro lado una mutación análoga, E67A, en la enzima MalP generó aumentos del $S_{0.5}$ para los sustratos de 95 y más de 30 veces en las direcciones de fosforólisis y síntesis, respectivamente (129). Asimismo, en dicha enzima la mutación generó una disminución en la V_{\max} de solamente 12 veces, mientras que en la GS de *E. coli*, reemplazar al Glu⁹ por Ala motivó un descenso de 135 veces en la actividad específica utilizando glucógeno como sustrato (Tabla 20).

No existen disponibles en la literatura datos numéricos de afinidad de la GS de *E. coli* por maltooligosacáridos con los que puedan compararse los resultados obtenidos en esta tesis. Mediante un ensayo en el cual la mezcla de reacción se filtra a través de resina Dowex para adsorber la ADP-[¹⁴C]Glc que no reaccionó, no fue posible alcanzar la saturación de la GS de *E. coli B* con maltosa o con maltotriosa hasta 50 mM (96). En un trabajo posterior, utilizando el mismo ensayo, se observó en la GS de *E. coli B* que es posible alcanzar niveles de actividad similares a los que se obtienen utilizando glucógeno con maltotetraosa o maltoheptaosa 25 mM, sin embargo la actividad con maltosa o maltotriosa se mantuvo en niveles inferiores incluso hasta concentraciones de 25 mM (97).

La afinidad aparente de la mutante N162A por la maltosa no pudo ser calculada porque la actividad se incrementó con el aumento de sustrato en forma lineal hasta las concentraciones de maltosa utilizadas (100 mM). El $S_{0.5}$ para la maltotriosa tampoco pudo ser calculado con precisión debido a que no se alcanzó saturación, pero estaría en el rango cercano a 50 mM. Por otra parte, la V_{max} alcanzada por esta mutante se encuentra en el mismo nivel que la enzima silvestre, tanto con glucógeno como maltosa y maltotriosa como sustratos (Tabla 20), si bien con estos dos últimos sustratos sólo es posible realizar una estimación.

	Glucógeno *				Maltosa				Maltotriosa			
	V_{max} (U/mg)	veces menor	$S_{0.5}$ (μ g/ml)	veces mayor	V_{max} (U/mg)	veces menor	$S_{0.5}$ (mM)	veces mayor	V_{max} (U/mg)	veces menor	$S_{0.5}$ (mM)	veces mayor
GS	500 \pm 65	1	770 \pm 80	1	21 \pm 4	1	15 \pm 4	1	103 \pm 3	1	10.2 \pm 0.8	1
E9A	3.7 \pm 0.1	135	622 \pm 85	0.8	0.015 \pm 0.002	1400	30 \pm 10	1.5	0.065 \pm 0.010	1580	66 \pm 3	6.5
N162A	510 \pm 24	0.98	1190 \pm 73	1.5	>20		>100	>6.6	>70		~50 \pm 10	~5
H139A	214 \pm 36	2.3	1184 \pm 95	1.5	>14	-	>100	>6.6	95 \pm 18	1.08	26 \pm 7	2.5

* El $S_{0.5}$ para la ADP-Glc no se vio afectado en más de 1.5 veces para ninguna de las mutaciones (datos no mostrados).

ND: no fue posible determinar

Tabla 20: Parámetros cinéticos de mutantes de la GS de *E. coli*.

De los residuos que aparecen interaccionando con el sub-sitio +2 en la estructura de MalP, el único que se mantiene presente en la GS es la His¹³⁹ (numeración de la GS de *E. coli*), si bien en varios miembros de la familia GT5 es reemplazada por una Gln. Esta His interacciona con el O3 de la glucosa +2, tanto en la estructura de MalP como en el modelo de la GS de *E. coli* (Figura 32). En la MalP hay un residuo conservado de Asn (posición 112) interaccionando con el O6 de la glucosa +2. En la GS de *E. coli* esta Asn se encuentra reemplazada por una Thr también con alto grado de conservación, la Thr¹⁶ perteneciente al motivo K¹⁵TGGL (Figura 32). Se reemplazó a la His¹³⁹ por Ala, y la mutante obtenida fue purificada y su actividad analizada en presencia de distintos sustratos. La mutación H139A no generó cambios importantes en los $S_{0,5}$ para los dos sustratos fisiológicos de la enzima, la ADP-Glc y el glucógeno. La afinidad por este último resultó 1.5 veces menor que la de la enzima silvestre. Sin embargo, cuando se ensayó la actividad utilizando maltosa como sustrato, la mutante H139A no alcanzó la saturación hasta concentraciones 100 mM. Con el sustrato maltotriosa, el $S_{0,5}$ pudo ser estimado en alrededor de 26 mM. En un estudio sobre el sitio de unión del oligosacárido en la enzima MalP, el residuo correspondiente a la His¹³⁹ fue reemplazado por Ala, y se observaron aumentos en el $S_{0,5}$ para el maltooligosacárido de 13.6 veces y 1.6 veces en las direcciones de fosforólisis y síntesis, respectivamente.

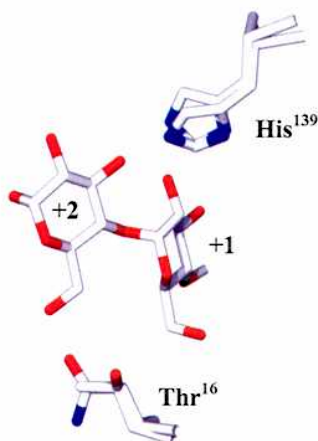


Figura 32: Representación de los residuos que aparecen interaccionando con la glucosa +2 de la molécula aceptora en el modelo de la GS de *E. coli* y la estructura de OtsA y MalP. Las moléculas de glucosa marcadas como +1 y +2 son el primer y segundo monómero de la molécula aceptora en MalP y la GS.

Estos resultados sugieren que la naturaleza del sitio de unión de la molécula aceptora en la GS de *E. coli* es similar a la de la MalP, pero asimismo muestran ciertas diferencias clave. Los resultados obtenidos con la mutante E9A muestran que, asumiendo que este Glu se encuentre involucrado en el mismo tipo de interacción que el Glu⁶⁷ en la MalP, la respectiva importancia en catálisis es muy diferente. El reemplazo del Glu⁹ por Ala tiene como principal efecto la disminución de la V_{\max} , lo cual, junto con los resultados obtenidos al mutar la His¹⁶¹ y el Asp¹³⁷ nuevamente resalta la importancia de un posicionamiento correcto de los sustratos para la catálisis en la GS de *E. coli*. Por otra parte, las mutaciones de la Asn¹⁶² y la His¹³⁹ por Ala tienen como principal efecto el aumento en el $S_{0.5}$ de la molécula aceptora, si bien esto sólo fue evidente cuando se utilizaron maltooligosacáridos como sustratos.

Conclusiones

En esta tesis se llevó a cabo una caracterización de relaciones entre estructura y función en la GS de *E. coli*. El punto de partida fue la identificación de los residuos involucrados en la inactivación de la enzima por agentes que reaccionan con Cys. En trabajos anteriores se había reportado que la GS de *E. coli* se inactiva en presencia de DTNB o IAA (106), pero sin demostrar cuáles residuos de Cys estaban involucrados. Mediante mutagénesis sitio-dirigida, se reemplazaron las Cys por Ser en todas las combinaciones posibles, y se realizaron estudios de modificación química. Los resultados de la modificación con DTNB mostraron que este compuesto reacciona con un solo residuo de Cys (Figura 8), y que éste es la Cys³⁷⁹ (Figura 7). Se probó entonces que la inactivación de la GS por DTNB ocurría a través de la reacción de éste con la Cys³⁷⁹ y que tanto la modificación como la consecuente inactivación de la enzima podían ser protegidas por la presencia del sustrato ADP-Glc (Figura 6). Los estudios con dobles mutantes de Cys a Ser mostraron que también la inactivación por IAA es debida a la reacción con la Cys³⁷⁹ (Figura 6 y Figura 7). El estudio de los parámetros cinéticos de las mutantes C379S y C379A sugirió que este residuo podía estar involucrado en la unión correcta del sustrato ADP-Glc a la enzima, dado que ambas mutaciones aumentaron el $S_{0.5}$ de este sustrato en 38 y 77 veces, respectivamente (Tabla 5). La V_{max} de estas mutantes fue aproximadamente 5 veces menor que la de la enzima silvestre, respectivamente, lo cual no es significativo como para asignarle a este residuo un papel en la catálisis enzimática. Cuando se reemplazó la Cys³⁷⁹ por otros grupos más voluminosos como Thr o Asp la actividad específica de las mutantes resultó severamente afectada (Tabla 5), y la mutante C379L fue proteolizada en la célula, generando un polipéptido de 41 kDa sin actividad de síntesis de glucógeno (Figura 5). Los ensayos de inhibición competitiva con AMP y Glc1P utilizando a la mutante C379A y comparando los resultados con la enzima silvestre, mostraron que la interacción de la Cys³⁷⁹ es muy probablemente con la porción fosfoglucona del sustrato, dado que la K_1 para el AMP no varió significativamente entre ambas enzimas, pero la K_1 para la Glc1P aumentó para la mutante C379A en el mismo rango en el que aumentó su $S_{0.5}$ para ADP-Glc (Figura 11, Figura 12 y Tabla 9). Estos resultados permitieron concluir que la Cys³⁷⁹ es el residuo responsable por la inactivación de la enzima

por DTNB o IAA y que se encuentra formando parte del sitio de unión de la ADP-Glc, posiblemente involucrada en una interacción con la porción fosfoglucona de la misma.

El alineamiento múltiple de secuencias correspondientes a la familia GT5 de glicosiltransferasas, que agrupa a las GS bacterianas y almidón sintetasas, permitió observar que la Cys³⁷⁹ es un residuo absolutamente conservado en esta familia, y que se encuentra en una zona conservada en general que es consistentemente predicha como *loop* por los programas de predicción de estructura secundaria (Tabla 10). Este *loop* está muy conservado, no sólo entre la familia GT5, sino también entre las GS eucariotas, que se encuentran clasificadas en una familia diferente, GT3. Al realizar estudios de mutagénesis dirigida en otros residuos de este *loop*, se encontró que el reemplazo del Glu³⁷⁷ por Ala generó una especie enzimática con una actividad específica extremadamente baja (10^4 veces inferior a la de la enzima silvestre), sin disminución significativa en las afinidades aparentes por ambos sustratos (Tabla 12 y Figura 14). La mutación E377Q aumentó aún más este efecto, mientras que el reemplazo más conservador por Asp generó una enzima con actividad específica sólo 57 veces menor que la silvestre, si bien con una menor afinidad por la ADP-Glc. La importancia de una carga negativa en esta posición se confirmó claramente al restituir la actividad enzimática de la mutante inactiva E377C mediante carboximetilación (Figura 13 y Tabla 13).

Otros residuos pertenecientes a este *loop*, absolutamente conservados en la familia GT5, fueron estudiados por mutagénesis sitio-dirigida. El reemplazo de la Ser³⁷⁴ (que también se encuentra conservada en la familia GT3) por Ala no modificó ninguno de los parámetros cinéticos de la enzima. La mutación Q383A generó una variante enzimática con una V_{\max} 23 veces menor que la de la enzima silvestre, pero sin disminuciones en la afinidad aparente por ambos sustratos (Tabla 15).

El Glu³⁷⁷ es el primer residuo catalítico descrito en una GS bacteriana. A pesar de la extremadamente baja similitud de secuencia, mediante alineamiento de predicciones de estructura secundaria fue posible identificar un residuo homólogo conservado en otras familias de glicosiltransferasas que retienen la configuración del sustrato (90). Ciertos estudios en enzimas de otras familias proveyeron evidencia de la importancia de una carga negativa en esta misma región. En la almidón sintetasa SSIb-2 de maíz, agrupada en la misma familia GT5 que las GS bacterianas, el reemplazo del Glu en el *loop* corres-

pendiente por Gln generó una enzima sin actividad detectable (120). En las almidón sintetasas este *loop* contiene también residuos conservados homólogos a la Ser³⁷⁴, Glu³⁷⁷, Cys³⁷⁹ y Gln³⁸³. También en la familia GT3 el reemplazo del Glu⁵¹⁰ por Ala en una fusión recombinante de la GS de músculo esquelético humano con la GFP, generó actividad indistinguible del control en extractos crudos de células COS-1 expresando transitoriamente la proteína (123). En la familia GT4 se llevo a cabo un estudio de los residuos conservados en la manosiltransferasa AceA. La mutante E287A, en una fusión parcialmente purificada con un *S-tag*, perdió la capacidad de transferir manosas desde la GDP-manosa al aceptor Glc β (1-4)Glc α -P-P-poliprenol (126). En ninguno de estos casos la magnitud de la reducción en la actividad específica pudo ser cuantificada.

Finalmente, los resultados con las mutantes del Glu³⁷⁷ están de acuerdo con los estudios de mutagénesis en la MalP (familia GT35). A pesar de que esta familia no utiliza nucleótidos azúcar como sustrato, la reacción reversa de síntesis es químicamente equivalente a la reacción directa de las GS. En ambas se produce la formación de un enlace glucosídico α 1,4 a partir de la ruptura de un enlace fosfoéster en el OHI de una α -glucosa. En la estructura cristalina de la glucógeno fosforilasa *b* de músculo de conejo, el Glu⁶⁷² interacciona con los O2 y O3 de la glucosa en el extremo no reductor. Basándose en esta estructura, se postuló que el Glu⁶⁷² estaba involucrado en la unión del sustrato (91). Sin embargo, las evidencias bioquímicas indican que la principal contribución es catalítica. Este residuo conservado fue mutado en la MalP de *E. coli* (Glu⁶³⁷) por Asp y Gln, y se observaron reducciones de 600 y 900 veces en la k_{cat} , respectivamente (140).

El mecanismo catalítico de la transferencia de grupos glucosídicos reteniendo la configuración anomérica del sustrato es un problema sin resolver que presenta muchos desafíos dentro del campo de la enzimología. Los candidatos mecanísticos más fuertes involucran un estado de transición del tipo ión oxonio. En la MalP, cuya estructura cristalizada muestra un *fold* de tipo GT-B (92), dos residuos cargados positivamente (Arg⁵³⁴ y Lys⁵³⁹) representan papeles importantes en el mecanismo catalítico. El primero estabiliza al fosfato del sustrato Glc1P mientras que el segundo posiciona al sustrato del cofactor piridoxal 5'-fosfato (130, 145). De acuerdo a los datos cristalográficos, el Glu⁶³⁷ neutraliza parcialmente la carga de la Lys⁵³⁹ para mantener una protonación balanceada de los fosfatos. Se ha postulado que el Glu⁶³⁷ podría participar en catálisis ejerciendo un

rol dual. Primero, fijaría al sustrato en una posición más favorable en el estado de transición a través de una interacción con el O3 de la glucopiranososa. En segundo lugar, estaría involucrado en una red de cargas con la Lys⁵³⁹. Existe una gran similitud con la estructura de la OtsA, que presenta el mismo *fold* GT-B que MalP. En este caso también están presentes dos residuos cargados positivamente, Arg²⁶³ y Lys²⁶⁸, los cuales interaccionan con los fosfatos α y β de la UDP-Glc. El centro catalítico completo es prácticamente idéntico al de la MalP y estas interacciones se encuentran en una disposición similar. La única diferencia es que el residuo negativo es el Asp³⁶² en lugar de un Glu. Como las predicciones de estructura terciaria indicaban que la GS adoptaría el mismo *fold* que estas dos glicosiltransferasas, se construyó un modelo de homología de la GS de *E. coli*, utilizando como moldes las estructuras de MalP y OtsA (Figura 16).

Los resultados del modelo de homología mostraron un arreglo conservado de residuos en el centro catalítico de las tres enzimas. Estos residuos están conservados dentro de cada una de las respectivas familias (Figura 17). Los resultados de realizar mutagénesis sitio-dirigida en estos residuos confirmaron su importancia dentro del sitio activo de la GS de *E. coli* y validaron el modelo de homología. El reemplazo de cualquiera de los residuos Asp¹³⁷, His¹⁶¹, Arg³⁰⁰, Lys³⁰⁵ o Glu³⁷⁷ por Ala generó disminuciones en la V_{\max} de la respectiva enzima mutante de 3 a 4 órdenes de magnitud (Tabla 16) sin alterar en forma severa las afinidades por los sustratos. Este grupo de residuos conservados que conforman el sitio activo de las familias GT20 y GT35 también está presente en las familias GT5, GT3 y GT4, todas ellas familias de GT que retienen la configuración anomérica del sustrato y cuya estructura terciaria esta predicha como GT-B (Tabla 17).

Los resultados presentados en esta tesis indican que las familias de GT que operan con retención de la configuración anomérica del sustrato y que poseen un *fold* GT-B comparten la arquitectura del sitio activo, y sugieren por lo tanto la existencia de un mecanismo de reacción común, pese a las diferencias en los sustratos utilizados.

Los posible sitios de unión de los sustratos también fueron analizados a partir del modelo de homología de la GS de *E. coli*. Se identificaron residuos conservados dentro de la familia GT5 y que estarían involucrados en la unión de la enzima con la ADP-Glc (Figura 23 y Tabla 18). Estos aminoácidos fueron reemplazados por Ala en la GS de *E. coli* y las propiedades cinéticas de las mutantes purificadas fueron analizadas. Todas es-

tas variantes enzimáticas mostraron disminuciones en su afinidad aparente por la ADP-Glc (Tabla 19), lo cual contribuye a confirmar la interacción con el sustrato sugerida por el modelo de homología. Con excepción de la Lys¹⁵ en la GS de *E. coli* (116, 117), no hay evidencias bioquímicas que identifiquen residuos involucrados en la unión de ADP-Glc en la familia GT5, ni en general en el sitio de unión del nucleótido azúcar en otras GT que retienen la configuración del sustrato. Los resultados presentados en esta tesis sugieren que el grupo de residuos estudiado participa en la unión de la ADP-Glc en la GS de *E. coli* (Figura 27). Esto se encuentra reforzado por la comparación con las estructuras cristalizadas de OtsA y MalP, y con la reciente estructura cristalina de la GS de *A. tumefaciens* (93).

Por último, en esta tesis doctoral se identifican ciertos residuos que podrían estar involucrados en el reconocimiento de la molécula aceptora en la GS de *E. coli*. Por comparación del modelo de homología de la GS con la estructura cristalina de la MalP en presencia de maltopentaosa, junto con ciertos datos aportados por las estructuras cristalinas de OtsA y la GS de *A. tumefaciens*, es posible sugerir la participación de un grupo de aminoácidos en la unión de los dos primeros residuos de glucosa de la molécula aceptora (Figura 31 y Figura 32). El reemplazo de estos residuos por Ala no generó aumentos significativos en la afinidad por el glucógeno, pero sí afectó severamente la capacidad de la GS de unir maltosa y maltotriosa para utilizarlos como sustratos (Tabla 20).

En resumen, esta tesis representa el primer análisis detallado de residuos catalíticos y de unión a sustratos llevado a cabo en una GS bacteriana, y en general, en una GT que utilice nucleótidos azúcar como sustratos.

Materiales y métodos

Reactivos

La [¹⁴C]Glc1P se adquirió de ICN Pharmaceuticals. La ADP[¹⁴C]Glc fue sintetizada como se describió previamente (146). Los oligonucleótidos fueron sintetizados y purificados por la Macromolecular Facility en la Michigan State University. La ADN polimerasa Pfu fue comprada a Stratagene. El glucógeno de hígado de conejo, el DTNB, el IAA y los oligosacáridos fueron comprados a Sigma (St. Louis, MO). El anticuerpo anti IgG de conejo unido a fosfatasa alcalina y el reactivo precipitante BM purple (sustrato de la fosfatasa alcalina) fueron obtenidos de Roche (Indianapolis, IN). La resina de níquel-ácido nitriloacético (Ni-NTA) fue obtenida de Novagen. Las proteasas fueron obtenidas de Boehringer Mannheim. Todos los otros reactivos se compraron de la mayor calidad disponible en el mercado.

Cepas bacterianas y medios de cultivo

Para la expresión de las distintas GS se utilizaron células de la cepa *E. coli* BL21 lisogenizadas (BL21(DE3)), las cuales se crecieron en el medio de Luria-Bertani (LB) con el agregado del antibiótico correspondiente. Para el subclonado y la amplificación de plásmidos, se utilizó la cepa de *E. coli* XL-1.

Cuantificación de proteínas

La cantidad de proteína total se determinó por el método del ácido bicínico (147) utilizando BSA como proteína testigo.

SDS-PAGE, Western blot y secuenciación

Los SDS-PAGE fueron llevados a cabo de acuerdo a la metodología de Laemmli, (148) utilizando geles preformados en gradiente de 4-15% Tris-HCl, comprados a Bio-Rad. Después de la electroforesis, las proteínas fueron observadas tiñendo con Coomassie Brilliant Blue R-250 o bien fueron electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa Protran™ (Schleicher & Schuell) de acuerdo a protocolos establecidos previamente (149), o a una membrana de polivinildefluoruro (PVDF) (Bio-Rad) (150). La membrana de nitrocelulosa fue tratada con IgG de conejo dirigida contra la GS de *E. coli*. El complejo antígeno-anticuerpo fue visualizado a través de un tratamiento con IgG anti-

conejo modificada covalentemente por unión con una fosfatasa alcalina, y subsiguiente teñido con el sustrato precipitante BM purple. La membrana de PVDF fue teñida con Coomassie Brilliant Blue R-250, y la banda deseada fue recortada de la membrana. Luego se envió para su secuenciación automatizada a la Macromolecular Facility de la Michigan State University.

Construcción de los plásmidos

El plásmido pAY1 fue generado subclonando el gen *glgA* de *E. coli* en los sitios NdeI-SacI del vector pET-24a (Novagen). Para este fin, se generó un producto de PCR utilizando como *primers* 5'-GGAGCGCATATGCAGGTTTTACATG-3' y 5'-GTCAGTTATTGCTCAGCGG-3, introduciendo un sitio NdeI en el N-terminal. El inserto fue secuenciado, y el resultado fue coincidente con la secuencia nucleotídica de la GS presente en las bases de datos del proyecto genoma de *E. coli*. El plásmido pAY3 fue generado subclonando el gen *glgA* en los sitios NdeI-XhoI del pET-24a. Se generó un producto de PCR a partir del pAY1 utilizando los oligonucleótidos 5'-TAATACGACTCACTATAGGG -3' y 5'-GTCAGTTATTGCTCAGCGG -3'. Esta construcción incorporó una cola de histidinas (His-Tag[®], Novagen) (LEHHHHHH) en el extremo C-terminal de la GS de *E. coli*.

Mutagénesis sitio-dirigida

Para mutar la región codificante de la GS de *E. coli*, se utilizaron dos reacciones de PCR secuenciales. Los *primers* externos utilizados se aparean en el vector con el promotor T7 y el terminador T7, respectivamente, y las secuencias nucleotídicas son 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' y 5'-GTCAGTTATTGCTCAGCGG-3'. Como ADN molde se utilizaron los plásmidos pAY1 o pAY3, según se indica para cada experimento. Los oligonucleótidos que introdujeron las mutaciones se detallan en la Tabla 21.

Mutación	Secuencia del oligonucleótido
C7S	5'-CGGGAACATCTCTGA <u>AGA</u> TACATGTAAAACC-3'
C379S	5'-CGTTTTGAACCGT <u>TCC</u> GGCTTAACGCAAC-3'
C408S	5'-CGGTTTCTGACT <u>TCT</u> TCTCTTGAGAACC-3'
C379A	5'-CGTTTTGAACCG <u>GCC</u> GGCTTAACGCAAC-3'
C379T	5'-CGTTTTGAACCG <u>ACC</u> GGCTTAACGCAAC-3'
C379D	5'-CGTTTTGAACCG <u>GAT</u> GGCTTAACGCAAC-3'
E377A	5'-GCCCAGCCGTTTT <u>GC</u> ACCGTGCGGC-3'
E377Q	5'-GCCGTTTT <u>CA</u> ACCGTGCGGC-3'
E377D	5'-GCCCAGCCGTTTT <u>GAC</u> CCGTGCGGC-3'
E377C-C379S	5'-GCCGTTTT <u>TGCC</u> CGTCCGGC-3'
Q383A	5'-TGCGGCTTA <u>ACG</u> GCACCTTATGGATTG-3'
S374A	5'-CATTCTGGTGCCC <u>GCC</u> CGTTTTGAACCG-3'
D137A	5'-GCCTGCATGCCA <u>CGC</u> GTGCGCATGCAC-3'
H161A	5'-GATAGGCCAGGTT <u>CGC</u> CACAGTAAACACCG-3'
R300A	5'-GCAGTGGTGAGC <u>GCT</u> CTGACCAGCC-3'
K305A	5'-CCAGCCAG <u>GCA</u> GGTCTCGAC-3'
N246A	5'-CCGGCGTACTG <u>GCC</u> GGCGTGGACG-3'
Y355A	5'-CAGATTGGC <u>GCT</u> CACGAAGC-3'
D21A	5'-GCCCCAATAAC <u>AGC</u> CAGACCG-3'
E9A	5'-CGGGAACAT <u>CGC</u> TGAACATAC-3'
N162A	5'-GCCTTGATAGGCCA <u>GCG</u> CGTCACAGTAAACACCG-3'
H139A	5'-GCCTGC <u>AGC</u> CCAGTCGTG-3'

Tabla 21: Listado de los *primers* utilizados para mutagénesis sitio-dirigida

La primera reacción de PCR fue llevada a cabo utilizando el oligonucleótido introduciendo la mutación y el *primer* externo más cercano en número de pares de bases. El fragmento obtenido fue sometido a electroforesis en gel de agarosa, y luego purificado utilizando el *kit* de purificación de gel de Qiagen. Se llevó a cabo una segunda reacción de PCR utilizando este fragmento purificado como *primer*, junto con el segundo *primer* externo. En aquellos casos en que fue requerido, se amplificó nuevamente el producto utilizando los oligonucleótidos externos. Posteriormente, se digirió el fragmento con NdeI y SacI o con NdeI y XhoI, según lo indicado, y fue ligado en el vector de expresión pET-24a previamente digerido con las mismas enzimas utilizando el kit de ligación Quick ligase de New England Biolabs. Se transformaron por electroporación células de

E. coli XL-1 Blue electrocompetentes, y las células transformadas se seleccionaron por su capacidad de crecimiento en LB-agar-kanamicina. La región codificante de todos los plásmidos mutados fue secuenciada para confirmar el cambio correcto de residuo aminoácido y cerciorarse de que no habían sido introducidas mutaciones indeseadas.

Ensayo de actividad de la glucógeno sintetasa

Glucógeno como aceptor: El ensayo fue llevado a cabo como ya ha sido descrito, en presencia de ADP[¹⁴C]glucosa 1 mM (~500 dpm/nmol), acetato de magnesio 0.01 M, 2.5 mg/ml de glucógeno de hígado de conejo, bicina-NaOH 50 mM pH 8.0 y albúmina sérica bovina 0.5 mg/ml, en un volumen total de 200 μ l (31). Luego de incubar 15 min a 37 °C, la reacción fue detenida hirviendo los tubos por 1 min, y el glucógeno formado fue precipitado agregando 2 ml de una solución 75% metanol, 1% KCl. El precipitado fue lavado dos veces resuspendiéndolo en 200 μ l de agua y reprecipitando con la solución de metanol/KCl antes de ser finalmente disuelto en 1 ml de agua. La radiactividad presente en el glucógeno fue medida en un contador de centelleo líquido. Una unidad de la enzima se define como 1 μ mol de unidades glucosídicas transferidas por minuto a 37 °C.

Oligosacáridos como aceptores: En aquellos casos en que se utilizaron oligosacáridos (maltosa, maltotriosa, maltotetraosa, maltopentaosa, maltohexaosa o maltoheptaosa) como aceptores, se utilizó un método basado en el principio descrito por Shen y Preiss (151). Este método se basa en la capacidad del papel DEAE-celulosa (Whatman DE-81) de adsorber la ADP-Glc. La reacción se llevó a cabo en condiciones similares al ensayo con glucógeno, durante 15 min a 37 °C, en un volumen total de 100 μ l. Una alícuota de la mezcla de reacción (40 μ l) fue sometida a una cromatografía en papel Whatman DE-81 utilizando agua MiliQ como solvente. En este sistema, la ADP-Glc que no participó de la reacción permanece adsorbida en el punto de siembra, mientras que los oligosacáridos avanzan junto con el frente de corrida. Las tiras de papel fueron secadas con aire caliente, y la radiactividad presente en las distintas secciones fue luego medida con un contador de centelleo. Como líquido de centelleo se utilizó una solución de 2,5-bis-(5'-terbutilbenzoxazolil-[2'])-tiofeno (BBTO) en tolueno.

Expresión y purificación de las enzimas

Se transformaron células de *E. coli* BL21(DE3) con el plásmido pAY1 conteniendo el gen silvestre o las diferentes mutantes. Las células se crecieron con agitación (200 rpm) a 37 °C hasta una densidad óptica $DO_{600} \sim 0.6$. En ese punto, se agregó isopropiltiogalactósido (IPTG) hasta una concentración de 1 mM, y se llevó a cabo la inducción a temperatura ambiente (23-25 °C) por un periodo de 16 hs. A partir de este momento, todos los pasos subsiguientes se realizaron a 4 °C. Las células fueron cosechadas por centrifugación y resuspendidas en buffer fosfato de potasio 50 mM (pH 6.8), ditiotretitol (DTT) 5 mM y NaCl 0.1M. La resuspensión de células fue sonicada, centrifugada a $10000 \times g$ por 15 min, y el sobrenadante (extracto crudo) fue sometido a un paso de fraccionamiento con 25% de saturación sulfato de amonio. El precipitado fue resuspendido en trietilamina-HCl (TEA-HCl) 20 mM (pH 7.5) y desalado utilizando las columnas Econo-Pac[®] Bio-Rad 10 DG previamente equilibradas con el mismo buffer. El DTT se excluyó de este buffer en aquellas enzimas utilizadas para experimentos de modificación con DTNB, con el fin de evitar posibles interferencias. La muestra de proteína fue cargada en una columna MonoQ HR 5/5 (FPLC, *Fast Protein Liquid Chromatography*, Pharmacia) y eluida con un gradiente lineal de KCl (20 volúmenes de columna, 0-0,6 M). Las fracciones activas de la Mono-Q fueron monitoreadas por SDS-PAGE para combinar únicamente las fracciones más puras. La muestra fue concentrada y el buffer fue cambiado a TEA-HCl 20 mM (pH 7.5) utilizando los filtros para centrifuga Ultrafree[®]-15 (Millipore) con una membrana Biomax-10, y conservadas en el congelador a -80 °C. En estas condiciones la enzima fue estable por al menos 12 meses.

Modificación con DTNB

La modificación de los grupos sulfhidrilo de las mutantes de la glucógeno sintetasa fue analizada espectrofotométricamente. Cada variante de la enzima (10 μ M) fue agregada a una cubeta conteniendo buffer bicina-NaOH 50 mM pH 8.0 en presencia o ausencia de ADP-Glc 1 mM, en un volumen total de 200 μ l. La reacción se inició con el agregado 4 μ l de DTNB (concentración final de 40 μ M) y se registró el espectro visible a partir de los 10 seg a temperatura ambiente (23-25 °C). Los espectros fueron registrados cada 0.5 nm desde los 340 a los 600 nm en un espectrofotómetro Beckmann DU650, a

una velocidad de escaneado de 600 nm/min. La primera derivada fue calculada con una ventana de 2 nm y suavizada con el algoritmo de Savitzky-Golay (152) utilizando una ventana de 41 puntos y coeficientes de segundo grado.

Inhibición con DTNB

La inactivación de la GS de *E. coli* con DTNB fue llevada a cabo a 0 °C en una mezcla de reacción conteniendo 0.5 a 1 µg de enzima disueltos en buffer bicina 50 mM pH 8.0, en un volumen total de 100 µl. La reacción se inició agregando 5 µl de DTNB pH 7.8 para obtener una concentración final de 10 µM. A diferentes tiempos, se retiraron alícuotas de la mezcla de reacción y se ensayaron para medir la actividad remanente. La protección por los sustratos se estudió con el mismo protocolo, pero la mezcla de reacción contenía ADP-Glc 1 mM o bien glucógeno de hígado de conejo 2.5 mg/ml.

Inhibición con IAA

La inactivación de la GS con IAA se llevo a cabo a temperatura ambiente (23-25 °C) en oscuridad. La mezcla de reacción contenía 0.5 a 1 µg de enzima disueltos en buffer bicina 50 mM pH 8.0, en un volumen total de 100 µl. La reacción se inició con el agregado de IAA hasta alcanzar una concentración de 1 mM. A diferentes tiempos se retiraron alícuotas de la mezcla de incubación, y se midió la actividad de síntesis de glucógeno. Los ensayos de protección por sustratos se realizaron de igual manera que en los experimentos de inhibición con DTNB.

Cromatografía en papel

Las cromatografías fueron llevadas a cabo en papel Whatman No. 1 por 72 hs utilizando como solvente 1-butanol:piridina:agua (6:4:3 v/v). Los sacáridos fueron revelados utilizando el método de teñido con plata (153).

Caracterización cinética

Los datos cinéticos fueron graficados como velocidad inicial (nmol/min) *versus* concentración de sustrato o efector. Las constantes cinéticas fueron calculadas ajustando los datos a la ecuación de Hill (154), con una fórmula no lineal de cuadrados mínimos,

utilizando el programa Origin™ 5.0. La constante n_{H1} es el coeficiente de Hill. $S_{0.5}$ es la concentración de sustrato con la cual se obtiene un 50% de la velocidad máxima. $I_{0.5}$ es la concentración de inhibidor que inactiva al 50% de la GS después de 10 min de incubación. El coeficiente de Hill y los $S_{0.5}$ fueron calculados a partir de las curvas. A menos que se indique lo contrario, los datos son el promedio de tres o más experimentos independientes, y el error expresado es la desviación estándar entre ellos.

Modificación química con IAA

La modificación química de la cuádruple mutante TM-E377C (C7S, C379S, E377C, C408S) se llevó a cabo a 0 °C en oscuridad, en una mezcla de reacción conteniendo 0.1 mg de la enzima en buffer bicina-NaOH 50 mM (pH 8.0), en un volumen total de 100 μ l. La reacción se inició agregando IAA 20 mM, alcanzando una concentración final de 1 mM. A diferentes tiempos se extrajeron alícuotas de 2 μ l para ensayar actividad enzimática. Para preparar enzima modificada para posteriores estudios cinéticos, la reacción se detuvo a los 10 min con el agregado de DTT hasta alcanzar una concentración final de 20 mM.

Co-sedimentación con glucógeno

El procedimiento seguido es una modificación de un protocolo publicado con anterioridad (155). Cada enzima recombinante purificada (10 μ g) se incubó a 4 °C por 30 min en un tubo de ultracentrífuga conteniendo Tris-HCl 50 mM (pH 7.5), NaCl 150 mM, 2-mercaptoetanol 0.1% (v/v), BSA 0.1 mg/ml y glucógeno de hígado de conejo 10 mg/ml en un volumen final de 1 ml. Después de centrifugar por 90 min a 100000 \times g, se recolectaron las fracciones de precipitado y sobrenadante y se sometieron tanto a SDS-PAGE como a determinación de actividad enzimática.

Expresión y purificación de las enzimas con un His·Tag®

Se transformaron células de *E. coli* BL21(DE3) con el plásmido pAY3 conteniendo el gen silvestre o las diferentes mutantes. Las células se crecieron a 37 °C con agitación (200 rpm) hasta alcanzar una $DO_{600} \sim 0.8$. La expresión de la proteína de interés se indujo con el agregado de IPTG hasta una concentración 1 mM, seguido por

16 hs de incubación con agitación a temperatura ambiente. El protocolo de purificación de las enzimas con un His-Tag[®] (6 histidinas, LEHHHHHH) en su extremo C-terminal es similar al publicado por Novagen, con algunas modificaciones. Todos los pasos detallados a continuación se llevaron a cabo a 4 °C. A partir de 100 ml de cultivo se cosecharon las células por centrifugación, y el precipitado celular se resuspendió en buffer de unión (fosfato de potasio 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 10 mM, pH 8.0). Se obtuvo un extracto crudo por sonicación y posterior centrifugación a 5000 × g. Dicho extracto crudo fue incubado durante 1 h con agitación en una proporción 4:1 con una resina de níquel-ácido nitriloacético (Ni-NTA) previamente equilibrada con el mismo buffer de unión. El sistema se basa en la afinidad de la cola de histidinas vecinas por el ión níquel inmovilizado en la columna. Esta mezcla fue colocada en una columna y la resina Ni-NTA con la proteína unida fue lavada dos veces con 8 volúmenes de columna de buffer de lavado (fosfato de potasio 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 50 mM, pH 8.0). Luego se eluyó en 4 × 1 volúmenes de columna de buffer de elución (fosfato de potasio 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 250 mM, pH 8.0). Alícuotas de las distintas fracciones fueron analizadas en un SDS-PAGE, y las fracciones de elución puras fueron combinadas, concentradas y el buffer reemplazado por TEA-HCl 20 mM pH 8.0 utilizando los filtros para centrífuga Ultrafree[®]-15. La muestra concentrada fue fraccionada y guardada a -80 °C. La enzima es estable, bajo estas condiciones, por al menos 12 meses.

Se realizó una purificación de la enzima silvestre en el sistema descrito para utilizarla como referencia en la purificación de las mutantes, y para verificar que el agregado de una His-Tag[®] en el extremo C-terminal no alteraba las propiedades cinéticas de la GS. El nivel de expresión de la GS silvestre con una His-Tag[®] fue similar a la de la enzima silvestre, como se determinó por *Western blot* (datos no mostrados). Ciertos controles fueron llevados a cabo durante todo el procedimiento de purificación para asegurar que no se estaba co-purificando la GS endógena de las células BL21. No se detectó actividad de GS (<0.002 U/mg) en los eluatos de la resina Ni-NTA cuando se la cargó con extractos crudos de células BL21(DE3) transformadas con el vector de expresión pET-24a. Tampoco se detectó actividad de GS en los eluatos cuando se sembró un extracto crudo de células expresando el plásmido pAY1 (que codifica para la GS silvestre sin His-Tag[®]). La purificación se llevó a cabo como se indica en Materiales y Métodos,

partiendo de 100 ml de cultivo. La Tabla 22 es el cuadro de purificación de la GS silvestre en este sistema. Este protocolo permite la purificación de la GS en un solo paso partiendo de muy pequeños volúmenes de cultivo.

En la Figura 33 se muestra un SDS-PAGE donde se sembraron alícuotas de las distintas fracciones de la purificación. Se obtuvieron resultados similares durante la purificación de las enzimas mutantes (datos no mostrados). Las fracciones de elución que aparecen homogéneas en el SDS-PAGE fueron agrupadas, concentradas, desaladas y divididas en alícuotas en buffer TEA/HCl 20 mM, pH 8.0. Las enzimas purificadas utilizando una cola de histidinas resultaron estables en el congelador a -80 °C por al menos 12 meses.

Etapa	Proteína total (mg)	Actividad (U)	Actividad específica (U/mg)	Rendimiento (%)	Veces purificación
Extracto crudo	16	768	48	100	1
Ni-NTA	0.9	460	500	60	10

Tabla 22: Purificación de la GS silvestre recombinante de *E. coli* con una HisTag®. La purificación comenzó a partir de un cultivo de 100 ml de células BL21(DE3) (0.8 g de células) transformadas con el plásmido pAY3. Los datos de la columna Ni-NTA corresponden únicamente a las fracciones más puras combinadas.

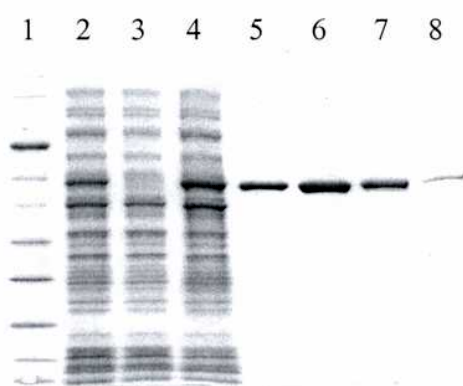


Figura 32: SDS-PAGE de los distintos pasos de purificación de la GS silvestre con una His-Tag®. Calle 1, marcador de pesos moleculares; calle 2, extracto crudo de las células BL21(DE3) transformadas con pAY3; calle 3, pico de siembra de la columna Ni-NTA; calle 4, lavados de la columna (concentrados 10 veces); calles 5 a 8, fracciones de elución de la columna Ni-NTA.

Predicción de estructura y modelado

Las predicciones de estructura secundaria fueron llevadas a cabo con el programa PHD (156) y el método PSI-PRED (157). Estos programas se encuentran disponibles en el servidor PredictProtein (<http://www1.embl-heidelberg.de/Services/sander/predictprotein/>) y en el servidor PSI-PRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>), respectivamente. Los análisis de *threading* y reconocimiento de *fold* fueron hechos aplicando el programa GenTHREADER (131) y el servidor Superfamily (158). El modelado homólogo de la GS de *E. coli* fue hecho utilizando el programa Modeller 6v2 (159). La estructura fue modelada usando tres moldes en simultáneo; las coordenadas atómicas conocidas de la trehalosa-6-fosfato sintetasa (OtsA) de *E. coli* en complejo con UDP (código del PDB 1gz5), la maltodextrina fosforilasa (MalP) de *E. coli* (código del PDB 1e4o) en complejo con maltopentaosa y la MurG de *E. coli* (código del PDB 1nlm). MurG fue utilizada como molde a pesar de que es una glucosiltransferasa que invierte la configuración del producto, porque presenta un plegado GT-B y mejoró el modelado de una α -hélice entre los residuos Ser⁴⁰⁹ y Ala⁴¹⁴. La confiabilidad de este modelo fue evaluada utilizando los programas Verify3D (137) y PROCHECK (160). El alineado con las proteínas molde se basó en homología de secuencia, estructura secundaria e hidrofobicidad. Los ajustes menores en el alineado con los moldes fueron revisados y modificados en forma iterativa a lo largo de la secuencia para mejorar los puntajes otorgados por el programa Verify3D. No hubo ningún cambio estructural, en ninguna de las iteraciones, en el área de los residuos del sitio activo putativo. Para el la generación del segundo modelo de la GS de *E. coli* se utilizó el programa Modeller 7v7, y se emplearon como moldes las estructuras de MalP (1e4o) y de la GS de *A. tumefaciens* (1rzu).

Proteólisis limitada de la GS

La GS silvestre de *E. coli* pura (0.5 mg/ml) fue digerida con distintas proteasas bajo las siguientes condiciones: 25 °C, CaCl₂ 1 mM y Tris-Cl 50 mM, pH 7.5 para la proteinasa K, quimotripsina, tripsina y subtilisina; 25 °C, CaCl₂ 1 mM y Tris-Cl 50 mM, pH 8.0 para la elastasa; 25 °C, CaCl₂ 1 mM y citrato de sodio 50 mM, pH 6.5 para la papaína. La duración de la incubación y las concentraciones de las distintas proteasas variaron de acuerdo al experimento. La proteólisis se detuvo mediante el agregado de fe-

nilmetilsulfonil fluoruro (PMSF) hasta una concentración de 0.5 mM, y se separaron alícuotas para analizar en un SDS-PAGE y para ensayar la actividad de síntesis de glucógeno.

Referencias bibliográficas

- 1- Dey PM y Harborne JB (1997). *Plant Biochemistry*. Academic Press, London.
- 2- Stryer L (1995). *Biochemistry*. 4th Ed. Freeman W. H., New York.
- 3- Meléndez R, Meléndez-Hevia E y Cascante M (1997). How did glycogen structure evolve to satisfy the requirement for rapid mobilization of glucose? A problem of physical constraints in structure building. *J. Mol. Evol.* **45**: 446-455.
- 4- Meléndez R, Meléndez-Hevia E y Canela EI (1999). The fractal structure of glycogen: a clever solution to optimize cell metabolism. *Biophys. J.* **77**: 1327-1332.
- 5- Calder PC (1991). Glycogen structure and biogenesis. *Int. J. Biochem.* **23**: 1335-1352.
- 6- Manners DJ (1991). Recent developments in our understanding of glycogen structure. *Carbohydr. Polym.* **16**: 37-82.
- 7- Preiss J (1999). Biosynthesis of bacterial and mammalian glycogen and plant starch synthesis and their regulation. In *Biorganic chemistry: carbohydrates* (Hecht S. M., ed), pp. 371-423, Oxford University Press, Oxford.
- 8- Ball SG y Morell MK (2003). From bacterial glycogen to starch: understanding the biogenesis of the plant starch granule. *Ann. Rev. Plant Biol.* **54**: 207-233.
- 9- Buleon A, Colonna P, Planchot V y Ball S (1998). Starch granules: structure and biosynthesis. *Int. J. Biol. Macromol.* **23**: 85-112.
- 10- Smith AM (2001). The biosynthesis of starch granules. *Biomacromolecules* **2**: 335-341.
- 11- Sivak MN y Preiss J (1998). Starch: basic science to biotechnology. In *Advances in Food and Nutrition Research* (Taylor S. L., ed), pp. 1-199, Academic Press, San Diego, California.
- 12- Cori GT y Cori CF (1939). The activating effect of glycogen on the enzymatic synthesis of glycogen from glucose-1-phosphate. *J. Biol. Chem.* **131**: 397-398.
- 13- Devlin TM (2002). *Textbook of biochemistry with clinical correlations*. 5 Ed. Wiley-Lyss, New York.
- 14- Leloir L y Cardini CE (1957). Biosynthesis of glycogen from uridine diphosphate glucose. *J. Am. Chem. Soc.* **79**: 6340-6341.
- 15- Preiss J y Romeo T (1989). Physiology, biochemistry and genetics of bacterial glycogen synthesis. *Adv. Microb. Phys.* **30**: 183-238.
- 16- Preiss J (1984). Bacterial glycogen synthesis and its regulation. *Annual Review of Microbiology* **38**: 419-458.
- 17- Preiss J y Sivak MN (1998). Starch and glycogen biosynthesis. In *Comprehensive Natural Products Chemistry* (Pinto B. M., ed) Vol. 3, pp. 441-495, Pergamon Press, Oxford, United Kingdom.
- 18- Spatafora G, Rohrer K, Barnard D y Michalek S (1995). A *Streptococcus mutans* mutant that synthesizes elevated levels of intracellular polysaccharide is hypercariogenic *in vivo*. *Inf. Immun.* **63**: 2556-2563.
- 19- Mackey BM y Morris JG (1971). Ultrastructural changes during sporulation of *Clostridium pasteurianum*. *J. Gen. Microbiol.* **66**: 1-&.

- 20- Brana AF, Mendez C, Diaz LA, Manzanal MB y Hardisson C (1986). Glycogen and trehalose accumulation during colony development in *Streptomyces antibioticus*. *J. Gen. Microbiol.* **132**: 1319-1326.
- 21- Nariya H e Inouye S (2003). An effective sporulation of *Myxococcus xanthus* requires glycogen consumption via Pkn4-activated 6-phosphofructokinase. *Mol. Microbiol.* **49**: 517-528.
- 22- Payot S, Guedon E, Desvaux M, Gelhaye E y Petitdemange E (1999). Effect of dilution rate, cellobiose and ammonium availabilities on *Clostridium cellulolyticum* sporulation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**: 670-674.
- 23- Sachs J (1887). *Lectures of the Physiology of Plants* (Press C., Ed.), Oxford.
- 24- Edwards GE y Walker DA (1983). *C3, C4: Mechanisms of cellular and environmental regulation of photosynthesis*. University of California Press, Berkeley, USA.
- 25- Badenhuizen IP (1969). *The biogenesis of starch granules in higher plants*. Appleton-Century Crofts, New York, USA.
- 26- Smith AM, Zeeman SC, Thorneycroft D y Smith SM (2003). Starch mobilization in leaves. *J. Exp. Bot.* **54**: 577-583.
- 27- James MG, Denyer K y Myers AM (2003). Starch synthesis in the cereal endosperm. *Curr. Op. Plant Biol.* **6**: 215-222.
- 28- Caputto R, Leloir LF, Cardini CE y Paladini AC (1950). Isolation of the coenzyme of the galactose phosphate-glucose phosphate transformation. *J. Biol. Chem.* **184**: 333-350.
- 29- Leloir LF (1971). Two decades of research on the biosynthesis of saccharides. *Science* **172**: 1299-1303.
- 30- Leloir LF y Goldemberg SH (1960). Synthesis of glycogen from uridine diphosphate glucose in liver. *J. Biol. Chem.* **235**: 919-923.
- 31- Greenberg E y Preiss J (1964). The occurrence of adenosine diphosphate glucose: glycogen transglucosylase in bacteria. *J. Biol. Chem.* **239**: PC4314-4315.
- 32- Sigal N, Cattaneo J y Segel IH (1964). Glycogen accumulation by wild-type and uridine diphosphate glucose pyrophosphorilase-negative strains of *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* **108**: 440-451.
- 33- Ballicora MA, Iglesias AA y Preiss J (2003). ADP-Glucose pyrophosphorylase, a regulatory enzyme for bacterial glycogen synthesis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**: 213-225.
- 34- Lomako J, Lomako WM y Whelan WJ (2004). Glycogenin: the primer for mammalian and yeast glycogen synthesis. *Biochim. Biophys. Acta* **1673**: 45-55.
- 35- Ugalde JE, Parodi AJ y Ugalde RA (2003). De novo synthesis of bacterial glycogen: *Agrobacterium tumefaciens* glycogen synthase is involved in glucan initiation and elongation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**: 10659-10663.
- 36- Seok YJ, Sondej M, Badawi P, Lewis MS, Briggs MC, Jaffe H y Peterkofsky A (1997). High affinity binding and allosteric regulation of *Escherichia coli* glycogen phosphorylase by the histidine phosphocarrier protein, HPr. *J. Biol. Chem.* **272**: 26511-26521.

- 37- Seok YJ, Koo BM, Sondej M y Peterkofsky A (2001). Regulation of *E. coli* glycogen phosphorylase activity by HPr. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **3**: 385-393.
- 38- Jeanningros R, Creuzet-Sigal N, Frixon C y Cattaneo J (1976). Purification and properties of a debranching enzyme from *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Acta* **438**: 163-171.
- 39- Boos W y Shuman H (1998). Maltose/maltodextrin system of *Escherichia coli*: Transport, metabolism, and regulation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 204-229.
- 40- Preiss J y Romeo T (1994). Molecular biology and regulatory aspects of glycogen biosynthesis in bacteria. *Prog. Nuc. Acid Res. Mol. Biol.* **47**: 299-329.
- 41- Howlett MR, Mounfort DO, Turner KW y Robertson AM (1976). Metabolism and growth yields in *Bacteriodes ruminicola* strain B₁₄. *Appl. Environ. Microbiol.* **32**: 274-283.
- 42- Russell JB (1993). Glucose toxicity in *Prevotella ruminicola*. Methylglyoxal accumulation and its effect on membrane physiology. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 2844-2850.
- 43- Lou J, Dawson K y Strobel H (1997). Glycogen biosynthesis via UDP-glucose in the ruminal bacterium *Prevotella bryantii* B₁₄. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 4355-4359.
- 44- Takahashi N y Yamada T (2000). Glucose metabolism by *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. *Oral Microbiol. Immunol.* **15**: 188-195.
- 45- Takahashi N, Kalfas S y Yamada T (1995). Phosphorylating enzymes involved in glucose fermentation of *Actinomyces naeslundii*. *J. Bacteriol.* **177**: 5806-5811.
- 46- Gruyer S, Legin E, Bliard C, Ball S y Duchiron F (2002). The endopolysaccharide metabolism of the hyperthermophilic archeon *Thermococcus hydrothermalis*: Polymer structure and biosynthesis. *Curr. Microbiol.* **44**: 206-211.
- 47- Horcajada C, Cid E, Guinovart JJ, Verdaguer N y Ferrer JC (2003). Crystallization and preliminary X-ray analysis of the glycogen synthase from *Pyrococcus abyssi*. *Acta Cryst.* **59**: 2322-2324.
- 48- Cid E, Geremia R, Guinovart J y Ferrer J (2002). Glycogen synthase: towards a minimum catalytic unit? *FEBS Lett.* **528**: 5-11.
- 49- Cardona S, Remonsellez F, Guiliani N y Jerez CA (2001). The glycogen-bound polyphosphate kinase from *Sulfolobus acidocaldarius* is actually a glycogen synthase. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 4773-4780.
- 50- Viola R, Nyvall P y Pedersen M (2001). The unique features of starch metabolism in red algae. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **268**: 1417-1422.
- 51- Sesma JI e Iglesias AA (1998). Synthesis of floridean starch in the red alga *Gracilaria gracilis* occurs via ADP-glucose. In *Photosynthesis: mechanisms and effects* (Garab G., ed) Vol. V, pp. 3537-3540, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- 52- Nyvall P, Pelloux J, Davies HV, Pedersen M y Viola R (1999). Purification and characterisation of a novel starch synthase selective for uridine 5'-diphosphate glucose from the red alga *Gracilaria tenuistipitata*. *Planta* **209**: 143-152.
- 53- McCracken DA y Cain JR (1981). Amylose in floridean starch. *New Phytol.* **88**: 67-71.

- 54- Ekman P, Yu SK y Pedersen M (1991). Effects of altered salinity, darkness and algal nutrient status on floridoside and starch content, alpha-galactosidase activity and agar yield of cultivated *Gracilaria sordida*. *Br. Phycol. J.* **26**: 123-131.
- 55- Fu YB, Ballicora MA, Leykam JF y Preiss J (1998). Mechanism of reductive activation of potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase. *J. Biol. Chem.* **273**: 25045-25052.
- 56- Ballicora MA, Fu Y, Frueauf JB, Schurmann P y Preiss J (1999). Role of the Cys¹² on the heat stability and activation by thioredoxin of the ADP-glucose pyrophosphorylase from potato (*Solanum tuberosum* L.) tuber. *FASEB J.* **13**: A1531-A1531.
- 57- Tiessen A, Hendriks JHM, Stitt M, Branscheid A, Gibon Y, Farre EM y Geigenberger P (2002). Starch synthesis in potato tubers is regulated by post-translational redox modification of ADP-glucose pyrophosphorylase: A novel regulatory mechanism linking starch synthesis to the sucrose supply. *Plant Cell* **14**: 2191-2213.
- 58- Ballicora MA, Iglesias AA y Preiss J (2004). ADP-glucose pyrophosphorylase: a regulatory enzyme for plant starch synthesis. *Photosynthesis Res.* **79**: 1-24.
- 59- Preiss J y Sivak MN (1998). Biochemistry, molecular biology and regulation of starch synthesis. *Genet. Eng. (NY)* **20**: 177-223.
- 60- Harn C, Knight M, Ramakrishnan A, Guan HP, Keeling PL y Wasserman BP (1998). Isolation and characterization of the ZSSIIa and ZSSIIb starch synthase cDNA from maize endosperm. *Plant Mol. Biol.* **37**: 639-649.
- 61- Vrinten PL y Nakamura T (2000). Wheat granule-bound starch synthase I and II are encoded by separate genes that are expressed in different tissues. *Plant Physiol.* **122**: 255-264.
- 62- Ball S (1998). Progress in understanding the biosynthesis of amylose. *Trends Plant. Sci.* **3**: 462-467.
- 63- Kleczkowski LA (1994). Glucose activation and metabolism through UDP-glucose pyrophosphorylase in plants. *Phytochemistry* **37**: 1507-1515.
- 64- Moreno S, Cardini CE y Tandecarz JS (1986). a-glucan synthesis on a protein primer, uridine diphosphoglucose: protein transglucosylase I. Separation from starch synthetase and phosphorylase and a study of its properties. *Eur. J. Biochem.* **157**: 539-545.
- 65- Singh DG, Lomako J, Lomako WM, Whelan WJ, Meyer HE, Serwe M y Metzger JW (1995). b-Glucosylarginine: a new glucose protein bond in a self-glucosylating protein from sweet corn. *FEBS Lett.* **376**: 61-64.
- 66- Krisman CR y Barengo R (1975). A precursor of glycogen biosynthesis: a-1,4-glucan-protein. *Eur. J. Biochem.* **52**: 117-123.
- 67- Rodriguez IR y Whelan WJ (1985). A novel glycosyl-amino acid linkage: rabbit-muscle glycogen is covalently linked to a protein via tyrosine. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **132**: 829-836.
- 68- Roach PJ y Skurat AV (1997). Self-glucosylating initiator proteins and their role in glycogen biosynthesis. *Prog. Nuc. Acid Res. Mol. Biol.* **57**: 289-316.
- 69- Cao YJ, Steinrauf LK y Roach PJ (1995). Mechanism of glycogenin self-glucosylation. *Arch. Biochem. Biophys.* **319**: 293-298.
- 70- Lin A, Mu J, Yang J y Roach PJ (1999). Self-glucosylation of glycogenin, the initiator of glycogen biosynthesis, involves an inter-subunit reaction. *Arch. Biochem. Biophys.* **363**: 163-170.

- 71- Roach P (1990). Control of glycogen synthase by hierarchal protein phosphorylation. *FASEB J.* **4**: 2961-2968.
- 72- Roach PJ, Cheng C, Huang D, Lin A, Mu J, Skurat AV, Wilson W y Zhai L (1998). Novel aspects of the regulation of glycogen storage. *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.* **9**: 139-151.
- 73- Yeaman SJ, Armstrong JL, Bonavaud SM, Poinasamy D, Pickersgill L y Halse R (2001). Regulation of glycogen synthesis in human muscle cells. *Biochem. Soc. Trans.* **29**: 537-541.
- 74- Roach PJ (2002). Glycogen and its metabolism. *Curr. Mol. Med.* **2**: 101-120.
- 75- Fiol C, Wang A, Roeske R y Roach P (1990). Ordered multisite protein phosphorylation. Analysis of glycogen synthase kinase 3 action using model peptide substrates. *J. Biol. Chem.* **265**: 6061-6065.
- 76- Sinnott ML (1991). Catalytic mechanisms of enzymic glycosyl transfer. *Chem. Rev.* **90**: 1170-1202.
- 77- Davies G y Henrissat B (1995). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* **3**: 853-859.
- 78- IUBMB (1992). *Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes*. Academic Press, London.
- 79- Henrissat B (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* **289**: 309-316.
- 80- Henrissat B y Davies G (1997). Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7**: 637-644.
- 81- Zechel DL y Withers SG (2000). Glycosidase mechanisms: anatomy of a finely tuned catalyst. *Acc. Chem. Res.* **33**: 11-18.
- 82- Kapitonov D y Yu R (1999). Conserved domains of glycosyltransferases. *Glycobiology* **9**: 961-978.
- 83- Coutinho PM, Deleury E, Davies GJ y Henrissat B (2003). An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases. *J. Mol. Biol.* **328**: 307-317.
- 84- Gibson RP, Turkenburg JP, Charnock SJ, Lloyd R y Davies GJ (2002). Insights into trehalose synthesis provided by the structure of the retaining glucosyltransferase OtsA. *Chem. Biol.* **9**: 1337-1346.
- 85- Liu J y Mushegian A (2003). Three monophyletic superfamilies account for the majority of the known glycosyltransferases. *Prot. Sci.* **12**: 1418-1431.
- 86- Gaboriaud C, Bissery V, Benchetrit T y Mormon JP (1987). Hydrophobic cluster analysis: An efficient new way to compare and analyse amino acid sequences. *FEBS Lett.* **224**: 149-155.
- 87- Altschul S, Madden T, Schaffer A, Zhang J, Zhang Z, Miller W y Lipman D (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids. Res.* **25**: 3389-3402.
- 88- Wrabl JO y Grishin NV (2001). Homology between O-linked GlcNAc transferases and proteins of the glycogen phosphorylase superfamily. *J. Mol. Biol.* **314**: 365-374.
- 89- Mason-Gamer R, Weil C y Kellogg E (1998). Granule-bound starch synthase: structure, function, and phylogenetic utility. *Mol. Biol. Evol.* **15**: 1658-1673.

- 90- MacGregor EA (2002). Possible structure and active site residues of starch, glycogen, and sucrose synthases. *J. Protein Chem.* **21**: 297-306.
- 91- Johnson LN, Acharya KR, Jordan MD y McLaughlin PJ (1990). Refined crystal structure of the phosphorylase-heptulose 2-phosphate-oligosaccharide-AMP complex. *J. Mol. Biol.* **211**: 645-661.
- 92- Watson KA, Schinzel R, Palm D y Johnson LN (1997). The crystal structure of *Escherichia coli* maltodextrin phosphorylase provides an explanation for the activity without control in this basic archetype of a phosphorylase. *EMBO J.* **16**: 1-14.
- 93- Buschiazzo A, Ugalde JE, Guerin ME, Shepard W, Ugalde RA y Alzari PM (2004). Crystal structure of glycogen synthase: homologous enzymes catalyze glycogen synthesis and degradation. *EMBO J.* **23**: 3196-3205.
- 94- Shen L, Ghosh HP, Greenberg E y Preiss J (1964). Adenosine diphosphate glucose-glycogen transglucosylase in *Arthobacter sp.* NRRL B 1973. *Biochim. Biophys. Acta* **26**: 370-372.
- 95- Greenberg E y Preiss J (1965). Biosynthesis of Bacterial Glycogen. II. Purification and properties of the adenosine diphosphoglucose glycogen transglucosylase of *Arthobacter species* NRRL B1973. *J. Biol. Chem.* **240**: 2341-2348.
- 96- Preiss J y Greenberg E (1965). Biosynthesis of bacterial glycogen. III. The adenosine diphosphate-glucose:α-4-glucosyl transferase of *Escherichia coli* B. *Biochemistry* **4**: 2328-2334.
- 97- Fox J, Kawaguchi K, Greenberg E y Preiss J (1976). Biosynthesis of bacterial glycogen. Purification and properties of the *Escherichia coli* B ADPglucose:1,4-α-D-glucan 4-α-glucosyltransferase. *Biochemistry* **15**: 849-857.
- 98- Holmes E y Preiss J (1979). Characterization of *Escherichia coli* B glycogen synthase enzymatic reactions and products. *Arch. Biochem. Biophys.* **196**: 436-448.
- 99- Barengo R, Flawia M y Krisman CR (1975). The initiation of glycogen biosynthesis in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **53**: 274-278.
- 100- Kawaguchi K, Fox J, Holmes E, Boyer C y Preiss J (1978). De novo synthesis of *Escherichia coli* glycogen is due to primer associated with glycogen synthase and activation by branching enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.* **190**: 385-397.
- 101- Ozbun JL, Hawker JS y Preiss J (1971). Multiple forms of α-1,4 glucan synthetase from spinach leaves. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **43**: 631-636.
- 102- Lavintman N, Tandecarz J, Carceller M, Mendiara S y Cardini CE (1974). Role of uridine diphosphate glucose in the biosynthesis of starch. Mechanism of formation and enlargement of a gluco-proteic acceptor. *Eur. J. Biochem.* **50**: 145-155.
- 103- Nimmo H, Proud C y Cohen P (1976). The purification and properties of rabbit skeletal muscle glycogen synthase. *Eur. J. Biochem.* **68**: 21-30.
- 104- Ernest MJ y Kim K-H (1973). Regulation of rat liver glycogen synthetase. Reversible inactivation of glucogen synthetase D by sulfhydryl-disulfide exchange. *J. Biol. Chem.* **248**: 1550-1555.
- 105- Lin DC y Segal HL (1973). Homogeneous glycogen synthetase b from rat liver. *J. Biol. Chem.* **248**: 7007-7011.

- 106- Holmes E y Preiss J (1982). Detection of two essential sulfhydryl residues in *Escherichia coli* B glycogen synthase. *Arch. Biochem. Biophys.* **216**: 736-740.
- 107- Padgett SR, Huynh QK, Aykent S, Sammons RD, Sikorski JA y Kishore GM (1988). Identification of the reactive cysteines of *Escherichia coli* 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase and their nonessentiality for enzymatic catalysis. *J. Biol. Chem.* **263**: 1798-1802.
- 108- Chen Z, Lu L, Shirley M, Lee WR y Chang SH (1990). Site-directed mutagenesis of glycine-14 and two "critical" cysteinyl residues in *Drosophila* alcohol dehydrogenase. *Biochemistry* **29**: 1112-1118.
- 109- Novak A, Goyal N y Gronostajski RM (1992). Four conserved cysteine residues are required for the DNA binding activity of nuclear factor I. *J. Biol. Chem.* **267**: 12986-12990.
- 110- Dick S, Siemann S, Frey HE, Lepock JR y Viswanatha T (2002). Recombinant lysine:N(6)-hydroxylase: effect of cysteine-->alanine replacements on structural integrity and catalytic competence. *Biochim. Biophys. Acta* **1594**: 219-233.
- 111- Gao G y Fonda ML (1994). Identification of an essential cysteine residue in pyridoxal phosphatase from human erythrocytes. *J. Biol. Chem.* **269**: 8234-8239.
- 112- Jorvall H, Fowler AV y Zabin I (1978). Probe of b-galactosidase structure with iodoacetate. Differential reactivity of thiol groups in wild-type and mutant forms of b-galactosidase. *Biochemistry* **17**: 5160-5165.
- 113- Fierobe HP, Mirgorodskaya E, McGuire KA, Roepstorff P, Svensson B y Clarke AJ (1998). Restoration of catalytic activity beyond wild-type level in glucoamylase from *Aspergillus awamori* by oxidation of the Glu400-->Cys catalytic-base mutant to cysteinesulfinic acid. *Biochemistry* **37**: 3743-3752.
- 114- Jez JM y Noel JP (2000). Mechanism of chalcone synthase. pKa of the catalytic cysteine and the role of the conserved histidine in a plant polyketide synthase. *J. Biol. Chem.* **275**: 39640-39646.
- 115- Kumar A, Larsen CE y Preiss J (1986). Biosynthesis of bacterial glycogen. Primary structure of *Escherichia coli* ADP-glucose:alpha-1,4-glucan, 4-glucosyltransferase as deduced from the nucleotide sequence of the *glgA* gene. *J. Biol. Chem.* **261**: 16256-16259.
- 116- Furukawa K, Tagaya M, Inouye M, Preiss J y Fukui T (1990). Identification of lysine 15 at the active site in *Escherichia coli* glycogen synthase. Conservation of Lys-X-Gly-Gly sequence in the bacterial and mammalian enzymes. *J. Biol. Chem.* **265**: 2086-2090.
- 117- Furukawa K, Tagaya M, Tanizawa K y Fukui T (1993). Role of the conserved Lys-X-Gly-Gly sequence at the ADP-glucose-binding site in *Escherichia coli* glycogen synthase. *J. Biol. Chem.* **268**: 23837-23842.
- 118- Furukawa K, Tagaya M, Tanizawa K y Fukui T (1994). Identification of Lys²⁷⁷ at the active site of *Escherichia coli* glycogen synthase. Application of affinity labeling combined with site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **269**: 868-871.
- 119- Imparl-Radosevich JM, Keeling PL y Guan H (1999). Essential arginine residues in maize starch synthase IIa are involved in both ADP-glucose and primer binding. *FEBS Lett.* **457**: 357-362.
- 120- Nichols DJ, Keeling PL, Spalding M y Guan H (2000). Involvement of conserved aspartate and glutamate residues in the catalysis and substrate binding of maize starch synthase. *Biochemistry* **39**: 7820-7825.

- 121- Blattner FR, Plunkett G, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, Collado Vides J, Glasner JD, Rode CK, Mayhew GF, Gregor J, Davis NW, Kirkpatrick HA, Goeden MA, Rose DJ, Mau B y Shao Y (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**: 1453-1474.
- 122- Brändén CI (1980). Relation between structure and function of alpha/beta-proteins. *Q. Rev. Biophys.* **13**: 317-338.
- 123- Cid E, Gomis RR, Geremia RA, Guinovart JJ y Ferrer JC (2000). Identification of two essential glutamic acid residues in glycogen synthase. *J. Biol. Chem.* **275**: 33614-33621.
- 124- Ha S, Walker D, Shi Y y Walker S (2000). The 1.9 Å crystal structure of *Escherichia coli* MurG, a membrane-associated glycosyltransferase involved in peptidoglycan biosynthesis. *Prot. Sci.* **9**: 1045-1052.
- 125- Hu Y, Chen L, Ha S, Gross B, Falcone B, Walker D, Mokhtarzadeh M y Walker S (2002). Crystal structure of the MurG:UDP-GlcNAc complex reveals common structural principles of a superfamily of glycosyltransferases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**: 845-849.
- 126- Abdian PL, Lellouch AC, Gautier C, Ielpi L y Geremia RA (2000). Identification of essential amino acids in the bacterial α -mannosyltransferase AceA. *J. Biol. Chem.* **275**: 40568-40575.
- 127- Campbell JA, Davies GJ, Bulone V y Henrissat B (1997). A classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* **326**: 929-939.
- 128- Bourne Y y Henrissat B (2001). Glycoside hydrolases and glycosyltransferases: families and functional modules. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **11**: 593-600.
- 129- Drucekes P, Boeck B, Palm D y Schinzel R (1996). Mutational analysis of the oligosaccharide recognition site at the active site of *Escherichia coli* maltodextrin phosphorylase. *Biochemistry* **35**: 6727-6734.
- 130- Schinzel R y Drucekes P (1991). The phosphate recognition site of *Escherichia coli* maltodextrin phosphorylase. *FEBS Lett.* **286**: 125-128.
- 131- Jones DT (1999). GenTHREADER: An efficient and reliable protein fold recognition method for genomic sequences. *J. Mol. Biol.* **287**: 797-815.
- 132- Kraut DA, Carroll KS y Herschlag D (2003). Challenges in enzyme mechanism and energetics. *Annu. Rev. Biochem.* **72**: 517-571.
- 133- Campbell RE, Mosimann SC, Tanner ME y Strynadka NC (2000). The structure of UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase reveals homology to phosphoglycosyl transferases. *Biochemistry* **39**: 14993-15001.
- 134- Vrieling A, Ruger W, Driessen HP y Freemont PS (1994). Crystal structure of the DNA modifying enzyme beta-glucosyltransferase in the presence and absence of the substrate uridine diphosphoglucose. *EMBO J.* **13**: 3413-3422.
- 135- Morera S, Lariviere L, Kurzeck J, Aschke-Sonnenborn U, Freemont PS, Janin J y Ruger W (2001). High resolution crystal structures of T4 phage β -glucosyltransferase: induced fit and effect of substrate and metal binding. *J. Mol. Biol.* **311**: 569-577.
- 136- O'Reilly M, Watson KA, Schinzel R, Palm D y Johnson LN (1997). Oligosaccharide substrate binding in *Escherichia coli* maltodextrin phosphorylase. *Nat. Struct. Biol.* **4**: 405-412.

- 137- Luthy R, Bowie JU y Eisenberg D (1992). Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Nature* **356**: 83-85.
- 138- Davies GJ, Tolley SP, Henrissat B, Hjort C y Schülein M (1995). Structures of oligosaccharide-bound forms of the endoglucanase V from *Humicola insolens* at 1.9 Å resolution. *Biochemistry* **34**: 16210-16220.
- 139- Gibson RP, Tarling CA, Roberts S, Withers SG y Davies GJ (2004). The donor subsite of trehalose-6-phosphate synthase - Binary complexes with UDP-glucose and UDP-2-deoxy-2-fluoro-glucose at 2 angstrom resolution. *J. Biol. Chem.* **279**: 1950-1955.
- 140- Schinzel R y Palm D (1990). *Escherichia coli* maltodextrin phosphorylase: contribution of active site residues glutamate-637 and tyrosine-538 to the phosphorolytic cleavage of α-glucans. *Biochemistry* **29**: 9956-9962.
- 141- Lariviere L, Gueguen-Chaignon V y Morera S (2003). Crystal structures of the T4 phage beta-glucosyltransferase and the D100A mutant in complex with UDP-glucose: Glucose binding and identification of the catalytic base for a direct displacement mechanism. *J. Mol. Biol.* **330**: 1077-1086.
- 142- Gibbons BJ, Roach PJ y Hurley TD (2002). Crystal structure of the autocatalytic initiator of glycogen biosynthesis, glycogenin. *J. Mol. Biol.* **319**: 463-477.
- 143- Denessiouk KA, Ville-Veikko R y Johnson MS (2001). Adenine recognition: a motif present in ADP-, CoA-, NAD-, NADP-, and FAD-dependent proteins. *Proteins: Structure, function and genetics* **44**: 282-291.
- 144- Denessiouk KA y Johnson MS (2000). When fold is not important: a common structural framework for adenine and AMP binding in 12 unrelated protein families. *Proteins* **38**: 310-326.
- 145- Watson KA, McCleverty C, Geremia S, Cottaz S, Driguez H y Johnson LN (1999). Phosphorylase recognition and phosphorolysis of its oligosaccharide substrate: answers to a long outstanding question. *EMBO J.* **18**: 4619-4632.
- 146- Preiss J y Greenberg E (1973). ADP-[¹⁴C]Glucose. *Meth. Enzymol.* **28**: 279-281.
- 147- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ y Klenk DC (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**: 76-85.
- 148- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- 149- Burnette WN (1981). Western blotting - Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated Protein-A. *Anal. Biochem.* **112**: 195-203.
- 150- Matsudaira P (1987). Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *J. Biol. Chem.* **262**: 10035-10038.
- 151- Shen L y Preiss J (1964). The activation and inhibition of bacterial adenosine-diphosphoglucose pyrophosphorylase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **14**: 424-429.
- 152- Savitzky A y Golay MJE (1964). Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedure. *Anal. Chem.* **36**: 1627-1638.

- 153- Trevelyan WE, Procter DP y Harrison JS (1950). Detection of sugars on paper chromatograms. *Nature* **166**: 4218-4219.
- 154- Hill AB (1910). The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves. *J. Physiol. (Lond)* **40**: 4-7.
- 155- Wang J, Stuckey JA, Wishart MJ y Dixon JE (2002). A unique carbohydrate binding domain targets the Lafora disease phosphatase to glycogen. *J. Biol. Chem.* **277**: 2377-2380.
- 156- Rost B (1996). PHD: Predicting one-dimensional protein structure by profile-based neural networks. *Meth. Enzymol.* **266**: 525-539.
- 157- Jones DT (1999). Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J. Mol. Biol.* **292**: 195-202.
- 158- Gough J, Karplus K, Hughey R y Chothia C (2001). Assignment of homology to genome sequences using a library of hidden Markov models that represent all proteins of known structure. *J. Mol. Biol.* **313**: 903-919.
- 159- Sali A y Blundell TL (1993). Comparative protein modeling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* **234**: 779-815.
- 160- Laskowski RA, Macarthur MW, Moss DS y Thornton JM (1993). Procheck - a Program to Check the Stereochemical Quality of Protein Structures. *J. Appl. Crystall.* **26**: 283-291.

