

Ana Auxiliadora García García

Bases moleculares de la N-
glicosilación en residuos de
asparagina en eucariotas
superiores y en residuos de
arginina en enteropatógenos

Director/es

Hurtado Guerrero, Ramón

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606

Tesis Doctoral

**BASES MOLECULARES DE LA N-GLICOSILACIÓN
EN RESIDUOS DE ASPARAGINA EN EUCARIOTAS
SUPERIORES Y EN RESIDUOS DE ARGININA EN
ENTEROPATÓGENOS**

Autor

Ana Auxiliadora García García

Director/es

Hurtado Guerrero, Ramón

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Escuela de Doctorado

Programa de Doctorado en Bioquímica y Biología Molecular

2022

Bases moleculares de la N-glicosilación en residuos de asparagina en eucariotas superiores y en residuos de arginina en enteropatógenos.

Memoria presentada por **Ana Auxiliadora García García**,
graduada en Química, para optar al grado de Doctor en
Ciencias.

Zaragoza, noviembre de 2021



Fondo Social Europeo
"Construyendo Europa desde Aragón"



**GOBIERNO
DE ARAGON**

Departamento de Innovación,
Investigación y Universidad

D. RAMÓN HURTADO GUERRERO, investigador ARAID del Instituto de Biocomputación y Física de Sistemas Complejos (BIFI) de la Universidad de Zaragoza,

CERTIFICA:

Que la tesis doctoral **Bases moleculares de la N-glicosilación en residuos de asparagina en eucariotas superiores y en residuos de arginina en enteropatógenos** ha sido realizada, bajo su dirección por la graduada ANA AUXILIADORA GARCÍA GARCÍA, en el Instituto de Biocomputación y Física de Sistemas Complejos y que reúne, a su juicio, las condiciones requeridas para optar al grado de Doctor en Ciencias por la Universidad de Zaragoza.

Zaragoza, noviembre de 2021.

La realización de esta tesis doctoral ha sido posible gracias a la financiación del Ministerio de Economía y Competitividad del Gobierno de España (BFU2016-75633-P y PID2019-105451GB-I00), de la Agencia Aragonesa para la Investigación y Desarrollo (ARAID) y de la Diputación General de Aragón (DGA, proyectos E34_17R, LMP58_18 y el proyecto COVID19 “Desarrollo de nanobodies y “adhirons” frente al dominio de unión de la glicoproteína “spike” del virus SARS-CoV-2 como tratamiento para la enfermedad CoVid19”). Se ha colaborado también con los sincrotrones DLS en Oxford (líneas I02, I03, I04 y I24) y ALBA, en Barcelona (línea BL13-XALOC).

Durante los cuatro años de realización de esta tesis (desde octubre de 2017 hasta noviembre de 2021, ambos incluidos), la doctoranda ha sido beneficiaria de una subvención de la Diputación General de Aragón destinada a la contratación de personal investigador predoctoral en formación (BOA del 16/01/2017) y cofinanciada por el Fondo Social Europeo.

Parece mentira haber conseguido llegar hasta aquí, pero al final en la vida todo llega. Han sido cuatro años muy intensos, llenos de frustraciones y algún que otro logro que conseguía amenizar las dificultades del día a día en el laboratorio.

Echando la vista atrás, lo primero que se me viene a la mente es mi familia, sin ellos nada de esto habría sido posible. Desde el principio me han dado su apoyo incondicional, siempre animándome en los momentos de bajón y por supuesto siendo mi rincón de paz y desconexión cada vez que podía escaparme a casa, porque, aunque lleve viviendo fuera desde los 18 años mi hogar será siempre donde estén ellos.

También quiero agradecer a mi familia adoptiva, porque me han acogido desde el principio y han hecho que el vivir lejos de casa sea más ameno.

Por supuesto, no puedo olvidar a Víctor, quién más me ha aguantado y apoyado durante este tiempo y quién me ha obligado siempre a seguir adelante, nunca permitiendo que dejara de creer en mí misma y por supuesto siempre apoyando mis decisiones, aunque sean tan cambiantes (ya lo siento).

A todos, muchísimas gracias.

Contenido

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	9
ÍNDICE DE FIGURAS	9
ÍNDICE DE TABLAS	14
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	17
1.1. VISIÓN GENERAL	19
1.2. FAMILIA DE EFECTORES NleB/SseK.....	22
1.2.1. SISTEMA DE SECRECIÓN TIPO III (T3SS)	23
1.2.2. MIEMBROS DE LA FAMILIA NleB/SseK.....	24
1.2.3. ACTIVIDAD Y ESTRUCTURA	24
1.2.4. PARTICIPACIÓN EN LA VIRULENCIA DE ESTOS FACTORES.....	28
1.2.5. TARGETS DE LOS EFECTORES NleB/SseK.....	29
1.3. FUT8.....	35
1.3.1. FUCOSILACIÓN	35
1.3.2. FUCOSILACIÓN CENTRAL.....	37
1.3.3. FUT8.....	38
1.3.3.1. ESTRUCTURA.....	38
1.3.4. EXPRESIÓN EN CÁNCER	39
1.3.5. MECANISMO REGULATORIO DE FUT8 EN CÁNCER ...	40
1.3.5.1. EVASIÓN INMUNE	40
1.3.5.2. CITOTOXICIDAD CELULAR DEPENDIENTE DE ANTICUERPOS (ADCC)	41

1.3.5.3.	FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE BETA (TGF- β)	42
1.3.5.4.	FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO (EGF)..	43
1.3.5.5.	$\alpha 3\beta 1$ INTEGRIN.....	43
1.3.5.6.	E-CADHERINA	44
CAPÍTULO 2: OBJETIVOS		45
2.	OBJETIVO GENERAL	47
2.1.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	47
CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS		49
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	51
3.1.	FAMILIA DE LAS NleB/SseK	51
3.1.1.	TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR	51
3.1.1.1.	CONSTRUCCIÓN DE LOS PLÁSMIDOS DE LAS PROTEÍNAS DE LA FAMILIA NleB/SseK Y DOMINIOS DE MUERTE.....	51
3.1.1.2.	TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES BL21(DE3).....	55
3.1.1.3.	CONSERVACIÓN EN GLICEROL DE LAS COLONIAS TRANSFORMADAS	56
3.1.2.	EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS.....	56
3.1.2.1.	CRECIMIENTO DE LAS CÉLULAS DE BL21(DE3) TRANSFORMADAS	57
3.1.3.	PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	57
3.1.3.1.	CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD CON HISTRAP (IMAC).....	58

3.1.3.2.	ELECTROFORESIS SDS-PAGE DESNATURALIZANTE Y TINCIÓN	59
3.1.3.3.	INTERCAMBIO DE TAMPÓN	60
3.1.3.4.	CORTE CON PROTEASA Y PURIFICACIÓN.....	61
3.1.3.5.	CONCENTRACIÓN Y CONSERVACIÓN.....	62
3.1.4.	TÉCNICAS BIOFÍSICAS PARA EL ANÁLISIS Y CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS	63
3.1.4.1.	DETERMINACIÓN DE LA CONSTANTE DE UNIÓN POR ITC.....	63
3.1.4.2.	ANÁLISIS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.....	65
3.1.5.	ENSAYOS CELULARES.....	67
3.1.5.1.	ENSAYO DE INFECCIÓN POR SALMONELLA EN MACRÓFAGOS.....	67
3.1.6.	TÉCNICAS COMPUTACIONALES	68
3.2.	FUT8.....	73
3.2.1.	TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR	73
3.2.1.1.	PLÁSMIDO DE FUT8.....	73
3.2.1.2.	TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES DH5 α	74
3.2.1.3.	EXTRACCIÓN DE ADN PLASMÍDICO	74
3.2.1.4.	CRISPR/Cas9 DIRIGIDO PARA HACER <i>KNOCKOUTS</i> EN CÉLULAS CHO	74
3.2.2.	EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS	76
3.2.2.1.	TRANSFECCIÓN DE FUT8 EN HEK293F	77
3.2.2.2.	EXPRESIÓN ESTABLE DE LOS IgG1, AGA, GLA y GBA HUMANOS RECOMBINANTES EN CÉLULAS CHO	77

3.2.3.	PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	78
3.2.3.1.	CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD CON HISTAG (IMAC).....	79
3.2.3.2.	ELECTROFORESIS SDS-PAGE DENATURALIZANTE Y TINCIÓN	79
3.2.3.3.	INTERCAMBIO DE TAMPÓN	79
3.2.3.4.	CORTE CON PROTEASA Y PURIFICACIÓN.....	80
3.2.3.5.	CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR	80
3.2.3.6.	CONCENTRACIÓN Y CONSERVACIÓN.....	81
3.2.3.7.	PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES EXPRESADAS EN LAS CÉLULAS CHO	81
3.2.4.	SÍNTESIS DE LOS GLICANOS EMPLEADOS.....	82
3.2.4.1.	PREPARACIÓN DE G0, G0-PÉPTIDO Y PÉPTIDO KVANKT.....	83
3.2.4.2.	PREPARACIÓN DE M3N2 Y M3N2-PÉPTIDO	84
3.2.4.3.	PREPARACIÓN DE M5N2-ASN	84
3.2.5.	ARRAY DE GLICANOS	85
3.2.6.	TÉCNICA DE ANÁLISIS ESTRUCTURAL: CRISTALIZACIÓN DE PROTEÍNAS	86
3.2.6.1.	COCRISTALIZACIÓN DE FUT8	87
3.2.6.2.	TOMA DE DATOS: DIFRACCIÓN DE RAYOS X.....	88
3.2.6.3.	RESOLUCIÓN DE LA ESTRUCTURA CRISTALOGRÁFICA.....	89
3.2.7.	TÉCNICAS BIOFÍSICAS PARA EL ANÁLISIS Y CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS.....	89

3.2.7.1.	DETERMINACIÓN DE LA CONSTANTE DE UNIÓN POR ITC.....	89
3.2.7.4.	ANÁLISIS DE LOS N-GLICANOS DE IGG POR CELIF.....	95
3.2.7.5.	TÉCNICAS DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS.....	97
3.2.8.	TÉCNICAS COMPUTACIONALES.....	100
3.2.8.1.	DINÁMICAS MOLECULARES DE FUT8.....	100
CAPÍTULO 4: RESULTADOS.....		101
4.	RESULTADOS.....	103
4.1.	EFFECTORES DE LA FAMILIA NleB/SseK.....	103
4.1.1.	ANÁLISIS DE LAS INTERACCIONES ENTRE FADD ^{DD} Y NleB1 ^{EPEC}	103
4.1.1.1.	ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y BIOINFORMÁTICO DE LOS EFFECTORES NleB/SseK.....	103
4.1.1.2.	ANÁLISIS CINÉTICO DE LOS EFFECTORES NleB/SseK.....	110
4.1.1.3.	ANÁLISIS TERMODINÁMICO DE LOS EFFECTORES NleB/SseK.....	117
4.1.1.4.	DINÁMICAS MOLECULARES.....	123
4.1.2.	ESTUDIOS CINÉTICOS Y TERMODINÁMICOS USANDO DR3 ^{DD} COMO SUSTRATO ACEPTOR.....	130
4.1.2.1.	ANÁLISIS CINÉTICO.....	130
4.1.2.2.	ANÁLISIS TERMODINÁMICO.....	133
4.1.3.	ESTUDIO EN MACRÓFAGOS.....	137
4.2.	FUT8.....	139

4.2.1. CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DE FUT8 USANDO MICROARRAYS Y BASES MOLECULARES DEL RECONOCIMIENTO DE FUT8 SOBRE SUS LIGANDOS.....	139
4.2.2. CINÉTICAS DE <i>HSFUT8</i> FRENTE A DISTINTOS N-GLICANOS Y N-GLICOPÉPTIDOS.....	150
4.2.3. TERMODINÁMICA DE FUT8 FRENTE A LOS DIFERENTES N-GLICANOS Y N-GLICOPÉPTIDOS.....	156
4.2.4. DINÁMICA MOLECULAR Y RMN-NOESY FRENTE A M3N2-PÉPTIDO Y M3N2.....	160
4.2.5. ESPECTROSCOPIA DE RMN-STD DE FUT8 FRENTE A G0-PÉPTIDO, M3N2-PÉPTIDO, M3N2 Y EL PÉPTIDO SIN N-GLICANO.....	165
4.2.6. FUCOSILACIÓN CENTRAL EN CÉLULAS.....	174
4.2.7. PAPEL DE LOS AMINOÁCIDOS MÁS CERCANOS AL N-GLICANO EN LA FUCOSILACIÓN CENTRAL.....	177
CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	183
5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	185
5.1. EFECTORES DE LA FAMILIA NleB/SseK.....	185
5.2. FUT8.....	187
CAPÍTULO 6: REFERENCIAS.....	191
6. REFERENCIAS.....	193
CAPÍTULO 7: ABREVIATURAS.....	217
7. ABREVIATURAS.....	219
CAPÍTULO 8: APÉNDICES.....	221
8. APÉNDICES.....	223
8.1. MEDIOS DE CULTIVO Y RECETAS.....	223

8.2.	PROPIEDADES DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES..	225
8.2.1.	SseK1	225
8.2.2.	SseK2	226
8.2.3.	NleB1 ^{EHEC}	226
8.2.4.	FADD ^{DD}	227
8.2.5.	DR3 ^{DD}	227
8.2.6.	HsFUT8.....	228
8.3.	Los aminoácidos	228

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tipos de MPTs más comunes y sus funciones principales.	19
Figura 2. Vía de N-glicosilación en los distintos reinos.....	21
Figura 3. Arquitectura de las SseK1, SseK2 y NleB2.	25
Figura 4. Estructura de la SseK3 apo y en complejo con UDP, GlcNAc y Mn ²⁺	26
Figura 5. Estructura de los dominios de muerte celular en su forma glicosilada por la NleB1.	27
Figura 6. Vía completa de señalización NF-κB.....	30
Figura 7. Resumen de las proteínas target de las NleB/SseK.	34
Figura 8. Fucosiltransferasas en humanos.....	37
Figura 9. Reacción de transferencia de fucosa al GlcNAc más interior del N-glicano mediado por FUT8.	37
Figura 10. Mapa de los vectores usados por GenScript para la creación de nuestros plásmidos.....	54
Figura 11. Gel de la purificación de SseK1	58
Figura 12. Gel del corte con PP y TEV de SseK1 y NleB1	59
Figura 13. Esquema general del funcionamiento del ITC.	63
Figura 14. Esquema del funcionamiento de los kits de Promega empleados.	66
Figura 15. Mapa del vector usado por GenScript para la creación de nuestro plásmido.	73
Figura 16. Esquema simplificado del sistema de edición CRISPR/Cas9.....	75
Figura 17. Cromatograma de la purificación de FUT8	79
Figura 18. Gel del corte con TEV de FUT8.....	79
Figura 19. Cromatograma de la exclusión molecular de FUT8.....	81

Figura 20. Esquema de la preparación de los glicanos.	82
Figura 21. Estructura química de G0 y G0-péptido.....	84
Figura 22. Estructura química de M3N2 y M3N2-péptido.	84
Figura 23. Estructura química de M5N2-Asn.....	85
Figura 24. Esquema del proceso de obtención de la estructura de una proteína por cristalización.	87
Figura 25. Ilustración de un experimento ¹ D STD NMR.....	92
Figura 26. Medida NOESY para el M3N2-péptido.....	94
Figura 27. Alineamiento múltiple de las secuencias de CrNleB, NleB1 ^{EPEC} , NleB1 ^{EHEC} , SseK1 ^{wt} , SseK2 ^{wt} y SseK3 ^{wt} ..	104
Figura 28. Representación en “cartoon” del complejo NleB1 ^{EPEC} -UDP-Mn+2-FADD ^{DD}	105
Figura 29. Alineamiento múltiple de las secuencias de proteínas que contienen un dominio de muerte..	108
Figura 30. (A) Cinética de NleB1 ^{EHEC} frente a UDP-GlcNAc con una concentración saturante de FADD ^{DD} , (B) Cinética NleB1 ^{EHEC} frente a FADD ^{DD} con una concentración saturante de UDP-GlcNAc.....	110
Figura 31. Cinética de SseK2 ^{wt} frente a FADD ^{DD} con una concentración saturante de UDP-GlcNAc.	111
Figura 32. Cinéticas de NleB1 ^{EHEC} /SseK1 ^{wt} /SseK2 ^{wt} y sus mutantes frente a FADD ^{DD}	113
Figura 33. Gráficas de comparación de los valores de K_m , k_{cat} y k_{cat}/K_m entre las diferentes enzimas estudiadas.	114
Figura 34. Dinámica de los efectores NleB/SseK a lo largo del ciclo catalítico.	118
Figura 35. Datos de ITC para la unión de FADD ^{DD} con NleB1 ^{EHEC} , SseK1 ^{wt} , SseK2 ^{wt} y los respectivos mutantes.....	121
Figura 36. Resultados termodinámicos de las interacciones entre las enzimas y FADD ^{DD}	121

Figura 37. Dinámicas moleculares de los complejos de NleB1 ^{EPEC} , S286Y ^{SseK1} , S286N ^{SseK1} , S286I ^{SseK1} y SseK1 ^{wt} formados con FADD ^{DD} y UDP-GalNAc-Mn ⁺²	124
Figura 38. Simulaciones de dinámicas moleculares de los complejos de S286Y ^{SseK1} y NleB1 ^{EPEC} con FADD ^{DD}	125
Figura 39. Dinámica molecular de los complejos de FADD ^{DD} con SseK1 ^{wt} , S286I ^{SseK1} y S286N ^{SseK1}	126
Figura 40. Distribuciones de distancias intermoleculares clave de los complejos de FADD ^{DD} con NleB1 ^{EPEC} , SseK1 ^{wt} , S286Y ^{SseK1} , S286I ^{SseK1} y S286N ^{SseK1}	127
Figura 41. Cinéticas de glicosilación de NleB1 ^{EHEC} /SseK1 ^{wt} /SseK2 ^{wt} y sus mutantes frente a DR3 ^{DD}	131
Figura 42. Gráficos de comparación de los parámetros cinéticos obtenidos: K_m , k_{cat} y la eficiencia catalítica (k_{cat}/K_m) de NleB1 ^{EHEC} /SseK1 ^{wt} y S286Y ^{SseK1} /N302Y ^{SseK2}	131
Figura 43. Datos de ITC para la unión de NleB1 ^{EHEC} , SseK1 ^{wt} , SseK2 ^{wt} y los respectivos mutantes frente a de DR3 ^{DD}	134
Figura 44. Resultados termodinámicos de las interacciones entre las enzimas y DR3 ^{DD}	135
Figura 45. Las mutaciones en el residuo S286 en SseK1 y N302 en SseK2 a Tyr promueven la proliferación de <i>Salmonella</i> en las células RAW264.7.	137
Figura 46. Espectro MALDI-TOF donde se muestra el incremento de masa debido a la incorporación de una fucosa en G0 debido a HsFUT8.	139
Figura 47. Microarray empleado para caracterizar la selectividad de sustrato de FUT8..	140
Figura 48. Ensayo de actividad de HsFUT8 en el microarray de glicanos..	141
Figura 49. Una molécula de HsFUT8 (A en gris) de una unidad asimétrica forma una estructura dimérica con otra molécula (B* en	

azul) de otra unidad asimétrica* a través de sus dominios <i>coiled-coil</i>	143
Figura 50. Estructura del complejo <i>HsFUT8</i> -GDP-G0.	144
Figura 51. Características estructurales de los sitios de unión de GDP-Fucosa y G0.....	146
Figura 52. FUT8 no glicosila N-glicanos conteniendo GlcNAc bisectantes.	150
Figura 53. (A) Preparación de G0, G0-péptido, M3N2 y M3N2-péptido derivados del N-glicano sialilado aislado de yema de huevo. (B) Preparación de M5N2-Asn a partir de aglutinina de soja.....	151
Figura 54. Espectro MALDI-TOFF de G0-péptido $[M+Na]^+=1981,007$ (panel superior) y reacción de G0-péptido con FUT8 en presencia de GDP-Fucosa (panel inferior).	152
Figura 55. Espectro MALDI-TOFF de M3N2 $[M+Na]^+=933,134$ (panel superior) y reacción de M3N2 con FUT8 en presencia de GDP- Fucosa,.....	152
Figura 56. Espectro MALDI-TOFF de M3N2-péptido $[M+Na]^+=1574,399$ (panel superior) y reacción de M3N2-péptido con FUT8 en presencia de GDP-Fucosa (panel inferior) mostrando la conversión parcial en el glicopéptido fucosilado $[M+Na]^+=1720,55$ tras 18 h de incubación.....	153
Figura 57. Cinética enzimática de FUT8 frente a los distintos N- glicanos y oligosacáridos unidos a Asn, y N-glicopéptidos.....	153
Figura 58. Cinética de FUT8 frente a concentraciones variables de GDP-Fucosa usando 500 μ M de G0.	154
Figura 59. Datos del ITC de algunos N-glicanos frente a FUT8.....	157
Figura 60. Datos de ITC para la unión de M5N2-Asn, M3N2-péptido y M3N2 frente a FUT8 en presencia de un exceso de GDP (1mM).. ..	158
Figura 61. Simulación de dinámica molecular de M3N2-péptido.	161

Figura 62. Distancias H1B-H4A y H1B-H5A consideradas para la asignación de las conformaciones <i>syn</i> y <i>anti</i> del enlace glicosídico entre los GlcNAc.	161
Figura 63. Medidas NOESY para M3N2-péptido.....	163
Figura 64. Simulación de dinámica molecular de M3N2-péptido.. ...	164
Figura 65. Determinación de la conformación de M3N2-péptido.	164
Figura 66. Análisis del espectro de RMN-STD para el péptido (KVANKT) en complejo con FUT8 en ausencia (A) y en presencia de GDP (B).	165
Figura 67. Análisis del espectro de RMN-STD para M3N2 en complejo con FUT8 en ausencia (A) y en presencia de GDP (B)... ..	166
Figura 68. Análisis del espectro de RMN-STD para M3N2-péptido en complejo con FUT8 en ausencia (A) y en presencia de GDP (B).....	167
Figura 69. Reconstrucción de las curvas de RMN-STD para G0-péptido en complejo con FUT8 en ausencia (A) y presencia de GDP (B).	168
Figura 70. Análisis del espectro de RMN-STD para G0-péptido en complejo con FUT8 en ausencia (A) y en presencia de GDP (B).	169
Figura 71. Mapeo del epítipo de unión a G0-péptido con FUT8 mediante STD y llevado a cabo en ausencia (A) y presencia (B) de GDP.....	170
Figura 72. Ensamblaje estructural derivado de la simulación de 0,5 μ s llevada a cabo para FUT8 en complejo con G0-péptido (izquierda) y M3N2-péptido (derecha).. ..	172
Figura 73. <i>Frame</i> representativa obtenida de la simulación de 0,5 μ s del complejo FUT8-GDP-M3N2-péptido.....	173
Figura 74. (A) Representación gráfica de los genes que participan en los primeros pasos de la síntesis de N-glicanos. (B y C) <i>In vivo</i> fucosilación central de los N-glicanos.	176
Figura 75. Estructuras amplificadas de los N-glicanos de GBA, MPO, AGA y GLA	180

Figura 76. Ensamblaje estructural obtenido de la simulación de 0,5 μ s de MPO (código del PDB: 1D2V), GLA (código del PDB: 1R46), GBA (código del PDB: 5LVX) y EPO (código del PDB: 1CN4). 181

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Mutantes obtenidos para SseK1 y SseK2.	53
Tabla 2. Tabla de interacciones entre los residuos de la interfaz del complejo NleB1 ^{EPEC} -FADD ^{DD}	105
Tabla 3. Parámetros cinéticos frente a FADD ^{DD}	115
Tabla 4. Parámetros termodinámicos para la unión de FADD ^{DD} a NleB1 ^{EHEC} , SseK1 ^{wt} , SseK2 ^{wt} y los correspondientes mutantes.....	121
Tabla 5. Fluctuaciones cuadráticas medias de las simulaciones de 1 μ s de GaMD de los cinco complejos.....	129
Tabla 6. Parámetros cinéticos obtenidos frente a DR3 ^{DD} para las enzimas NleB1 ^{EHEC} , SseK1 ^{wt} , SseK2 ^{wt} y sus mutantes.....	132
Tabla 7. Parámetros termodinámicos para la unión de NleB1 ^{EHEC} , SseK1 ^{wt} , SseK2 ^{wt} y sus mutantes frente a DR3 ^{DD}	136
Tabla 8. Recolección de datos y estadísticas del refinamiento del complejo <i>HsFUT8</i> -GDP-G0.	142
Tabla 9. Parámetros cinéticos de la fucosilación de FUT8 frente a diferentes N-glicanos y oligosacáridos unidos a Asn, y N-glicopéptidos usados en nuestro estudio.	154
Tabla 10. Parámetros termodinámicos para los N-glicanos y oligosacáridos unidos a Asn y los N-glicopéptidos frente a FUT8.	159

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1. VISIÓN GENERAL

Las modificaciones post-traduccionales (MPTs) son las responsables de la amplia diversidad de las funciones de las proteínas, así como del gran tamaño que presenta el proteoma. Hasta ahora se han descrito un gran número de MPTs diferentes que son determinadas por un número de enzimas cuyo correcto funcionamiento determinan el estado de salud del organismo (**Figura 1**) (Ohtsubo y Marth, 2006).

Estas MPTs también son responsables de la localización y la actividad de las proteínas modificadas, y además intervienen o influyen las interacciones con otras proteínas (Monahan *et al.*, 2008).

MPTs más comunes e importantes	
Tipo de MPTs	Funciones principales
Fosforilación pTyr pSer, pThr	Activación/inactivación de enzimas, modulación de interacciones, señalización
Acetilación	Estabilidad, regulación de interacciones proteína-DNA
Metilación	Regulación de expresión de genes
Acilación, modificación de ácidos grasos	Localización celular y señalización, mediador de interacciones
Glicosilación <i>N-linked</i> <i>O-linked</i>	Proteínas excretadas, reconocimiento celular/señalización, funciones reguladoras
Hidroxilación	Estabilidad e interacciones proteína-ligando
Sulfatación	Modular interacciones proteína-proteína y receptor-ligando
Formación de puentes disulfuro	Estabilidad
Ubiquitinación	Señalización

Figura 1. Tipos de MPTs más comunes y sus funciones principales. En la figura se muestran las MPTs más comunes de las más de 200 descritas con sus funciones principales. Estas MPTs explican la gran complejidad y variabilidad del proteoma.

Las proteínas pueden ser modificadas por más de un tipo de MPT o por el mismo en diferentes residuos, pudiendo darse las modificaciones

separadas en el tiempo o bien secuencialmente en un mismo residuo (Deribe *et al.*, 2010).

Dentro de la variedad de MPTs, la glicosilación es la más abundante en la naturaleza. Podemos encontrarnos con la N-glicosilación (que es aquella donde se produce la adición covalente de un azúcar al nitrógeno de los grupos amida presentes en asparagina o arginina), la O-glicosilación (donde la adición comúnmente tiene lugar en el grupo hidroxilo de serinas o treoninas) y en casos más raros, la C-manosilación (donde se forma un enlace covalente entre el carbono anomérico de la manosa y el carbono 2 del anillo de indol del triptófano) (Nothaft y Szymanski, 2010).

En todos los casos, la glicosilación se produce en dos etapas: una primera donde la glicosiltransferasa generalmente reconoce un motivo determinado en la proteína y transfiere el primer monosacárido, y una segunda donde un gran número de otras glicosiltransferasas pueden participar secuencialmente construyendo la estructura del glicano. Hay diferencias bastante significativas en la glicosilación entre los distintos reinos, encontrándose los glicanos más complejos en los organismos que se encuentran más evolucionados (Stanley, P., Schachter, H., y Taniguchi, 2009). En concreto en la presente tesis nos vamos a centrar en la N-glicosilación que tiene lugar en residuos de asparagina (**Figura 2**) en eucariotas superiores y en residuos de arginina en enteropatógenos.

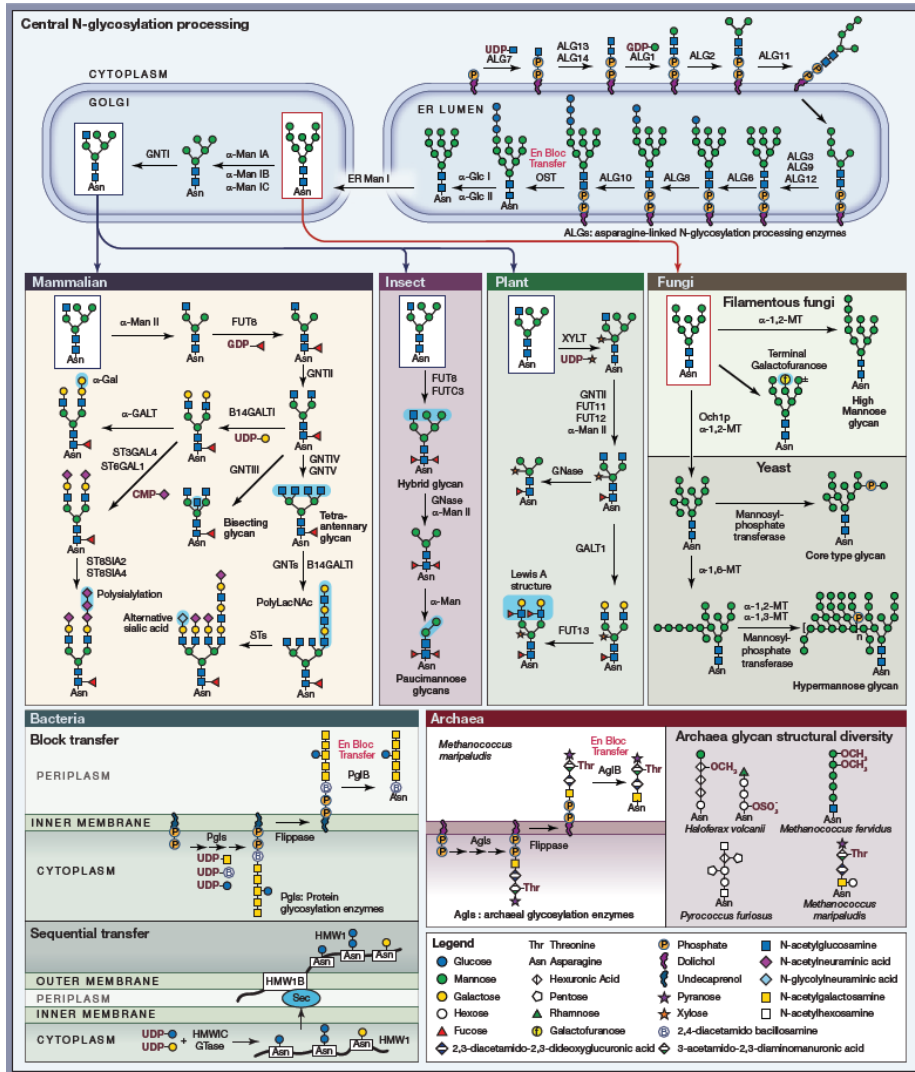


Figura 2. Vía de N-glicosilación en los distintos reinos (Chung *et al.*, 2017). En la mayoría de los organismos eucariotas, la vía de inicio es similar y ocurre en el retículo endoplasmático. La síntesis se inicia con la generación de un lípido unido a un oligosacárido (LLO) por múltiples enzimas de procesamiento de N-glicosilación (ALG). A continuación, el oligosacárido se transfiere "en bloque" al esqueleto polipeptídico mediante la oligosacariltransferasa (OST). Las proteínas se modifican en los residuos Asn que contienen la secuencia N-X-S/T. El procesamiento entonces diverge significativamente entre especies evolutivamente distantes en el aparato de Golgi siendo más complejos los N-glicanos resultantes que los presentes en bacterias y *archeas*. En estos dos

últimos casos el inicio de la vía comienza con distintos precursores más simples.

En concreto nos centraremos en las enzimas de la familia de las NleB/SseK, que son proteínas de bacterias que N-glicosilan en residuos de arginina, y en FUT8, enzima presente en mamíferos e insectos cuya función se centra en fucosilar N-glicanos haciéndolos más complejos y dotándolos de funciones específicas.

1.2. FAMILIA DE EFECTORES NleB/SseK

Las NleB/SseK, son proteínas efectoras de bacterias gram-negativas o enteropatógenos causantes de infecciones generalmente gastrointestinales en humanos y animales. Estas enzimas se han caracterizado en: *Citrobacter rodentium*, agente causal de hiperplasia en el colon, diarrea e incluso muerte en ratones (Mundy *et al.*, 2005); *E.coli EHEC*, agente causal de diarrea severa y hemorrágica, así como de colitis hemorrágica (HC) y síndrome urémico hemorrágico (HUS) en humanos (Welinder-Olsson y Kaijser, 2005); *E.coli EPEC*, agente causal de diarrea persistente en humanos (Goosney *et al.*, 2000); y *S. entérica*, agente causal de salmonelosis, cuyos síntomas pueden ser diarrea, fiebre y calambres intestinales (Uzzau *et al.*, 2000).

Estas proteínas efectoras, tienen un papel muy importante en el mecanismo de infección de dichas bacterias y a continuación, veremos una breve introducción sobre el mecanismo que emplean las mismas para introducir los efectores en los organismos huésped, así como la introducción propiamente dicha de la familia NleB/SseK.

1.2.1. SISTEMA DE SECRECIÓN TIPO III (T3SS)

Muchas bacterias mantienen una relación estrecha con el organismo en el que habitan, ya sea manteniendo una relación simbiótica, sean neutrales o bien patógenas para el mismo. Esta estrecha relación entre bacteria y huésped está mediada por proteínas secretadas por las mismas bacterias para interactuar con objetivos específicos o *targets* dentro del organismo, resultando en la modulación del comportamiento de las células y la respuesta de las mismas dentro del huésped.

Este tipo de modulación no se da solo secretando dichas proteínas al ambiente extracelular, sino traslocándolas directamente desde las bacterias hacia el interior de las células del huésped. Una de las formas de hacer esto es mediante el sistema de secreción tipo III, propio de bacterias gram-negativas.

Gracias a este sistema, las proteínas secretadas llamadas también efectores, son transportadas a través de la membrana bacteriana y de las barreras propias de la célula huésped (Wagner *et al.*, 2018).

Los efectores tienen una amplia diversidad en cuanto a su actividad y proteínas objetivo, teniendo usualmente un dominio de secreción N-terminal y uno o varios dominios C-terminal funcionales (Galán, 2009).

Los efectores se pueden clasificar también en 4 categorías según su actividad (N. E. Scott y Hartland, 2017):

- Efectores que median su actividad mediante interacciones físicas con los *targets*.
- Efectores que mimetizan proteínas del huésped para alterar los procesos dentro del organismo.
- Efectores que promueven MPTs en proteínas del huésped.
- Efectores con actividad proteasa.

1.2.2. MIEMBROS DE LA FAMILIA NleB/SseK

Los efectores de esta familia de enzimas catalizan la reacción de transferencia de un grupo N-acetilglucosamina (GlcNAc) desde UDP-GlcNAc al grupo amino de argininas en las proteínas *target* del huésped para interrumpir las funciones del sistema inmune (Li *et al.*, 2013). La glicosilación de argininas es un hecho muy inusual debido a que ocurre en el grupo guanidinio de las mismas, siendo estos grupos muy poco nucleófilos (El Qaidi *et al.*, 2020). Estos efectores se han estudiado en *C. rodentium*, *E.coli* EHEC, *E.coli* EPEC y *S. entérica*.

NleB se descubrió en *C. rodentium*, pero encontramos distintos homólogos de NleB según el organismo (Deng *et al.*, 2004). En *E.coli* EHEC y *E.coli* EPEC encontramos dos homólogos de NleB llamados NleB1 y NleB2 (Petty *et al.*, 2010). NleB1 presenta un 89% de identidad con la NleB de *C. rodentium*, mientras que NleB2 es idéntica en ambas cepas de *E.coli* pero sólo guardan un 60% de identidad con la NleB de *C. rodentium*. En *S. entérica* nos encontramos con tres ortólogos: SseK1, SseK2 y SseK3 (Kujat Choy *et al.*, 2004; Brown *et al.*, 2011).

1.2.3. ACTIVIDAD Y ESTRUCTURA

Como se ha mencionado previamente, la N-glicosilación de residuos de arginina es un tipo de glicosilación poco común, la mayoría de los estudios sobre glicosilación de proteínas se centraban en la O-glicosilación de serinas, treoninas y tirosinas, y la N-glicosilación de asparaginas (Nothaft y Szymanski, 2010).

Al principio se describió la actividad transferasa de GlcNAc de la NleB de *C. rodentium* aunque se desconocía el residuo aceptor (Gao *et al.*, 2016). Posteriormente, se determinó que el residuo aceptor era una arginina y se mostró que esta actividad la realizaban la NleB de *C. rodentium*, NleB1 EHEC y SseK1 *S. enterica*, mientras que no se

detectó actividad para NleB2 y había dudas de la actividad de SseK2 y SseK3 (Günster *et al.*, 2017; El Qaidi *et al.*, 2017).

Hasta la fecha, se han determinado muchas estructuras de los miembros de la familia NleB/SseK, algunas de las cuales se muestran en la **Figura 3**, de donde se concluye que estas proteínas adoptan el plegamiento típico de la familia GT-A o dominio tipo GT-A y presentan el motivo DxD para la coordinación del metal, esencial para la unión del UDP-GlcNAc y la actividad enzimática (Esposito *et al.*, 2018; Park *et al.*, 2018; Ding *et al.*, 2019; Newson *et al.*, 2019). Además, todas estas enzimas muestran un dominio más pequeño formado por dos alfas hélices unidas por un *loop* (dominio también llamado HLH; **Figura 3**).

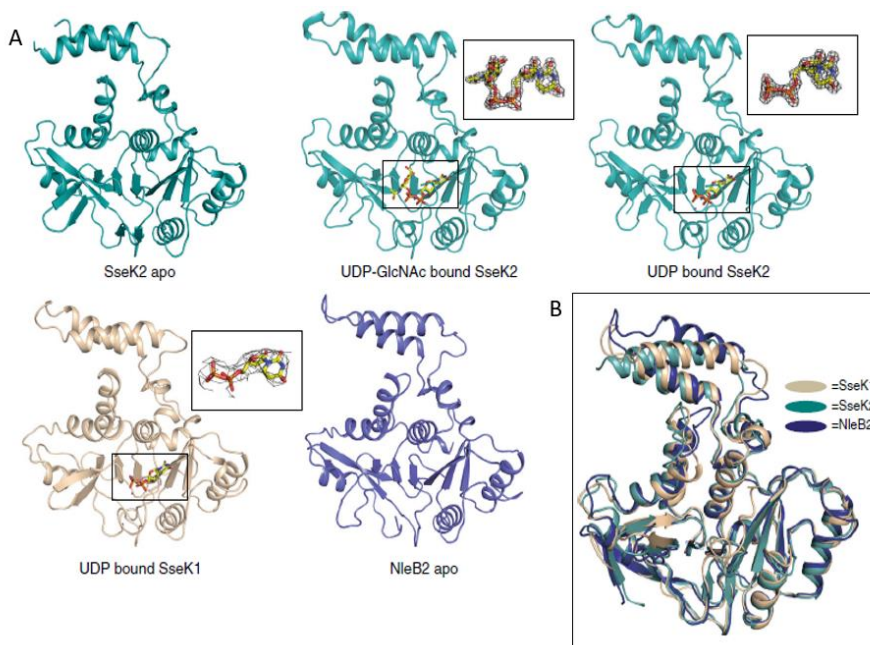


Figura 3. Arquitectura de las SseK1, SseK2 y NleB2. En (A) Se muestran las estructuras cristalinas y los mapas de densidad electrónica para los ligandos. En (B) se muestra la superposición de SseK1, SseK2 y NleB2 (Park *et al.*, 2018).

En cuanto al mecanismo de transferencia de estas enzimas, existe bastante controversia. Las estructuras de SseK3 obtenidas en el estado apo y en complejo con UDP, GlcNAc y manganeso, sugieren que el mecanismo es de retención (**Figura 4**) (Esposito *et al.*, 2018), lo que concuerda con otro estudio en el que se determinó mediante espectroscopía de RMN la configuración del enlace formado al glicosilar GADPH₁₈₇₋₂₀₃ tras su incubación con SseK1 y UDP-GlcNAc/MnCl₂ (Park *et al.*, 2018). Adicionalmente, se ha reportado que los homólogos estructurales más cercanos para SseK1 y SseK3 son enzimas de retención (Newson *et al.*, 2019)

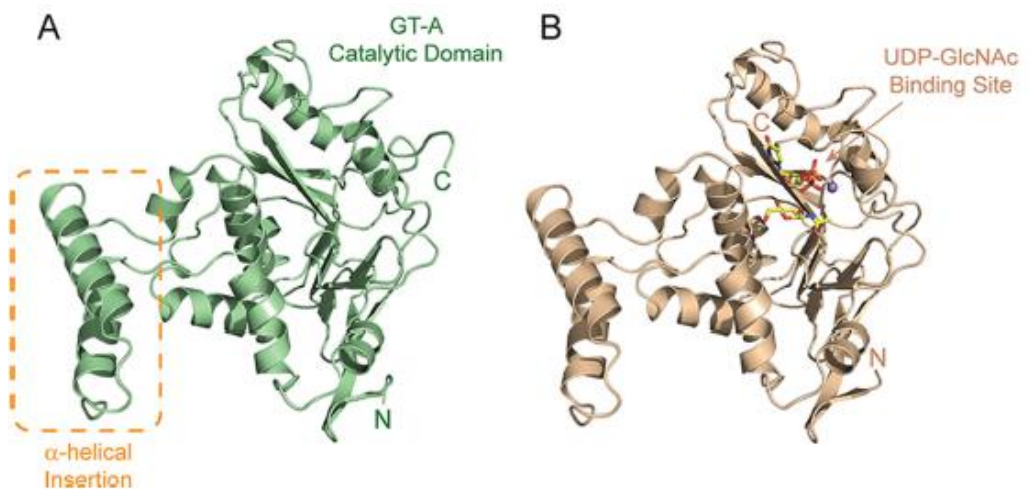


Figura 4. Estructura de la SseK3 apo y en complejo con UDP, GlcNAc y Mn²⁺. En (A) se muestra en representación *ribbon* la estructura de SseK3 (14-333) en forma apo y en (B) la estructura de SseK3 en complejo con UDP-GlcNAc y Mn²⁺. En ambas figuras se muestra el dominio catalítico GT-A donde se une el ligando, y en (A) se resalta el dominio HLH, el cual se ha mostrado que presenta una gran movilidad según el estado del ciclo catalítico de estas enzimas. Debido al tiempo que conlleva el proceso de cristalización y la capacidad de hidrólisis de SseK3, el UDP-GlcNAc inicial fue hidrolizado, permaneciendo en el sitio de unión el UDP y el GlcNAc (Esposito *et al.*, 2018).

Más recientemente, se determinó la estructura apo de la NleB1 *EPEC* y en complejo con FADD-UDP. Además en este mismo estudio se determinó la estructura de los dominios de muerte TRADD y RIPK1 previamente glicosilados por NleB1 (**Figura 5**) concluyendo que esta enzima en cambio sigue un mecanismo de inversión (Ding *et al.*, 2019).

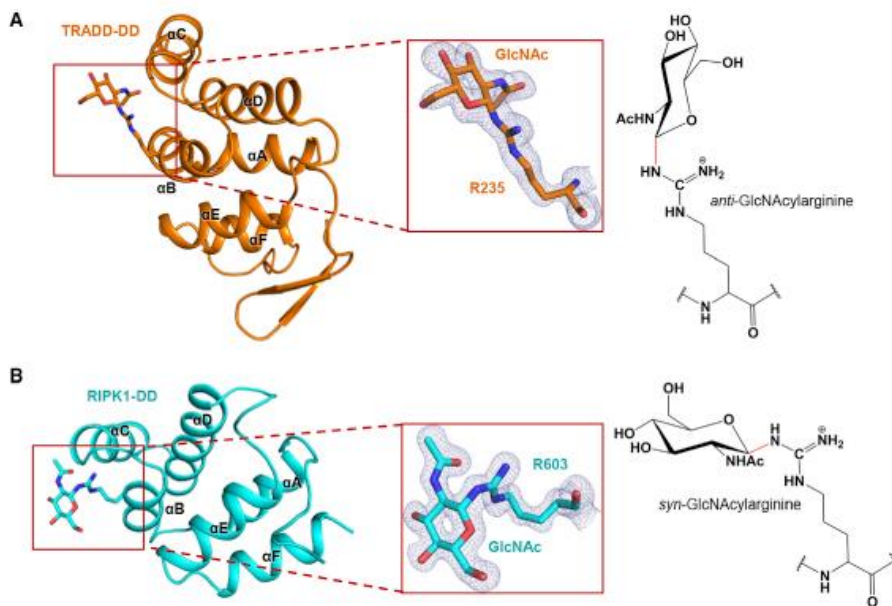


Figura 5. Estructura de los dominios de muerte celular en su forma glicosilada por la NleB1. (A) Estructuras de TRADD DD y (B) RIPK1 DD glicosilados por NleB1. Las figuras localizadas en el lado izquierdo son representaciones *ribbon* de las estructuras de los dominios de muerte glicosilados. La posición de las estructuras secundarias se muestra en ambas estructuras. En el centro de la figura se muestran en *sticks* los mapas de densidad electrónica 2Fo-Fc para las argininas glicosiladas en cada dominio de muerte. En la derecha de la figura se muestran las estructuras químicas de las argininas glicosiladas donde se resalta el enlace del carbono anomérico en rojo (Ding *et al.*, 2019).

1.2.4. PARTICIPACIÓN EN LA VIRULENCIA DE ESTOS FACTORES

Normalmente es difícil demostrar el rol en la virulencia de un efector del T3SS debido a que hay muchos otros efectores y por tanto factores de virulencia participando al mismo tiempo, pero en el caso de la familia NleB/SseK se ha conseguido demostrar que estas enzimas participan en la virulencia de los enteropatógenos que las expresan.

Un cribado de *knockouts* de factores de virulencia en ratones C57BL/6 identificó la NleB como un importante factor de virulencia de este patógeno. Esto se dedujo, al comparar la colonización de la cepa silvestre con aquella donde se había suprimido la NleB, en la cual se observó una reducción muy drástica en la colonización (Kelly *et al.*, 2006). Se ha demostrado también que la actividad glicosiltransferasa de NleB es muy importante para la virulencia, ya que mutantes en el motivo DxD (D₂₂₁AD₂₂₃) como es NleB-A₂₂₁AA₂₂₃, no son capaces de recuperar la infectividad (Gao *et al.*, 2013). Al introducir el gen codificante para la NleB1 *EHEC* en una cepa de *C. rodentium* con un *knockout* de la NleB, la cepa recupera su virulencia, mientras que, si introducimos NleB2, esto no ocurre.

El motivo estructural His₂₄₂-Glu₂₅₃-Asn₂₅₄ en la enzima NleB^{*EHEC*}, se ha demostrado que es esencial para la actividad y la virulencia (Park *et al.*, 2018), lo que concordaba con un estudio previo donde se identificaron los residuos Glu₂₅₃ y Tyr₂₁₉ como residuos esenciales para la actividad enzimática y la virulencia de la NleB1 *EPEC* (Wong Fok Lung *et al.*, 2016).

La presencia de NleB1 en las cepas *EHEC* y *EPEC* se ha asociado también con la colonización en distintos organismos como son las ovejas (Cornick *et al.*, 2017), ganado bovino (Misyurina *et al.*, 2010), y en humanos (Afset *et al.*, 2006; Bugarel *et al.*, 2011; Wickham *et al.*,

2006; Buvens y Piérard, 2012; De Boer *et al.*, 2015; Ferdous *et al.*, 2016).

En contraposición, el rol de la NleB2 en la virulencia sigue sin determinarse.

En lo referente a los ortólogos de la NleB, en el primer estudio que se hizo sobre los efectores SseK1 y SseK2 de *S. enterica* serovar Typhimurium, no se consiguió detectar signos de atenuación para cepas *knockout* de SseK1, SseK2 o SseK1-SseK2 en ratones BALB/c mediante infección intraperitoneal (Kujat Choy *et al.*, 2004). En cambio, sí se muestra una reducción significativa en los niveles de crecimiento en macrófagos RAW264.7 cuando se emplea una cepa triple *knockout* $\Delta ssek1\Delta ssek2\Delta ssek3$, aunque de nuevo, no se aprecia esta reducción en ratones (Buckner *et al.*, 2011).

Cuando la infección oral se produce comparando los *knockout* $\Delta ssek1\Delta ssek2$ y $\Delta ssek1\Delta ssek2\Delta ssek3$ frente a la cepa *wt*, ya si se aprecia una diferencia significativa estadísticamente en la reducción de la infectividad para ambos obteniendo valores parecidos, sugiriendo así que SseK3 no afecta a la virulencia del sistema (Brown *et al.*, 2011).

1.2.5. TARGETS DE LOS EFECTORES NleB/SseK

La función más clara de esta familia de efectores del T3SS es la inhibición de la cascada de señalización de NF- κ B y la apoptosis de las células huésped durante la infección (**Figura 6**). Inicialmente, se sugirió que la aportación principal de la NleB1 *EPEC* en la inhibición de NF- κ B consistía en aumentar la actividad de NleE, otro efector que inhibe la fosforilación de I κ B, motivo que conlleva la estabilización de I κ B reteniendo NF- κ B en el citoplasma (Nadler *et al.*, 2010).

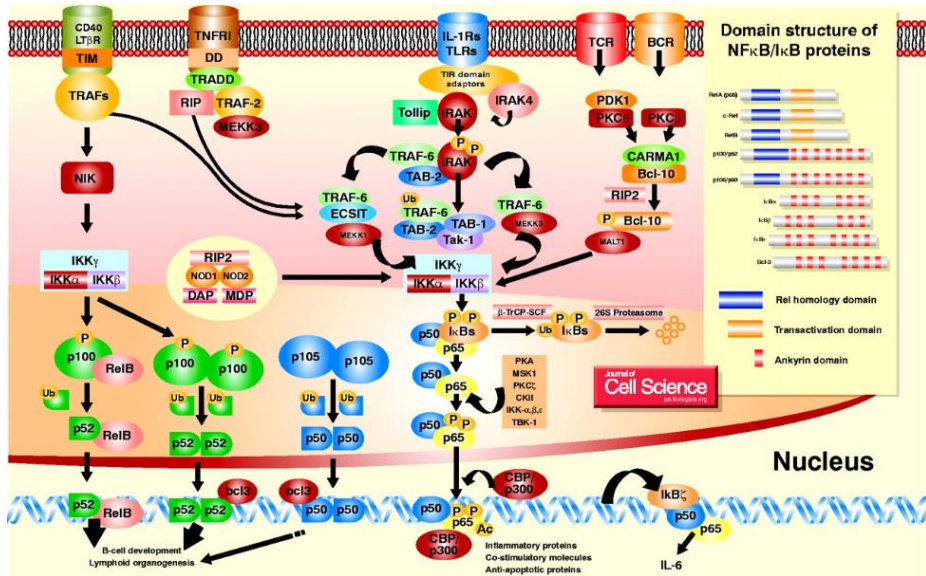


Figura 6. Vía completa de señalización NF-κB (Moynagh, 2005).

Posteriormente, se propuso un modelo en el que NleB1 interviene en otro punto de la cascada de señalización de NF-κB que se activa en respuesta al receptor TNF (Newton *et al.*, 2010) y no en el TLR/ILR1 (Ruchaud-Sparagano *et al.*, 2011). Hay varias formas de activar NF-κB y una de ellas implica el reconocimiento de los miembros de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF) por los receptores TNF (TNFRs). Este hecho, inicia la señalización de los receptores de muerte, formándose interacciones homo y heterotípicas entre los dominios de muerte intracelulares en los receptores y los dominios de muerte en las proteínas adaptadoras, incluyendo TRADD (*TNFR1-associated death domain*) y FADD (*FAS-associated death domain*). Las proteínas que contienen dominios de muerte también regulan la muerte celular mediante la activación de la cascada de señalización de caspasa 8 (Molloy, 2013).

El mecanismo de acción de NleB1 fue elucidado por dos estudios independientes. En estos dos estudios, se concluyó que la NleB1 glicosilaba los dominios de muerte del organismo huésped,

inactivándolos directamente. Entre los dominios de muerte que se estudiaron inicialmente, se encontraban TRADD, FADD, RIPK1 y TNFR1 (Li *et al.*, 2013; Pearson *et al.*, 2013). La inhibición depende de la transferencia del GlcNAc, que modifica específicamente las argininas Arg₂₃₅ y Arg₁₁₇ en los dominios de muerte de TRADD y FADD respectivamente. Estas modificaciones interrumpen la interacción entre los dominios de muerte y por tanto interrumpen la respuesta inflamatoria de la señalización de NF- κ B, la apoptosis dependiente de caspasa 8 y la necroptosis (Newson *et al.*, 2019).

En cuanto a los sustratos preferidos de NleB1 *EPEC* y NleB de *C. rodentium*, se ha establecido que es FADD, y para determinarlo, se combinó un método de enriquecimiento de proteínas glicosiladas en argininas con GlcNAc acoplado a espectrometría de masas (N. E. Scott *et al.*, 2017).

Algunos de los miembros de la familia de las SseK presentes en *S. entérica* serovar Typhimurium también tienen efecto en la cascada de NF- κ B. De forma parecida a NleB1, SseK1 inhibe la señalización de TNF- α /NF- κ B a través de la glicosilación de TRADD (Li *et al.*, 2013). La expresión ectópica de SseK3 bloquea también la actividad de NF- κ B estimulada por TNF y este efecto depende de la conservación del motivo catalítico DxD (Zhe Yang *et al.*, 2015). En estudios en macrófagos, se ha visto que SseK1 y SseK3 inhiben la activación de NF- κ B y la muerte celular (Günster *et al.*, 2017).

Aunque SseK2 también inhibe la activación de NF- κ B al estimular TNF- α no queda del todo claro si es un buen inhibidor de la vía ya que solo se detectó el efecto al sobre expresarla en células de mamíferos HeLA y no en los experimentos con macrófagos. El patrón de glicosilación de argininas muestra diferencias cuando se expresan SseK1 o SseK3 en el triple *knockout* Δ sseK1/2/3 durante la infección de macrófagos RAW264.7, mientras que la expresión de SseK2 no mostró

modificaciones detectables. Así mismo, se determinó que SseK1 es capaz de glicosilar TRADD y en menor medida, también lo hace SseK3 (Günster *et al.*, 2017), corroborando otros estudios independientes que combinaban un ensayo de inmunoprecipación de glicopéptidos de arginina modificada con GlcNAc y espectrometría de masas en el que se identificaban todas las proteínas modificadas del huésped por las enzimas endógenas SseK1 y SseK3 durante la infección por *Salmonella*. Se concluyó también que los receptores TNFR1 y TRAILR son sustratos fisiológicos de SseK3, y son modificados en las argininas Arg₃₇₆ y Arg₂₉₃ respectivamente (Newson *et al.*, 2019).

En una investigación más reciente, se confirma que SseK1, SseK3, NleB1 *EHEC*, NleB1 *EPEC* y NleB de *C. rodentium* son capaces de bloquear la activación de la vía de señalización de NF- κ B mediado por TNF, mientras que SseK2 y NleB2 no la bloquean. Como novedad, también consiguen establecer que FADD también es sustrato de SseK2 (El Qaidi *et al.*, 2017).

Se han detectado también proteínas que no contienen un dominio de muerte y que resultan ser sustrato de las NleB/SseK. Un ejemplo de esto es la gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GADPH), que es sustrato de la NleB de *C. rodentium*. Esta misma proteína interacciona con el factor 2 asociado a TNFR (TRAF2), el cual es necesario para la activación de NF- κ B a través de TNF α . En el estudio sugieren un nuevo modelo en el que la glicosilación de GADPH interrumpe así la interacción con TRAF2, bloqueando así su ubiquitinación y la activación de NF- κ B (Gao *et al.*, 2013).

Los mismos autores del estudio, sugieren más adelante que la modificación de GADPH también inhibe la interacción con TRAF3 (TNF factor asociado al receptor 3), reduciendo por tanto la ubiquitinación de la misma y provocando la inhibición de la señalización de interferón tipo I (Gao *et al.*, 2016).

Aunque muchos investigadores han sido incapaces de detectar la glicosilación de GADPH dependiente de NleB (Li *et al.*, 2013; Ding *et al.*, 2019; Scott *et al.*, 2017), esta modificación ha sido confirmada por otros estudios empleando diferentes técnicas y metodologías (El Qaidi *et al.*, 2017; Park *et al.*, 2018; El Qaidi *et al.*, 2018). En concreto se usaron la espectrometría de masas en combinación con la mutagénesis dirigida, demostrando que la NleB1 EHEC glicosila GADPH en Arg197 y Arg200, y que GADPH también es sustrato de SseK1 (El Qaidi *et al.*, 2017).

Recientemente, se ha descubierto un nuevo papel de la NleB1 EPEC debido a su interacción y modificación de HIF-1 α , el regulador de la homeostasis de O₂ celular. NleB1 glicosila la Arg₁₈ del N-terminal promoviendo la actividad e induciendo así la expresión de los genes del huésped para alterar el metabolismo de la glucosa (Xu *et al.*, 2018).

Hay otras proteínas del huésped que se han descrito como posibles sustratos de la familia NleB/SseK pero su glicosilación no ha sido demostrada, como es el caso de TRIM32, ligando de SseK3 (Zhe Yang *et al.*, 2015). TRIM32 es una E3 ubiquitin ligasa que no parece ser necesaria para que SseK3 inhiba la vía de señalización de NF- κ B durante la infección de macrófagos (Günster *et al.*, 2017).

Además, se ha mostrado que NleB1 también es capaz de glicosilar una proteína de bacteria como es la GshB (glutación sintasa) en la Arg₂₅₆. De hecho, fue el sustrato más abundante de muestras de HEK293T infectadas con EHEC (El Qaidi *et al.*, 2020). GshB es glicosilada *in vitro* e *in vivo* por NleB de *C. rodentium* e *in vitro* por SseK1 de *Salmonella*. En los ensayos *in vitro*, esta glicosilación aumenta la producción de glutación mediada por GshB, hecho que proporciona mayor resistencia al estrés oxidativo. Debido a esto, los mutantes de *nleB* y *gshB* de *C. rodentium* tienen un defecto de crecimiento en presencia de H₂O₂, dando indicios de que NleB tiene un nuevo rol en la supervivencia de

estas bacterias frente al estrés provocado por el peróxido de hidrógeno. Esta fue la primera descripción de que estos efectores son activos en las mismas bacterias que las expresan, un concepto que va en contra de lo asumido por la comunidad científica ya que se pensaba que los factores de virulencia son solo activos una vez presentes en el huésped.

Cabe añadir también, que estos efectores no solo glicosilan las proteínas *target* dentro del organismo huésped, sino que también son capaces de autoglicosilarse. La autoglicosilación parece determinante ya que la mutación de estos sitios provoca una disminución significativa de la actividad de estas enzimas. En el mismo estudio donde se muestra esto, se determinan nuevos dominios de muerte que son sustratos de la familia NleB/SseK, como son: DR3 que es sustrato de NleB y SseK1, ANK1 y ANK2 que son sustratos de NleB y SseK3, y ANK3 que es sustrato de NleB1, SseK1 y 3 (Pan *et al.*, 2019).

En la **Figura 7**, se reúnen a modo de resumen todas las interacciones que se han ido mencionando entre las NleB/SseK y las proteínas del huésped.

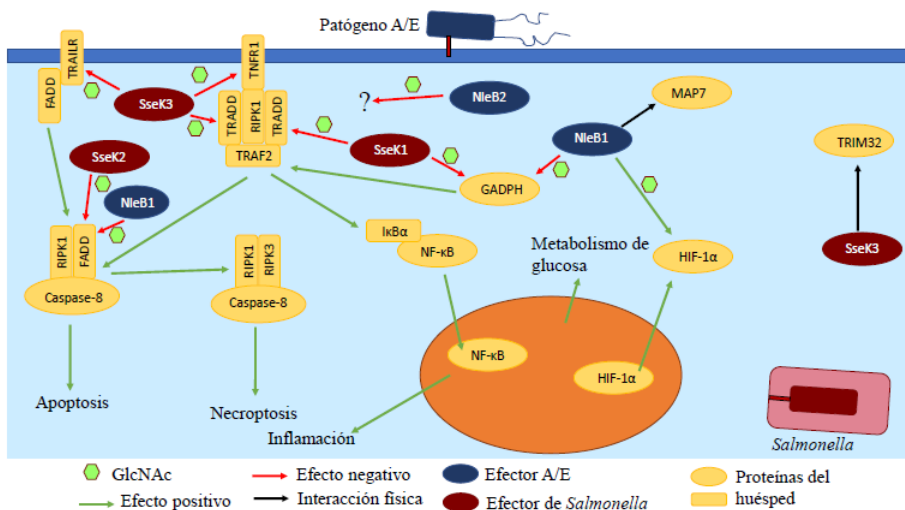


Figura 7. Resumen de las proteínas target de las NleB/SseK.

1.3. FUT8

1.3.1. FUCOSILACIÓN

La fucosilación es un tipo de glicosilación, en el que una L-fucosa se transfiere desde GDP-L-fucosa a un N-glicano, un O-glicano o a glicolípidos. Dentro de la fucosilación podemos encontrarnos también con dos tipos en función del residuo donde se transfiera esa fucosa, podemos tener fucosilación terminal o central.

En esta tesis nos vamos a centrar en la fucosilación central sobre N-glicanos.

En el genoma humano se han identificado 13 fucosiltransferasas (FUT) (Becker y Lowe, 2003; Stanley, P., Schachter, H., y Taniguchi, 2009), de las cuales FUT8 es la única encargada de la fucosilación central en N-glicanos (Becker y Lowe, 2003; Q. Yang y Wang, 2016). En la **Figura 8** se recogen a modo de resumen las 13 fucosiltransferasas que se encuentran en humanos.

Nombre común	Abreviación	Localización subcelular	Productos más representativos
Fuc-TI α -(1,2)-fucosiltransferasa	FUT1	Membranas	
Fuc-TII α -(1,2)-fucosiltransferasa	FUT2	Membrana plasmática, citósol	
Fuc-TIII α -(1,3/4)-fucosiltransferasa	FUT3	Membrana intracelular	Estructura sialil de Lewis Estructura de Lewis
Fuc-TIV α -(1,3)-fucosiltransferasa Fucosiltransferasa ligando de ELAM-1	FUT4	Vesículas	
Fuc-TV α -(1,3)-fucosiltransferasa	FUT5	Membrana	
Fuc-TVI α -(1,3)-fucosiltransferasa	FUT6	Aparato de Golgi	
Fuc-TVII α -(1,3)-fucosiltransferasa	FUT7	Aparato de Golgi	
Fuc-TVIII α -(1,6)-fucosiltransferasa	FUT8	Aparato de Golgi Citosol	Estructura central de todos los N-glicanos
Fuc-TIX α -(1,3)-fucosiltransferasa	FUT9	Nucleoplasma Reticulo endoplasmático Aparato de golgi	
Fuc-TX α -(1,3)-fucosiltransferasa	FUT10	Nucleoplasma Reticulo endoplasmático Aparato de golgi	Desconocido
Fuc-TXI α -(1,3)-fucosiltransferasa	FUT11	Membrana nuclear Aparato de golgi	Desconocido
O-fucosiltransferasa 1	PoFUT1/ FUT12	Centrosoma	
O-fucosiltransferasa 2	PoFUT2/ FUT13	Intracelular	

Figura 8. Fucosiltransferasas en humanos. Se han mostrado los productos más representativos de cada enzima. Adaptación propia de (Schneider *et al.*, 2017).

1.3.2. FUCOSILACIÓN CENTRAL

La fucosilación central llevada a cabo por FUT8 es una MPT muy importante que se ha relacionado con la proliferación de las células cancerígenas y la metástasis (Honma *et al.*, 2015; Tu *et al.*, 2017; Kang *et al.*, 2012; Shao *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2006; Osumi *et al.*, 2009).

FUT8 es una enzima del aparato de Golgi que realiza la transferencia de L-fucosa desde GDP-L-fucosa al hidroxilo OH6 del GlcNAc interior de los N-glicanos formando un enlace α (1,6) en él (**Figura 9**).

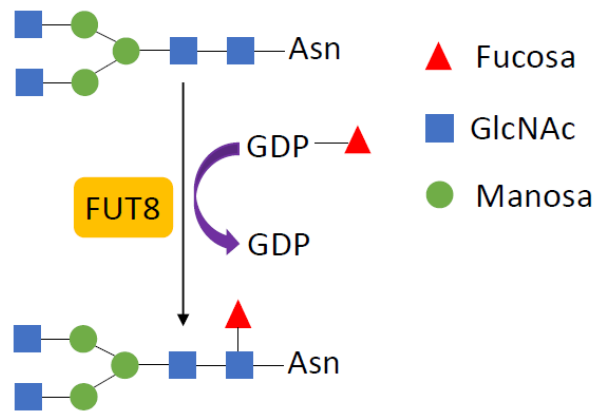


Figura 9. Reacción de transferencia de fucosa al GlcNAc más interior del N-glicano mediado por FUT8.

Los niveles de fucosilación central, están regulados por los niveles de sustrato (GDP-L-fucosa) disponibles dentro del aparato de Golgi, ya sea por la falta de sustrato debido al metabolismo del mismo o bien por una deficiencia en el transporte al interior (Becker y Lowe, 2003).

1.3.3. FUT8

El gen que codifica a FUT8 se localiza en el cromosoma 14.q23.3. Como se ha mencionado previamente, FUT8 es la única enzima responsable de llevar a cabo la fucosilación central en N-glicoproteínas (Q. Yang y Wang, 2016). Se encuentra expresada en varios tejidos del cuerpo humano, con niveles más elevados en el cerebro, la placenta, los pulmones, el estómago y el intestino delgado (*The Human Protein Atlas*, 2021).

El rol fisiológico de FUT8 es crucial para la supervivencia. En ensayos de *knockout* en ratones la mayoría experimentan muerte temprana postnatal, un retraso severo en el crecimiento y cambios en el pulmón similares al enfisema, lo que sugiere una gran importancia de la fucosilación central para la activación de los receptores de factores de crecimiento (Wang *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2006). En los ratones *knockout* no se encontraron estructuras de oligosacáridos con fucosa central y un 70-80% de ellos murieron 2 o 3 días después de nacer. Esta letalidad no ocurre cuando se realizan estos experimentos con las otras fucosiltransferasas (Schneider *et al.*, 2017; Miyoshi *et al.*, 2008; de Vries y van den Eijnden, 1994; Kudo *et al.*, 2007).

1.3.3.1. ESTRUCTURA

La estructura de la proteína en forma apo se obtuvo en 2006 (Ihara *et al.*, 2006). La estructura, reveló que FUT8 es una enzima multidominio, presentando un dominio N-terminal *coiled-coil*, un dominio catalítico que adopta un plegamiento tipo GT-B, y un dominio C-terminal SH3.

FUT8 presenta una alta especificidad de sustrato en el brazo α (1,3) del N-glicano, siendo determinante la presencia de un GlcNAc terminal para que ocurra la catálisis. Por el contrario, presenta más promiscuidad

en el brazo α (1,6). Mientras el N-glicano presente el GlcNAc terminal en el brazo α (1,3), FUT8 no necesita que el N-glicano esté unido a un péptido o proteína. Para la fucosilación de N-glicanos ricos en manosa se ha observado que la misma solo tiene lugar cuando el N-glicano está unido a péptidos o proteínas, sugiriendo por tanto que FUT8 reconoce la secuencia peptídica que contiene el residuo de asparagina glicosilado y que esto es determinante para la misma para este tipo de N-glicanos (Calderon *et al.*, 2016).

Aunque FUT8 se localiza principalmente en el aparato de Golgi, un estudio llevado a cabo por Tomida *et al.*, sugiere que FUT8 también podría encontrarse parcialmente en la superficie celular en una manera dependiente del dominio SH3 (Kawamoto *et al.*, 2011).

Respecto al mecanismo catalítico de FUT8, no se tenía conocimiento del mecanismo que esta enzima seguía y como expondré en la sección de resultados, nosotros hemos conseguido elucidarlo al resolver la estructura del complejo ternario formado por FUT8 con GDP y un N-glicano (ver sección de resultados).

1.3.4. EXPRESIÓN EN CÁNCER

La fucosilación aberrante es una de las modificaciones en oligosacáridos más importantes relacionadas con cáncer e inflamación, normalmente causada por una regulación descontrolada en la expresión de las fucosiltransferasas (Dube y Bertozzi, 2005; Miyoshi *et al.*, 2008; E. Scott *et al.*, 2020; Pinho y Reis, 2015).

Se ha demostrado que FUT8 tiene un papel importante en la biología y las características tumorales, encontrándose sobre expresada en varios tipos de cáncer como el de pulmón (Chen *et al.*, 2013), hígado (Noda *et al.*, 1998; Cheng *et al.*, 2016), colorrectal (M. Noda *et al.*, 2018; Osumi *et al.*, 2009), ovárico (Lv *et al.*, 2019), prostático (Wang *et al.*,

2014), de mama (Tu *et al.*, 2017), melanoma (Agrawal *et al.*, 2017), tiroides (Ito *et al.*, 2003), y pancreático (Tada *et al.*, 2020).

FUT8 ha sido sugerida como un biomarcador para identificar pacientes con diversos tipos de cáncer como los de pulmón (Honma *et al.*, 2015), colorrectal (M. Noda *et al.*, 2018) y prostático (E. Scott y Munkley, 2019). Las glicoproteínas fucosiladas son muy prometedoras como biomarcadores cancerígenos, pero hasta el momento no hay biomarcadores clínicamente relevantes para predecir resultados en los tratamientos de inmunoterapia.

1.3.5. MECANISMO REGULATORIO DE FUT8 EN CÁNCER

El mecanismo de regulación de FUT8 aún no estaba elucidado por completo, pero se habían hecho asociaciones importantes. Hay estudios que indican que la fucosilación central puede regular la expresión de la proteína de muerte celular programada 1 (PD-1) (Okada *et al.*, 2017) y alterar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) (Pereira *et al.*, 2018).

Adicionalmente, la fucosilación central también regula el receptor del factor de crecimiento transformante- β 1 (TGF- β 1) (Tu *et al.*, 2017), el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Wang *et al.*, 2006), α 3 β 1 integrin (Zhao *et al.*, 2006) y E-caherin (Shao *et al.*, 2015), siendo todas proteínas muy implicadas en procesos cancerígenos.

1.3.5.1. EVASIÓN INMUNE

FUT8 juega un papel muy importante en la evasión inmune en cáncer y se ha demostrado que es una potencial diana terapéutica para mejorar la respuesta en inmunoterapias. La inhibición de FUT8 se ha

visto que reduce la expresión en la superficie celular de PD-1 promoviendo la activación de las células T y consiguiendo con ello una mayor erradicación del tumor. PD-1 contiene dos sitios de N-glicosilación que son fucosilados por FUT8, siendo estas modificaciones las reguladoras de la expresión de PD-1 y por ello un punto clave en la optimización de la respuesta anti tumoral.

Además, en las células T en tumores se encuentran muchas estructuras altamente fucosiladas por FUT8. En conjunto, ambas funciones sugieren que la inhibición de FUT8 puede frenar la evasión inmune del tumor reduciendo las interacciones PD-1/PD-L1 e inhibir el crecimiento del mismo (Okada *et al.*, 2017).

1.3.5.2. CITOTOXICIDAD CELULAR DEPENDIENTE DE ANTICUERPOS (ADCC)

ADCC es el proceso por el que las células (por ejemplo, bacterias) recubiertas por anticuerpos son destruidas por células del sistema inmunológico como los linfocitos. Esto tiene lugar ya que los anticuerpos a través de su región constante (Fc) se unen a los receptores de linfocitos (FcRs) (Shinkawa *et al.*, 2003).

Hay cinco tipos de isotipos de inmunoglobulinas, de las cuales, la inmunoglobulina G (IgG) es la más abundante en la sangre humana (Vidarsson *et al.*, 2014). Los anticuerpos terapéuticos humanos IgG1 tienen unidos dos N-oligosacáridos tipo biantenarios complejos en la región constante que pueden mediar funciones efectoras e influir en la ADCC (Clynes *et al.*, 2000; Imai-Nishiya *et al.*, 2007).

La mayoría de los anticuerpos terapéuticos autorizados, presentan oligosacáridos en la región Fc con fucosa central debido a que se producen en líneas celulares de mamíferos. Para conseguir una óptima actividad ADCC se trabajan con anticuerpos que carecen de esa

fucosilación central. Esto se debe a que los anticuerpos sin la fucosa central tienen más afinidad por el Fc lo cual conlleva a una mejor actividad ADCC. Los primeros estudios avalando esta hipótesis, se hicieron en leucemia y linfoma, y mostraron que anticuerpos sin la fucosa determinaban una mejor respuesta ADCC y por consiguiente una mejor respuesta frente a estos tipos de cáncer (Niwa, Hatanaka, *et al.*, 2004; Niwa *et al.*, 2005; Niwa, Shoji-Hosaka, *et al.*, 2004).

Actualmente la estrategia se centra en crear anticuerpos no fucosilados para aumentar la respuesta ADCC ya que son mejores anticuerpos terapéuticos. Específicamente, la inhibición de la actividad de FUT8 promete ser una potente respuesta anti tumoral (Imai-Nishiya *et al.*, 2007).

1.3.5.3. FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE BETA (TGF- β)

La fucosilación central altera las moléculas de la superficie celular, el microambiente tumoral de la matriz extracelular y los factores de crecimiento, promoviendo así la progresión del cáncer. La presencia de esta fucosa central afecta positivamente a la afinidad de la unión entre TGF- β y el receptor de TGF- β siendo crítica esta unión para su función (Wang *et al.*, 2005). TGF- β ha demostrado ser un efectivo inmunosupresor en cáncer previniendo así la muerte mediada por inmunidad antitumoral (Dahmani y Delisle, 2018).

En experimentos de *knockdown* de FUT8, se muestra una disminución de la transición epitelio-mesenquimal (EMT) mediada por TGF- β , mientras que en el cáncer, durante esta transición se observa una sobreexpresión de FUT8 sugiriendo un *feedback* positivo entre la expresión de FUT8 y la señalización de TGF- β promoviendo EMT y el desarrollo de los tumores (Tu *et al.*, 2017; Lin *et al.*, 2011). El proceso

de EMT es necesario para la transformación de un tumor de benigno a un cáncer muy agresivo y altamente invasivo (Thiery, 2002).

Aún no se conoce el mecanismo por el que se da la sobre regulación de FUT8 durante la EMT inducida por TGF- β , el descubrimiento de su funcionamiento podría suponer pistas pronósticas o terapéuticas prometedoras para los cánceres (Tu *et al.*, 2017).

1.3.5.4. FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO (EGF)

La fucosilación central también juega un papel clave en la regulación de los EGF en muchos tipos de células distintos. En estudios con células de fibroblastos embrionarias de FUT8^{-/-}, la fosforilación de los receptores de EGF está bloqueada, mientras que la actividad de la tirosina fosfatasa no se observa que esté modificada (Wang *et al.*, 2006). Se ha visto también que cuando se produce la sobreexpresión de FUT8, se produce un aumento en la fucosilación de los receptores de EGF y así se aumenta la respuesta de los EGF reduciéndose su sensibilidad a los inhibidores de la tirosina kinasa.

1.3.5.5. $\alpha 3\beta 1$ INTEGRIN

Además de lo mencionado anteriormente, la pérdida de la fucosilación central también inhibe la migración celular y la señalización celular mediada por $\alpha 3\beta 1$ integrin. En células FUT8^{-/-}, la migración celular y la señalización se reducen, pero se puede recuperar parcialmente introduciendo FUT8 (Zhao *et al.*, 2006).

1.3.5.6. E-CADHERINA

Se sabe que el incremento de la fucosilación central en E-cadherina, aumenta la fuerza de la adhesión celular y los procesos de migración celular mediados por E-cadherina (Osumi *et al.*, 2009).

Los niveles de E-cadherina y FUT8 son más altos en muestras de cáncer colorrectal. Un estudio llevado a cabo por Osumi *et al.*, analizó los niveles de E-cadherina en base a la transfección de FUT8 en muestras de células cancerígenas humanas de colon, en células con *knockout* de FUT8 y en células de ratón deficientes de FUT8. Los resultados del estudio demostraron que la actividad de FUT8 regulaba la cantidad total de E-cadherina.

En cáncer de pulmón agresivo, E-cadherina está normalmente desregulada. En un estudio se encontró que, en muchas células de cáncer de pulmón con metástasis, la E-cadherina está fucosilada mientras que en cáncer con poca metástasis los niveles de fucosilación central son menores. Además, los resultados de esta investigación confirmaron que E-cadherina es sustrato de FUT8 y su fucosilación está muy relacionada con la metástasis (Shao *et al.*, 2015; Geng *et al.*, 2004; Hu *et al.*, 2008).

CAPÍTULO 2: OBJETIVOS

2. OBJETIVO GENERAL

Una vez introducidos los dos temas que se han estudiado durante la duración de la tesis doctoral, vamos a exponer los objetivos que se plantearon al inicio, y cuyo cumplimiento se ha perseguido durante estos cuatro años. Con esta finalidad, se han realizado un amplio número de experimentos que se han complementado con varias colaboraciones, resultando así una tesis con carácter multidisciplinar y con resultados muy interesantes.

Como hemos visto, se desconocen los mecanismos catalíticos tanto de los efectores de la familia NleB/SseK, como de FUT8. En base a esto, no es de extrañar que el objetivo general de esta tesis haya sido el de profundizar en las bases moleculares, los mecanismos catalíticos y las preferencias de sustrato de ambas enzimas. Además, para ahondar más en los temas, se plantearon diversos objetivos específicos para cada proyecto que se exponen a continuación.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

En base a la estructura disponible del complejo NleB-UDP-Mn²⁺-FADD^{DD}, nos propusimos los siguientes objetivos:

- Determinación de los residuos clave para la actividad de la NleB1 frente a FADD^{DD}.
- Activación del efector SseK1 frente a FADD^{DD} mediante mutagénesis dirigida.
- Activación de SseK2 frente a DR3^{DD}.
- Comprensión de los mecanismos de activación de los mutantes de SseK1 sobre FADD^{DD} mediante experimentos de dinámica molecular.

- Papel de los mutantes activados de SseK1 y SseK2 en la proliferación de *S. entérica* en macrófagos.

Por otro lado, referidos al proyecto de la enzima FUT8, nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

- Obtención de la estructura cristalina del complejo formado por HsFUT8-GDP-G0.
- Caracterización cinética y termodinámica de la enzima FUT8 frente a distintos N-glicanos.
- Elucidación del papel del péptido unido al N-glicano en la fucosilación por FUT8.
- Comparación de la fucosilación central *in vitro* e *in vivo* en N-glicanos complejos y con alto o bajo contenido de manosas.

CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

A lo largo de la presente tesis, el trabajo realizado por la doctoranda se ha ido complementando con el trabajo de otros colaboradores. El resultado es una investigación multidisciplinar y heterogénea cuya finalidad ha sido la de responder lo más precisamente posible las preguntas biológicas y bioquímicas que se han planteado.

En conjunto se han usado un gran número de técnicas, y en el presente capítulo vamos a profundizar en aquellas llevadas a cabo por la doctoranda, explicando sin incidir mucho en las técnicas complementarias ya que son importantes para los resultados que luego se presentan y las posteriores conclusiones obtenidas.

Al igual que en la introducción, esta sección se dividirá en dos partes con el fin de facilitar la lectura y el capítulo siguiente de resultados.

3.1. FAMILIA DE LAS NleB/SseK

3.1.1. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

3.1.1.1. CONSTRUCCIÓN DE LOS PLÁSMIDOS DE LAS PROTEÍNAS DE LA FAMILIA NleB/SseK Y DOMINIOS DE MUERTE

Las secuencias de ADN codificante para los residuos 28 al 329 de la enzima de *E.coli* EHEC NleB1, los residuos 93 al 192 del dominio de muerte FADD, los residuos 332 al 417 del dominio de muerte DR3, y los residuos 21 al 336 y 34 al 348 de las enzimas de *S. entérica* SseK1 y SseK2 respectivamente, fueron sintetizados por la empresa GenScript

(EEUU), y se optimizaron sus frecuencias de codones para facilitar su expresión en *E.coli*.

La enzima NleB1^{EHEC} contiene la mutación K115A para mejorar su estabilidad al igual que está descrito anteriormente para NleB1^{EPEC}. La Lys₁₁₅ está muy conservada en los efectores NleB/SseK y mantiene intacta la actividad glicosiltransferasa (Ding *et al.*, 2019).

La enzima SseK1 *wt* y los mutantes que se sintetizaron posteriormente contienen una doble mutación, C39S-C210S, para prevenir la precipitación debido a la formación de un puente disulfuro. Tal y como ocurre con la mutación K₁₁₅ en NleB1^{EHEC}, esta doble mutación no afecta a la actividad de la SseK1 (Park *et al.*, 2018). A partir de ahora, estas dos enzimas que son consideradas nuestras *wt* serán nombradas como NleB1^{EHEC} y SseK1^{*wt*}.

Las construcciones de NleB1^{EHEC} y DR3^{DD} se clonaron en el vector pMALC2x (**Figura 10**), obteniendo los vectores pMALC2x-12Hist-TEV-NleB1^{EHEC} y pMALC2x-12Hist-TEV-DR3^{DD} respectivamente. Ambos plásmidos contienen una secuencia que codifica para una cola de 12 histidinas y un sitio de corte para TEV entre la proteína de unión a maltosa y la proteína de interés.

Las construcciones de FADD^{DD} y SseK1 se clonaron en el pET15bPP (**Figura 10**), para obtener los vectores pET15bPP-FADD^{DD} y pET15bPP-SseK1^{*wt*}, respectivamente. Ambos plásmidos contienen una secuencia que codifica para una cola de 6 histidinas y un sitio de corte para la proteasa de precisión (PP) que se encuentra en el N-terminal de cada constructo. La construcción de SseK2^{*wt*} se clonó en pProEXHTa (**Figura 10**) dando lugar al vector pProEXHTa-6Hist-TEV-SseK2^{*wt*}. Este plásmido contiene una secuencia que codifica para el sitio de corte de TEV entre una cola de 6 histidinas y la proteína SseK2^{*wt*}.

Todos los mutantes de SseK1^{wt} y SseK2^{wt} se generaron siguiendo el protocolo de mutagénesis de sitio dirigido por GenScript usando de base los vectores pET15bPP-SseK1^{wt} y pProEXHTa-6Hist-TEV-SseK2^{wt}, obteniendo así los siguientes mutantes mostrados en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Mutantes obtenidos para SseK1 y SseK2. Se muestran las mutaciones introducidas, los plásmidos generados y los nombres con los que vamos a referirnos a dichos mutantes a partir de ahora.

Mutaciones	Plásmido	Nombre
K151E-M147Y	pET15bPP-SseK1 ^{wt} - <i>K151E-M147Y</i>	K151E-M147Y
N291K-R294K	pET15bPP-SseK1 ^{wt} - <i>N291K-R294K</i>	N291K-R294K
K151E-M147Y-N291K-R294K	pET15bPP-SseK1 ^{wt} - <i>K151E-M147Y-N291K-R294K</i>	Cuádruple
K151E-M147Y-N291K-R294K-S286Y	pET15bPP-SseK1 ^{wt} - <i>K151E-M147Y-N291K-R294K-S286Y</i>	Quíntuple
K151E-M147Y-N291K-R294K-S286Y-ARHVQ deletion	pET15bPP-SseK1 ^{wt} - <i>K151E-M147Y-N291K-R294K-S286Y-ARHVQdeletion</i>	Quíntuple-del
S286Y	pET15bPP-SseK1 ^{wt} - <i>S286Y</i>	S286Y
S286I	pET15bPP-SseK1 ^{wt} - <i>S286I</i>	S286I
S286N	pET15bPP-SseK1 ^{wt} - <i>S286N</i>	S286N
N302Y	pProEXHTa-6Hist-TEV-SseK2 ^{wt} - <i>N302Y</i>	N302Y

N302S	pProEXHTa-6Hist-TEV- <i>SseK2^{wt}-N302S</i>	N302S
N302I	pProEXHTa-6Hist-TEV- <i>SseK2^{wt}-N302I</i>	N302I

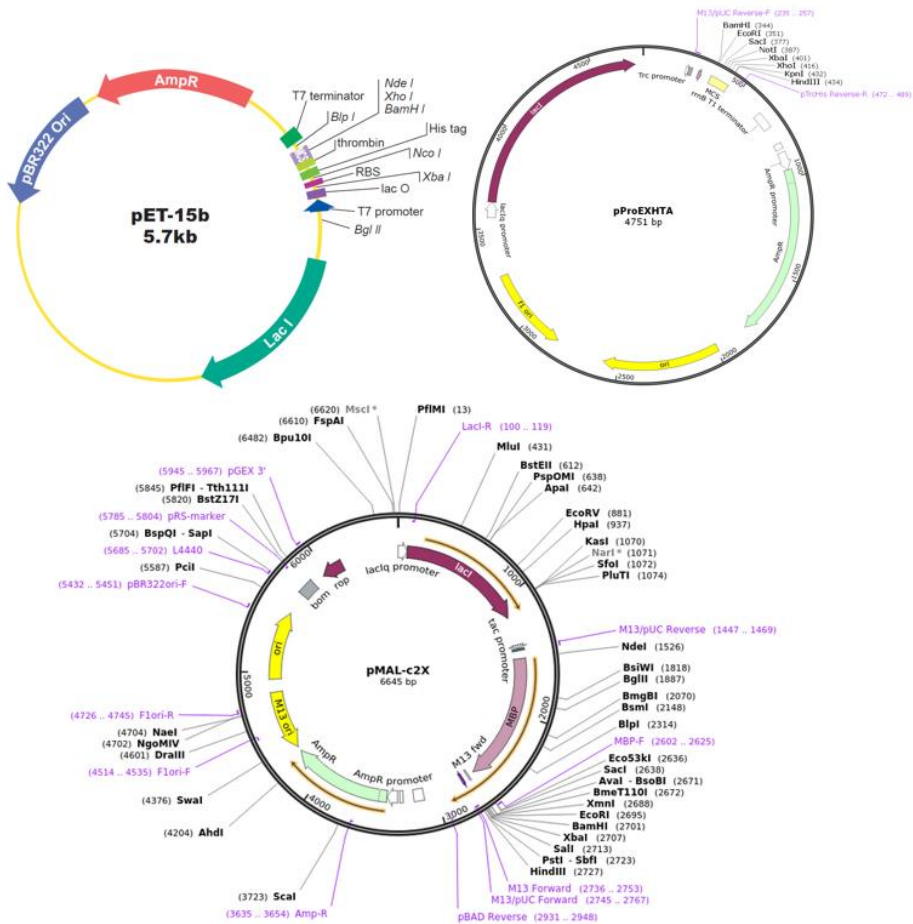


Figura 10. Mapa de los vectores usados por GenScript para la creación de nuestros plásmidos. **Fuente:** <https://www.addgene.org>

3.1.1.2. TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES BL21(DE3)

La transformación de células competentes es un proceso por el cuál introducimos un plásmido sintetizado que contiene el gen que codifica nuestra proteína de interés en el genoma de una bacteria. En nuestro caso, hemos empleado la cepa de *E.coli* BL21(DE3) para la producción de nuestras proteínas de interés.

El protocolo de transformación es el siguiente:

- Incubación en hielo durante 30 minutos de 200 ng de plásmido adicionado a una alícuota de 250 μ L de células competentes.
- Choque térmico a 42 °C durante 1 minuto.
- Incubación en hielo durante 2 minutos.
- Añadimos 500 μ L de medio SOC frío (Apéndice 8.1.)
- Recuperación de las células a 37 °C y con agitación de 180-220 rpm durante 1-3 horas.

Una vez recuperadas las células, se siembran para seleccionar colonias en placas de LB/Agar (Apéndice 8.1.) con el antibiótico correspondiente que en nuestro caso es ampicilina (Carbosynth) a 100 μ g/ml. Para sembrar las células centrifugamos 5 minutos a 2000 rpm, retiramos los 500 μ L de medio de recuperación añadido, resuspendemos las células y sembramos el resto. Las placas se dejan en un incubador a 37 °C *over night*.

3.1.1.3. CONSERVACIÓN EN GLICEROL DE LAS COLONIAS TRANSFORMADAS

Una vez transformadas y seleccionadas las colonias con antibiótico en las placas, guardamos glicerol de esas colonias para evitar tener que transformar de nuevo cuando necesitemos producir más proteína.

Para hacer lo glicerol, manteniendo todo en esterilidad, picamos una colonia de la placa correspondiente y la pasamos a 10 mL de medio LB (Apéndice 8.1.) con ampicilina y la dejamos *over night* a 37 °C con agitación (180-220 rpm). Al día siguiente, del cultivo ya crecido se sacan 700 µL y se mezclan con 300 µL de glicerol al 80% estéril. Una vez etiquetado se guardan a -80 °C.

3.1.2. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS

Para la expresión de las proteínas recombinantes de las familias NleB/SseK, así como de los dominios de muerte FADD y DR3 se ha usado la cepa de *E.coli* BL21(DE3). Esta cepa es para la expresión de proteínas que no son tóxicas para la propia célula. La cepa DE3 contiene los genes de la ARN polimerasa de T7 bajo el promotor lacUV5, lo que permite inducir la expresión de la proteína con IPTG. Esta cepa tampoco contiene las proteasas Lon ni OmpT, por lo que reduce la degradación de las proteínas expresadas. Estas células se pueden adquirir en Thermo Fisher. (<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/EC0114#/EC0114>)

3.1.2.1. CRECIMIENTO DE LAS CÉLULAS DE BL21(DE3) TRANSFORMADAS

Para la expresión a gran escala de cada proteína en células de *E.coli*, hemos seguido el siguiente protocolo:

- El primer día inoculamos células en un matraz de 250 mL con 100 mL de medio 2xTY (Apéndice 8.1.) con ampicilina, e incubamos *over night* a 37 °C con agitación a 180-220 rpm.
- El siguiente día inoculamos esos 100 mL de células a un matraz con 2 L de medio y ampicilina, las mantenemos a 37 °C y controlamos la densidad óptica a 600 nm hasta que alcance un valor de ~0,6-0,8. En ese momento inducimos con 1 mM de IPTG (Carbosynth) la expresión de proteína y lo dejamos a 18 °C durante 16 horas.
- El último día recogemos el pellet de células centrifugando a 10000 rpm durante 10 minutos y a 4 °C. Guardamos el pellet a -20 °C hasta su uso.

3.1.3. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Cuando la expresión de las proteínas se ha llevado a cabo en bacterias, el primer paso consiste en la lisis celular. En este paso, se resuspenden los pellets de las células en tampón A (25 mM Tris pH 7,5, 500 mM NaCl, 10 mM imidazol), al cual se añade un vial de *cocktail* de inhibidores de proteasas (Apéndice 8.1) para evitar la degradación de las proteínas y luego se sonicán en hielo durante 15 minutos (con intervalos de descanso de 30 segundos cada 30 segundos) a un 80% de potencia (Sonics VibraCell™).

Tras la lisis celular, centrifugamos 20 minutos a 20000 rpm y 4 °C para retirar los restos de las células y filtramos el sobrenadante con filtros de 0,45 µm (Scharlau).

3.1.3.1. CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD CON HISTRAP (IMAC)

La cromatografía de afinidad es una de las técnicas más empleadas en la purificación de proteínas. Consiste en la generación de interacciones específicas entre nuestra proteína y la matriz de la columna cromatográfica, de forma que nos deshacemos de la mayoría de las impurezas presentes en la muestra. Derivado de esto, surge la IMAC, que es la cromatografía de afinidad por metales inmovilizados. En esta variante, las interacciones específicas se dan entre un metal (níquel en nuestro caso) y los residuos de histidinas que hemos introducido a la hora de construir nuestros plásmidos (Gaberc-Porekar y Menart, 2001). Este es un paso común en la purificación de la mayoría de las proteínas de las que hacemos mención en esta tesis.

El sobrenadante ya filtrado se carga en la columna HisTrap HP (GE Healthcare) equilibrada previamente con tampón A. Una vez pasa la muestra, lavamos con ese mismo tampón y eluimos en gradiente de imidazol de 10 a 500 mM, con tampón B (25 mM Tris pH 7,5, 500 mM NaCl, 500 mM imidazol).

Para confirmar que hemos purificado nuestra proteína de interés y ver su estado procedemos al siguiente punto (ejemplo en la **Figura 11**).

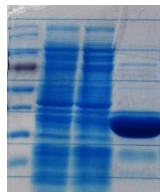


Figura 11. Gel de la purificación de SseK1^{wt}.

3.1.3.2. ELECTROFORESIS SDS-PAGE DESNATURALIZANTE Y TINCIÓN

La electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida es una técnica clásicamente empleada para la separación y visualización de proteínas durante y tras la purificación de las mismas (Brunelle y Green, 2014).

Esta técnica se basa en la separación en función del peso molecular de una proteína cargada negativamente en un gel de acrilamida al ser sometida a una diferencia de potencial eléctrico.

Para llevar a cabo la electroforesis, el primer paso es desnaturalizar las muestras calentando a 100 °C en presencia de la disolución de carga (laemmli) (Apéndice 8.1.) que entre otras cosas lleva SDS, un detergente aniónico que se une inespecíficamente a las proteínas y les confiere una relación tamaño/carga constante.

Una vez cargadas las muestras en el gel, este se somete a un voltaje constante de 130 V durante 80-90 minutos en función del porcentaje de acrilamida de dicho gel. Las proteínas migran por la red de acrilamida a una velocidad inversamente proporcional al logaritmo de su peso molecular y se pueden comparar con un patrón estándar (marcador de peso molecular, en nuestro caso Page Ruler Protein Ladder, (Thermo Fisher)).

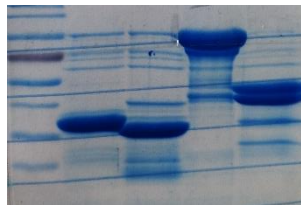


Figura 12. Gel del corte con PP (izquierda) y con TEV (derecha) de las proteínas SseK1^{wt} y NleB1^{EHEC}.

En este caso, hemos usado geles del 12% para todas las proteínas exceptuando los dominios de muerte, que al ser más pequeños necesitan que el gel sea del 15%. En la **Figura 12** podemos ver un ejemplo donde se comprueba que el corte con las proteasas ha sido completo, de esto se hablará en los siguientes apartados.

3.1.3.3. INTERCAMBIO DE TAMPÓN

Tras comprobar en el gel que hemos purificado nuestras proteínas de interés, procedemos a cambiar el tampón para quitar el imidazol. Hay distintas formas de llevar a cabo este paso, pero puesto que tenemos un volumen de entre 15-30 mL, el intercambio de tampón lo hacemos mediante un proceso de exclusión molecular con una columna HiPrep 26/10 Desalting (GE Healthcare), que permite que separemos las moléculas en función de su tamaño al pasar por una matriz porosa. Lo primero que saldrá de la columna serán las moléculas más grandes (nuestra proteína), quedando retenido más tiempo el tampón en el que se encontraba.

El procedimiento es muy simple, primero se tiene que equilibrar la columna con 3-5 volúmenes de agua mili-Q para retirar el etanol al 20% en el que se mantiene guardada y luego otros 3-5 volúmenes de tampón 25 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl. Tras el equilibrado se inyectan 15 mL máximo de muestra y se recogen alícuotas hasta que haya eluído la proteína, que sale diluida en torno a los 15 mL mencionados. Tras este volumen podemos apreciar que comienza a salir el tampón anterior ya que vemos un cambio de conductividad en el cromatograma. Si tenemos que inyectar más muestra debemos esperar que la conductividad y el ultravioleta vuelvan a los niveles iniciales. La columna se procede a limpiar entonces con agua mili-Q de nuevo y luego se guarda en etanol 20%.

3.1.3.4. CORTE CON PROTEASA Y PURIFICACIÓN

Una vez cambiado el tampón, procedemos a cortar con la proteasa que corresponda. En primer lugar, cuantificamos con Bradford (Biorad) para saber la concentración en miligramos de nuestras muestras, tras esto añadimos TEV en proporción 1:50 con respecto a la concentración en miligramos para las muestras de MBP-His-TEV-NleB1^{EHEC}, MBP-His-TEV-DR3^{DD}, His-TEV-SseK2^{wt} y sus mutantes. Tomamos muestras previas al corte para comprobar en un gel si hay corte y dejamos las muestras a 18 °C hasta el día siguiente. En el caso de SseK1^{wt} y sus mutantes, así como de FADD^{DD} añadimos PP en proporción 1:100 y dejamos cortando a 4 °C.

Al día siguiente corremos un gel para comprobar que el corte ha sido completo (**Figura 12**) y procedemos a purificar las muestras para eliminar las proteasas y las colas de las proteínas.

Este paso es similar al apartado 3.1.3.1. Usamos una columna de níquel donde se quedará unida por afinidad la cola de histidinas o la MBP que también lleva cola de histidinas según la muestra que carguemos, y saldrá en el *flow through* nuestra proteína purificada. En el caso de las proteínas que hayamos cortado con TEV, esta se quedará unida a la columna de níquel, pero si hemos usado PP necesitamos añadir una columna de GST FF (GE Healthcare) donde se unirá por afinidad la GST ya que la PP es una proteína de fusión.

A la hora de limpiar la columna de níquel, pasamos primero un 10% de tampón B para asegurarnos que ha salido toda nuestra proteína, y luego limpiamos con 3 volúmenes de tampón B 100%, agua mili-Q y guardamos en etanol 20%.

Puesto que nos quedamos con el *flow through*, debemos eluir la columna de GST donde se habrá quedado unida la PP con tampón de elución (25 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 10 mM de glutatión reducido),

tras este paso la tratamos igual que a la columna de níquel, lavamos con agua y luego guardamos en etanol 20%.

Podemos comprobar en un gel la pureza de la muestra.

3.1.3.5. CONCENTRACIÓN Y CONSERVACIÓN

Tras acabar la purificación de cada proteína, necesitamos reducir su volumen para poder almacenarla correctamente. Para ello, concentramos mediante el uso de centricones de 15 mL (Milipore) de distinto tamaño de poro de la membrana en función del peso de nuestra proteína, en nuestro caso usamos *cut offs* de 30 kDa, 10 kDa y 3 kDa. Para concentrar, primero equilibramos la membrana del centricon en agua mili-Q y luego en el tampón en el que se encuentre nuestra proteína pasándole 15 ml de disolución. Una vez equilibrados, adicionamos la proteína y centrifugamos a 4000 rpm y 4 °C, variando el tiempo en función de la cantidad de proteína que tengamos, para ello usamos un centrifuga de mesa Beckman Coulter Allegra X-30R Centrifuge.

Una vez concentrada la muestra podemos cambiarle el tampón diluyendo y concentrando en el mismo centricon para eliminar la sal.

Para conservar las muestras primero debemos cuantificar midiendo la absorbancia a 280 nm usando los coeficientes de extinción teóricos en un nanodrop DeNovix Serie DS-11.

Los coeficientes de extinción teóricos son: $\epsilon_{280\text{nm}}$ para SseK1^{wt} y los mutantes varían en el rango 38850 y 41830 M⁻¹ cm⁻¹; $\epsilon_{280\text{nm}}$ para SseK2^{wt} y sus mutantes varían en el rango de 42350 and 44860 M⁻¹ cm⁻¹; $\epsilon_{280\text{nm}}^{\text{NleB1}} = 55810 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; $\epsilon_{280\text{nm}}^{\text{FADD}} = 12500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; $\epsilon_{280\text{nm}}^{\text{DR3}} = 15470 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Tras la cuantificación, etiquetamos los viales con las proteínas purificadas y congelamos en nitrógeno líquido, para luego guardarlas a -80 °C hasta su utilización.

3.1.4. TÉCNICAS BIOFÍSICAS PARA EL ANÁLISIS Y CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS

3.1.4.1. DETERMINACIÓN DE LA CONSTANTE DE UNIÓN POR ITC

La calorimetría de titulación isotérmica (ITC) se emplea para obtener las constantes de equilibrio o las entalpías de unión en las interacciones entre macromoléculas o bien macromoléculas y ligandos. El ITC mide el calor absorbido o emitido en una serie de inyecciones secuenciales de una especie localizada en la jeringa de inyección, sobre la otra especie localizada en la celda de muestra (Biswasy Tsodikov, 2010). Esta técnica se puede emplear prácticamente para medir interacciones entre cualquier tipo de biomoléculas, ya sean proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, carbohidratos, etc. El esquema de funcionamiento se muestra en la **Figura 13**.

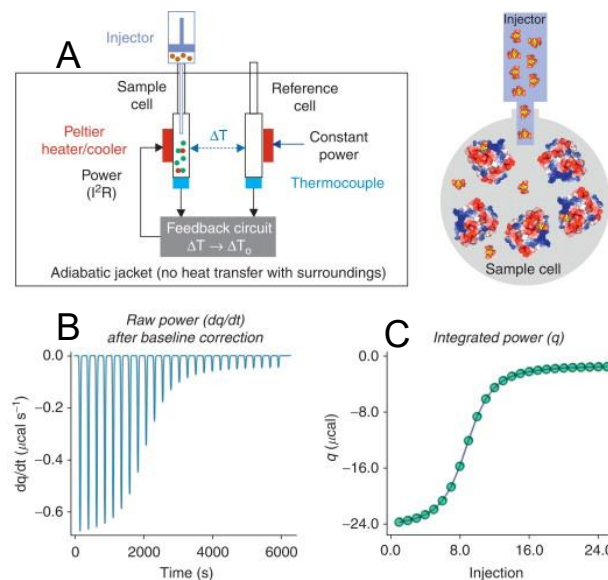


Figura 13. Esquema general del funcionamiento del ITC. En (A) podemos ver el esquema del equipo donde se muestra una cámara adiabática donde se

encuentran las dos celdas, una de referencia (con agua) y la de muestra conectada a una jeringa donde se encuentra el ligando que se va a inyectar. En (B) vemos los datos brutos obtenidos debido a la diferencia de calores medidos entre la celda de referencia y la de muestra; y en (C) los datos ya procesados de cuyo ajuste obtenemos la constante de unión (K), la entalpía (ΔH) y el número de sitios de unión (n).

3.1.4.1.1. DETERMINACIÓN DE LA CONSTANTE DE UNIÓN POR ITC DE LAS INTERACCIONES ENTRE LAS ENZIMAS NleB/SseK Y LOS DOMINIOS DE MUERTE

En esta tesis se ha empleado el equipo Auto-iTC200 (Microcal, GE Healthcare) para la caracterización de las interacciones entre NleB1^{EHEC} con UDP, NleB1^{EHEC} y S286Y^{SseK1} con FADD^{DD} sin UDP, y NleB1^{EHEC}, SseK1^{wt}, SseK2^{wt} y sus correspondientes mutantes con FADD^{DD} y DR3^{DD} en presencia de UDP y MnCl⁺² saturante. Todos los experimentos se han llevado a cabo a 25 °C en tampón 25 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl.

Las concentraciones empleadas fueron las siguientes:

- 40 μM de NleB1^{EHEC} con 500 μM de UDP en 25 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl y 0,5 mM MnCl₂.
- NleB1^{EHEC} y S286Y^{SseK1} a 40 μM y 400 μM de FADD^{DD} sin UDP ni MnCl₂.
- 40 μM de NleB1^{EHEC}/SseK1^{wt}/SseK2^{wt} y los correspondientes mutantes con una concentración variable de FADD^{DD} desde 350 μM a 1 mM en la jeringa de inyección en tampón 25 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 1mM UDP y 0,5 mM MnCl₂.
- 30 μM de DR3^{DD} con NleB1^{EHEC}/SseK1^{wt}/SseK2^{wt} y los correspondientes mutantes con una concentración variable

entre 300 a 500 μM en la jeringa de inyección en tampón 25 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 1mM de UDP y 0,5 mM MnCl_2 .

Los experimentos de caracterización frente a DR3 se hicieron por titulación inversa ya que DR3 presenta una baja solubilidad.

Todos los experimentos se hicieron en duplicados, y la integración, corrección y análisis de los datos se hicieron con el software Origin 7 (Microcal) empleando el modelo de unión de un solo sitio.

3.1.4.2. ANÁLISIS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Otro de los métodos empleados en la presente tesis para entender y caracterizar las interacciones de las enzimas con sus respectivos ligandos ha sido el análisis de la actividad enzimática. Ya que no disponemos de métodos para seguir la reacción de transferencia del azúcar al ligando en tiempo real, hemos empleado kits de detección de ATP donde se acopla la reacción de transferencia de nuestro azúcar liberando UDP o GDP a una reacción donde ese UDP/GDP se transforma en ATP (**Figura 14**), que se une al reactivo de detección de ATP dando señal de luminiscencia. Los kits son UDP-GloTM y GDP-GloTM (Promega). Se menciona el kit de GDP-GloTM porque se usará para medir la actividad de FUT8.

Cada kit contiene un reactivo de detección que se mezcla en proporción 1:1 con la reacción y se incuba a temperatura ambiente 1 hora en oscuridad. Una vez pasado este tiempo se mide la luminiscencia en el lector de placas Synergy HT (Biotek). Las reacciones se pueden hacer en placas de 96 o de 384 pocillos blancas opacas, en nuestro caso hemos empleado las placas de 384 pocillos ya que podemos usar un volumen de reacción menor (5 μL). Para cada medida se hizo siempre una recta de calibrado ya sea de UDP o de

GDP que se sometió a la misma temperatura y el mismo tiempo que las reacciones. Todas las medidas se hicieron por duplicado.

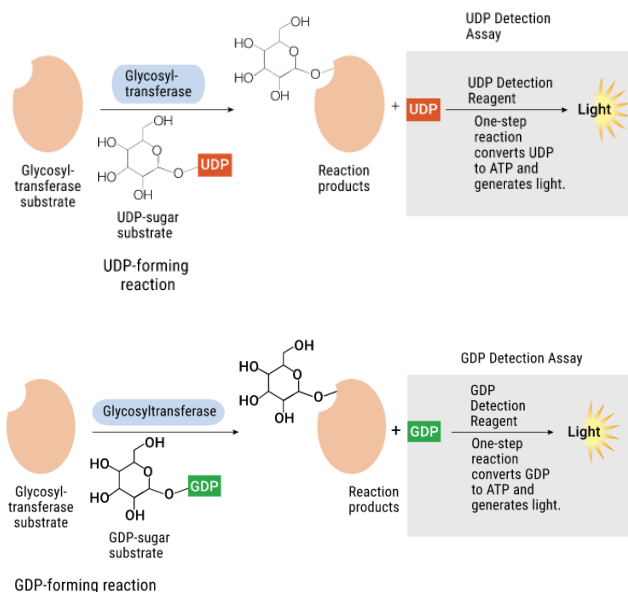


Figura 14. Esquema del funcionamiento de los kits de Promega empleados.

Fuente: Promega.

3.1.4.2.1. CINÉTICAS DE LAS ENZIMAS NleB/SseK

Para la medida de las cinéticas de las NleB/SseK hemos usado el kit UDP-Glo ya que transfieren el GlcNAc a partir de UDP-GlcNAc.

Para establecer la cantidad de UDP-GlcNAc que se iba a poner de forma constante en las reacciones, primero se hizo la cinética de NleB1^{EHEC} frente a UDP-GlcNAc manteniendo FADD^{DD} constante. La concentración de la enzima empleada fue 10 nM en 25 mM Tris pH 7,5, 150 mM de NaCl, 50 μ M de MnCl₂ y 800 μ M de FADD^{DD}, poniendo concentraciones variables de UDP-GlcNAc desde 5 a 800 μ M.

Para el resto de cinéticas, las reacciones contenían 10 nM de cada enzima en 25 mM de Tris pH 7,5, 150 mM de NaCl, 50 μ M de MnCl₂ y 500 μ M de UDP-GlcNAc en presencia de FADD^{DD} o DR3^{DD}, siendo la

concentración de FADD^{DD} variable entre 5 a 800 μM , y la de DR3^{DD} de 5 a 140 μM .

Una vez preparadas las reacciones, se incubaron 30 minutos a 30 °C, parándose la reacción al añadir el reactivo de detección en ratio 1:1 como se ha mencionado previamente en una placa blanca y opaca de 384 pocillos. Posteriormente, las placas se incubaron en oscuridad durante 1 hora a temperatura ambiente y luego se midió la luminiscencia.

Los valores obtenidos se corrigieron para eliminar la hidrólisis del UDP-GlcNAc y se ajustaron al modelo no lineal de Michaelis-Menten o al modelo de inhibición por sustrato según los valores obtenidos, usando el programa GraphPad Prism 6 del cuál obtuvimos los valores de K_m , k_{cat} , V_{max} , y K_i , así como la desviación estándar.

3.1.5. ENSAYOS CELULARES

3.1.5.1. ENSAYO DE INFECCIÓN POR SALMONELLA EN MACRÓFAGOS

La infección de los macrófagos se llevó a cabo para medir la abundancia intracelular de las cepas complementarias de *Salmonella* $\Delta sseK1\Delta sseK2\Delta sseK3$ en células RAW264.7. Dichas células de sembraron a 1×10^5 células/pocillo en una placa de 24 pocillos 24 horas antes de la infección. El cultivo de las bacterias se creció hasta una densidad óptica de 0,4 y 10^6 CFUs, y se añadieron a las células RAW264.7 durante 30 minutos. Las células se incubaron entonces en medio con gentamicina (Apéndice 8.1.) 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 1 hora y luego se incubaron durante 23 horas más subiendo la cantidad de gentamicina a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Finalmente, las bacterias se liberaron de las células RAW264.7 usando 1% de saponin diluido en PBS (Apéndice 8.1), plaqueando luego para poder realizar la contabilización de las colonias.

Esto ha sido realizado por el Dr. Samir El Qaidi y el Dr. Philip Hardwidge, de la Universidad de Kansas, USA.

3.1.6. TÉCNICAS COMPUTACIONALES

Las simulaciones de dinámicas moleculares (MD) son una de las técnicas computacionales que nos permiten extrapolar, interpretar y pre visualizar los resultados experimentales obtenidos, de forma que obtenemos una información complementaria y que puede enriquecer nuestros estudios.

En concreto, la dinámica molecular consiste en simulaciones informáticas en las que una vez definidos matemáticamente los parámetros estéricos y de interacción con el medio en base a la estructura de nuestra proteína de interés, podemos predecir la posición y el movimiento de los átomos del sistema a lo largo de un tiempo determinado.

Durante esta tesis, esta técnica computacional nos ha ayudado a complementar los estudios experimentales de los dos proyectos que estamos tratando.

3.1.6.1. DINÁMICA MOLECULAR DE NleB/SseK

Los complejos iniciales se prepararon usando Schrödinger Maestro y las coordenadas cartesianas para el complejo NleB1^{EHEC}-UDP-Mn²⁺-FADD^{DD} se obtuvieron a partir del *Protein Data Bank* (código del PDB: 6ACI). En cuanto al UDP-GlcNAc, se tuvo que añadir manualmente en base a las coordenadas de dicho PDB para el UDP.

El sistema se preparó entonces usando el wizard de preparación de proteínas. Los átomos de nitrógeno se añadieron y se predijo el estado de ionización con PROPKA. La estructura resultante se minimizó con OPLS usando un umbral de 0,3 Å para la convergencia de los átomos pesados. Las coordenadas cartesianas de la enzima se tomaron de la estructura cristalina de SseK1^{wt} (entrada del PDB 5H60), a partir de la cual se construyeron los tres mutantes simples (S286Y^{SseK1}, S286N^{SseK1} y S286I^{SseK1}). Se añadieron los átomos de hidrógeno y se eliminaron los ligandos y aguas no importantes estructuralmente. La estructura se minimizó siguiendo el protocolo antes mencionado.

Para cada complejo, el UDP-GlcNAc se colocó en el sitio del donador y se construyeron los complejos con el sustrato aceptor, FADD^{DD} mediante un alineamiento estructural con la enzima NleB1^{EPEC} en la estructura cristalina NleB1^{EPEC}-UDP-Mn²⁺-FADD^{DD} seguido de una optimización energética. El UDP-GlcNAc se preparó usando LigPrep en Maestro con una serie de conformaciones de baja energía generado con MacroModel. Los conformeros se colocaron en una grid con una caja exterior de dimensiones 23 Å x 23 Å x 23 Å y una caja interior de 10 Å x 10 Å x 10 Å con el centro de la caja colocado en el medio del sitio de unión del UDP-GlcNAc. UDP-GlcNAc fue minimizado en el sitio activo usando Glide. Seleccionamos una de las estructuras resultantes y la usamos para construir los complejos de SseK1^{wt} y sus mutantes.

Las cargas de las simulaciones MD para el fragmento UDP de UDP-GlcNAc se derivaron del método de ajuste RESP con la carga general establecida en -2. Para que fueran compatibles con GLYCAM, las cargas para este fragmento se calcularon con el anillo del GlcNAc sustituido con un grupo metilo. El grupo metilo fue asignado con una carga de 0,194 previamente a su eliminación, dejando la carga total del fragmento de UDP metilado como 2,194.

Las simulaciones de los complejos NleB1^{EPEC}-UDP-GlcNAc-Mn²⁺-FADD^{DD}, SseK1^{wt}-UDP-GlcNAc-Mn²⁺-FADD^{DD} y S286Y/N/I^{SseK1}-UDP-GlcNAc-Mn²⁺-FADD^{DD} se llevaron a cabo usando Amber PMEMD. Los sistemas se solvataron y el sistema se neutralizó usando iones de Na⁺. El algoritmo de gradiente conjugado se empleó para minimizar los sistemas con el umbral de convergencia establecido en 10⁻⁴ kcal mol⁻¹ Å⁻¹, primero usando una restricción de 20 kcal mol⁻¹ Å⁻² en átomos de soluto, después de lo cual se repitió la minimización sin restricciones.

A continuación, cada sistema se calentó a una temperatura de 310 K sobre 500 ps antes de equilibrar la presión a 1 atm en el transcurso de otros 500 ps. Durante el calentamiento y el equilibrio de presión, se colocaron restricciones de 20 kcal mol⁻¹ Å⁻² en los átomos de soluto.

A continuación, se liberaron las restricciones del sistema en cuatro etapas, cada una de 200 ps de longitud. Luego, se utilizó la dinámica molecular acelerada de Gauss (GaMD) para simular cada sistema durante 1 μs. En esto, las simulaciones se dividen cada una en cuatro etapas. La primera etapa es una simulación estándar de 2 ns para calcular el potencial de impulso. Este potencial de impulso se utiliza luego para simular los primeros 400 ps antes de permitir la adaptación durante 5,6 ns. El potencial de refuerzo final se usó para realizar la simulación de dinámica molecular durante 1 μs con las coordenadas que se guardaron cada 100 ps. El algoritmo SHAKE se utilizó en todas las simulaciones para restringir los enlaces a los átomos de hidrógeno, con el intervalo de tiempo establecido en 2 fs. Para mantener la temperatura se implementó un termostato Langevin con una frecuencia de colisión de 5 ps⁻¹. Para mantener la presión, se utilizó un algoritmo de Berendsen isotrópico como barostato con un tiempo de relajación establecido en 1 ps. Se utilizaron condiciones de contorno periódicas con malla de partículas Ewald para calcular la electrostática.

Esto ha sido realizado por Thomas Hicks, de la Universidad de East Anglia, UK.

3.2. FUT8

3.2.1. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

3.2.1.1. PLÁSMIDO DE FUT8

La secuencia de ADN codificante para los residuos 68 al 575 de la enzima humana FUT8, fue sintetizada y su frecuencia de codones optimizada para la expresión en células HEK293 por GenScript (EEUU). La construcción fue clonada en el vector pHLSec (**Figura 15**) conteniendo una cola de 12 histidinas después de la secuencia de la señal de secreción, una GFP (Moremen *et al.*, 2018) y un sitio de corte TEV para dar lugar al plásmido pHLSec-12Hist-GFP-TEV-HsFUT8.

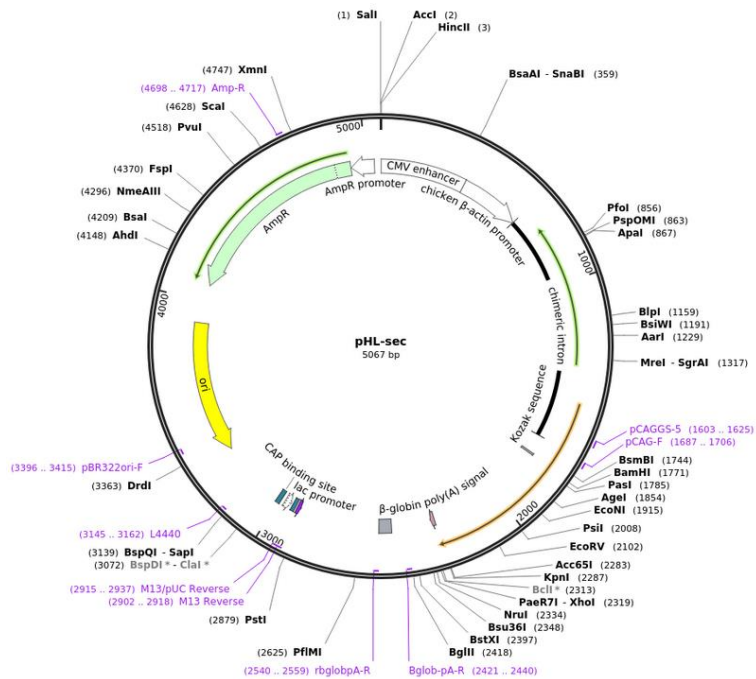


Figura 15. Mapa del vector usado por GenScript para la creación de nuestro plásmido. **Fuente:** <https://www.addgene.org>

3.2.1.2. TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES DH5 α

El protocolo de transformación es igual que el que seguimos en el apartado 3.1.1.2, pero en este caso empleamos células competentes DH5 α ya que queremos obtener ADN plasmídico de FUT8.

3.2.1.3. EXTRACCIÓN DE ADN PLASMÍDICO

Puesto que para expresar la proteína emplearemos células de HEK293F transfectadas en transiente, necesitamos altas cantidades de ADN plasmídico de alta calidad. Para ello, empleamos el kit “PureLink™ Expi Endotoxin-Free Giga Plasmid Purification Kit” (<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A31233#/A3123>) siguiendo las correspondientes instrucciones del fabricante.

3.2.1.4. CRISPR/Cas9 DIRIGIDO PARA HACER *KNOCKOUTS* EN CÉLULAS CHO

El sistema CRISPR/Cas es el sistema empleado en muchas bacterias y archaeas para adaptar su sistema inmune (Horvath y Barrangou, 2010), de forma que pueden adquirir inmunidad frente a virus y plásmidos.

Desde el 2012, este sistema se comenzó a aplicar a la edición del genoma y se sentaron las bases del sistema CRISPR/Cas9, que, de forma simplificada se muestra en la **Figura 16**:

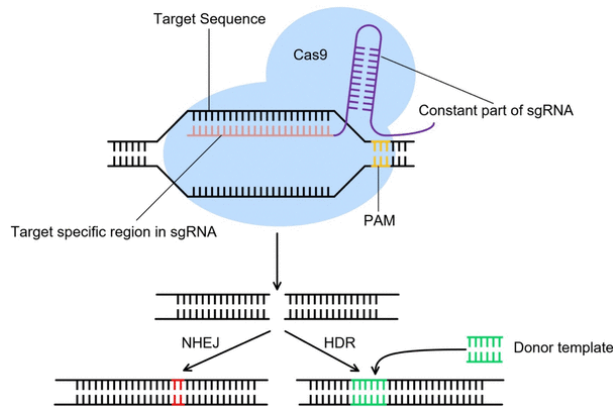


Figura 16. Esquema simplificado del sistema de edición CRISPR/Cas9.
Fuente: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12539-018-0298-z/figures/1>

En primer lugar, se forma un complejo entre el gARN que hemos diseñado y la endonucleasa Cas9, que se unen al ADN objetivo y cortan en los sitios indicados. El ARN presenta dos partes, una constante (violeta en la **figura 16**) donde se une Cas9 y otra variable que es complementaria a nuestro ADN objetivo (rosa en la **figura 16**) (Cong y Zhang, 2015).

El sitio objetivo en el ADN contiene principalmente dos partes, un *protospacer* (negro en la **figura 16**) complementario a la secuencia de nuestro gARN y un motivo adyacente llamado PAM (color amarillo en la **figura 16**) unido a Cas9. PAM suele ser corto y directamente unido al *protospacer* y si no está presente, Cas9 no cortará la secuencia en el ADN. Cuando el *protospacer* y Cas9 se unen con PAM, se produce una rotura en la doble hebra (DSB). Tras esto, la maquinaria de reparación del ADN comienza la reparación del mismo y se pueden dar dos casos, que se produzca la pérdida de la secuencia objetivo (consiguiendo la represión del gen) o bien que se introduzca una secuencia exógena para ocupar ese hueco (Wyman y Kanaar, 2006).

Tras esta breve introducción, podemos explicar en más detalle el protocolo seguido en nuestros experimentos.

La edición de los genes, se llevó a cabo en los clones estables de células CHO que expresaban las proteínas *reporters*. Las células se sembraron a $0,5 \times 10^6$ células/ml en un flask T25 (NUNC, Dinamarca) 24 horas antes de la transfección, usándose 2×10^6 células y 1 μg de cada plásmido de Cas9-GFP y gARN para la electroporación. 48 horas después, las células que mostraron GFP se enriquecieron mediante FACS y tras una semana de cultivo, las células se clasificaron por FACS en 96 pocillos.

Los clones *knockout* con las mutaciones deseadas se cribaron siguiendo un método rápido de cribado como es la detección de Indel por análisis de amplicones (IDAA) (Zhang Yang, Steentoft, *et al.*, 2015). Los clones finales se secuenciaron mediante la secuenciación Sanger, y finalmente se seleccionaron 2-5 clones de cada mutación.

Esto ha sido realizado por el Dr. Yang Zhang, de la Universidad de Copenhague.

3.2.2. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS

La expresión de FUT8 se ha llevado a cabo a partir células de mamíferos usando HEK293F. Estas células se han adaptado al crecimiento en suspensión de alta densidad sin sueros y permiten la transfección en forma transiente. Se pueden obtener también de Thermo Fisher (<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/R79007#/R7900>).

La expresión de las proteínas recombinantes humanas IgG1, AGA, GLA y GBA, se llevó a cabo a partir de los clones estables en células CHO que hizo el Dr. Yang Zhang.

3.2.2.1. TRANSFECCIÓN DE FUT8 EN HEK293F

La expresión de FUT8 se ha llevado a cabo en células de mamífero mediante expresión transiente. Para ello hemos necesitado transfectar las células para que expresen nuestra proteína. Las células se mantienen en suspensión en un incubador a 37 °C con un 8% de CO₂ y un 80% de humedad a 125 rpm.

Una vez que tenemos el volumen deseado y teniendo las células una densidad de 2,5 x 10⁶ células/ml, procedemos a transfectar. En primer lugar, cambiamos el medio centrifugando a 1200 rpm durante 10 minutos y resuspendemos en medio fresco FreeStyle F17 (Thermo Fisher) suplementado con 2% de Glutamax (Gibco) y un 0,1% de Kolliphor P188 (Sigma Aldrich). Por cada ml de cultivo añadimos 3 µg de DNA y NaCl para dejarlo a una concentración final de 3,75 mM. Una vez añadido al cultivo lo volvemos a dejar en el incubador durante 5 minutos. Añadimos 9 µg de PEI-MAX 40K por cada ml de cultivo y se devuelve al incubador.

Una vez pasadas las 24 horas, duplicamos el volumen con medio suplementado y añadimos VPA (Sigma Aldrich) dejándolo a una concentración final de 2,2 mM. Dejamos expresando durante 6 días antes de recoger el sobrenadante centrifugando 5 minutos a 300 xg y luego 15 minutos a 4000 xg.

3.2.2.2. EXPRESIÓN ESTABLE DE LOS IgG1, AGA, GLA y GBA HUMANOS RECOMBINANTES EN CÉLULAS CHO

Para la producción de los clones estables, se emplearon células CHOZN GS^{-/-} (Merck), que se mantuvieron en suspensión en medio libre de suero (EX-CELL CHO CD Fusion, cat. No 14365C) suplementado con 4 mM de L-glutamina. La expresión del IgG1 humano

anti ratón se ha usado previamente para la producción de clones estables. Las secuencias que codifican los GLA, GBA y AGA humanos han sido sintetizadas por Genewiz y se clonaron en pCGS3 (Merck).

Las células se sembraron a $0,5 \times 10^6$ células/ml en flask T25 (NUNC) 24 horas antes de la transfección, que se llevó a cabo en 2×10^6 células con 8 μg de plásmidos usando el kit V de Amaxa y el programa U24 con Amaxa Nucleofector 2B (Lonza). 72 horas tras la transfección se plaquearon a 500 – 1000 células/ml en placas de 96 pocillos con 200 μL de medio Minipool Plating Medium conteniendo 80% de EX-CELL CHO Cloning Medium y 20% de EX-CELL CD CHO Fusión sin glutamina para la selección.

El cribado de los clones estables con alta expresión se llevó a cabo midiendo la actividad enzimática usando medio para AGA o anticuerpo Anti-hFc-HRP (Merck). Los clones seleccionados se expandieron en 50 mL en TPP TubeSpin con agitación a 37 °C, 180 rpm y 5% CO_2 . Esto ha sido realizado por el Dr. Yang Zhang, de la Universidad de Copenhague.

3.2.3. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Cuando la proteína se expresa secretada en el sobrenadante del cultivo celular de células de mamífero (HEK293F en nuestro caso, como se ha mencionado previamente), el primer paso de la purificación consiste en dializar el sobrenadante en tampón A (25 mM Tris pH 7,5, 500 mM NaCl, 10 mM imidazol) *over night*, y tras la diálisis, filtramos el sobrenadante con filtros de 0,45 μm (Scharlau).

3.2.3.1. CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD CON HISTAG (IMAC)

Ver apartado 3.1.3.1.

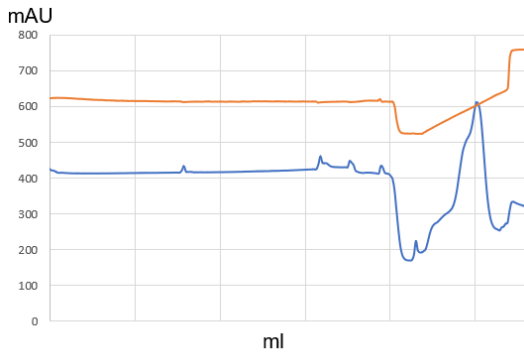


Figura 17. Cromatograma de la purificación por HistTag de FUT8. En azul se representa el ultravioleta y en naranja la conductividad de la muestra.

3.2.3.2. ELECTROFORESIS DESNATURALIZANTE Y TINCIÓN SDS-PAGE

Ver apartado 3.1.3.2.

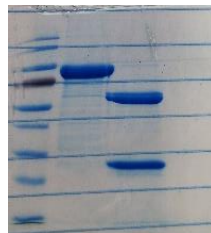


Figura 18. Gel del corte con TEV de FUT8.

3.2.3.3. INTERCAMBIO DE TAMPÓN

Ver apartado 3.1.3.3.

3.2.3.4. CORTE CON PROTEASA Y PURIFICACIÓN

Tras la cuantificación con Bradford, añadimos TEV en proporción 1:50 con respecto a la concentración en miligramos para la muestra de Hist-GFP-FUT8. Tomamos muestras previas para comprobar en un gel si hay corte y dejamos las muestras a 18 °C hasta el día siguiente. El protocolo es igual que en el apartado 3.1.3.4. Un ejemplo del corte lo vemos en la **Figura 18**.

3.2.3.5. CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR

Este paso solo ha sido necesario para la purificación de FUT8 ya que ha sido la única proteína empleada para cristalografía.

En la cromatografía de exclusión molecular, usamos columnas cuya matriz porosa presenta canales de tamaño selectivo que nos permite separar moléculas en función de su tamaño gracias a que este afecta al tiempo de retención en dicha matriz. Este paso lo llevamos a cabo con la finalidad de separar nuestra proteína de impurezas o bien de agregados que nos dificulten luego el proceso de cristalización de la muestra. La columna que hemos usado es la HiLoad 26/60 Superdex 75, con un rango de separación óptimo entre 3 y 70 kDa.

El procedimiento consiste en inyectar 5 ml máximo de muestra en la columna previamente equilibrada en 25 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, esperar que pase el volumen muerto de la columna y luego recoger alícuotas hasta que salga nuestra proteína. Podemos comprobar la pureza y el estado de nuestra proteína en un gel de acrilamida.

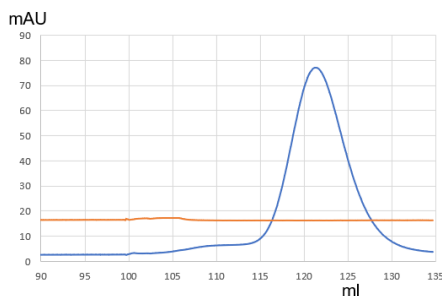


Figura 19. Cromatograma de la exclusión molecular de FUT8. Como se puede ver en la gráfica FUT8 presenta muy pocos agregados, y sale en un volumen correspondiente a la forma dimérica de la proteína.

3.2.3.6. CONCENTRACIÓN Y CONSERVACIÓN

Ver apartado 3.1.3.5.

El coeficiente de extinción teórico para FUT8 es: $\epsilon_{280\text{ nm}}^{\text{HsFut8}} = 90760 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

3.2.3.7. PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES EXPRESADAS EN LAS CÉLULAS CHO

Al ser proteínas secretadas al medio, precisamos centrifugar el cultivo a 500 xg durante 20 minutos y luego filtrar el sobrenadante por $0,45 \mu\text{m}$ al igual que ocurre con las proteínas producidas con HEK293F.

La purificación de IgG1 y GLA, GBA y EPO se llevó a cabo según los protocolos ya publicados (Tian *et al.*, 2019; Yang, Wang, *et al.*, 2015; Schulz *et al.*, 2018). Para purificar AGA, se añadió un 20% de tampón 70 mM Tris pH 7 al medio y luego se cargó en una columna Q-FastFlow Sepharose (GE Healthcare) ya equilibrada previamente en 20 mM Tris, 20 mM acetato sódico, 70 mM NaCl pH 6,8. Tras lavar con el mismo tampón, eluimos en un solo paso con el tampón de elución (25 mM

acetato sódico, 250 mM NaCl pH 4,5) en un tubo de ensayo conteniendo 300 mM de fosfato sódico pH 7,3.

Los eluidos se diluyeron a un 50% v/v con 4 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y luego se cargaron en una columna de Phenyl-Sepharose Fast Flow (GE Healthcare). Finalmente, lavamos y eluimos en gradiente hasta 2 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 20 mM Tris pH 7.

Esto ha sido realizado por el Dr. Yang Zhang, de la Universidad de Copenhague.

3.2.4. SÍNTESIS DE LOS GLICANOS EMPLEADOS

Toda la síntesis de los glicanos ha sido realizada por la Dr. Sonia Serna y el Dr. Raik Artschwager del CIC biomaGUNE, San Sebastián, siguiendo el esquema que se muestra en la **Figura 20**.

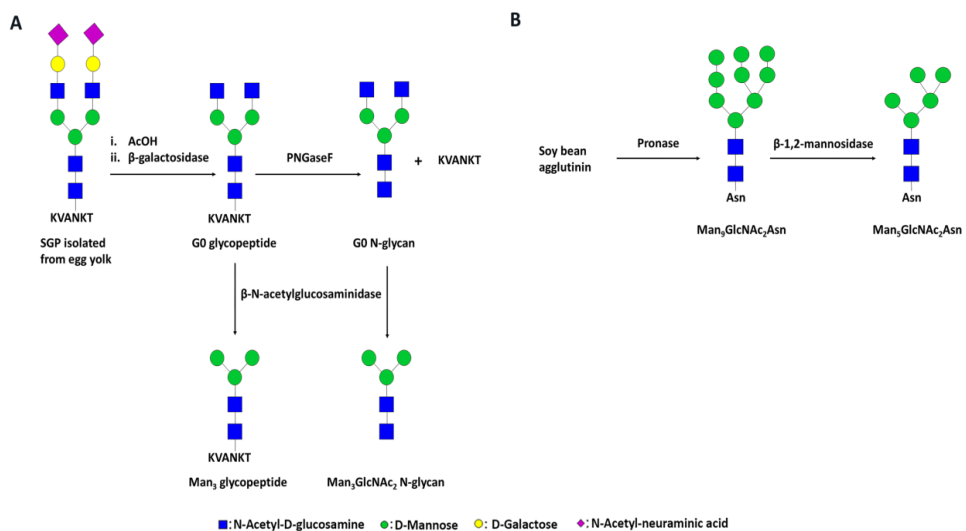


Figura 20. Esquema de la preparación de los glicanos. A. Preparación de G0, M3N2 y el péptido (KVANKT) derivados del glicopéptido siálico de yema de huevo (SGP). B. Síntesis de M5N2-Asn a partir la aglutinina de soja.

3.2.4.1. PREPARACIÓN DE G0, G0-PÉPTIDO Y PÉPTIDO KVANKT

Para la preparación del glicano biantenarico complejo A2-N-glicano (que llamaremos G0 (**Figura 21 izquierda**)), se aisló de yema de huevo el glicopéptido siálico (SGP) mayormente glicosilado con el glicano A2G2S2 y luego se procesó enzimática y químicamente (Sun *et al.*, 2014). Primero se trató el glicopéptido con ácido acético a 80°C para eliminar el ácido siálico, se deglicosiló con PNGasa F (Asparia Glycomics) obteniendo una mezcla de glicanos mono y bis galactosilados. La mezcla se disolvió en tampón 50 mM de fosfato pH 5 y se añadieron β -galactosidasa de *Aspergillus niger* y una disolución acuosa de NaN_3 0,02%. Incubamos a 37 °C y se monitoreó el progreso de la reacción por MALDI-TOF. Una vez eliminada la galactosa, se añade metanol y se centrifuga la muestra a 4500 rpm, eliminando así el metanol y cargando el sobrenadante en un cartucho con grafito, eluimos con agua, 25% metanol en agua y 50% metanol en agua. Se analizaron las fracciones por MALDI-TOF y los productos se concentraron y liofilizaron. El producto G0 se obtuvo como un sólido blanco.

Al deglicosilar con PNGasa F, a parte del producto G0 obtenemos también el péptido KVANKT ($\text{NH}_2\text{-Lys-Val-Ala-Asn-Lys-Thr-CO}_2\text{H}$). La purificación tuvo lugar mediante HPLC con una columna cromatográfica C18 y empleando un gradiente de 0.1% de ácido trifluoroacético en agua hasta un 20% de metanol en 0.1% de ácido trifluoroacético en agua.

Para la preparación de G0-péptido (**Figura 21 derecha**), la diferencia en el protocolo radica en que no se usó la PNGasa F, ya que este producto lo queremos con el péptido.

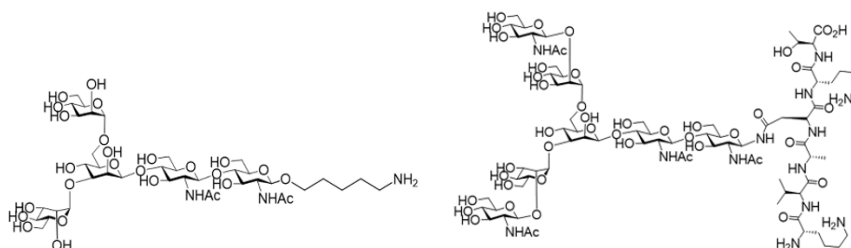


Figura 21. Estructura química de G0 y G0-péptido.

3.2.4.2. PREPARACIÓN DE M3N2 Y M3N2-PÉPTIDO

Para la obtención de los productos M3N2 y M3N2-péptido (**Figura 22**), se trató enzimáticamente G0 y G0-péptido con la β -N-acetilglucosaminidasa (New England Biolabs) para eliminar la N-acetilglucosamina terminal. La purificación se llevó a cabo mediante cromatografía de carbono grafitizado mediante un gradiente desde agua hasta 50% de metanol (Hamilton *et al.*, 2017).

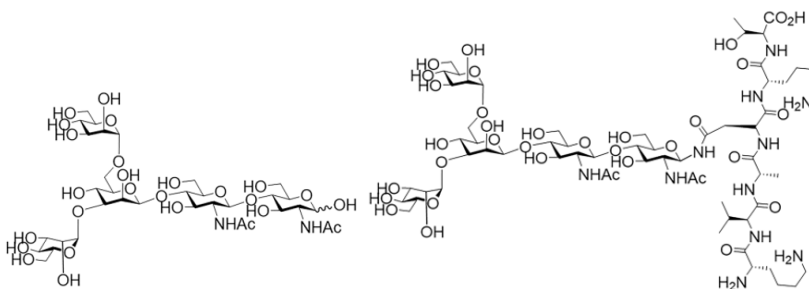


Figura 22. Estructura química de M3N2 y M3N2-péptido.

3.2.4.3. PREPARACIÓN DE M5N2-ASN

A partir de la harina de soja, se purificó la aglutinina de soja mediante cromatografía de afinidad siguiendo el siguiente protocolo ya descrito previamente (Fasina *et al.*, 2003). M5N2-Asn (**Figura 23**) se obtuvo tras la digestión de la aglutinina con Pronasa de *Streptomyces griseus*

(Sigma Aldrich) a 37 °C, seguido por un paso de purificación con carbono grafitizado y luego con Sephadex LH-20. $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{Asn}$ se digirió para obtener el producto final con α -1,2-manosidasa de *Bacteroides thetaiotaomicron* (NZYtech). La purificación final se hizo mediante cromatografía de carbono grafitizado empleando un gradiente desde agua hasta un 50% de metanol.

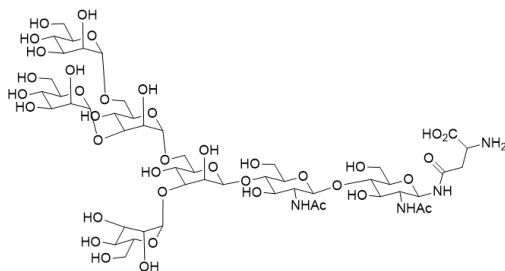


Figura 23. Estructura química de M5N2-Asn.

3.2.5. ARRAY DE GLICANOS

El cribado de FUT8 en un microarray de glicanos se había llevado a cabo previamente con algunas modificaciones (Serna *et al.*, 2011). El microarray de glicanos se realizó incubando los glicanos con una solución de FUT8 a dos concentraciones distintas (650 nM y 3,25 μM), GDP-fuc (0,5 mM) y MnCl_2 (10 mM) en 25 mM Tris, 150 mM NaCl pH 7,5 a temperatura ambiente *over night*. Se eliminó el sobrenadante y se lavó con PBS y agua. Para comprobar la adición de fucosa por FUT8 se incubó con lectina de *Aleuria aurantia* (Vector laboratories) unida a Alexa Fluor™ 555 NHS succinimidil ester (Thermo Fisher) a temperatura ambiente *over night*. Se lavó el microarray con tampón de unión (25 mM Tris, 150 mM NaCl pH 7,5 conteniendo un 0,01% de Tween-20) y agua previamente a la medida de fluorescencia en un sistema de escáner de microarray Agilent G265BA (Agilent Technologies). La cuantificación se hizo con ProScanArray® (Perkin

Elmer) y con el software de Microsoft Excel. La representación de los datos se llevó a cabo con GraphPad Prism 6.

Esto se ha llevado a cabo en colaboración con la Dr. Sonia Serna, el Dr. Raik Artschwager y el Dr. Niels C. Reichardt, del CIC biomaGUNE, San Sebastián.

3.2.6. TÉCNICA DE ANÁLISIS ESTRUCTURAL: CRISTALIZACIÓN DE PROTEÍNAS

La cristalización de proteínas, es un proceso mediante el cual las moléculas de proteína se ordenan de forma repetitiva y periódica en las tres dimensiones del espacio, bajo unas condiciones determinadas, dando lugar a lo que conocemos como un cristal. Para que esto ocurra, la muestra tiene que ser lo más homogénea posible. La difracción por rayos X de dicho cristal nos dará la estructura tridimensional de dicha proteína tras el procesamiento matemático de los datos obtenidos. Un esquema simplificado se muestra en la **Figura 24**.

A pesar de las dificultades que presenta, hoy día sigue siendo la técnica más empleada para la obtención de estructuras de proteínas (Müller, 2017), y es responsable de más del 86% de las estructuras depositadas en el Protein Data Bank (PDB).

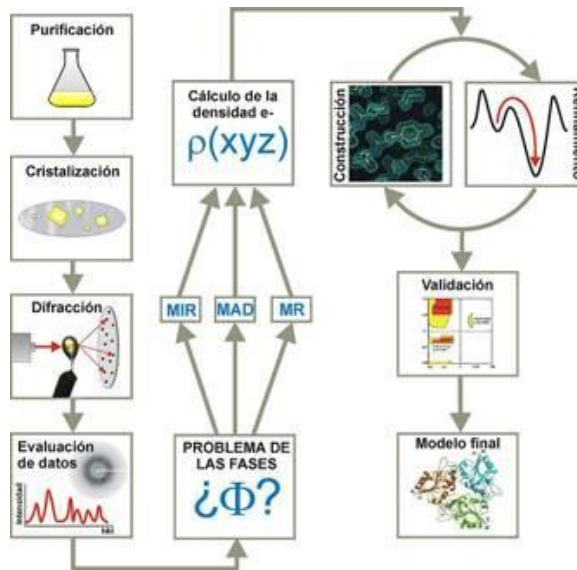


Figura 24. Esquema del proceso de obtención de la estructura de una proteína por cristalización. El primer paso es purificar la proteína de forma que la muestra sea lo más homogénea posible y así obtener cristales de la misma en una condición determinada. Tras difractar por rayos X, los datos obtenidos, se procesan y se solventa el problema de las fases (en nuestro caso mediante remplazamiento molecular partiendo de la estructura de proteínas con una identidad mayor al 20%), obteniendo así los datos de las coordenadas de cada átomo de la estructura que da lugar al mapa de densidad electrónica. A partir de dicho mapa, refinando los datos experimentales obtenemos la representación final de la estructura de la proteína (Párraga *et al.*, 2010).

3.2.6.1. COCRISTALIZACIÓN DE FUT8

La cocrystalización consiste en la obtención de cristales de proteína en conjunto con sus ligandos para obtener la estructura de un complejo. A la hora de encontrar las condiciones de cristalización para cada proteína o complejo se pueden emplear distintas técnicas. En esta tesis los cristales se han obtenido mediante la técnica de difusión de vapor en gota sentada (Davies y Segal, 1971).

Los experimentos se realizaron en placas de 96 pocillos, en cuales se añaden 60 μL de las condiciones que encontramos en los cribados comerciales. Los cribados que hemos empleado han sido JCSG HTS +, Morpheus I, Morpheus II y PROPLEX (Molecular Dimensions).

En cada condición, se mezclan 0,5 μL de disolución de proteína recién purificada (FUT8 a 4,5 mg/ml, 5 mM GDP y 5 mM de G0 en 25mM Tris pH 7,5) con 0,5 μL de disolución del reservorio. Una vez montada la placa, se almacena a 18 °C aislada de ruidos y vibraciones hasta que salen los cristales.

Finalmente, de las condiciones donde se obtuvieron cristales, aquellos que difractaron mejor salieron en la condición que contiene 0,1 M de ácidos carboxílicos, 0,1 M de tampón 3 pH 8,5 y un 30% de mezcla precipitante 1 (Molecular Dimensions).

3.2.6.2. TOMA DE DATOS: DIFRACCIÓN DE RAYOS X

Una vez que los cristales se han formado, se congelan en nitrógeno líquido. Para ello hemos empleado una solución crioprotectora con la finalidad de mantener las estructuras intactas evitando formación de hielo interno que pueda romper dichos cristales. En este caso, la disolución crioprotectora empleada consiste en la disolución madre donde han salido los cristales conteniendo un 30% de glicerol.

La difracción y la recogida de los datos se llevó a cabo en la línea I24 del sincrotrón Diamond Light Source (Hardwell Science and Innovation Campus, Oxfordshire, UK) a una longitud de onda de 0,97 Å y una temperatura de 100 K.

3.2.6.3. RESOLUCIÓN DE LA ESTRUCTURA CRISTALOGRÁFICA

El procesamiento de los datos se realizó con el programa XDS (Kabsch, 2010) y el software CCP4 (Winn *et al.*, 2011). La estructura cristalina se resolvió por remplazamiento molecular con Phaser (Winn *et al.*, 2011) empleando la entrada del PDB 2DE0 como modelo.

La asignación de los aminoácidos correspondientes al mapa de densidad electrónica se realizó mediante ciclos de *building* en Coot (Emsley y Cowtan, 2004), seguidos de refinamiento en REFMAC5 (Murshudov *et al.*, 2011).

La validación del modelo se hizo con PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993). Las coordenadas y factores estructurales se depositaron finalmente en el World Wide Protein Data Bank (wwPDB).

3.2.7. TÉCNICAS BIOFÍSICAS PARA EL ANÁLISIS Y CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS

3.2.7.1. DETERMINACIÓN DE LA CONSTANTE DE UNIÓN POR ITC

Para la caracterización de las interacciones entre FUT8 y GDP, G0, G0-péptido, M3N2, M3N2-péptido y M5N2-Asn se empleó el mismo equipo mencionado anteriormente. Todos los experimentos se llevaron a cabo a 25 °C en tampón 25 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl.

En primer lugar, se realizaron las medidas de unión entre FUT8 y los ligandos GDP y G0, para luego realizar las medidas frente a G0, G0-péptido, M3N2, M3N2-péptido y M5N2-Asn en presencia de GDP saturante (1 mM). La concentración de FUT8 se estableció en 70 μ M y la concentración de los ligandos variable entre 0,4 y 1 mM.

Todos los experimentos se hicieron en duplicados, y la integración, corrección y análisis de los datos se hicieron con el software Origin 7 (Microcal) empleando el modelo de unión de un solo sitio.

3.2.7.2. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

En el caso de FUT8, el kit empleado es el de GDP-Glo, y al igual que ocurrió en el apartado 3.1.4.2.1., el primer paso fue establecer los parámetros de FUT8 frente a GDP-Fucosa para establecer las concentraciones que se emplearían en los ensayos posteriores.

La concentración de FUT8 en este ensayo fue 100 nM en 25 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 500 μ M de G0 y concentraciones variables de GDP-Fucosa desde 5 a 500 μ M.

Para el resto de cinéticas, las condiciones fueron semejantes: 100 nM en 25 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 200 μ M de GDP-Fucosa y concentraciones variables de G0, G0-péptido, M3N2, M3N2-péptido y M5N2-Asn desde 5 μ M a 1 mM. Las reacciones se incubaron 30 minutos a 37 °C, parándose la reacción al añadir el reactivo de detección. Posteriormente, las placas se incubaron en oscuridad durante 1 hora a temperatura ambiente y luego se midió la luminiscencia. Los valores obtenidos se corrigieron para eliminar la hidrólisis del GDP-Fucosa y se ajustaron al modelo no lineal de Michaelis-Menten usando el programa GraphPad Prism 6 del cuál obtuvimos los valores de K_m , k_{cat} , V_{max} , y K_i , así como la desviación estándar.

3.2.7.3. RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

La resonancia magnética nuclear es un fenómeno en el que se produce la excitación de los spines nucleares al aplicar un campo magnético externo. En el caso de las proteínas, el fenómeno de RMN se observa mediante la cuantificación de las transiciones producidas entre niveles próximos de energía (Ferentz y Wagner, 2000). Los únicos núcleos con spin en las proteínas son los átomos de hidrógeno. En estas condiciones se pueden obtener espectros monodimensionales ^1H de los que se puede obtener información sobre el plegamiento de una proteína y que presentan unas señales a su vez caracterizadas por su valor de intensidad (I) y su desplazamiento químico (δ). El valor de δ depende de las propiedades de cada núcleo atómico y del entorno de éste, por lo que permite detectar las variaciones causadas por la presencia o ausencia de interacción con un determinado ligando. Esto mismo se puede aplicar a muestras enriquecidas con ^{13}C y ^{15}N para obtener información complementaria de la estructura.

Hay muchos tipos de RMN de proteínas según las interacciones y los efectos que estemos midiendo, pero el más importante que se ha usado para esta tesis es la resonancia magnética nuclear de diferencia de transferencia de saturación (STD-NMR).

- STD-NMR

Esta variante de RMN permite detectar y caracterizar las interacciones entre el complejo proteína-ligando en disolución. En este caso, las señales que observamos son las del ligando, ya que presenta las propiedades espectroscópicas necesarias para estos estudios a alta resolución (Angulo y Nieto, 2011). Un esquema del funcionamiento de esta técnica se presenta en la **Figura 25**.

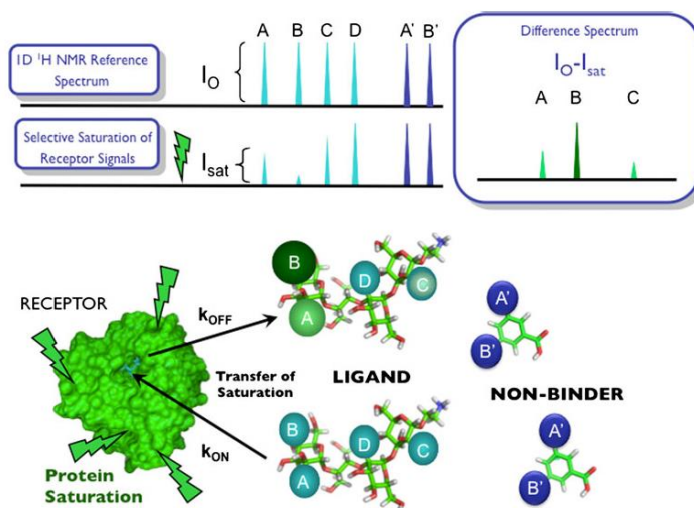


Figura 25. Ilustración de un experimento ^1D STD NMR. En la parte superior vemos los espectros monodimensionales ^1H de referencia en el sistema en equilibrio y el espectro NOESY donde se ha saturado selectivamente la señal de los protones del ligando que interactúan con la superficie de la proteína. El último espectro es la resta de los dos primeros, propiamente el espectro diferencial, y sólo muestra las señales correspondientes a los protones que han interactuado directamente, con mayor o menor intensidad según la proximidad con la proteína.

Estos experimentos se han llevado a cabo en colaboración con el Dr. Jesús Angluo, el Dr. Ignacio Delso y Thomas Hicks, de la Universidad de East Anglia; para caracterizar las interacciones entre FUT8 y los correspondientes glicanos. El protocolo seguido en los experimentos se describe a continuación.

3.2.7.3.1. ASIGNACIÓN DE LOS LIGANDOS Y MÉTODO RMN-STD

Los experimentos se llevaron a cabo a 283 K usando un espectrómetro AVANCE 800 MHz con una sonda de triple resonancia TXI de 5 mm con gradientes de campo de pulso en el eje z (5 mm PATXI 1H-13C/15N/D Z-GRD). Se intercambiaron los protones lábiles de los

ligandos con deuterio disolviéndolos y luego secándolos por congelación durante 3 ciclos, para luego disolverlos finalmente a una concentración de 5 mM en agua deuterada. Los experimentos 2D-NOESY, se midieron para M3N2 y M3N2-péptido (**Figura 26**) usando un programa de pulsos de Bruker noesygpqh con tiempos de mezcla (d8) de 100, 150, 200, 250, 300, 400, 600, 800, 1000 y 1500 ms. El tiempo de relajación se estableció en 1 s. Se aplicó la transformada de Fourier a las dos dimensiones y las trazas horizontales correspondientes se extrajeron para H1B (4,47 ppm) y H5A (3,42 ppm) en el M3N2-péptido.

La fase y la línea base se corrigieron para cada traza, integrando luego las regiones correspondientes. Se representaron los valores de las integrales frente al tiempo de mezcla y la parte lineal inicial de cada curva se ajustó a una línea para calcular el solapamiento correspondiente.

La media de las distancias H1A-H5A y H1B-H5B se calculó de la MD de 1 μ s y se usó para los cálculos de acuerdo a la ecuación de la **Figura 23C**. Las señales $^1\text{H-NMR}$ y $^{13}\text{C-NMR}$ se asignaron usando los experimentos $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ HSQC (hsqcedetgp), $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ HSQC-TOCSY (hsqcgpm1ph), TOCSY (mlevph), COSY (cosygmpfqf), HMBC (hmbcgp1pndqf) y NOESY (noesygpqh).

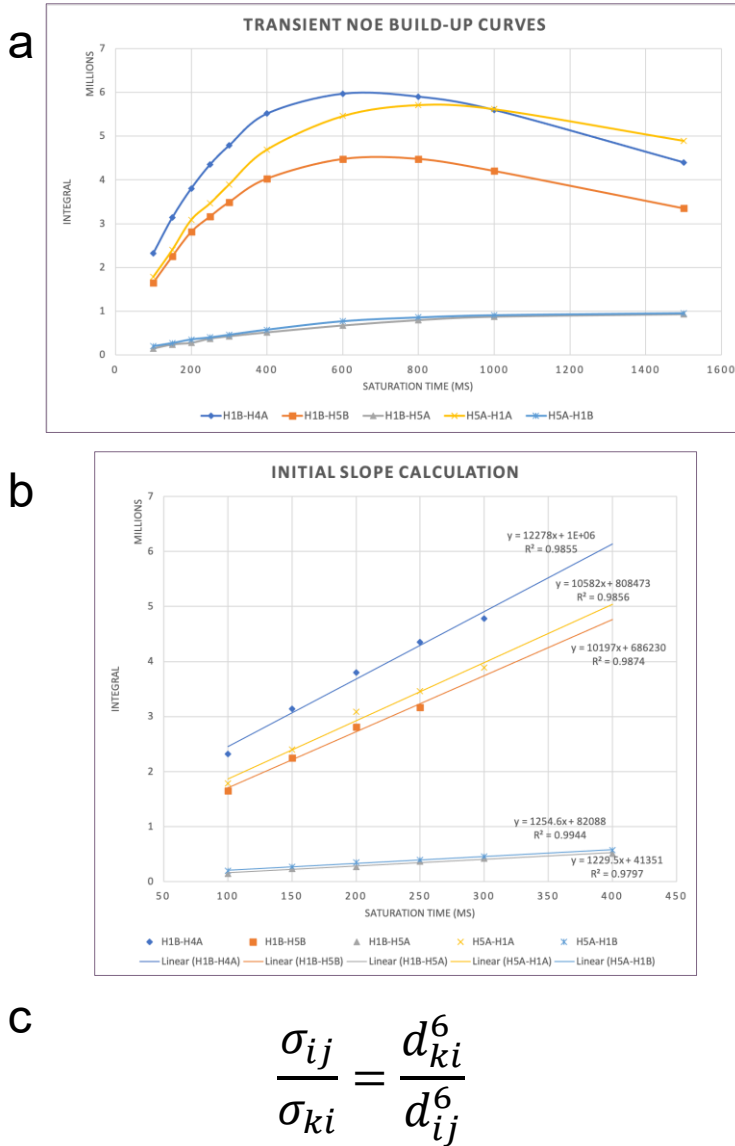


Figura 26. Medida NOESY para el M3N2-péptido. A. Curvas construidas del NOE para la selección de los pares de protones. B. Cálculo del solapamiento inicial (σ). C. Ecuación para el cálculo de la distancia (d).

3.2.7.3.2. MEDIDAS DE STD-NMR

Los espectros STD-NMR se midieron para los glicanos en presencia de 20 μM de FUT8, ambos con y sin presencia de GDP saturante (1

mM). Estos experimentos se llevaron a cabo en tampón 50 mM Tris deuterado pH 7,4 y 150 mM de NaCl en D₂O. Un tren de pulsos Gaussianos de 50 ms se usó a 0,2 mW aplicados en el canal F2 a -0,5 ppm (en resonancia) y 40 ppm (sin resonancia) para obtener el espectro STD. Para eliminar la magnetización XY que no queríamos del escaneo anterior una secuencia de *spoil* de 2 pulsos de ajuste de 2,5 y 5 ms con un gradiente z del 40% se aplicó durante 3 ms al comienzo del experimento. Para suprimir las señales de la proteína, se usó un bloqueador de spin de 1,55 W y 40 ms. Para conseguir las curvas de cada sistema, los experimentos se repitieron en tiempos de saturación (D20) de 0,5, 1, 1.5, 2, 3, 4 y 5 s con retrasos de reciclo D1 establecidos a 2, 2,5, 3, 3,5, 4,5, 5,5 y 6,5 s respectivamente.

3.2.7.4. ANÁLISIS DE LOS N-GLICANOS DE IgG POR CE-LIF

La separación mediante electroforesis tiene lugar debido a la diferente movilidad que presentan las moléculas en disolución cuando se aplica un campo eléctrico. En la electroforesis capilar (CE), la separación se lleva a cabo en un capilar de diámetro muy pequeño y por tanto presenta muchas ventajas como son la alta resolución que presenta, un corto tiempo de separación, bajo volumen de muestra requerido, etc.

En este caso, el sistema de detección consiste en la inducción de fluorescencia al aplicar un láser sobre la muestra, aumentando así la sensibilidad del análisis. Todo esto es lo que nos llevó a emplear esta técnica para separar y analizar los N-glicanos de IgG. Estos experimentos han sido realizados en colaboración con el Dr. Yang Zhang, del departamento de medicina molecular y celular del *Centre for Glycomics*, de la Universidad de Copenhague, Dinamarca; y los protocolos se detallan con más detalle a continuación.

3.2.7.4.1. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA PARA EL ANÁLISIS ESPECÍFICO DE LOS SITIOS PARA LOS N-GLICOPÉPTIDOS

Para preparar las muestras, se disolvieron 25 µg de las GLA, GBA y AGA purificadas en 50 mM de bicarbonato amónico pH 7,4, luego se añadió 10 mM de DTT para reducir la muestra a 60 °C durante 45 minutos en un agitador y posteriormente se produjo la alquilación con 20 mM de iodoacetamida a 25 °C durante 30 minutos en oscuridad. La muestra se sometió a una digestión proteolítica con quimotripsina (en proporción 1:40 enzima:sustrato). La reacción fue quencheada con 1 µL de TFA, tras esto, la muestra digerida se desalinizó con una columna StageTip que contenía 3 capas de C18 y dos de membrana C8 (3M Empore disks, Sigma Aldrich).

La elución se llevó a cabo entonces en dos pasos de 50 µL con 50% de metanol en 0,1% de ácido fórmico. Se hicieron alícuotas, la primera de ellas se colocó en un inserto de vidrio (Sigma Aldrich), y se secó por completo en un SpeedVac (Eppendorf) para luego redisolverla en 50 µL de 0,1% ácido fórmico y se cargó para su análisis mediante nLC-MS. La segunda alícuota se secó por completo en SpeedVac en un eppendorf y se redisolvió en 50µL de 50 mM bicarbonato sódico pH 7,4, se añadió 1 unidad de PNGasa F por muestra a 37 °C y se dejó 12 horas en agitación. Tras esto, se realizó una desalinización y se secó mediante el mismo método mencionado previamente, para tras esto, analizar la muestra por nLC-MS/MS.

3.2.7.4.2. ANÁLISIS DE LOS N-GLICANOS DE IgG1

El análisis se llevó a cabo mediante electroforesis capilar, siguiendo el siguiente protocolo. Se mezclaron 15 µL de beads de Protein G Sepharose (GE Healthcare) con 200 µL de medio en una placa de 96 pocillos. Tras lavar con 50 mM de bicarbonato amónico dos veces, se

añadió 1 unidad de PNGasaF (Roche) a la placa, incubando 1 hora a 50 °C. La mezcla se ajustó a 87,5% de ACN y se mezcló con 15 µL de *beads* magnéticas recubiertas de carbonilo pre-equilibradas (Thermo-Scientific). Las *beads* se lavaron dos veces con 87,5% de ACN y se mezclaron con 6 µL de 40 mM APTS en 20% de ácido acético y 2 µL de 1 M NaBH₃CN en tetrahidrofurano e incubamos 2 horas a 37 °C. Tras el marcaje, el exceso de APTS se eliminó lavando dos veces con 87,5% de ACN y los N-glicanos marcados se liberaron con 40 µL de agua mili-Q. Para el análisis por electroforesis capilar, 2 µL de los glicanos marcados se mezclaron con 8 µL de HiDi Formamide y 0,05µL del estándar 500GS-LAS. Se inyectaron en el analizador equipado con 24 capilares y detección de láser inducido (LIF, Thermo Fisher). Los datos se analizaron con el software de GeneMapper.

3.2.7.5. TÉCNICAS DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Estos experimentos se han realizado en colaboración con el Dr. Sergey Y. Vakhrushev, del departamento de medicina molecular y celular del *Centre for Glycomics*, de la Universidad de Copenhague, Dinamarca.

3.2.7.5.1. ANÁLISIS DE LA ESPECIFICIDAD DE SUSTRATO DE FUT8 MEDIANTE MALDI-TOF

Las soluciones de las diferentes estructuras de N-glicanos (1 nmol) se incubaron con enzima FUT8 (18 µM) y GDP-fucosa (2 nmol) en Tris 25 mM pH 7,5, NaCl 150 mM (volumen total de 10 µL) durante 18 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se analizó mediante espectrometría de masas MALDI-TOF empleando una solución de ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB, 5 mg / ml en CH₃CN: TFA al 0,1%, 30:70 que contiene NaCl al 0,05%) como matriz. Los espectros MALDI-

TOF se registraron en un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo Ultraflex extreme III equipado con un láser Nd: YAG pulsado (355 nm) y controlado por el software FlexControl 3.3 (Bruker Daltonics). El rango m/z se seleccionó de acuerdo con la masa de la muestra y los espectros adquiridos se procesaron con el software FlexAnalysis 3.3 (Bruker Daltonics).

3.2.7.5.2. ANÁLISIS MEDIANTE NLC-MS/MS PARA LOS GLICANOS Y LOS GLICOPÉPTIDOS

Se utilizó un sistema EASY-nLC 1000 LC (Thermo Fisher Scientific) interconectado a través de una fuente de iones nanoSpray Flex a un Orbitrap Fusion Lumos MS (Thermo Fisher Scientific) para el análisis MS y MS/MS. Se aplicó en el nLC una configuración de columna analítica única con emisores PicoFrit empacados a medida con la fase Repronil-Pure-AQ C18 (tamaño de partícula de 1,9 μm , longitud de columna de 19-21 cm). Se inyectaron 2 μl de cada muestra en la columna, seguido de elución con un gradiente de Disolvente B del 2 al 25% a 200 nL/min durante 45 min (Disolvente A: 100% H₂O + 0,1% (v / v) ácido fórmico; disolvente B: acetonitrilo al 100% + ácido fórmico al 0,1% (v / v)). Con el ajuste de resolución nominal de 120.000, se obtuvieron los precursores de la exploración. Luego, se adquirió HCD-MS² de los cinco precursores con carga múltiple más abundantes en el espectro de MS¹ con el ajuste de resolución nominal de 60000. Para desencadenar eventos de fragmentación dependientes de datos, el umbral mínimo de señal de MS fue 50000. El análisis de MS/MS se realizó configurando un panel de propiedades de exploración de MSⁿ dirigido (tMSⁿ). Se incluyeron treinta entradas específicas en la tabla de lista de masas.

3.2.7.5.3. ANÁLISIS DE DATOS

El análisis de la composición de los glicopéptidos se obtuvo a partir de características m/z utilizando el software SysBioWare. Para el reconocimiento de las características m/z a partir de los MS completos, se utilizó el Minora Feature Detector Node of the Proteome discoverer 2.3. (ThermoFisher Scientific). Se importó una lista de iones precursores (m/z , carga y tiempo de retención) como datos ASCII en SysBioWare y se realizó una asignación de composición dentro de una tolerancia de masa de 5 ppm. Los principales bloques de construcción utilizados para el análisis de composición fueron: NeuAc, Hex, HexNAc, dHex y fosfato.

Para el análisis de composición de los N-glicopéptidos, los péptidos más prominentes correspondientes a cada sitio potencial de glicosilación se determinaron experimentalmente comparando el rendimiento de péptidos desamidados antes y después del tratamiento con PNGasa F y también se agregaron como un bloque de construcción para la asignación de composición.

La secuencia de péptidos se determinó mediante HCD MS/MS y el nivel de abundancia se calculó a partir de PD 2.3. Se generó una lista de glicanos y glicopéptidos potenciales para cada sitio de glicosilación y se seleccionaron los 10-15 primeros de los candidatos más abundantes para el análisis de MS/MS específico para confirmar la estructura propuesta. Cada espectro de MS/MS objetivo se sometió a interpretación manual. Dado que la misma composición de N-glicanos puede representar estructuras isobáricas, las estructuras de glicanos enumeradas se hicieron para coincidir con los datos de la literatura, las funciones enzimáticas predichas de los genes diana y cualquier información útil de los fragmentos MS/MS.

3.2.8. TÉCNICAS COMPUTACIONALES

Ver apartado 3.1.6. Estos experimentos se han realizado en colaboración con el Dr. Francisco Corzana, del departamento de Química de la Universidad de la Rioja.

3.2.8.1. DINÁMICAS MOLECULARES DE FUT8

3.2.8.1.1. MINIMIZACIÓN DE LAS MECÁNICAS MOLECULARES

La molécula de GDP-Fucosa se obtuvo de CePoFUT1 en complejo con GDP-fucosa (código del PDB: 3ZY6) y luego se realizó la superposición en nuestra estructura cristalina. Los cálculos de los complejos se llevaron a cabo usando el programa AMBER 18, que se implementó con ff14SB, GLYCAM06 y los campos de fuerza de GAFF. El complejo se sumergió en una caja de agua con un tampón de 10 Å de moléculas de agua neutralizadas mediante la adición explícita de Na⁺. Se llevó a cabo entonces una optimización mediante la aproximación a una geometría de dos etapas con un total de 5000 pasos de minimización usando los parámetros por defecto de AMBER18. En la primera etapa solo se minimizaron las posiciones de las moléculas de solvente y los iones, y ya en la segunda etapa se eliminó la restricción de la minimización de todos los átomos del sistema.

CAPÍTULO 4: RESULTADOS

4. RESULTADOS

A continuación, se exponen los resultados obtenidos durante la realización de la tesis doctoral. En un primer apartado se expondrán los resultados que se han obtenido a partir del estudio de la familia de los efectores NleB/SseK y en el segundo, los resultados obtenidos del trabajo sobre FUT8.

4.1. EFECTORES DE LA FAMILIA NleB/SseK

Tal y como se menciona en los objetivos, nuestra primera intención fue entender el mecanismo de esta familia de efectores, así como estudiar y profundizar en las preferencias de sustrato de los miembros de la familia, ya que presentan una alta homología en la secuencia que no se refleja en sus preferencias de sustrato.

Es por esto, que nos centramos en primer lugar en el sustrato preferido por la NleB1, FADD^{DD}.

4.1.1. ANÁLISIS DE LAS INTERACCIONES ENTRE FADD^{DD} Y NleB1^{EPEC}

4.1.1.1. ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y BIOINFORMÁTICO DE LOS EFECTORES NleB/SseK

Para determinar la base molecular por la cual SseK1^{wt} no es capaz de glicosilar FADD^{DD}, en primer lugar, se realizó el análisis de un alineamiento múltiple de *Citrobacter rodentium* NleB, NleB1^{EPEC/EHEC} y los efectores de SseK fijándonos en los residuos de NleB1^{EPEC} que participan en el reconocimiento de FADD^{DD} obtenidos de la estructura

publicada del complejo NleB1^{EPEC}-UDP-Mn²⁺-FADD^{DD} (entrada del PDB 6ACI) que se muestra en la **Figura 27**.

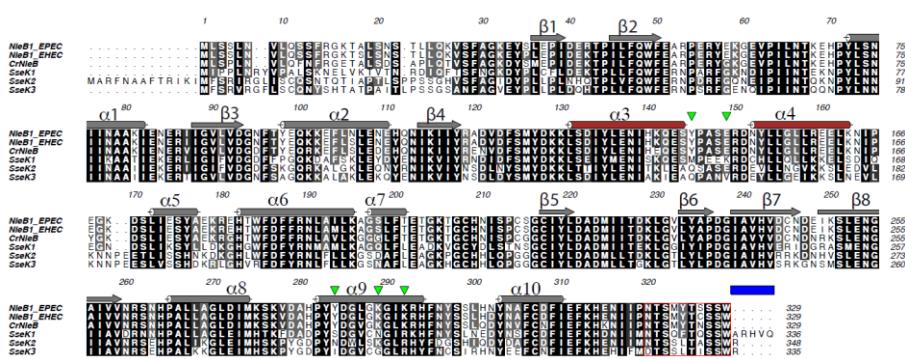


Figura 27. Alineamiento múltiple de las secuencias de C/NleB, NleB1^{EPEC}, NleB1^{EHEC}, SseK1^{wt}, SseK2^{wt} y SseK3^{wt}. El color de los residuos viene representado en función de la conservación de la secuencia, donde los colores negro, gris y blanco representan identidad completa o casi completa, alta similitud y no identidad alguna, respectivamente. En la parte superior de la secuencia de NleB1^{EPEC}, donde vemos en gris el dominio catalítico y marrón el dominio HLH, se muestran los elementos de la estructura secundaria (α -hélices y láminas β) basados en la estructura del complejo NleB1^{EPEC}-UDP-Mn²⁺-FADD^{DD} (código PDB: 6ACI). Los residuos que forman parte del "lid" del dominio C-terminal se indican en un recuadro rojo, mientras que los cinco residuos terminales, solo encontrados en SseK1^{wt}, se marcan con un recuadro azul. Los triángulos invertidos en verde indican los residuos de los efectores NleB/NleB1 que no están conservados o sólo parcialmente, con los efectores SseK y que participan en el reconocimiento de FADD^{DD}. Estos residuos son los que fueron seleccionados para la mutagénesis de sitio dirigido en SseK1^{wt} y SseK2^{wt}.

Catorce residuos de NleB1^{EPEC} son los que establecen diversos tipos de interacción con los residuos de FADD^{DD}, siendo las más prevalentes las interacciones de puente salino, seguidos de enlaces de hidrógeno y las interacciones hidrofóbicas (como podemos ver más detalladamente en la **Figura 28** y en la **Tabla 2**).

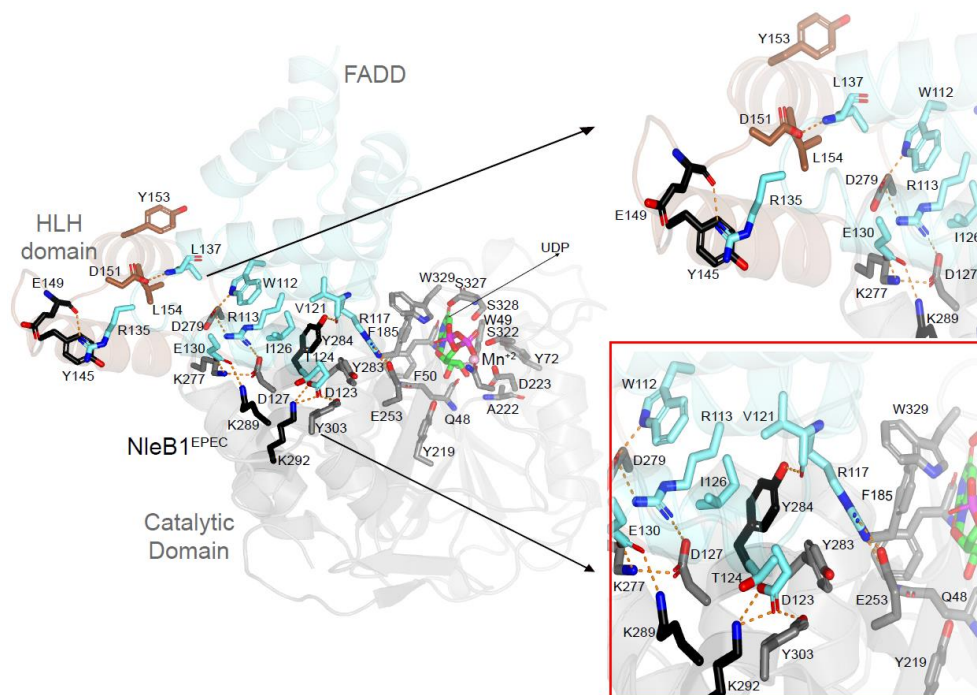


Figura 28. Representación en “cartoon” del complejo NleB1^{EPEC}-UDP-Mn²⁺-FADD^{DD}. Los dominios catalítico y HLH de NleB1^{EPEC} se muestran en gris y marrón, respectivamente. FADD^{DD} se muestra en cian. Los residuos se representan como “sticks” con los átomos de carbono en los colores que se indican a continuación. UDP presenta los átomos de carbono en verde, Mn²⁺ se representa como una esfera rosa, y los puentes de hidrógeno se muestran como líneas punteadas naranjas, pero solamente en los residuos que interactúan en la interfaz del complejo.

Tabla 2. Tabla de interacciones entre los residuos de la interfaz del complejo NleB1^{EPEC}-FADD^{DD}. Los residuos marcados en rojo son los elegidos para la mutagénesis de sitio dirigido en SseK1^{wt} y SseK2^{wt}.

Aminoácido (NleB1 ^{EPEC})	Aminoácido (FADD ^{DD})	Tipo de interacción	Grado de conservación en SseKs
Y145 (cadena lateral)	R135 (cadena lateral)	CH- π	No conservado
E149 (<i>backbone</i>)	R135 (cadena lateral)	Puente de hidrógeno	No conservado con SseK1 ^{wt} y SseK3 ^{wt}
D151 (cadena lateral)	L137 (<i>backbone</i>)	Puente de hidrógeno	Conservado
Y153 (cadena lateral)	L137 (cadena lateral)	CH-CH	Conservado (a nivel de hidrofobicidad)
L154 (cadena lateral)	L137 (cadena lateral)	CH-CH	Conservado
E253 (cadena lateral)	R117 (cadena lateral)	Puente salino	Conservado
K277 (cadena lateral)	E130 (cadena lateral)	Puente salino	Conservado
D279 (cadena lateral) D279 (cadena lateral)	R113 (cadena lateral) W112 (cadena lateral)	Puente salino Puente de hidrógeno	Conservado con SseK1 ^{wt}
Y283 (cadena lateral)	R117 (cadena lateral)	Catión- π	Conservado

Y284 (cadena lateral)	V121 (<i>backbone</i>) I126 (cadena lateral)	Puente de hidrógeno CH- π	No conservado
Y284 (cadena lateral)			
D285 (cadena lateral)	R113 (cadena lateral)	Puente salino	Conservado
K289 (cadena lateral)	E130 (cadena lateral)	Puente salino	No conservado en SseK1 ^{wt} y SseK3 ^{wt}
K292 (cadena lateral)	D123 (cadena lateral)	Puente salino	Parcialmente conservado (Residuo de arginina en todos los efectores SseK)
Y303 (cadena lateral)	D123 (cadena lateral)	Puente de hidrógeno	Conservado

Cinco de estos catorce residuos provienen del dominio HLH (Tyr145, Glu149, Asp151, Tyr153 y Leu154), mientras que el resto (Glu253, Lys277, Asp279, Tyr283, Tyr284, Asp285, Lys289, Lys292 y Tyr303) se localizan en el dominio catalítico (**Figuras 28** y **Tabla 2**).

Algo interesante y que nos llamó la atención es que ningún residuo del “*lid*” del dominio C-terminal interactuaba con los residuos de FADD^{DD}. Además de esto, a excepción del Glu149 que presenta una interacción a través del “*backbone*” con la cadena lateral de la Arg135^{FADD}, el resto de residuos interactúan mediante su cadena lateral. Un número algo más pequeño de residuos de FADD^{DD} se veían envueltos en el reconocimiento de NleB1^{EPEC}. Los nueve residuos se

localizan a lo largo de α_2 , α_3 , α_4 y los *loops* que los conectan (**Figura 29** y **tabla 2**).

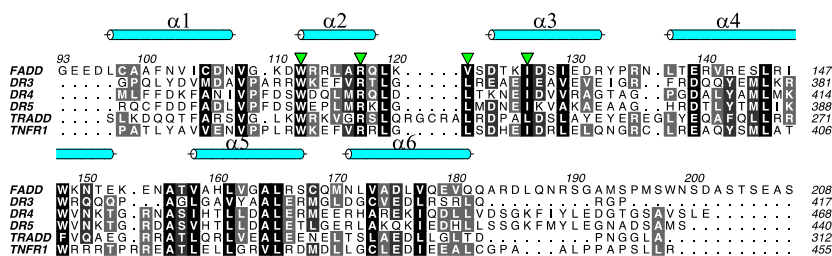


Figura 29. Alineamiento múltiple de las secuencias de proteínas que contienen un dominio de muerte. Para facilitar la lectura, solo se muestran los dominios de muerte en el alineamiento. NleB1^{EPEC} no puede glicosilar el receptor 1 de TRAIL (TRAIL-R1, conocido también como DR4) y el TRAIL-R2 (DR5). Los residuos indicados con triángulos invertidos color verde están altamente conservados entre estos dominios y también participan en la interacción con NleB1^{EPEC}. Las α -hélices de FADD^{DD} se muestran en base al complejo NleB1^{EPEC}-UDP-Mn²⁺-FADD^{DD} en color cian.

Al igual que ocurre con los residuos de NleB1^{EPEC}, los residuos de FADD^{DD} que participan en el reconocimiento de NleB1^{EPEC}, lo hacen a través de sus cadenas laterales. Cuatro de estos residuos (Trp112^{FADD}, Arg117^{FADD}, Val121^{FADD} y Ile126^{FADD}) se conservan completamente entre los distintos dominios de muerte y prácticamente son el epítipo mínimo de reconocimiento de los efectores NleB/SseK sugerido anteriormente (Park *et al.*, 2018; Ding *et al.*, 2019).

El residuo de Arg117^{FADD} es el sitio aceptor de GlcNAc e interacciona mediante un puente salino con la base catalítica propuesta, Glu253 (tal y como vemos en la **Figura 28**) (Ding *et al.*, 2019).

Una comparación exhaustiva del grado de conservación de los catorce residuos que interactúan de NleB1^{EPEC} con residuos alineados de otros ortólogos indicó que solo cinco residuos podrían estar tras la actividad nula de SseK1^{wt} sobre FADD^{DD}. La mayoría de estos residuos

no están conservados o solo parcialmente conservados en la SseK1^{wt}. Tyr145 y Glu149 se encuentran cercanos en la estructura y se localizan en un *loop* conectando $\alpha 3$ con $\alpha 4$ en el dominio HLH (ver en la **Figura 28**). Los otros tres residuos (Tyr284, Lys289 y Lys292) se encuentran en el dominio catalítico y en concreto en $\alpha 9$. Mientras que los dos residuos de lisina se encuentran próximos en la estructura y forman puentes salinos con Asp123^{FADD} y Glu130^{FADD}, Tyr284 está más aislado e interacciona a través de su cadena lateral con el *backbone* de Val121^{FADD} y la cadena lateral de Ile126^{FADD} (**Figura 28** y **Tabla 2**).

Tyr284 también presenta una interacción CH- π con la cadena lateral de Tyr283, el cual controla la interacción entre Arg117^{FADD} y la base catalítica Glu253 (**Figura 28**). Por lo tanto, Tyr284 es un residuo que juega un papel secundario con respecto a la actividad catalítica, en la que Glu253 juega uno de los papeles clave.

En base al análisis previo en función de los alineamientos y la estructura del complejo, seleccionamos cinco residuos de la NleB1 para realizar mutagénesis de sitio dirigido en las posiciones correspondientes de SseK1^{wt} y SseK2^{wt}. Para simplificar el número de mutaciones en SseK1^{wt} y minimizar las combinaciones potenciales entre ellas, establecimos tres grupos de residuos: los dos pares Tyr145-Glu149^{NleB1}, Lys298-Lys292^{NleB1}, en base a su proximidad en la estructura, y Tyr284^{NleB1} como residuo único e independiente.

4.1.1.2. ANÁLISIS CINÉTICO DE LOS EFECTORES NleB/SseK

Para comenzar el estudio, en primer lugar, se determinaron los parámetros cinéticos de NleB1^{EHEC} frente a UDP-GlcNAc y FADD^{DD} (**Figura 30**).

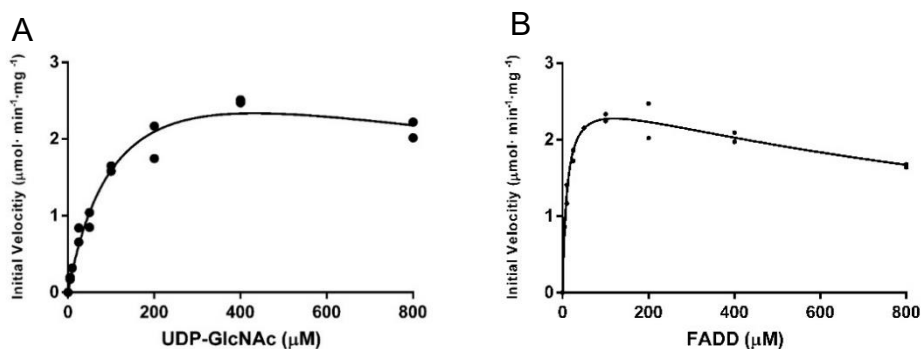


Figura 30. A. Cinética de NleB1^{EHEC} frente a UDP-GlcNAc con una concentración saturante de FADD^{DD}. B. Cinética NleB1^{EHEC} frente a FADD^{DD} con una concentración saturante de UDP-GlcNAc.

NleB1^{EHEC} presenta un perfil claro de inhibición por sustrato en presencia de concentraciones variables de FADD^{DD} ($K_i = 793 \pm 160 \mu\text{M}$) (**Tabla 3**) que no está presente en el resto de mutantes de SseK1^{wt}/SseK2^{wt}. Este comportamiento puede ser atribuido a una conformación no productiva de FADD^{DD} frente a NleB1^{EHEC} debido a las altas concentraciones de este sustrato. Por el contrario, la inhibición por sustrato en presencia de concentraciones variables de UDP-GlcNAc apenas está presente (**Figura 30A**). Las K_m s para UDP-GlcNAc y FADD^{DD} obtenidas son $125 \pm 33 \mu\text{M}$ y $13 \pm 2,5 \mu\text{M}$ respectivamente, y k_{cat} tiene un valor $\sim 100 \text{ min}^{-1}$ (**Tabla 3**).

Como se esperaba, SseK1^{wt} es inactiva frente a FADD^{DD} y SseK2^{wt} es muy lenta (**Figura 31** y **32**). En concreto la K_m , k_{cat} y la eficiencia catalítica son 95-, 6,7- y 630- veces peor que los valores obtenidos para

NleB1^{EHEC} (**Figura 33**). Es importante tener en cuenta que los valores de SseK2^{wt} son estimados debido a la mala unión a FADD^{DD}.

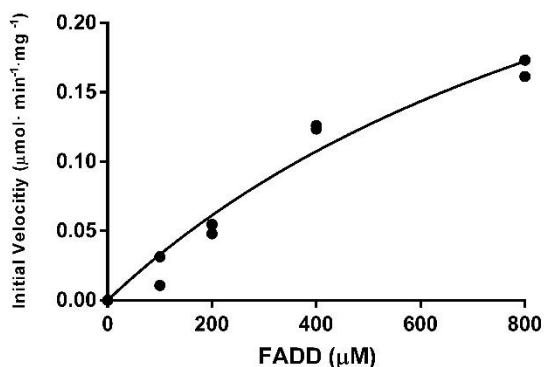


Figura 31. Cinética de SseK2^{wt} frente a FADD^{DD} con una concentración saturante de UDP-GlcNAc.

Persiguiendo el objetivo de activar SseK1^{wt} frente a FADD^{DD}, procedimos entonces a la caracterización cinética de los mutantes dobles M147Y-K151E^{SseK1}, N291K-R294K^{SseK1}, y el mutante simple S286Y^{SseK1}. Aunque la velocidad inicial de los dobles mutantes era muy lenta (**Figura 32B**) (~46 veces peor que las encontradas para la NleB1^{EHEC} en presencia de 800 μM de FADD^{DD}), la k_{cat} para el mutante simple alcanza los valores de la NleB1^{EHEC} (siendo solo 1,38 veces peor) (**Figura 32A y Figura 33**), lo cual implica que una simple mutación en la SseK1 provoca que la k_{cat} sea casi la misma que la k_{cat} óptima que obtenemos para NleB1^{EHEC}. Por el contrario, la K_m y la eficiencia catalítica son ligeramente peor que para la NleB1^{EHEC} (4,4- y 6,7- veces peor).

Para conseguir un mutante de SseK1 con parámetros cinéticos similares a los de NleB1^{EHEC}, hicimos entonces combinaciones de los dobles mutantes, para generar un mutante cuádruple (M147Y-K151E-N291K-R294K^{SseK1}). Posteriormente añadimos también la mutación S286Y^{SseK1} para generar un mutante quíntuple (M147Y-K151E-N291K-

R294K-S286Y^{SseK1}) y a partir de este último eliminamos los últimos cinco residuos del dominio C-terminal, también llamado quintuple-del (M147Y-K151E-N291K-R294K-S286Y-ARHVQdel^{SseK1}). Como se mencionó anteriormente, estos cinco residuos no estaban conservados con el resto de efectores (**Figura 27**).

Las k_{cat} , K_m y eficiencia catalíticas para el cuádruple mutante fueron 4,3-/2,7-/6,1-/1,4- y 27-/4- veces peor que aquellas correspondientes para NleB1^{EHEC} y S286Y^{SseK1}, respectivamente (**Figura 33**). Esto demuestra que los parámetros cinéticos para el cuádruple mutante están más cercanos a los valores encontrados para S86Y^{SseK1} que a los de NleB1^{EHEC} (**Figura 32A**).

Los parámetros cinéticos del quintuple y quintuple-del, principalmente k_{cat} y k_{cat}/K_m , fueron muy similares entre sí y muy cercanos a los de S286Y^{SseK1}. Sin embargo, diferían ligeramente más en las K_m s, siendo las K_m s de los mutantes quintuple/quintuple-del 2 veces más bajas que las de S286Y. La reducción de K_m para los mutantes quintuple/quintuple-del mejoró sus eficiencias catalíticas, aproximando sus valores a los de NleB1^{EHEC} (**Tabla 3**). En general, la eliminación de los 5 aminoácidos C-terminales en SseK1^{wt} y la adición de 5 mutaciones condujeron a una forma de SseK1 con los parámetros cinéticos más cercanos a los de NleB1^{EHEC}, principalmente debido a la K_m más baja hacia FADD^{DD}.

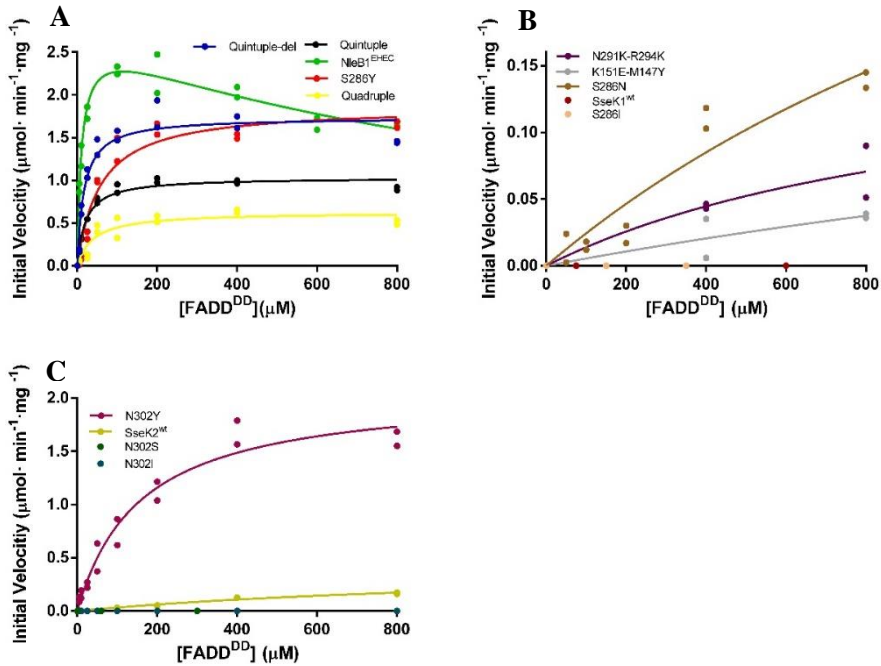


Figura 32. Cinéticas de NleB1^{EHEC}/SseK1^{wt}/SseK2^{wt} y sus mutantes frente a FADD^{DD}. (A) Curvas de Michaelis-Menten donde se alcanza la saturación de NleB1^{EHEC} y los mutantes, cuádruple^{SseK1}, quíntuple^{SseK1}, quíntuple-del^{SseK1} y S286Y^{SseK1}. (B) Curvas de Michaelis-Menten donde no se alcanza la saturación y donde se observa una baja actividad en N291K-R294K^{SseK1}, K151E-M147Y^{SseK1} y S286N^{SseK1}, y no actividad de SseK1^{wt} y S286I^{SseK1}. (C) Curvas de Michaelis-Menten para SseK2^{wt} y sus mutantes. Solo se observa saturación en la N302Y mientras que los mutantes N302S/I son inactivos y la SseK2^{wt} presenta una actividad relativamente baja con respecto a N302Y.

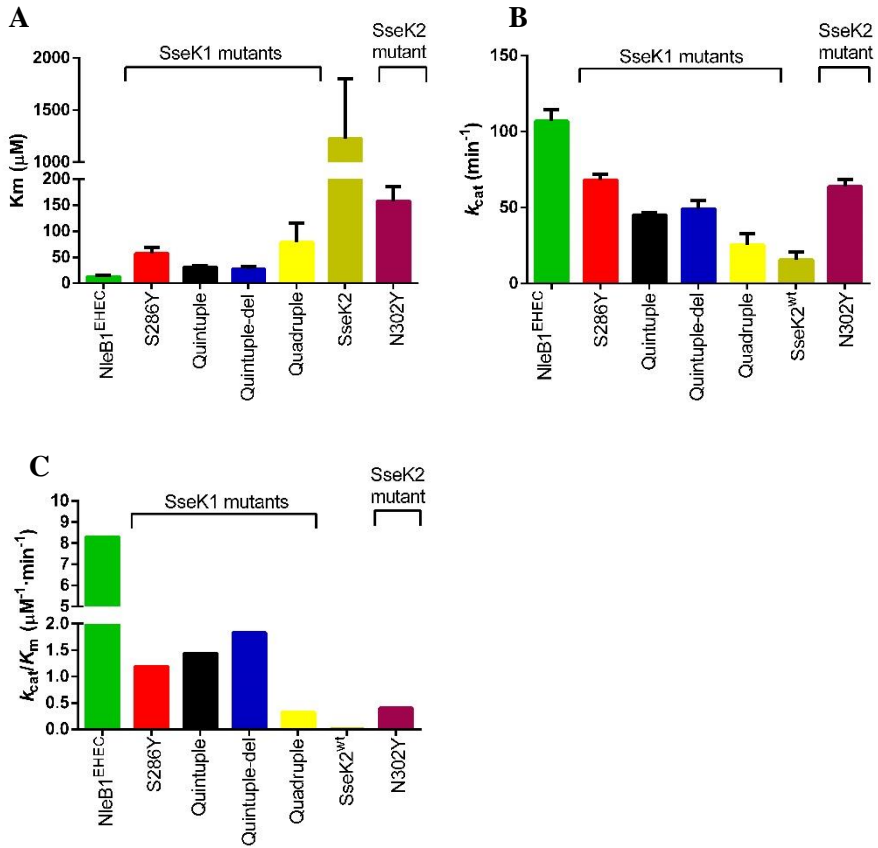


Figura 33. Gráficas de comparación de los valores de K_m , k_{cat} y k_{cat}/K_m entre las diferentes enzimas estudiadas.

Tabla 3. Parámetros cinéticos frente a FADD^{DD}. La primera fila son los parámetros obtenidos de la cinética de NleB1^{EHEC} frente a UDP-GlcNAc (resaltado en color verde). NleB1^{EHEC} fue la única enzima que mostró inhibición por sustrato en presencia de distintas concentraciones de FADD^{DD}.

	K_m (μM)	R^2	V_{max} ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{min}^{-1}\cdot\mu\text{M}^{-1}$)	K_i (μM)
NleB1^{EHEC} (UDP-GlcNAc)	125 ± 33	0,98	2,5 ± 0,22	94 ± 8,1	0,75	-
NleB1 ^{EHEC}	13 ± 2,5	0,94	2,92 ± 0,20	107 ± 7,6	8,2	793 ± 160
SseK1 ^{wt}	**	**	**	**	**	-
Quintuple-del	27 ± 4,7	0,97	1,35 ± 0,14	49 ± 5,2	1,8	-
S286Y	57 ± 12,0	0,95	1,86 ± 0,10	68 ± 3,9	1,2	-
Quintuple	31 ± 2,8	0,99	1,23 ± 0,04	45 ± 1,6	1,45	-
Quadruple	79 ± 36,7	0,90	0,67 ± 0,21	25 ± 7,8	0,3	-
K151E-M147Y	*	*	*	*	*	-
N291K-R294K	*	*	*	*	*	-
S286I	**	**	**	**	**	-
S286N	*	*	*	*	*	-
SseK2 ^{wt***}	1226 ± 574	0,96	0,43 ± 0,13	16 ± 4,9	0,013	-
N302Y	157 ± 28,3	0,96	1,8 ± 0,13	64 ± 4,7	0,41	-
N302I	**	**	**	**	**	-
N302S	**	**	**	**	**	-

- Datos no determinados (los datos no se pudieron ajustar a la ecuación no lineal de Michaelis-Menten debido a que, con nuestras condiciones,

los mutantes mostraron un aumento lineal de la actividad frente a las concentraciones variables de FADD^{DD}).

** No activo

*** Los parámetros cinéticos de SseK2^{wt} no son fiables debido a que son una estimación. Hay que resaltar, que la K_m es 1226 μM cuando la concentración máxima de FADD^{DD} del ensayo fue de 800 μM .

Habiendo establecido que la mutación simple, S286Y^{SseK1}, era suficiente para alcanzar parámetros cinéticos óptimos, alcanzando una de las mejores K_m s de todos los mutantes, decidimos mutar Ser286^{SseK1} y Asn302^{SseK2} a Asn/Ile y Ser/Ile/Tyr respectivamente, para generar los mutantes S268N^{SseK1}, S286I^{SseK1}, N302S^{SseK2}, N302I^{SseK2} y N302Y^{SseK2} (**Figura 32B,C**) Estos mutantes provienen del alineamiento que analizamos anteriormente, donde sacamos los distintos residuos que se encuentran en una posición equivalente a Tyr284^{CrNleB/NleB1}, siendo estos Ser286^{SseK1}, Asn302^{SseK2} y Ile289^{SseK3} (**Figura 27**).

Tal y como esperábamos de los resultados previos y de la literatura, como SseK3^{wt} es inactiva frente a FADD^{DD}, los mutantes S286I^{SseK1} y N302I^{SseK2} eran inactivos, y N302S^{SseK2} también, al igual que la SseK1^{wt}, implicando que los residuos Ser y Ile, son perjudiciales para la catálisis.

El mutante S286N^{SseK1}, mostró una pobre glicosilación de FADD^{DD} (en torno a 15 veces peor que la NleB1^{EHEC}) al igual que vimos para la SseK2^{wt}. De hecho, estos datos tampoco se podían ajustar de forma fiable y son por tanto aproximados.

Finalmente, N302Y^{SseK2} alcanzó una k_{cat} similar a las encontradas para NleB1^{EHEC} y S286Y^{SseK1}, mientras que la K_m es algo peor, debido a peor afinidad que presenta por el FADD^{DD} en comparación a las K_m s de S286Y^{SseK1} y NleB1^{EHEC} (**Figura 33A, B**). Esto, por tanto, provoca una caída en la eficiencia catalítica comparada con la NleB1^{EHEC} (**Figura 33C**).

En resumen, nuestros datos indican que una simple mutación, ya sea Ser286^{SseK1} o Asn302^{SseK2} a Tyr, es suficiente para activar el efector SseK1 y mejorar la actividad de SseK2 frente a FADD^{DD}. Esta mutación permite, además, alcanzar valores de los parámetros cinéticos muy cercanos a aquellos de la NleB1^{EHEC}.

4.1.1.3. ANÁLISIS TERMODINÁMICO DE LOS EFECTORES NleB/SseK

Para la determinación de los parámetros termodinámicos de los efectores y sus mutantes frente a FADD^{DD}, empleamos la calorimetría de titulación isotérmica (ITC). En primer lugar, obtuvimos la K_d de la NleB1^{EHEC} frente a UDP en presencia de MnCl₂ ($K_d = 14,92 \pm 1,11 \mu\text{M}$) (**Figura 35 y Tabla 4**). A partir de ahí, evaluamos si era necesaria la presencia de UDP para la unión de FADD^{DD}. Comparando los ensayos de NleB1^{EHEC} y S286Y^{SseK1} frente a FADD^{DD} solo vimos unión cuando había un exceso de UDP presente (**Figura 35 y Tabla 4**). Este hecho, nos proporciona una evidencia convincente de que los efectores NleB/SseK probablemente sigan un mecanismo cinético bi-bi ordenado. En este mecanismo, las enzimas probablemente estén en un estado inactivo en su forma apo (el *lid* del dominio C-terminal abierto) y solo cambia al estado activo (*lid* del dominio C-terminal cerrado) en presencia de UDP-GlcNAc/MnCl₂. Este mecanismo también implica un mecanismo de ajuste inducido por UDP-GlcNAc, en el que el nucleótido azucarado induce el cierre del *lid* del C-terminal que conduce al estado activo (**Figura 34**).

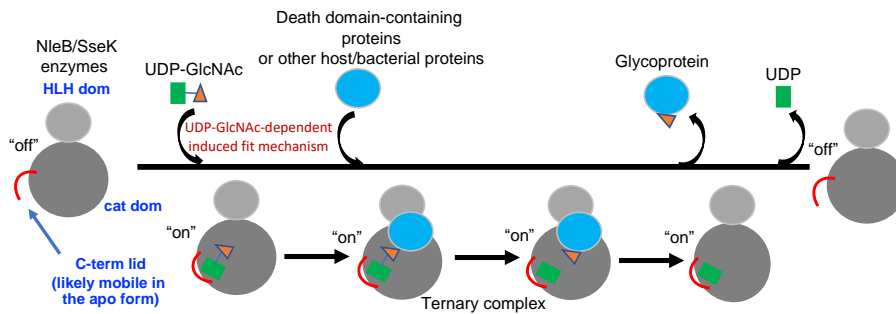


Figura 34. Dinámica de los efectores NleB/SseK a lo largo del ciclo catalítico. El esquema muestra un mecanismo cinético ordenado para estas enzimas en el que UDP-GlcNAc induce un mecanismo de ajuste para cerrar el *lid* del C-terminal y generar la forma activa de estas enzimas. En la forma apo, el *lid* es flexible y probablemente esté abierto, y las enzimas están en una forma inactiva. Como dijimos anteriormente, el *lid* del C-terminal en la forma SseK2^{wt} apo está desordenado y se ordena en presencia de UDP o UDP-GlcNAc/MnCl₂. Solo después de que estas enzimas están en el estado activo, las proteínas que contienen dominios de muerte (DD) del huésped u otras proteínas bacterianas pueden unirse y puede tener lugar la catálisis. En el complejo NleB1^{EPEC}-UDP-Mn⁺²-FADD^{DD}, no se observaron interacciones entre los residuos del *lid* del C-terminal y FADD^{DD}. Sin embargo, el cierre del mismo es un requisito previo para una unión óptima al sustrato proteico. Nótese que la unión a UDP-GlcNAc necesita la presencia de Mn⁺² a pesar de que esto no está indicado en el esquema.

Una vez determinado que necesitamos UDP presente para la unión, procedimos a medir los parámetros termodinámicos del resto de mutantes frente a FADD^{DD} en presencia de un exceso de UDP. Solo pudimos ver titulación para NleB1^{EHEC} y los mutantes S286Y^{SseK1}, N302Y^{SseK2}, y los cuádruple, quíntuple y quíntuple-del (**Figura 35**).

Un análisis detallado de los parámetros termodinámicos de las interacciones mostró, que la unión a FADD^{DD} está entrópicamente dirigida, mientras que la unión de UDP está favorecida entálpicamente (**Figura 36** y **Tabla 4**), implicando que hay distintos comportamientos

en las interacciones de estas moléculas. El perfil que muestra la unión de FADD^{DD} puede deberse a la liberación de un gran número de moléculas de agua de la superficie tanto de FADD^{DD} como del efector, promoviendo una entropía de desolvatación favorable. Por otro lado, la reducción significativa en la movilidad del sustrato donador una vez unido a la enzima, junto con el número de enlaces de hidrógenos formados entre el UDP o el UDP-GlcNAc y las enzimas, serían los factores que explicarían el hecho de que esta unión fuese entálpicamente dirigida.

Las K_d están en el rango μM bajo, exceptuando aquella de N302Y^{SseK2}. Aunque las K_d s son mucho más bajas que las K_m s, hay una cierta correlación entre las K_m s y las K_d s: aquellas enzimas con valores más bajos de K_m , también tienen valores bajos de K_d (**Tabla 4**). De nuevo, NleB1^{EHEC} tiene la mayor afinidad ($K_d = 0,2 \pm 0,04 \mu\text{M}$), siendo 3-, 6-, 13- y 472- veces mejor que aquellos valores para los mutantes quintuple-del, quintuple/S286Y^{SseK1}, cuádruple y N302Y^{SseK2}, respectivamente (**Figura 36 y Tabla 4**).

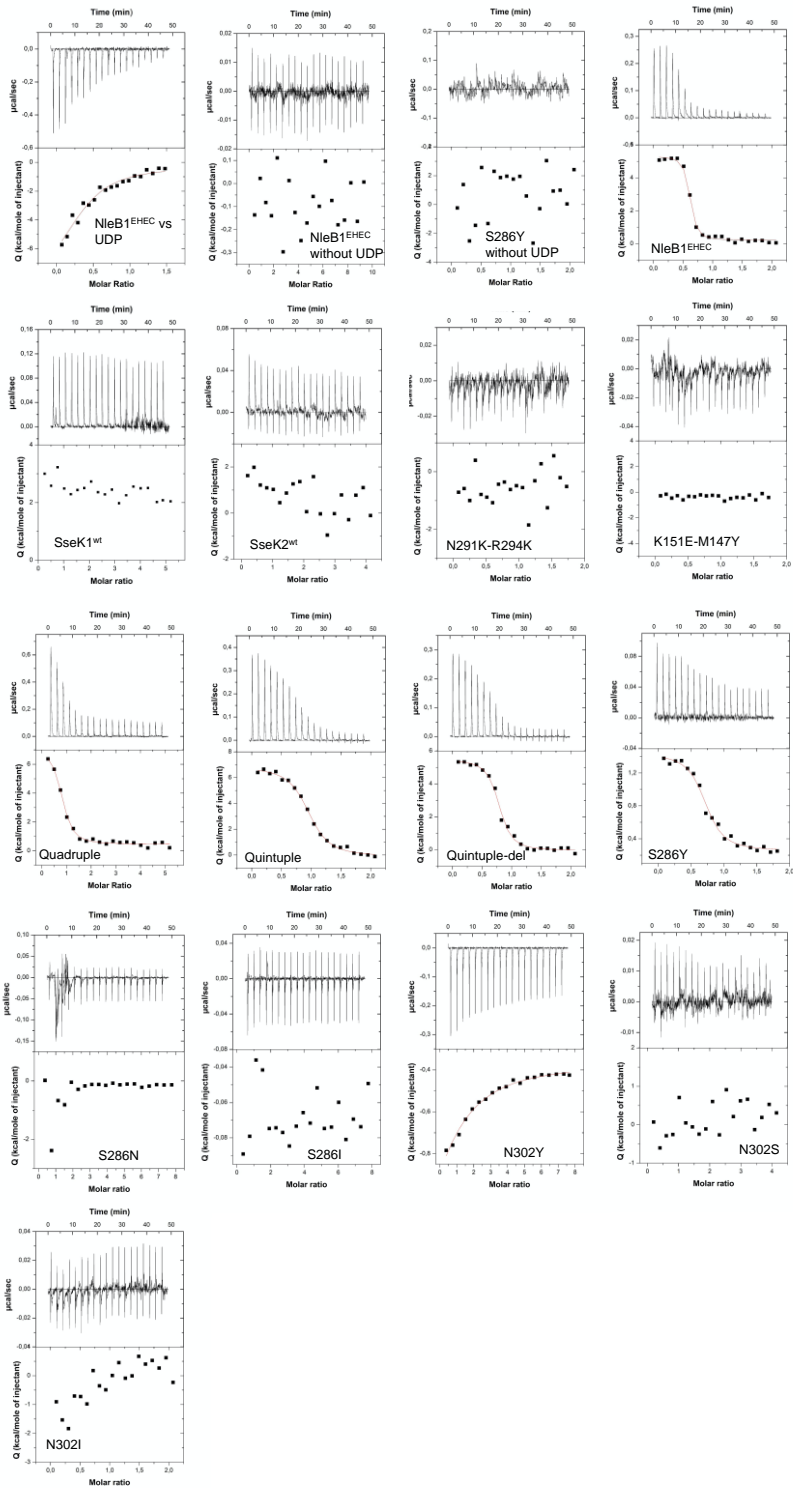


Figura 35. Datos de ITC para la unión de FADD^{DD} con NleB1^{EHEC}, SseK1^{wt}, SseK2^{wt} y los respectivos mutantes. En la parte superior: termograma (potencia térmica frente al tiempo). En la parte inferior: isoterma de unión (calores normalizados frente a relación molar). Como se ha mencionado previamente, exceptuando los tres primeros de la parte superior, el resto de experimentos se realizaron frente a FADD^{DD} en presencia de UDP y Mn²⁺ saturantes.

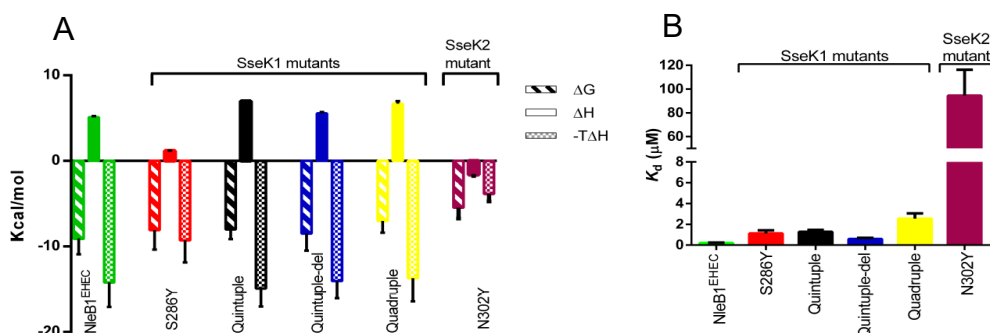


Figura 36. Resultados termodinámicos de las interacciones entre las enzimas y FADD^{DD}. (A) Parámetros termodinámicos donde se muestran la energía libre de Gibbs (ΔG), la entalpía (ΔH) y la entropía ($-T\Delta S$) en kcal/mol. Los resultados con valor negativo muestran una contribución favorable a la unión, y los positivos una contribución desfavorable. (B) Gráfica donde se representan las K_d s de las distintas enzimas frente a FADD^{DD}.

Tabla 4. Parámetros termodinámicos para la unión de FADD^{DD} a NleB1^{EHEC}, SseK1^{wt}, SseK2^{wt} y los correspondientes mutantes. K_d es la constante de disociación ($1/K$), y ΔG , ΔH y $-T\Delta S$ son los parámetros termodinámicos. La estequiometría en todos los casos es cercana a 1. Excepto el primer ITC resaltado en azul donde la K_d se determinó para UDP, el resto son frente a FADD^{DD} en presencia o ausencia de UDP.

	K_d (μ M)	ΔG (Kcal/mol)	ΔH (Kcal/mol)	$-T\Delta S$ (Kcal/mol)	n
NleB1^{EHEC} (UDP)	14,92 \pm 1,11	-6,05 \pm 0,45	-8,45 \pm -3,4	2,4 \pm 0,96	0,60
NleB1^{EHEC}	0,2 \pm 0,04	-9,1 \pm 1,82	5,12 \pm 0,11	-14,22 \pm 2,84	0,67
NleB1^{EHEC} (sin UDP)	*	*	*	*	*
SseK1^{wt}	*	*	*	*	*
Quintuple-del	0,58 \pm 0,12	-8,48 \pm 1,75	5,56 \pm 0,15	-14,03 \pm 2,98	0,76
S286Y	1,11 \pm 0,31	-8,09 \pm 2,26	1,19 \pm 0,02	-9,28 \pm 2,59	0,7
S286Y (sin UDP)	*	*	*	*	*
Quintuple	1,28 \pm 0,18	-8,01 \pm 1,12	6,98 \pm 0,01	-14,92 \pm 2,09	0,94
Quadruple	2,55 \pm 0,5	-7,02 \pm 1,38	6,69 \pm 0,3	-13,71 \pm 2,7	0,75
K151E-M147Y	*	*	*	*	*
N291K-R294K	*	*	*	*	*
S286I	*	*	*	*	*
S286N	*	*	*	*	*
SseK2	*	*	*	*	*
N302Y	94,4 \pm 21,9	-5,47 \pm 1,27	-1,61 \pm 0,16	-3,86 \pm 0,89	0,98
N302I	*	*	*	*	*
N302S	*	*	*	*	*

* No medible bajo nuestras condiciones experimentales. Puede deberse a que la unión es demasiado débil. Además, no pudimos subir la concentración de FADD^{DD} por encima de 1 mM debido a la solubilidad de esta proteína.

En general, nuestros datos muestran una mejora en la unión de los mutantes de SseK1 frente a FADD^{DD}, lo cual es esencial para promover

la catálisis. Sorprendentemente, estos resultados pueden ser alcanzados con una única mutación, S286Y^{SseK1} o N302Y^{SseK2}, o bien con la combinación de múltiples mutaciones en diferentes regiones de la enzima. De cualquier forma, una mutación simple, es suficiente para alcanzar una de las mejores K_d s de todos los mutantes, indicando que el residuo Tyr en esa posición concreta juega un papel clave en la catálisis de estas enzimas.

4.1.1.4. DINÁMICAS MOLECULARES

Para comprender el papel estructural de la mutación simple S286Y^{SseK1} para mejorar la unión y permitir la actividad glicosiltransferasa hacia FADD^{DD}, llevamos a cabo simulaciones de dinámica molecular acelerada de Gauss (GaMD) usando modelos moleculares 3D de los complejos de NleB1^{EHEC}, SseK1^{wt} y mutantes con UDP-GlcNAc- Mn²⁺ y FADD^{DD}. Los 5 complejos mostraron estabilidad a lo largo de todo el tiempo de simulación (1 μ s; **Figura 37**).

Esto indica que la duración de la simulación, aunque significativa en la escala de tiempo de la dinámica estructural interna, no es lo suficientemente larga como para simular la desunión de los complejos de menor afinidad (los formados por SseK1^{wt} y S286I^{SseK1}, enzimas inactivas, y S286N^{SseK1}, la cual glicosila pobremente a FADD^{DD}). De hecho, las desviaciones del estado ligado para una simulación de 1 μ s, en principio, solo ocurrirían para valores de k_{off} muy por encima de 10^6 s⁻¹, correspondientes a afinidades extremadamente pobres.

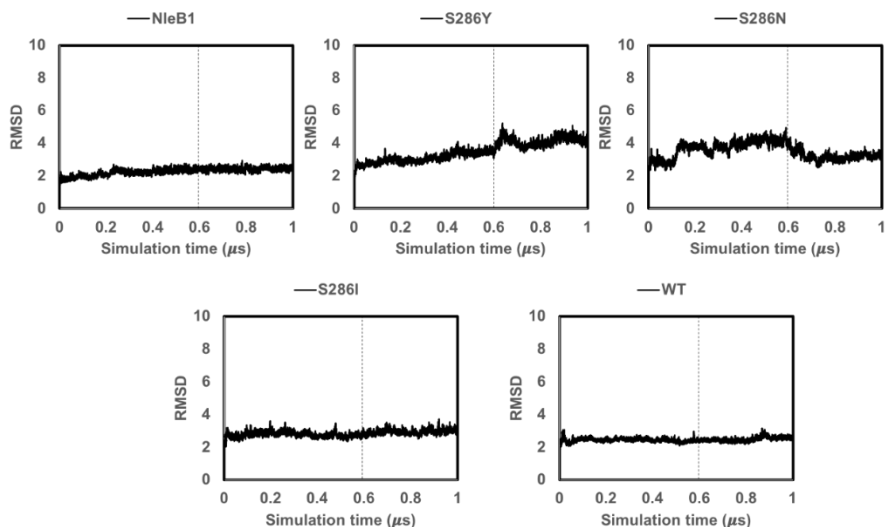


Figura 37. Dinámicas moleculares de los complejos de NleB1^{EPEC}, S286Y^{SseK1}, S286N^{SseK1}, S286I^{SseK1} y SseK1^{wt} formados con FADD^{DD} y UDP-GalNAc-Mn⁺². Desviaciones cuadráticas medias (Å) de los átomos del *backbone* de los cinco complejos durante 1 μ s. Todos alcanzan un límite constante a tiempos de simulación altos. Las dinámicas del motivo HLH en el mutante simple S286Y^{SseK1} producen un incremento en los valores RMSD en torno a 0,6 μ s. La línea punteada vertical indica el tiempo a partir del cual se llevó a cabo el análisis estructural de los complejos después de que todos los complejos alcanzaron el límite estable.

La unión de estas enzimas se puede dar en un rango por debajo de ese límite y, aun así, seguirían siendo poco o nada activas. En todos los complejos, la conformación inicial del sustrato donador de UDP-GlcNAc y la cadena lateral del sitio aceptor Arg117^{FADD} adoptan una disposición compatible con el ataque del nucleófilo sobre la cara beta del anillo de hexopiranosas, que a su vez conduciría a la inversión de la configuración en la posterior reacción de transferencia.

En el caso del mutante S286Y^{SseK1}, Tyr286 mantiene a lo largo de la simulación interacciones favorables similares a las del complejo de NleB1^{EPEC} con FADD^{DD}, donde su cadena lateral aromática está bien insertada en el surco formado por las hélices α 2 y α 3 y el *loop* que las

conecta, formando interacciones estrechas con el *backbone* de Val121^{FADD} y la cadena lateral de Ile126^{FADD} (**Figura 38A, C**). Las simulaciones de GaMD del complejo de NleB1^{EPEC} con FADD^{DD} también mostraron que esas interacciones (que involucran a Tyr284^{NleB1}) son estables a lo largo del tiempo de simulación de 1 μ s, lo que indica que el residuo Tyr en la posición de la mutación en S286Y^{SseK1} muestra un comportamiento similar al de los residuos alineados en NleB1^{EPEC} (**Figura 38B, D**). Sin embargo, para SseK1^{wt} y S286I^{SseK1} la cadena lateral en esa posición es demasiado pequeña (Ser286) o demasiado voluminosa (Ile286) como para ubicarse correctamente en la ranura entre las hélices α 2 y α 3, respectivamente (**Figura 39**). En el caso de S286N^{SseK1}, la cadena lateral tampoco está bien insertada en el surco de FADD^{DD}, aunque se observó un enlace de hidrógeno con Asp123^{FADD} en la hélice α 2 (**Figura 39**).

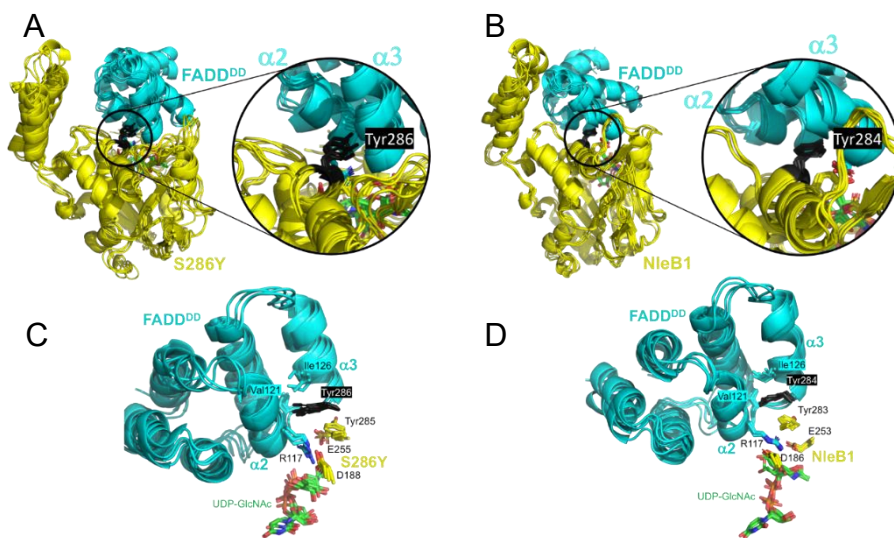


Figura 38. Simulaciones de dinámicas moleculares de los complejos de S286Y^{SseK1} y NleB1^{EPEC} con FADD^{DD}. Se muestra la superposición de las *frames* (0,7, 0,8, 0,9 y 1 μ s) de los complejos. (A) y (C) muestra el complejo de S286Y^{SseK1} con FADD^{DD}. (B) y (D) muestran el complejo con NleB1^{EPEC}. En (A) y (B) ambas proteínas se muestran en *cartoon* (enzima en amarillo, FADD^{DD}

en cian), y la cadena lateral de la posición mutada (Tyr286^{SseK1} o Tyr284^{NleB1}) en *stick* negros. (C) y (D) muestran en más detalle los residuos clave en la superficie de contacto del dominio catalítico (residuos mostrados como *sticks* amarillos).

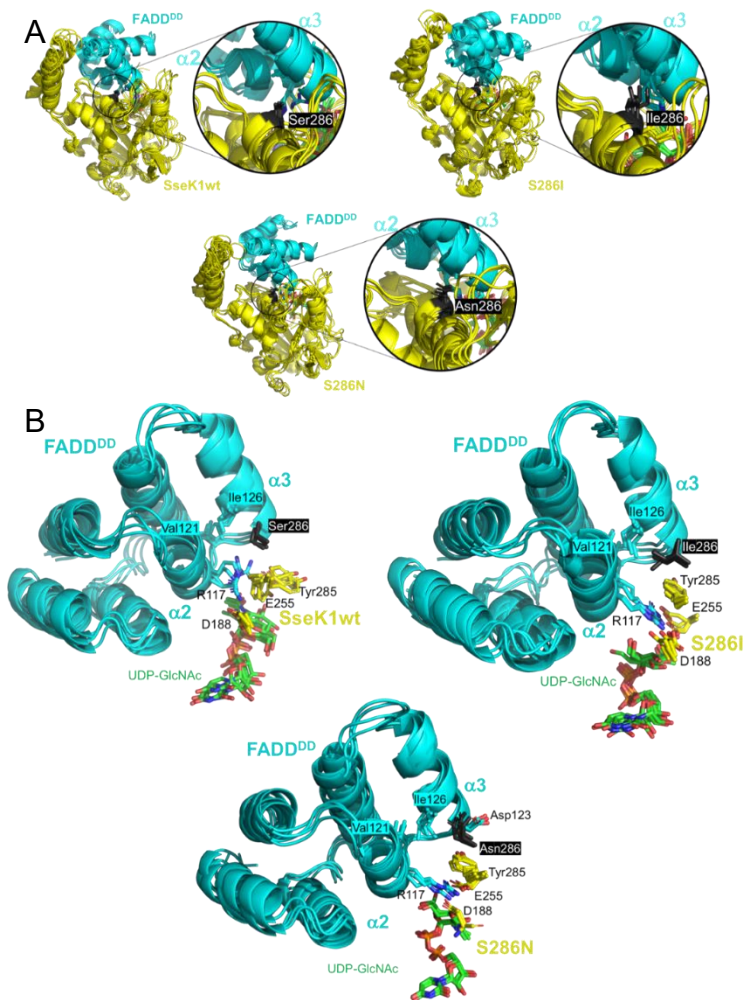


Figura 39. Dinámica molecular de los complejos de FADD^{DD} con SseK1^{wt}, S286I^{SseK1} y S286N^{SseK1}. Superposición de las *frames* de MD (0,7, 0,8, 0,9 y 1,0 μ s) de los complejos. (A) Las proteínas están en representación de *cartoon* (enzima en amarillo, aceptor FADD^{DD} en cian), y la cadena lateral en la posición de la mutación (Ser286^{SseK1}, Ile286^{SseK1} o Asn286^{SseK1}) está en *sticks* negros. (B) Figura en más detalle de los residuos clave en la interfaz de contacto entre el dominio catalítico y FADD^{DD} (FADD^{DD} en representación de *cartoon* cian;

Ser286^{SseK1}, Ile286^{SseK1} o Asn286^{SseK1} en *sticks* negros; residuos clave SseK1^{wt}, S286I^{SseK1} o S286N^{SseK1} en *sticks* amarillos). En el caso del mutante S286N^{SseK1}, Asp123^{FADD} está representado en *sticks* ya que hace contactos favorables con la cadena lateral de Asn286. La cadena lateral de Ser286^{SseK1} en la SseK1 silvestre y Asn286^{SseK1} en el mutante S286N^{SseK1}, son demasiado pequeñas como para establecer contactos favorables con Val121^{FADD} e Ile126^{FADD} en el surco entre las $\alpha 2$ y $\alpha 3$ hélices. Por otro lado, la cadena lateral de Ile286^{SseK1} en el mutante S286I^{SseK1} es demasiado voluminosa y no puede entrar en el surco, careciendo también de esos contactos favorables.

Nuestras simulaciones de GaMD se correlacionan muy bien con las medidas cinéticas para SseK1^{wt} y los mutantes. De hecho, monitoreando la distribución de distancias a lo largo de la GaMD entre los centros geométricos de las cadenas laterales alineadas con Tyr284^{NleB1} (la posición de la mutación) en todas las enzimas y la cadena lateral de Ile126^{FADD} en el surco de FADD^{DD} $\alpha 2$ - $\alpha 3$ mostró que las distancias más cortas eran las encontradas para NleB1^{EPEC} y S286Y^{SseK1}, seguidas de S286N^{SseK1}, y finalmente SseK1^{wt} y S286I^{SseK1} estando más lejos (**Figura 40**). Esto apoya un papel clave de la interacción de la cadena lateral de Ile126^{FADD} del surco $\alpha 2$ - $\alpha 3$ de FADD^{DD} con los residuos en la posición 286 de SseK1, muy probablemente contribuyendo en forma de entalpía favorable.

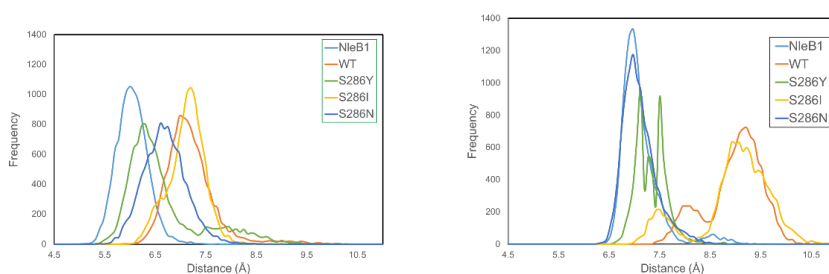


Figura 40. Distribuciones de distancias intermoleculares clave de los complejos de FADD^{DD} con NleB1^{EPEC}, SseK1^{wt}, S286Y^{SseK1}, S286I^{SseK1} y S286N^{SseK1}. (**Izquierda**) Distancias desde el centro de masa de la cadena lateral de Ile126^{FADD} al centro de masa de la cadena lateral del residuo del

aminoácido en la posición de la mutación (es decir, Tyr284^{NleB1} (azul claro), Ser286^{SseK1} (rojo), Tyr286^{S286Y} (verde), Ile286^{S286I} (amarillo), Asn286^{S286N} (azul oscuro)). Tyr286 en el mutante S286Y^{SseK1} muestra buenos contactos a lo largo de la simulación con la cadena lateral de Ile126^{FADD}, acercándose al comportamiento de NleB1^{EPEC}. Ser286^{SseK1} e Ile286^{S286I} no hacen contacto con Ile126^{FADD}, debido al tamaño pequeño y grande de su cadena lateral, respectivamente. Asn286^{S286N} se acerca a la cadena lateral de Ile126^{FADD} en ciertas etapas de la simulación. (**Derecha**) Distancias desde el carbono central del guanidinio de Arg117^{FADD} al carbono carboxílico central de Asp186^{NleB1} (azul claro), Asp188^{SseK1} (rojo), Asp188^{S286Y} (verde), Asp188^{S286I} (amarillo), o Asp188^{S286N} (azul oscuro). Las distancias más cortas se correlacionan con la presencia de interacciones de puente de hidrógeno estables a lo largo de las simulaciones entre las cadenas laterales de Arg117^{FADD} con las cadenas laterales del carboxilato de Asp186^{NleB1}, Asp188^{S286Y} y Asp188^{S286N}.

Las simulaciones de GaMD permitieron también encontrar una importante correlación entre la cadena lateral presente en la posición de la mutación y la catálisis, analizando la dinámica interna del sitio aceptor (cadena lateral Arg117^{FADD}).

En NleB1^{EPEC}, la interacción de puente salino entre la base catalítica propuesta (Glu253^{NleB1}) y el guanidinio de Arg117^{FADD} se conserva a lo largo de la simulación de 1 μ s de GaMD y mantiene la Arg117 en una orientación apropiada para el ataque nucleofílico sobre la cara beta.

Esa interacción no está tan bien conservada para las simulaciones de las otras enzimas, y el papel de Glu253^{NleB1} (Glu255^{SseK1}) se reemplaza por el carboxilato de otro residuo, Asp188^{SseK1}, que mantiene la cadena lateral de la Arg117 en una orientación adecuada pero bastante rígida a lo largo del tiempo de simulación. Esto solo ocurre para los mutantes que muestran actividad glicosiltransferasa, S286Y^{SseK1} y S286N^{SseK1}, cuya interacción está ausente en los casos de S286I^{SseK1} y SseK1^{wt} (**Figura 40**) donde el residuo Arg117 es más dinámico.

Esto se refleja en los valores de las fluctuaciones cuadráticas medias (RMSF) de Arg117 en los complejos con NleB1^{EPEC}, S286Y^{SseK1} y S286N^{SseK1}, que mostraron los valores más bajos (por debajo de 1 Å; **Tabla 5**).

Tabla 5. Fluctuaciones cuadráticas medias de las simulaciones de 1μs de GaMD de los cinco complejos.

	RMSF (Å)
NleB1^{EPEC}: FADD	0,71
SseK1^{wt}: FADD	1,27
S286Y^{SseK1}: FADD	0,95
S286I^{SseK1}: FADD	1,00
S286N^{SseK1}: FADD	0,80

En general, las simulaciones de GaMD apoyan que una sola mutación en Ser286^{SseK1} a Tyr conduce a un acoplamiento favorable entre el aumento de la afinidad del complejo con la estabilidad de la orientación apropiada de la cadena lateral del sitio aceptor, Arg117^{FADD}. Este acoplamiento además favorecería el ataque nucleofílico de la Arg117^{FADD} sobre el carbono anomérico para hacer la inversión de la configuración. Esto se logra mediante una interacción adecuada del residuo Tyr286^{SseK1} con Ile126^{FADD}, lo que conduce a una interacción de puente salino muy estable formado entre la cabeza polar del guanidinio de Arg117^{FADD} con el carboxilato de Asp188^{SseK1}. El hecho de que Glu255^{SseK1} está lejos de Arg117^{FADD} y que Asp188^{SseK1} asume el papel del carboxilato principal para mantener el guanidinio en una orientación

adecuada sobre la cara beta del residuo GlcNAc del sustrato donador, sugieren fuertemente que Asp188^{SseK1} podría funcionar como base catalítica en los mutantes S286Y^{SseK1} y S286N^{SseK1}. También se ha descrito anteriormente que la mutación D186A en NleB1^{EPEC} (Asp188 en SseK1) es perjudicial para la actividad de NleB1, resaltando su papel esencial en catálisis (Ding *et al.*, 2019).

4.1.2. ESTUDIOS CINÉTICOS Y TERMODINÁMICOS USANDO DR3^{DD} COMO SUSTRATO ACEPTOR

Habiendo establecido la importancia en la unión y catálisis de un residuo Tyr en la posición 284 de C/NleB/NleB1^{EPEC/EPEC}, 286 de SseK1 y 302 de SseK2, razonamos que la actividad nula de SseK2^{wt} sobre otro sustrato aceptor, podría rescatarse reemplazando Asn302 por una Tyr al igual que hicimos en los resultados previos. Para lograrlo, evaluamos en primer lugar la actividad de NleB1^{EHEC}, SseK1^{wt} y SseK2^{wt} en DR3^{DD}, descubriendo que mientras que NleB1^{EHEC} y SseK1^{wt} mostraban ser activos frente a DR3^{DD}, SseK2^{wt} no lo era.

4.1.2.1. ANÁLISIS CINÉTICO

Siguiendo el mismo procedimiento que antes frente a FADD^{DD}, realizamos el análisis cinético de los mutantes S286I/N/Y^{SseK1} y N302I/S/Y^{SseK2}. Al igual que ocurre con SseK2^{wt}, S286N^{SseK1} es inactivo frente a DR3^{DD} (**Figura 41B**), mientras que el resto de mutantes presentan velocidades iniciales variables (**Figura 41A, B**).

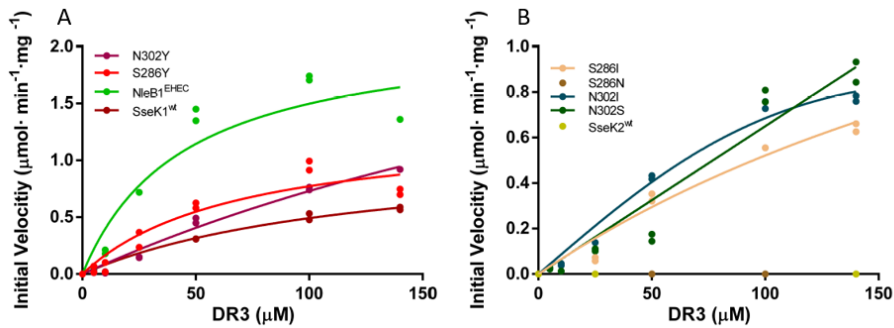


Figura 41. Cinéticas de glicosilación de NleB1^{EHEC}/SseK1^{wt}/SseK2^{wt} y sus mutantes frente a DR3^{DD}. En (A) se muestran las cinéticas con los ajustes más fiables debido a que alcanzan saturación en su mayor parte. (B) Cinéticas donde no alcanzamos saturación.

Aunque los mutantes S286I^{SseK1} y N302I/S^{SseK2} mostraron una velocidad inicial entorno a la mitad de NleB1^{EHEC} a 140 μM de DR3^{DD}, estos mutantes no alcanzaron una saturación en la cinética, impidiéndonos la determinación de sus parámetros cinéticos. Aun así, pudimos obtener parámetros fiables para S286Y^{SseK1} y N302Y^{SseK2} (Figura 41A, Figura 42 y Tabla 6).

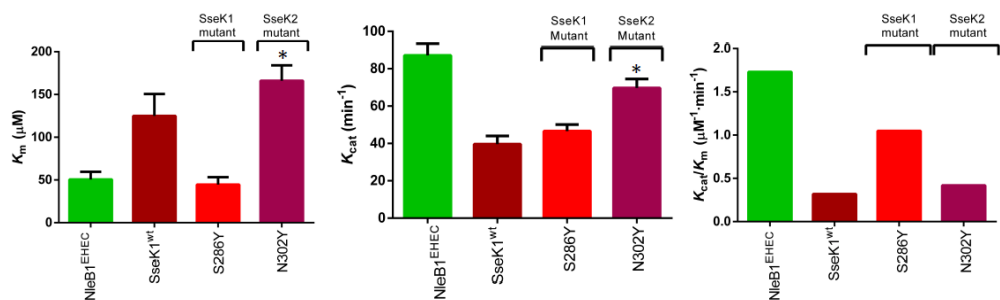


Figura 42. Gráficos de comparación de los parámetros cinéticos obtenidos: K_m , k_{cat} y la eficiencia catalítica (k_{cat}/K_m) de NleB1^{EHEC}/SseK1^{wt} y S286Y^{SseK1}/N302Y^{SseK2}. Los parámetros cinéticos de N302Y^{SseK2} son estimados debido a la peor unión que presenta a DR3^{DD}.

Tabla 6. Parámetros cinéticos obtenidos frente a DR3^{DD} para las enzimas NleB1^{EHEC}, SseK1^{wt}, SseK2^{wt} y sus mutantes.

	K_m (μM)	R^2	V_{max} ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{min}^{-1}\cdot\mu\text{M}^{-1}$)
NleB1^{EHEC}	50,5 ± 9,05	0,979	2,5 ± 0,18	87,1 ± 6,3	1,72
SseK1^{wt}	125 ± 25,75	0,994	1,1 ± 0,13	40 ± 4,4	0,32
S286Y^{wt}	45 ± 8,7	0,972	1,3 ± 0,1	47 ± 3,5	1,04
S286I	*	*	*	*	*
S286N	**	**	**	**	**
SseK2	**	**	**	**	**
N302Y	166 ± 18,5	0,997	2,0 ± 0,14	70 ± 5	0,42
N302I	*	*	*	*	*
N302S	*	*	*	*	*

*Datos no determinados (los datos no se pudieron ajustar a la ecuación no lineal de Michaelis-Menten debido a que, bajo nuestras condiciones, estos mutantes mostraron un incremento lineal de la actividad frente a la concentración creciente de sustrato DR3^{DD}). Esto se debe a que no pudimos realizar los ensayos a concentraciones mayores de DR3^{DD} debido a la baja solubilidad que presenta DR3^{DD}.

**Enzimas no activas

Como podemos ver, la K_m , la k_{cat} y la eficiencia catalítica de NleB1^{EHEC} es 2,5-, 2,2- y 5,4- veces mejor que para las de SseK1^{wt} (Figura 42 y Tabla 6). De nuevo, la mutación a Tyr en SseK1^{wt} y SseK2^{wt} conllevan a una mejor saturación en las cinéticas frente a DR3^{DD}. Las K_m s para NleB1^{EHEC} y S286Y^{SseK1} son muy similares,

aunque la k_{cat} y la eficiencia catalítica son 1,75- veces mejor para la NleB1^{EHEC} que para el mutante. En contraposición, los valores de k_{cat} son muy similares entre NleB1^{EHEC} y el mutante N302Y^{SseK2}, difiriendo más en sus valores de K_m y eficiencia catalítica (3,3- y 4,1- veces mejor en el caso de NleB1^{EHEC}) (**Tabla 6**).

En general, nuestros datos con DR3^{DD}, son ligeramente más complejos que los obtenidos para FADD^{DD} y, en particular, sugieren que un residuo de tirosina en las posiciones 284^{C/NleB/NleB1}, 286^{SseK1} y 302^{SseK2} es más beneficioso para la cinética enzimática que un residuo de serina, y este último sobre isoleucina, siendo un residuo de asparagina en esas posiciones perjudicial para la actividad.

4.1.2.2. ANÁLISIS TERMODINÁMICO

El análisis termodinámico se determinó para NleB1^{EHEC}, SseK1^{wt}, SseK2^{wt} y los mutantes frente a DR3^{DD} en presencia de UDP saturante. En esta ocasión pudimos observar titulación para todas las enzimas exceptuando SseK2^{wt} (**Figura 43**).

Un análisis más detallado de los parámetros termodinámicos, mostraron que la unión a DR3^{DD}, al igual que ocurre con FADD^{DD}, para NleB1^{EHEC} y los mutantes está entrópicamente dirigida, exceptuando el mutante N302S^{SseK2} (**Figura 44**). Este último comportamiento no nos queda claro a qué se debe ya que resulta inusual teniendo en cuenta que todos los mutantes siguen el mismo patrón frente a FADD^{DD} y DR3^{DD}.

Las K_d s están en el rango de bajo μ M exceptuando los mutantes S286I/N^{SseK1} y N302I/S^{SseK2}. En esta ocasión, NleB1^{EHEC}, S286Y^{SseK1} y N302Y^{SseK2} muestran las mejores afinidades siguiendo la misma tendencia que sus K_m s (**Figura 44A**, y **Tablas 6 y 7**). La peor afinidad es para el mutante S286N^{SseK1}, aunque para SseK2^{wt} no pudo

determinarse, lo que implica que el residuo Asn en la posición 286^{SseK1} o 302^{SseK2} es perjudicial para la unión.

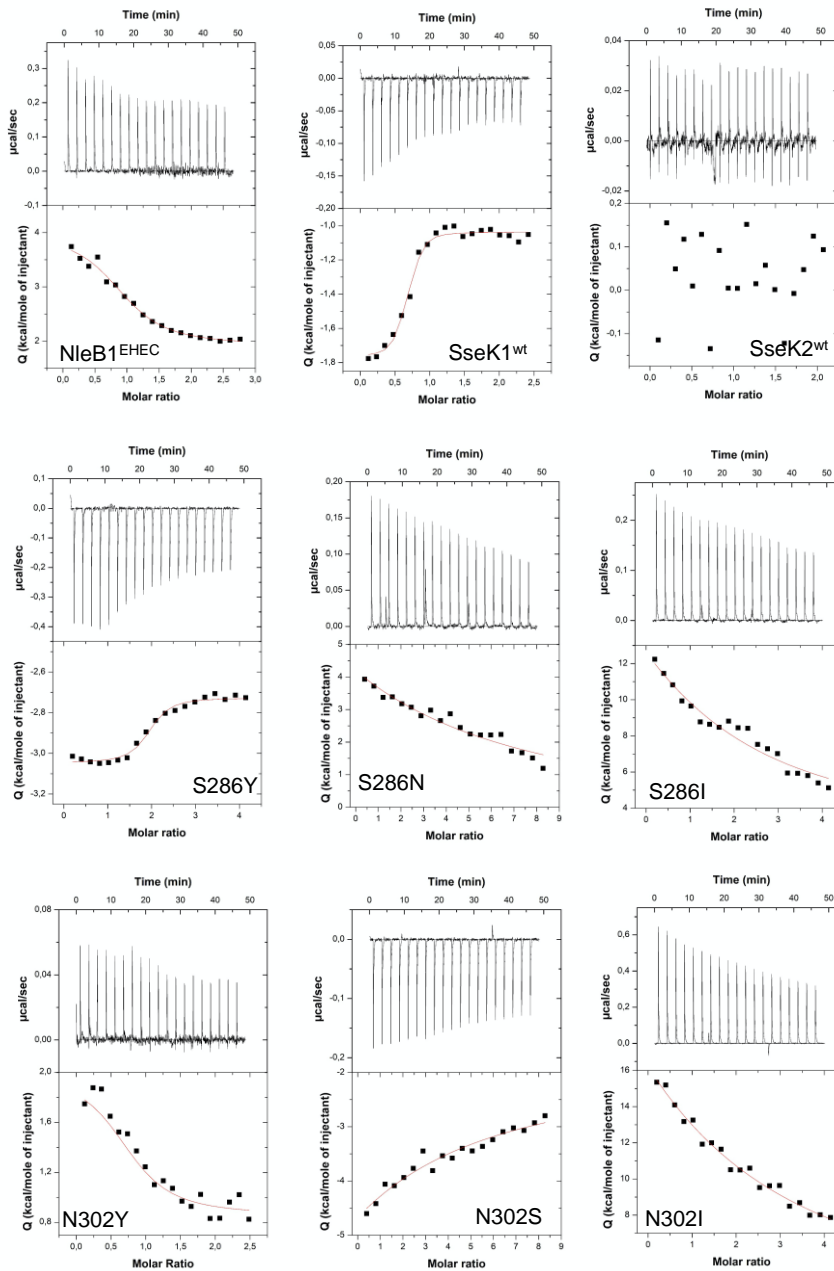


Figura 43. Datos de ITC para la unión de NleB1^{EHEC}, SseK1^{wt}, SseK2^{wt} y los respectivos mutantes frente a de DR3^{DD}. En la parte superior de cada ITC se

muestra el termograma (potencia térmica frente al tiempo). En la parte inferior se muestra la isoterma de unión (calores normalizados frente a relación molar). Los experimentos se realizaron frente a DR3^{DD} en presencia de UDP y Mn²⁺ saturantes.

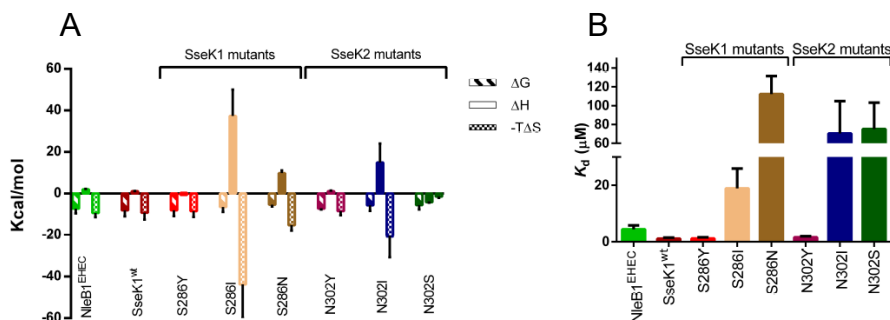


Figura 44. Resultados termodinámicos de las interacciones entre las enzimas y DR3^{DD}. (A) Parámetros termodinámicos donde se muestran la energía libre de Gibbs (ΔG), la entalpía (ΔH) y la entropía ($-T\Delta S$) en kcal/mol. Los resultados con valor negativo muestran una contribución favorable a la unión, y los positivos una contribución desfavorable. (B) Gráfica donde se representan las K_d s de las distintas enzimas frente a DR3^{DD}.

En resumen, nuestros datos muestran que un residuo de Tyr en las posiciones 284^{CrNleB/NleB1}, 286^{SseK1} y 302^{SseK2} es más beneficioso para la unión a DR3^{DD} que cualquier otro residuo exceptuando la Ser en SseK1^{wt}, sugiriendo que la influencia del residuo en esa posición depende también de los aminoácidos del entorno en la enzima y del propio sustrato proteico.

Tabla 7. Parámetros termodinámicos para la unión de NleB1^{EHEC}, SseK1^{wt}, SseK2^{wt} y sus mutantes frente a DR3^{DD}. K_d es la constante de disociación (1/K) y ΔG , ΔH y $-T\Delta S$ los parámetros termodinámicos. La estequiometría de unión en cada caso es cercana a 1. Todos los ITCs se hicieron en presencia de UDP saturante.

	K_d (μM)	ΔG (Kcal/mol)	ΔH (Kcal/mol)	$-T\Delta S$ (Kcal/mol)	n
NleB1^{EHEC}	4,4 \pm 1,4	-7,28 \pm 2,3	2,06 \pm 0,17	-9,34 \pm 2	0,97
SseK1^{wt}	1,11 \pm 0,4	-8,09 \pm 2,9	1,19 \pm 0,02	-9,28 \pm 3,32	0,7
S286Y	1,17 \pm 0,4	-8,06 \pm 2,75	-0,36 \pm 0,02	-8,42 \pm 2,87	1,6
S286I	18,9 \pm 7,04	-6,42 \pm 2,39	37,3 \pm 12,8	-43,72 \pm 16,27	1,1
S286N	112,3 \pm 19,2	-5,37 \pm 0,92	9,87 \pm 1,29	-15,24 \pm 2,6	1,03
SseK2^{wt}	*	*	*	*	*
N302Y	1,58 \pm 0,39	-7,28 \pm 1,8	1,14 \pm 0,32	-8,42 \pm 2,08	0,8
N302I	70,5 \pm 34,38	-5,64 \pm 2,75	14,98 \pm 9,05	-20,62 \pm 10,05	1,28
N302S	75,19 \pm 27,99	-5,6 \pm 2,08	-4,11 \pm 0,22	-1,49 \pm 0,55	1,01

* No medible bajo nuestras condiciones. Puede deberse a que la unión es muy débil. Al no poder aumentar la concentración de la enzima por problemas con la solubilidad, es probable que no pudiésemos ver titulación.

4.1.3. ESTUDIO EN MACRÓFAGOS

Una vez que conseguimos entender que la incorporación de un residuo de Tyr en las posiciones 286 de SseK1 y 302 de SseK2 es clave para la actividad y la unión de la enzima a los sustratos proteicos, propusimos que los mutantes Tyr286^{SseK1} y Tyr302^{SseK2} podrían aumentar la supervivencia de las cepas de *Salmonella* entérica en macrófagos infectados.

Para probar esta hipótesis, expresamos SseK1^{wt}, SseK2^{wt}, S286Y^{SseK1} y N302Y^{SseK2} en una cepa de *Salmonella* que carecía de todos los efectores SseK. La supervivencia de estas cepas mutantes fue evaluada en macrófagos, resultando que los mutantes S286Y^{SseK1} y N302Y^{SseK2} mejoraron la proliferación de estas bacterias comparándolas con las cepas sin efectores SseK o que expresaban los efectores silvestres SseK1 y SseK2. Además, el nivel de proliferación alcanzado por las cepas que expresan S286Y^{SseK1} y N302Y^{SseK2} fue muy similar al de las bacterias de tipo salvaje que expresan los tres efectores (Figura 45).

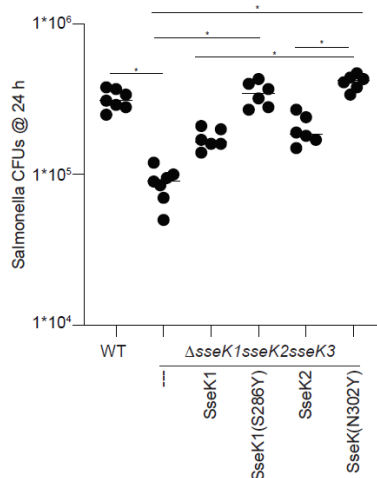


Figura 45. Las mutaciones en el residuo S286 en SseK1 y N302 en SseK2 a Tyr promueven la proliferación de *Salmonella* en las células RAW264.7. Se

infectaron células RAW 264.7 con las cepas de *Salmonella* indicadas con una multiplicidad de infección de 10. Los recuentos de colonias se llevaron a cabo 24 h después. * indica diferencias significativas ($p < 0,05$) entre muestras, según se determina mediante el análisis de varianza unidireccional (ANOVA) con los test de comparaciones múltiples de Dunnett.

Este resultado demuestra que los efectores SseK que contienen Tyr en las posiciones 286^{SseK1} y 302^{SseK2} (y potencialmente 293^{SseK3}) son enzimas más robustas que conllevan a una mayor proliferación bacteriana en macrófagos y por tanto probablemente a una mayor virulencia.

4.2. FUT8

4.2.1. CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DE FUT8 USANDO MICROARRAYS Y BASES MOLECULARES DEL RECONOCIMIENTO DE FUT8 SOBRE SUS LIGANDOS

La enzima FUT8 humana fue purificada obteniéndose de forma lo suficientemente homogénea como para permitirnos llevar a cabo una caracterización estructural y funcional. La actividad de *HsFUT8* frente a G0 se monitoreó mediante espectrometría de masas y se observó un incremento de 146 Da, correspondiente a la incorporación de una fucosa a la estructura del glicano en presencia de GDP-Fucosa (**Figura 46**).

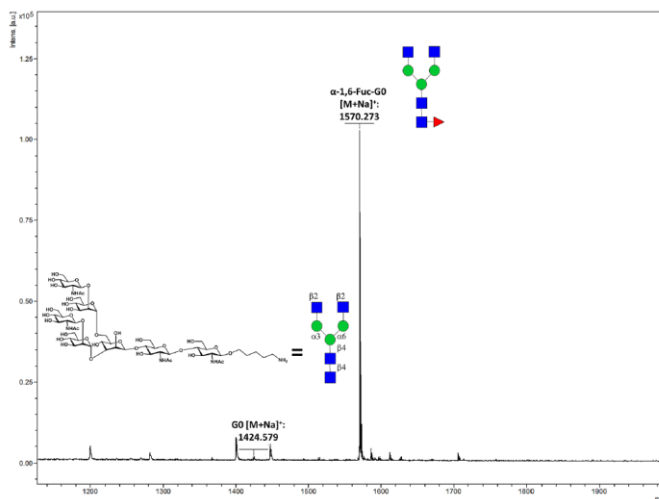


Figura 46. Espectro MALDI-TOF donde se muestra el incremento de masa debido a la incorporación de una fucosa en G0 debido a *HsFUT8*.

Una vez confirmado que la enzima era funcional, evaluamos la especificidad de sustrato aceptor de FUT8 en un microarray de N-glicanos sintéticos (**Figura 47**).

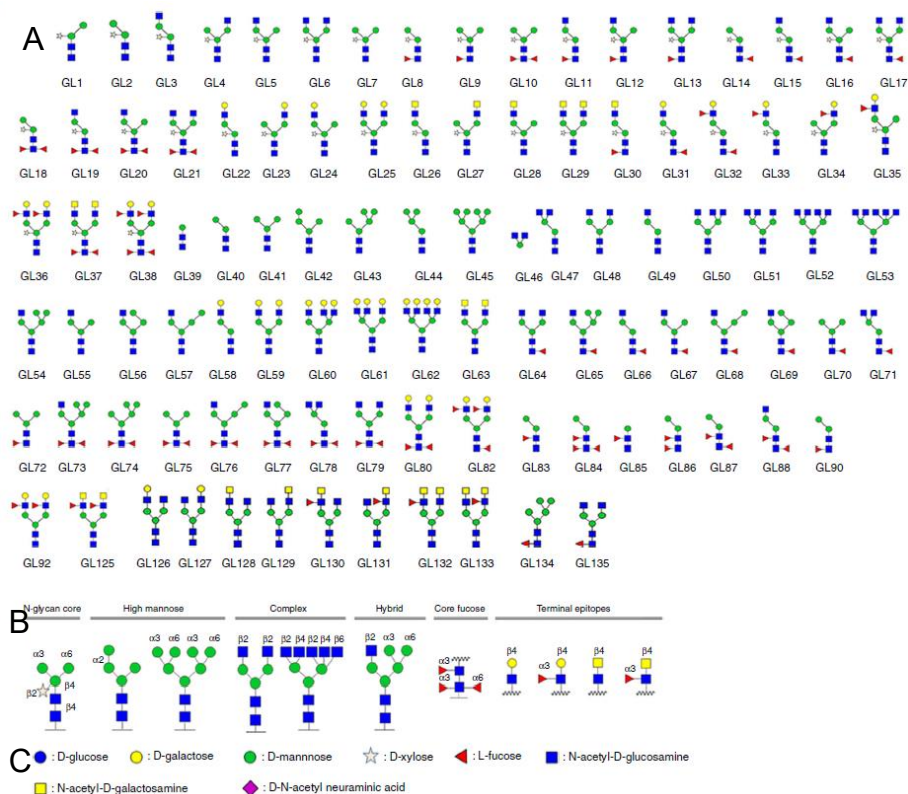


Figura 47. Microarray empleado para caracterizar la selectividad de sustrato de FUT8. (A) Representación en pictogramas de las estructuras de los N-glicanos incluidos en el array. (B) Especificaciones de las configuraciones de los enlaces glicosídicos. (C) Símbolos de la nomenclatura de los monosacáridos de acuerdo a lo establecido por el consorcio internacional dedicado a la glicobiología (<http://www.functionalglycomics.org/static/consortium/Nomenclature.shtml>).

Los resultados, mostraron que FUT8 tiene una preferencia de sustrato aceptor idéntica a *C. elegans* FUT8 (**Figura 48**), y verificaron la importancia del GlcNAc terminal en el brazo α (1,3) como un requisito

para la catálisis y la promiscuidad en el brazo α (1,6) como habían descrito estudios anteriores.

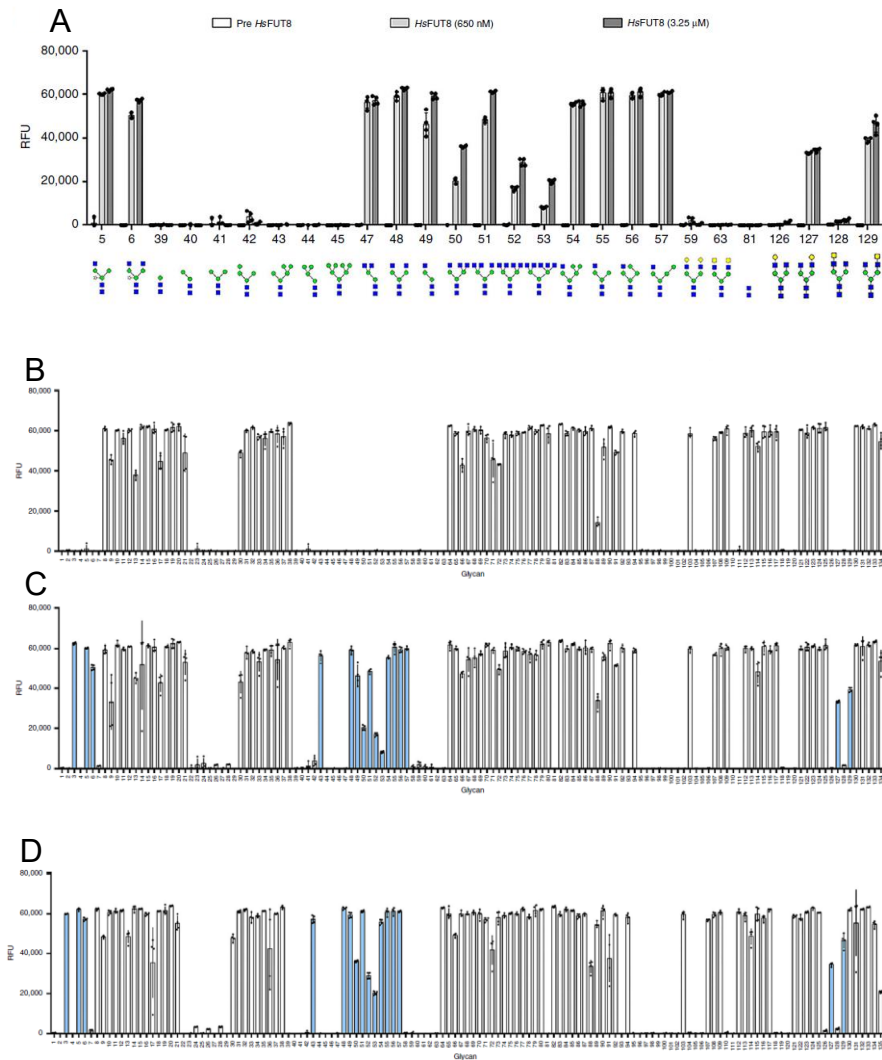


Figura 48. Ensayo de actividad de *HsFUT8* en el microarray de glicanos. (A) Unión a la lectina *Aleuria aurantia* (AAL-555) antes y después de la incubación con *HsFUT8* a dos concentraciones diferentes (650 nM y 3,5 μ M) en una selección de estructuras de glicanos. (B) Perfil de unión de ALL-555 a los glicanos antes del tratamiento con *HsFUT8*. (C) Ensayo de unión a ALL-555 después del tratamiento con *HsFUT8* a 650 nM y (D) unión de la lectina tras el

tratamiento con 3,25 μM de enzima. Las barras muestran la fluorescencia media RFU (unidades de fluorescencia relativa) de cuatro réplicas. Las barras de error representan la desviación estándar. Los N-glicanos que mostraron unión a AAL tras la incubación con FUT8 se representan en azul.

Tras comprobar que la enzima que purificamos es activa y funcional, procedimos a cristalizar el complejo formado por *HsFUT8*-GDP-G0. Los cristales pertenecen al grupo de simetría C2 (**Tabla 8**) y nos permitieron resolver la estructura a una alta resolución (1,95 Å) e interpretar los mapas de densidad (**Tabla 8**).

Tabla 8. Recolección de datos y estadísticas del refinamiento del complejo *HsFUT8*-GDP-G0.

Data collection	
Space group	C2
Cell dimensions	
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	208.04, 68.59, 173.92
α , β , γ (°)	90, 149.90, 90
Resolution (Å)	20-1.95 (2.06-1.95) ^a
<i>R</i> _{merge}	0.133 (1.368)
<i>I</i> / σ <i>I</i>	6.4 (1.4)
Completeness (%)	99.9 (100)
Redundancy	4.4 (4.5)
Refinement	
Resolution (Å)	1.95
No. of reflections	394,687
<i>R</i> _{work} / <i>R</i> _{free}	0.185/0.218
No. of atoms	
Protein	7511
GDP	56
G0	180
Waters	506
Glycerol	102
<i>B</i> -factors (Å ²)	
Protein	38.11
GDP	47.64
G0	44.70
Waters	49.00
Glycerol	63.01
R.m.s. deviations	
Bond lengths (Å)	0.0159
Bond angles (°)	2.0646

One crystal was used to determine the crystal structure. ^aValues in parentheses are for highest-resolution shell.

La unidad asimétrica (AU) de los cristales C2 contienen dos moléculas de *HsFUT8* que se organizan formando dímeros con dos moléculas de unidades asimétricas vecinas mediante contacto directo a través de sus correspondientes dominios N-terminal *coiled-coil*

(Figura 49). La desviación cuadrática media (RMSD) entre ambas moléculas pertenecientes a la cadena A y B en la unidad asimétrica es 0,44 Å en los 452 átomos de C α (Figura 50). A partir de ahora solo nos centraremos en la cadena A ya que no contiene ninguna región desordenada.

Tal y como esperábamos, el análisis de la estructura de *HsFUT8* con el servidor DALI (Holm & Laakso, 2016) reveló que la estructura presenta una alta homología con dos fucosiltransferasas llamadas *Arabidopsis thaliana* FUT1 (*AtFUT1*, códigos del PDB 5KX6, 5KOP, 5KOR, 5KWK y 5KOE) y la POFUT2 humana y de *C. elegans* (*HsPoFUT2* y *CePoFUT2*; códigos del PDB 4AP5, 4AP6 y 5FOE).

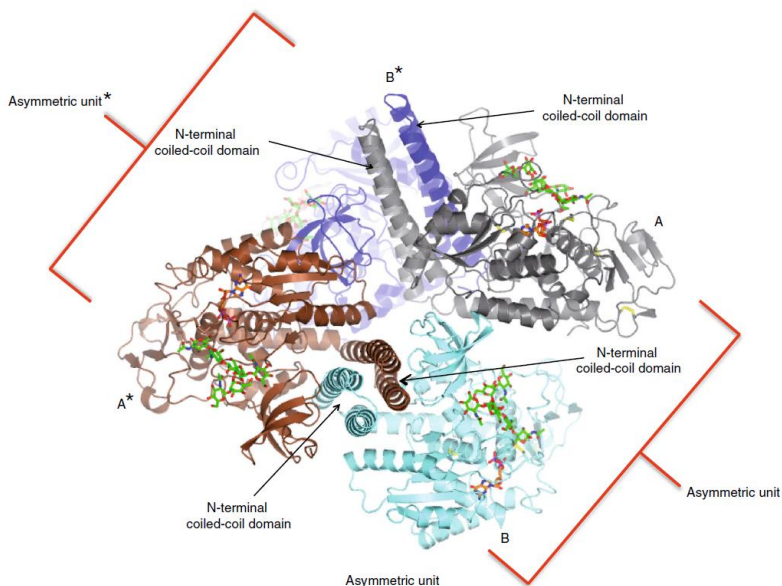


Figura 49. Una molécula de *HsFUT8* (A en gris) de una unidad asimétrica forma una estructura dimérica con otra molécula (B* en azul) de otra unidad asimétrica* a través de sus dominios *coiled-coil*.

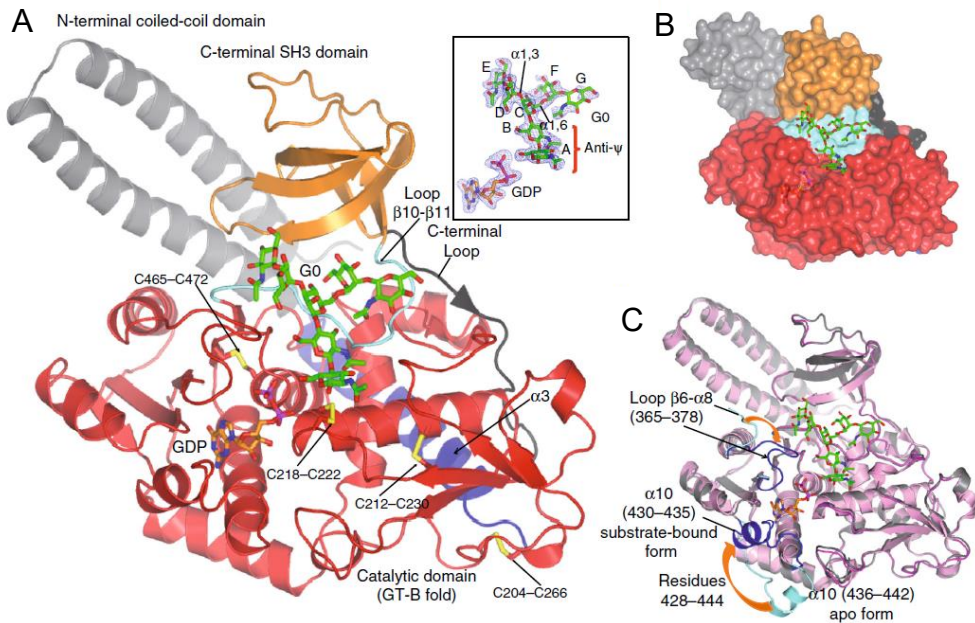


Figura 50. Estructura del complejo *HsFUT8*-GDP-G0. (A) Estructura *ribbon* de *FUT8* con GDP (átomos de carbono en naranja) y G0 (átomos de carbono en verde). El dominio *coiled-coil* se muestra en gris, el catalítico en rojo y el SH3 en naranja. La zona interdominio $\alpha 3$ y el *loop* $\beta 10$ - $\beta 11$ se muestran en azul y aguamarina respectivamente. Los puentes disulfuro de muestran en amarillo. El *loop* del C-terminal se muestra en negro. En el recuadro se muestran los mapas de densidad electrónica Fo-Fc (en azul) contorneados a $2,2\sigma$ para GDP y G0. Se muestran también las etiquetas para las unidades azucaradas. (B) Representación de la superficie del complejo. (C) Superposición de *HsFUT8* apo (rosa) y la forma en complejo (gris). Esta figura también muestra los cambios conformacionales vistos en los residuos 365-378 y 428-444. Estas regiones se muestran en aguamarina (forma apo) y azul (forma de la enzima en complejo).

Aunque *HsFUT8* es muy distante de *AtFUT1* y *HsPoFUT2/CePOFUT2* en términos de sustrato aceptor, el servidor nos dio una puntuación muy alta implicando que se superponen relativamente bien (RMSDs de $\sim 3,2$ y ~ 5 Å entre las estructuras cristalinas de *AtFUT1* y *HsFUT8*, y *HsPoFUT2/CePoFUT2* y *HsFUT8*, respectivamente; los residuos que se superpusieron oscilaban entre

429 y 459). La estructura del complejo, muestra perfectamente los tres dominios mencionados y cómo están conectados entre ellos. Aunque el dominio catalítico está conectado con el dominio *coiled-coil* a través de $\alpha 3$, el dominio SH3 está conectado con el dominio catalítico mediante el *loop* $\beta 10$ - $\beta 11$ (**Figura 50A**). En general, las densidades para GDP y el resto de la molécula de G0 están muy bien definidos, pero sí observamos una densidad parcial para la estructura del GlcNAc en el brazo α (1,6) (G^{G0}) (ver el panel más pequeño de la **Figura 50A**). Hay que recalcar especialmente la conformación anti- ψ de la chitobiosa del N-glicano (correspondiente a las unidades A^{G0} - B^{G0}). Esta conformación es menos estable que la típica conformación syn- ψ que se encuentra en solución. Adicionalmente, el enlace en G0 entre Man α 1-6Man adopta una conformación “extendida gg”, con valores de ψ y de ω de 174,7° y 50,4° respectivamente. La estructura también nos muestra que la molécula de GDP está parcialmente cubierta y se localiza casi exclusivamente en el dominio catalítico, mientras que la parte interna y los brazos α (1,3)/ α (1,6) de G0 se encuentran en el dominio catalítico y el exosito formado por los *loops* $\beta 10$ - $\beta 11$ y el dominio SH3 respectivamente (**Figura 50B**). La presencia de exositos para la unión de N-glicanos se ha observado anteriormente en glicosiltransferasas distantes y glicosilhidrolasas como son MGAT2 y MAN2A1, respectivamente (Kadirvelraj *et al.*, 2018).

Nuestra estructura también muestra dos cambios conformacionales bastante llamativos en relación con la forma apo (RMSD de 0,56 Å en los 436 Cas equivalentes, **Figura 50C**). Los residuos 428–444 (formados por un *loop* y $\alpha 10$) experimentan un gran cambio conformacional (la mayor distancia, cercana a 22 Å, fue observada para la Gly437 en ambas formas) que permite el cierre parcial del sitio de unión de GDP-Fucosa y que protegería la parte más hidrofóbica de la molécula (el resto de guanosina) del solvente. Significativamente,

durante la transición de la forma apo a la forma unida al sustrato, se produce una reordenación en el que $\alpha 10$ de la forma apo (residuos 436–442) se desestructura y se forma otra $\alpha 10$, que comprende los residuos 430-435. Además, el *loop* $\beta 6$ - $\alpha 8$ (residuos 365-378) está parcialmente desordenado en la forma apo y sufre un cambio conformacional en presencia de ambos ligandos, dando lugar a un *loop* ordenado que contribuye a la formación tanto del sitio de unión de GDP-Fucosa como del sitio de unión del ligando aceptor (**Figura 50C**).

El sitio de unión de *HsFUT8* es grande y comprende los sitios para GDP-Fucosa y el sitio de unión del N-glicano (**Figura 51A, B**).

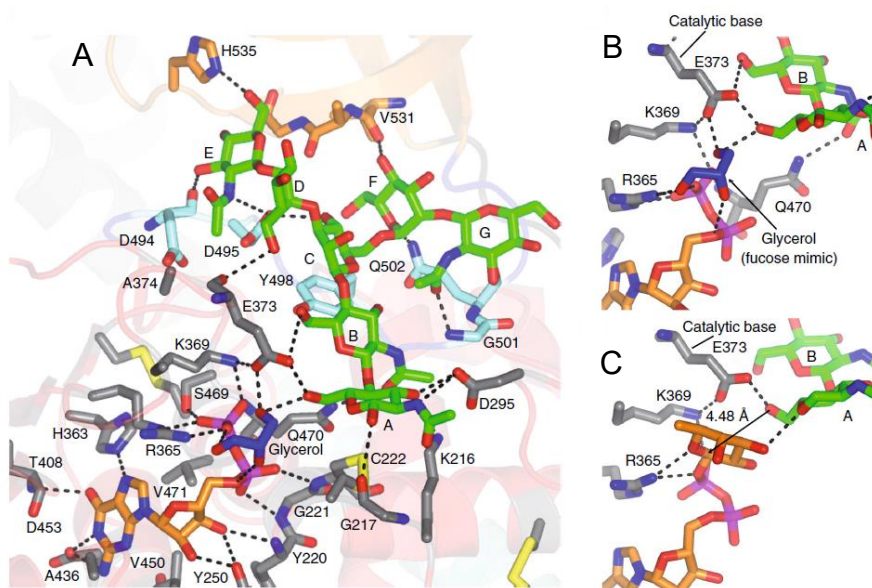


Figura 51. Características estructurales de los sitios de unión de GDP-Fucosa y G0. (A) Sitios de unión completos de GDP-Fucosa y G0. Los residuos que forman los sitios de unión GDP-Fucosa/A^{G0}/B^{G0} y C^{G0}/D^{G0}/E^{G0}/F^{G0}/G^{G0} se representan como átomos de carbono gris y aguamarina/naranja, respectivamente. G0 y glicerol se muestran como átomos de carbono naranja, verde y azul, respectivamente, mientras que las interacciones de los enlaces de hidrógeno se muestran como líneas negras punteadas. (B) y (C) muestran una vista ampliada focalizada alrededor de las moléculas de GDP, A^{G0} y B^{G0}.

Además, se muestran los residuos esenciales (Arg365, Lys369 y Glu373) que son los principales actores en el mecanismo de reacción tipo S_N2 . Hay que prestar especial atención a la proximidad y la orientación del carbono anomérico de GDP-Fucosa con respecto al OH6 de A^{G0} (4,48 Å), la cual es compatible con la inversión de la configuración durante la reacción.

La guanina de GDP establece interacciones CH- π con Ala436, Val450 y Val471 mientras que el resto de guanosina establece enlaces de hidrógeno con las cadenas laterales de Tyr250/His363/Asp453 y con los *backbones* de Tyr220/Thr408. El pirofosfato interactúa con el *backbone* de Gly221/Cys222/Gln470, las cadenas laterales de Lys369/Arg365/Ser469 y un resto de glicerol. La presencia de residuos cargados positivamente como Arg365 y Lys369 se encuentran normalmente en las glicosiltransferasas con plegamiento GT-B, que no son dependientes de metal. Estos residuos reemplazan el metal presente en el plegamiento GT-A para estabilizar los grupos pirofosfato y las conformaciones correctas del nucleótido azucarado para la catálisis (Moremen y Haltiwanger, 2019).

El resto de glicerol actúa imitando a una fucosa, ya que ocupa una posición similar a la encontrada para la fucosa (**Figura 51B, C**), y además interactúa con las cadenas laterales de Arg365 y Glu373, y el OH6 de A^{G0}, el sitio de fucosilación en G0 (**Figura 51B**). Las coordenadas de GDP-Fucosa se obtuvieron de la estructura cristalina de CePoFUT1 en complejo con GDP-Fucosa (código del PDB 3ZY6, (Lira-Navarrete *et al.*, 2011) y el complejo resultante de HsFUT8-GDP-Fucosa-G0 se minimizó utilizando cálculos de mecánica molecular (MM) (ver materiales y métodos). Dos grupos hidroxilo de la molécula de glicerol ocupan posiciones que imitan al OH4 de la fucosa y el oxígeno endocíclico. Además, uno de estos dos grupos hidroxilo también se encuentra a una distancia adecuada para la interacción con Arg365 e imita la interacción conservada observada por el oxígeno endocíclico de la fucosa y Arg365 (**Figura 51B, C**). La cadena lateral

de Glu373 interactúa con el OH6 de A^{G0} y la cadena lateral de Lys369, la cual ayuda a estabilizar la carga negativa del carboxilato de Glu373. Esto podría mejorar el carácter de base catalítica de Glu373 para desprotonar el OH6 de A^{G0} (**Figura 51A, B**). La importancia de Arg365, Lys369 y Glu373 para la catálisis fue previamente confirmada por sustituciones de estos residuos a alaninas. Los mutantes fueron completamente inactivos (Ihara *et al.*, 2006). La ubicación de los residuos Arg365, Lys369 y Glu373 en el *loop* móvil $\beta 6$ - $\alpha 8$ demuestra la importancia de este *loop* en la unión a los ligandos y la catálisis. La estructura de HsFUT8 con GDP-Fucosa y G0 demuestra la inversión del carbono anomérico de la fucosa una vez unido al N-glicano con respecto a GDP-Fucosa (**Figura 51C**). Por lo tanto, estos resultados son compatibles con un mecanismo de reacción de desplazamiento simple S_N2, que es el que hacen la mayoría de las glicosiltransferasas de inversión.

A diferencia del reconocimiento de GDP por HsFUT8, G0 muestra menos contactos con la proteína (**Figura 51A**) en línea con los datos anteriores de SPR en los que la unión de FUT8 a GDP-Fucosa fue ~ 40 veces más fuerte que su unión a G0 (Kötzler *et al.*, 2013) (**Figura 51A**). A^{G0} se reconoce a través de enlaces de hidrógeno formados entre el OH1 de A^{G0} y el *backbone* de Gly217, la acetamida de A^{G0} y la cadena lateral de Asp295, y el OH3 de A^{G0} y las cadenas laterales de Asp295/Lys216. B^{G0} se une a través de interacciones formadas entre el OH6 de B^{G0} con la cadena lateral de Glu373, y el grupo carbonilo de la acetamida de B^{G0} con la cadena lateral Gln470. La conformación anti- ψ inusual de A^{G0} y B^{G0}, que es impuesta por la enzima, es un requisito estricto para la correcta colocación del OH6 de A^{G0} frente a GDP-Fucosa (**Figura 51A**). Aunque es una conformación menos favorable energéticamente que la conformación syn- ψ (-8,9 versus -9,5 kcal/mol, estimado por cálculos de MM para el disacárido que contiene unidades

$A^{G0} - B^{G0}$) en fase de solución, esta conformación es un requisito esencial para que la catálisis tenga lugar. Los azúcares que forman la parte ramificada de $G0$ (C^{G0} , D^{G0} , E^{G0} , F^{G0} y G^{G0}) se encuentran en el exosítio formado por el *loop* $\beta 10$ – $\beta 11$ y el dominio SH3 (**Figura 51A**). C^{G0} establece una interacción CH– π con Tyr498 y proporciona un enlace de hidrógeno entre el OH4 de C^{G0} y la cadena lateral de Asp495. D^{G0} está solamente reconocido por un enlace de hidrógeno entre el OH6 de D^{G0} y el Glu373. Sin embargo, el resto GlcNAc terminal en el brazo α (1,3), E^{G0} , es el monosacárido más íntimamente reconocido de todos los residuos de los azúcares transferidos. E^{G0} establece tres interacciones que se forman entre el OH6 de E^{G0} y la cadena lateral His535, el OH2 de E^{G0} y Asp494, y el NH de la acetamida de E^{G0} con la cadena lateral de Asp495. Además, el grupo metilo acetamida de E^{G0} participa en una interacción hidrofóbica con Ala374 (**Figura 51A**). Los contactos que E^{G0} establece con la enzima podrían explicar el estricto requisito de un resto GlcNAc en esta posición. Este residuo mejora la unión del brazo α (1,3) y, a su vez, proporciona estabilización de toda la molécula en el estado unido. Por el contrario, los azúcares ramificados en el brazo α (1,6) están mucho menos reconocidos, lo que proporciona una explicación plausible para la mayor promiscuidad hacia la rama α (1,6). El oxígeno endocíclico de F^{G0} y el OH4 de F^{G0} establecen dos enlaces de hidrógeno con la cadena lateral de Gln502 y el *backbone* de Val531, respectivamente, mientras otras posibles interacciones entre G^{G0} y HsFUT8 (el grupo carbonilo de G^{G0} y el OH3 de G^{G0} con Gly501 y el *backbone* de Gln502, respectivamente) no se pueden confirmar debido a que la densidad de $G0$ es parcial (**Figura 50A** y **Figura 51A**).

Por último, la adición de un GlcNAc bisectante en $G0$ impediría la fucosilación por FUT8 porque es probable que este azúcar imponga un

impedimento estérico con FUT8 (**Figura 52**), lo que explicaría por qué los N-glicanos con GlcNAc bisectantes no son sustratos de FUT8.

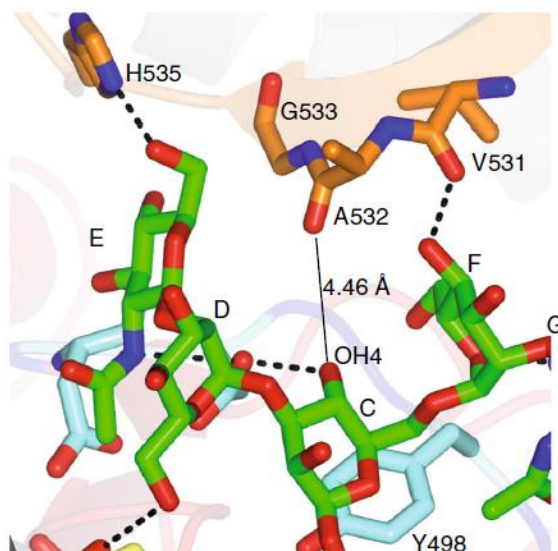


Figura 52. FUT8 no glicosila N-glicanos conteniendo GlcNAc bisectantes. Los N-glicanos que llevan un GlcNAc no son sustratos de *HsFUT8* probablemente debido a un choque estérico entre dicho GlcNAc con Ala532 (distancia de 4,46 Å entre el *backbone* de la Ala532 y el OH4 de C^{6'}). Hay que tener en cuenta que el GlcNAc bisectante estaría unido a C^{6'} a través del OH4 de C^{6'}, y es este GlcNAc el que chocaría con Ala352. También es probable que la adición de un GlcNAc bisecante provoca cambios conformacionales en el azúcar ramificado vecino, lo que podría contribuir a interrumpir la unión a *HsFUT8*.

4.2.2. CINÉTICAS DE HSFUT8 FRENTE A DISTINTOS N-GLICANOS Y N-GLICOPÉPTIDOS

Para evaluar el papel subyacente del péptido en la fucosilación de los N-glicanos, sintetizamos una serie de N-glicanos y oligosacáridos unidos a Asn, y N-glicopéptidos (ver materiales y métodos; **Figura 53**). Una vez tuvimos los compuestos, determinamos cualitativamente la

actividad de FUT8 sobre las estructuras preparadas por MALDI-TOF, observando que G0-péptido estaba más fucosilado que M3N2-péptido y M3N2. Este último se fucosilaba mal a tiempos largos de incubación (**Figuras 54-56**). Posteriormente, determinamos los parámetros cinéticos de FUT8 de estos compuestos, lo que permitió la determinación de k_{cat} , K_m y k_{cat}/K_m para G0 y G0-péptido (**Figura 57A**). Los parámetros para GDP-Fucosa se determinaron en presencia de una concentración saturante de G0 (**Figura 58**). Las K_m s para GDP-Fucosa, G0 y G0-péptido son $14,56 \pm 3,4$, $113,1 \pm 15,43$ y $133,1 \pm 19,99$ respectivamente, y las k_{cat} , en torno a 15 min^{-1} (**Figura 57A y Tabla 9**). Dicho valor de k_{cat} está de acuerdo a valores previamente reportados por otros autores (k_{cat} de $24,6 \text{ min}^{-1}$ en un trabajo anterior de Ihara *et al.*) (Ihara *et al.*, 2005).

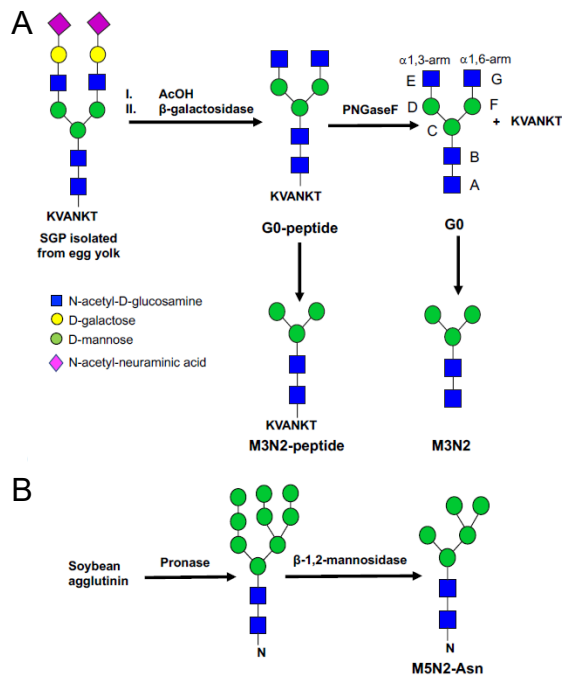


Figura 53. (A) Preparación de G0, G0-péptido, M3N2 y M3N2-péptido derivados del N-glicano sialilado aislado de yema de huevo. (B) Preparación de M5N2-Asn a partir de aglutinina de soja.

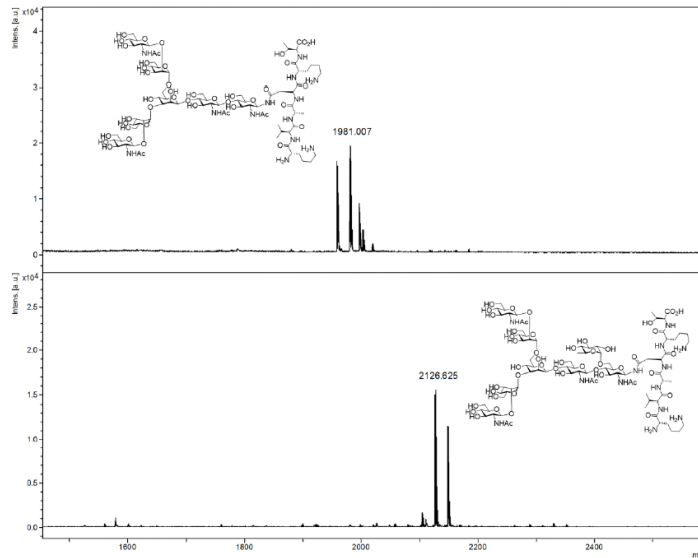


Figura 54. Espectro MALDI-TOFF de G0-péptido $[M+Na]^+=1981,007$ (panel superior) y reacción de G0-péptido con FUT8 en presencia de GDP-Fucosa (panel inferior) mostrando la conversión completa del glicopéptido fucosilado $[M+Na]^+=2126,625$ tras 18 h de incubación.

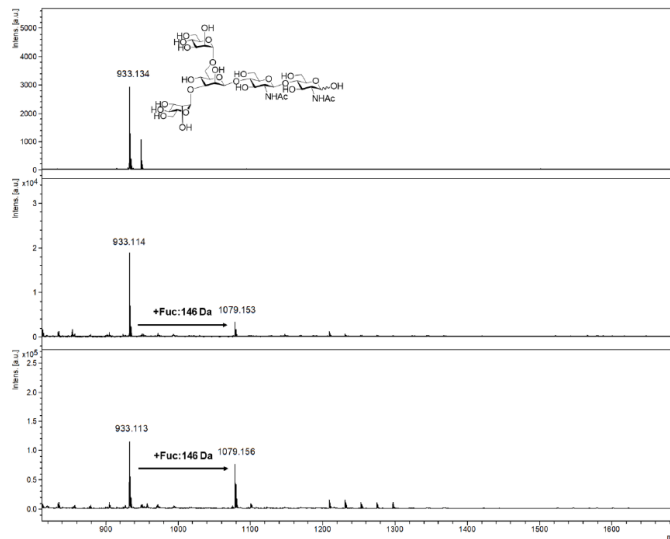


Figura 55. Espectro MALDI-TOFF de M3N2 $[M+Na]^+=933,134$ (panel superior) y reacción de M3N2 con FUT8 en presencia de GDP-Fucosa, mostrando la

conversión parcial en el glicopéptido fucosilado $[M+Na]^+=1079,15$ tras 18 h de incubación (panel intermedio) y tras 114 h de incubación (panel inferior).

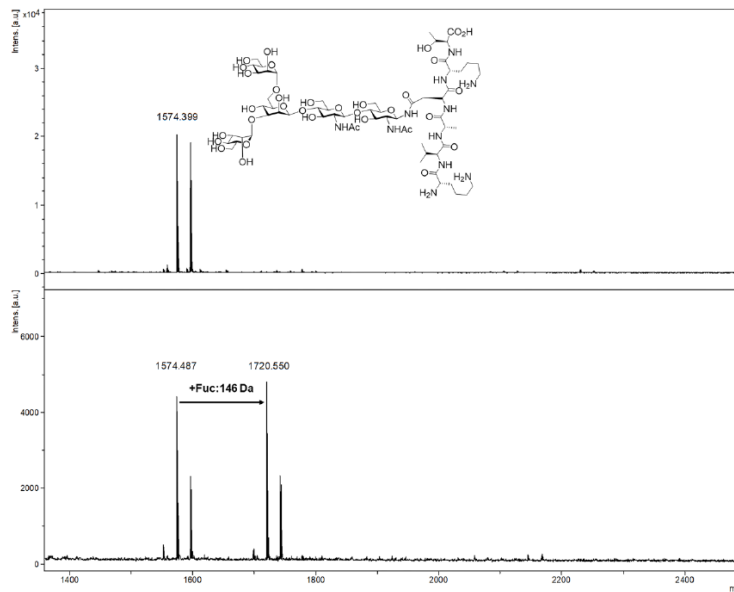


Figura 56. Espectro MALDI-TOFF de M3N2-péptido $[M+Na]^+=1574,399$ (panel superior) y reacción de M3N2-péptido con FUT8 en presencia de GDP-Fucosa (panel inferior) mostrando la conversión parcial en el glicopéptido fucosilado $[M+Na]^+=1720,55$ tras 18 h de incubación.

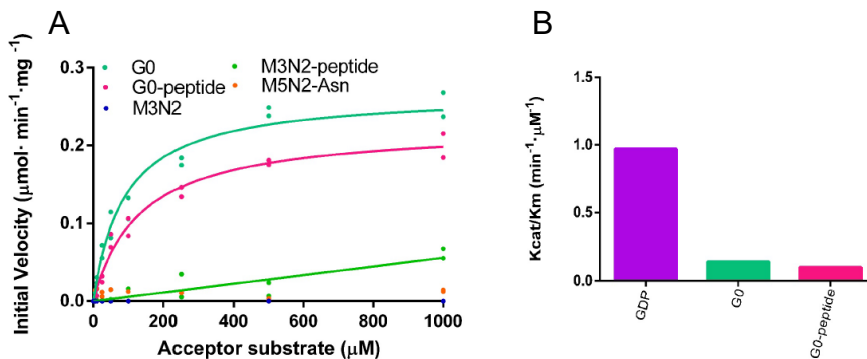


Figura 57. Cinética enzimática de FUT8 frente a los distintos N-glicanos y oligosacáridos unidos a Asn, y N-glicopéptidos. (A) Cinéticas de glicosilación de FUT8 frente a los diferentes sustratos aceptores. (B) Gráfica de comparación de las eficiencias catalíticas de FUT8 frente a GDP-Fucosa, G0 y G0-péptido. Los datos adicionales de las cinéticas se muestran en la **Tabla**

9. Los parámetros cinéticos no se pudieron obtener para M3N2-péptido ni M5N2-Asn y no se observó glicosilación con M3N2.

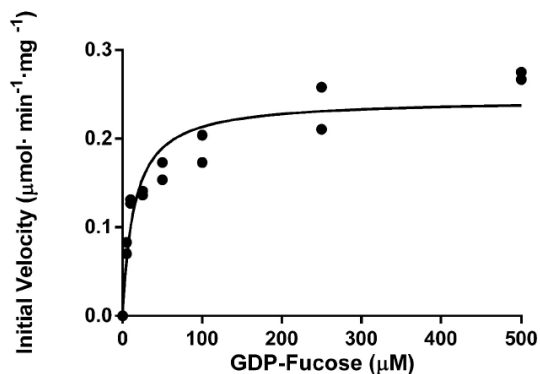


Figura 58. Cinética de FUT8 frente a concentraciones variables de GDP-Fucosa usando 500 μM de G0.

Tabla 9. Parámetros cinéticos de la fucosilación de FUT8 frente a diferentes N-glicanos y oligosacáridos unidos a Asn, y N-glicopéptidos usados en nuestro estudio. La primera línea define los parámetros para el sustrato donador, GDP-Fucosa.

	K_m (μM)	V_{mas} (nmol·min ⁻¹ ·mg ⁻¹)	k_{cat} (min ⁻¹)	k_{cat}/K_m (min ⁻¹ ·μM ⁻¹)
GDP-Fucosa*	14,56 ± 3,4	244,3 ± 13,1	14,17 ± 0,76	0,97
G0	113,1 ± 15,43	282,1 ± 11,72	15,62 ± 0,5	0,14
G0-péptido	133,1 ± 19,99	224,7 ± 10,68	13,03 ± 0,62	0,1
M3N2	**	**	**	**
M3N2-péptido	***	***	***	***
M5N2-Asn	***	***	***	***

* La K_m de GDP-Fucosa se determinó en presencia de G0 saturante.

** No activo

***Parámetros cinéticos no determinados, los datos no se pudieron ajustar a la ecuación no lineal de Michaelis-Menten debido a que, bajo nuestras condiciones, la actividad de FUT8 frente a concentraciones crecientes de los

N-glicanos aumentaba linealmente y por tanto no se llegó a alcanzar la saturación de la enzima.

La reacción de transferencia fue también ~10 veces más eficiente catalíticamente para GDP-Fucosa que para G0, debido sobre todo a una mejor K_m (~8 veces mejor K_m de GDP-Fucosa que la de G0). Por otro lado, y de forma esperada debido al análisis por MALDI-TOF, la velocidad de FUT8 frente a M3N2-péptido era más lenta que para G0 y G0-péptido a una concentración de sustrato aceptor de 1 mM (**Figura 57A**), mucho más lenta para M5N2-Asn (~3,6 y 14 veces más lentas en comparación con G0/G0-péptido, respectivamente) e inactiva para M3N2. Los datos no se pudieron ajustar frente a M3N2-péptido y M5N2-Asn para obtener parámetros fiables ya que, a concentraciones altas de sustrato aceptor, FUT8 no estaba saturada. En conjunto, estos datos están respaldados por un estudio anterior que muestra que el complejo biantenarico N-glicano, G0-Asn, es mejor sustrato que M3N2-Asn y M5N2-Asn (Boruah *et al.*, 2020). Además, un informe reciente también respalda nuestros hallazgos de que los parámetros cinéticos son muy similares entre el G0 y el G0-péptido, lo que implica que el péptido no influye en los parámetros cinéticos del G0-péptido frente al G0 (Zhang *et al.*, 2021). En resumen, mientras que la presencia del péptido no hace diferencia en los parámetros cinéticos de FUT8 frente a G0 y G0-péptido, está claro que sí juega un papel crítico en la fucosilación de M3N2-péptido.

4.2.3. TERMODINÁMICA DE FUT8 FRENTE A LOS DIFERENTES N-GLICANOS Y N-GLICOPÉPTIDOS

Para determinar los parámetros termodinámicos de FUT8 frente a los diferentes N-glicanos y oligosacáridos unidos a Asn, y los N-glicopéptidos, llevamos a cabo experimentos de ITC (ver materiales y métodos). En primer lugar, determinamos la K_d para GDP ($K_d = 6,1 \pm 1,4 \mu\text{M}$, **Tabla 10**, **Figura 59A**, y panel superior de la **Figura 59B**). A partir de ahí, evaluamos si la enzima necesita la unión de GDP para que tenga lugar la unión de G0. Mientras que en ausencia de GDP, FUT8 muestra una unión muy mala a G0 ($K_d = 318 \pm 139 \mu\text{M}$), si estamos en presencia de GDP saturante, la unión mejora significativamente ($K_d = 8 \pm 1,3 \mu\text{M}$; en torno a 40 veces mejor en presencia de GDP, **Figura 59A, B y Tabla 10**). La pobre unión en ausencia de GDP concuerda con datos previos de SPR donde la K_d fue $390 \mu\text{M}$ (Kötzler *et al.*, 2013). Estos datos nos permiten concluir que FUT8 sigue un mecanismo cinético ordenado bi-bi. En este mecanismo, que también está apoyado por la estructura cristalina del complejo, la enzima se encuentra en un estado inactivo en forma apo (*loops* abiertos) y cambia a un estado activo (*loops* cerrados) en presencia de GDP-Fucosa. Este mecanismo implica un ajuste inducido por GDP-Fucosa, donde el nucleótido azucarado induciría el cierre de varios *loops* para llegar a una conformación activa (Boruah *et al.*, 2020). Este mecanismo de ajuste inducido se ha convertido en un mecanismo general que siguen muchas GTs.

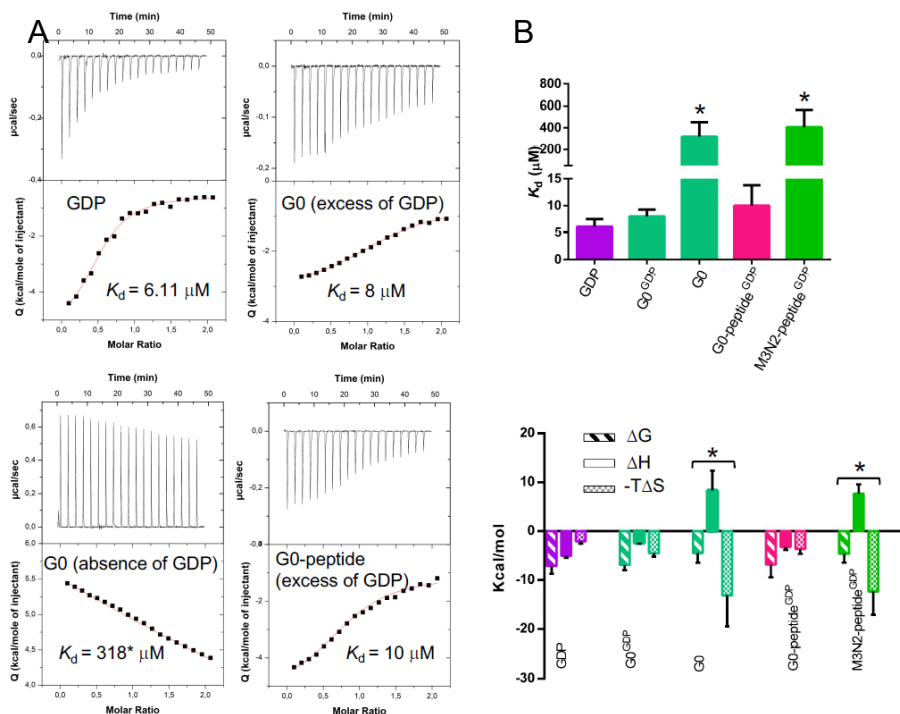


Figura 59. Datos del ITC de algunos N-glicanos frente a FUT8. (A) Arriba: termograma (potencia térmica frente a tiempo). Abajo: Isotherma de unión (calor normalizado frente a *ratio molar*). (B) Panel superior: Gráfica de comparación de las K_d s de los diferentes ligandos. Panel inferior: parámetros termodinámicos para cada ligando. Se muestran la energía libre de Gibbs (ΔG), la entalpía (ΔH) y la entropía ($-T\Delta S$) en kcal/mol. Los resultados con valor negativo muestran una contribución favorable a la unión, y los positivos una contribución desfavorable.

Habiendo establecido que la presencia de GDP conlleva una mejor unión a G0, procedimos a determinar los parámetros termodinámicos para G0-péptido, M3N2, M3N2-péptido y M5N3-Asn en presencia de GDP saturante. Tal y como vimos que ocurría con los parámetros cinéticos, no hay diferencias significativas entre los datos para G0 y G0-péptido. Esto implica que el péptido tampoco es importante para la unión de G0-péptido. En cambio, vimos que FUT8 se une a M3N2-péptido ($K_d = 406 \pm 159 \mu\text{M}$) y no a M3N2 (Tabla 10, Figura 60).

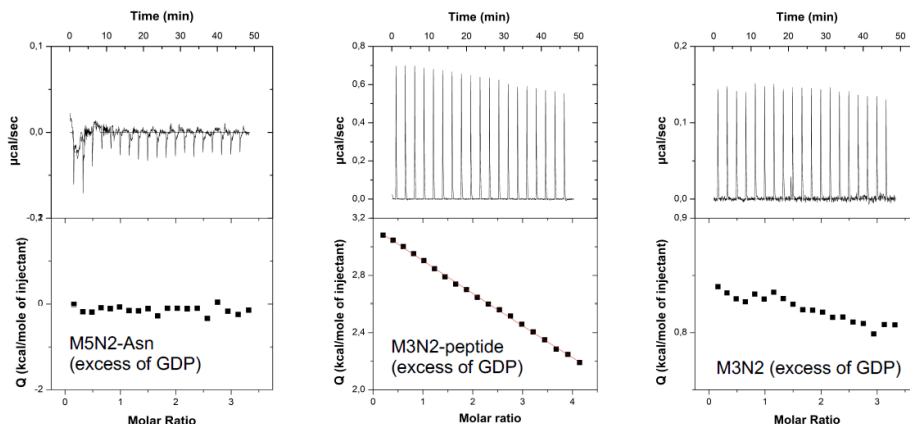


Figura 60. Datos de ITC para la unión de M5N2-Asn, M3N2-péptido y M3N2 frente a FUT8 en presencia de un exceso de GDP (1mM). Arriba: termograma (potencia térmica frente a tiempo). Abajo: Isotherma de unión (calor normalizado frente a *ratio molar*).

De hecho, no pudimos determinar la K_d para M3N2 (**Tabla 10**). Esto claramente nos sugiere que el péptido mayormente juega un papel importante en la unión de M3N2-péptido y es la razón por la cual este N-glicano es sustrato de FUT8, aunque tenga una afinidad moderada. Además, tampoco pudimos observar un perfil de titulación de unión para M5N2-Asn, probablemente porque fue uno de los peores sustratos para FUT8. Un análisis detallado de los parámetros termodinámicos indica que la unión de los distintos aceptores de FUT8 están entrópicamente dirigidos ($-T\Delta S$), mientras que la unión de GDP se vio favorecida por una ganancia en entalpía (ΔH), (**Figura 59B, panel inferior**, y **Tabla 10**), lo que implica distintos comportamientos de interacción entre estas moléculas. El perfil termodinámico mostrado por los diferentes aceptores puede deberse a la liberación de un gran número de moléculas de agua de la superficie de FUT8 tras la unión del aceptor, promoviendo la ganancia de entropía de desolvatación. Por el contrario, la reducción significativa en la movilidad del sustrato donador, GDP-Fucosa, al unirse a la enzima, junto con el gran número de enlaces de hidrógeno entre el GDP y FUT8 son en gran medida los principales

factores que explican la reducción en el componente entrópico y la entalpía favorable.

Tabla 10. Parámetros termodinámicos para los N-glicanos y oligosacáridos unidos a Asn y los N-glicopéptidos frente a FUT8. K_d es la constante de disociación ($1/K$), y ΔG , ΔH y $-T\Delta S$ los parámetros termodinámicos. La estequiometría de unión en cada caso es cercana a 1. Exceptuando el primer ITC, el resto se hicieron en presencia y ausencia de GDP.

	K_d (μM)	ΔG (kcal/mol)	ΔH (kcal/mol)	$-T\Delta S$ (kcal/mol)	n
GDP	$6,1 \pm 1,4$	$-7,09 \pm 1,65$	$-5,02 \pm 0,4$	$-2,07 \pm 0,48$	0,6
G0 (con GDP)	$8 \pm 1,3$	$-6,89 \pm 1,11$	$-2,42 \pm 0,15$	$-4,47 \pm 0,72$	1,2
G0 (sin GDP)	$318 \pm 134^{**}$	$-4,75 \pm 2$	$8,35 \pm 4,05$	$-13,1 \pm 6,35$	1,6
G0-péptido (con GDP)	10 ± 4	$-6,82 \pm 2,6$	$-3,2 \pm 0,56$	$-3,62 \pm 0,99$	0,84
M3N2-péptido (con GDP)	$406 \pm 159^{**}$	$-4,6 \pm 1,8$	$7,7 \pm 1,9$	$-12,3 \pm 4,8$	1,6
M3N2 (con GDP)	*	*	*	*	*
M5N2-Asn (con GDP)	*	*	*	*	*

* No medible bajo nuestras condiciones. Puede deberse a que la unión es demasiado débil.

** Valores estimados del ajuste.

Como conclusión, aunque el péptido en G0-péptido no tenga un papel significativo en la unión a FUT8, la presencia de dicho péptido en M3N2-péptido es clave para su unión y catálisis. Estas diferencias

podrían atribuirse a que G0 ya es un muy buen sustrato para FUT8 y el péptido no contribuye mucho a esta unión ya de por sí buena. Sin embargo, M3N2 es un N-glicano con una unión muy mala y, por tanto, al añadir el péptido si mejora la unión a FUT8 y por tanto la catálisis.

4.2.4. DINÁMICA MOLECULAR Y RMN-NOESY FRENTE A M3N2-PÉPTIDO Y M3N2

Una publicación reciente (Zhang *et al.*, 2021) planteó la hipótesis de que la presencia del péptido podría impulsar la conformación anti- ψ de la quitobiosa GlcNAc del N-glicano en estado libre. Tal como demostramos anteriormente, esta conformación, que es menos estable en relación con la conformación típica syn- ψ que se encuentra en solución, era necesaria para el reconocimiento y la catálisis de FUT8 (ver apartado 4.2.1 enfocado en el análisis estructural). Para determinar la veracidad de esa hipótesis, también realizamos simulaciones de dinámica molecular (MD) y experimentos de RMN tipo NOESY para calcular distancias medias internucleares del M3N2-péptido y M3N2. Se llevaron a cabo simulaciones tanto para el M3N2-péptido como para el M3N2 a partir de las conformaciones *syn* y *anti* de la quitobiosa. Ambos conformeros *anti* cambiaron rápidamente a la conformación *syn* más estable energéticamente, siendo la preferida entre las cuatro simulaciones (**Figura 61**).

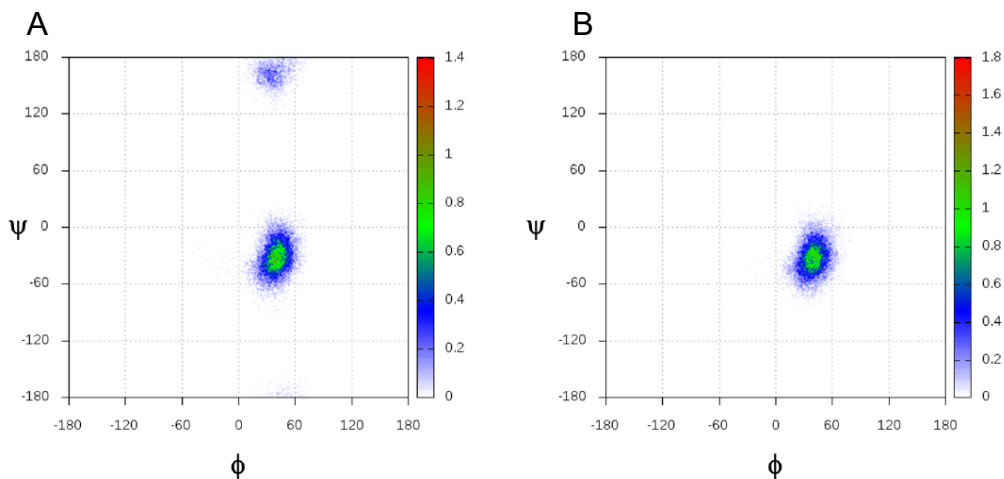


Figura 61. Simulación de dinámica molecular de M3N2-péptido. La distribución de los ángulos Φ/Ψ derivan de la simulación de 1 μ s de M3N2-péptido empezando en la conformación (A) *anti* y (B) *syn*. La definición del ángulo diédrico es $\Phi = \text{H1(B)-C1-(B)-O4(A)-C4(A)}$, y $\Psi = \text{C1-(B)-O4(A)-C4(A)-H4}$.

Además, para obtener la evidencia experimental de la conformación propuesta, se determinaron distancias medias internucleares a partir de las pendientes iniciales de las curvas de construcción NOE transitorias (**Figura 62**). Se adquirieron varios experimentos 2D-NOESY con un tiempo de mezcla creciente para el M3N2-péptido y M3N2. La superposición de señales en el espectro M3N2 hizo imposible la integración de suficientes señales aisladas para calcular cualquier distancia.

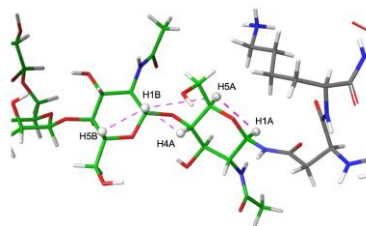
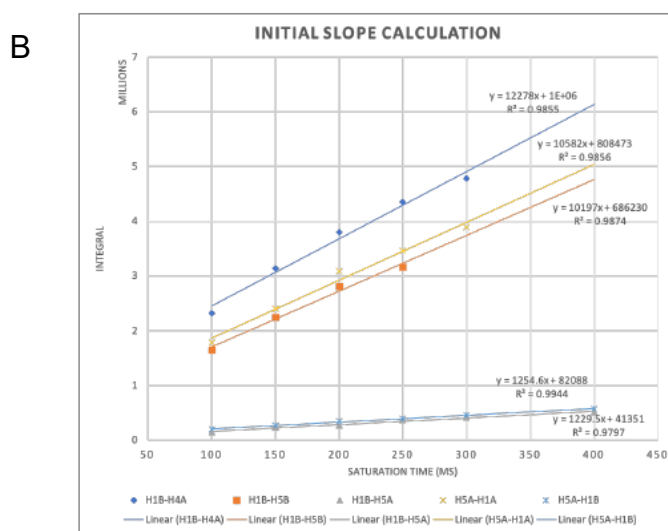
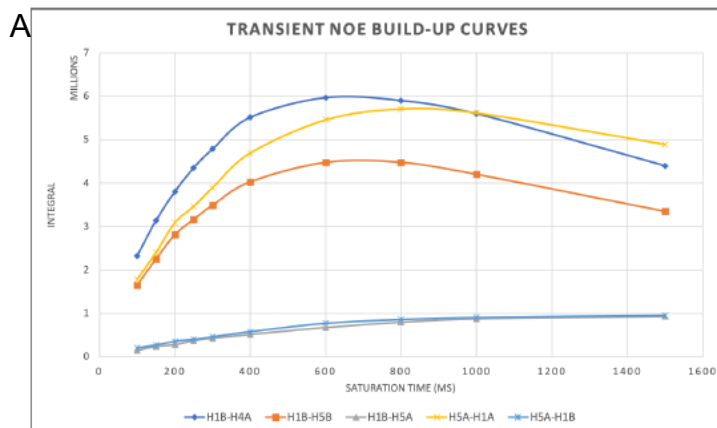


Figura 62. Distancias H1B-H4A y H1B-H5A consideradas para la asignación de las conformaciones *syn* y *anti* del enlace glicosídico entre los GlcNAc. Las distancias H1A-H5A y H1B-H5B se usaron como referencia.

Sin embargo, en el caso del M3N2-péptido fue posible obtener curvas de acumulación para varios pares de protones y se calcularon las pendientes de crecimiento inicial (**Figura 63**). Las distancias de referencia H1A-H5A y H1B-H5B se extrajeron de la simulación MD para mayor precisión (**Figura 64**), siendo 2,58 Å en ambos casos. A continuación, se determinaron las distancias interglucosídicas H1B-H4A y H1B-H5A utilizando la aproximación de pares de espines aislados que dan valores de 2,60 y 3,70 Å, respectivamente, que son compatibles solo con una conformación *syn* de GlcNAc-β1,4-GlcNAc (**Figura 65**), demostrando por tanto que el péptido no induce la conformación *anti* de la quitobiosa.



C

$$\frac{\sigma_{ij}}{\sigma_{ki}} = \frac{d_{ki}^6}{d_{ij}^6}$$

Figura 63. Medidas NOESY para M3N2-péptido. (A) Construcción de las curvas NOE para el par de protones seleccionado. (B) Cálculo de la pendiente inicial (σ). (C) Ecuación empleada para el cálculo de las distancias (d).

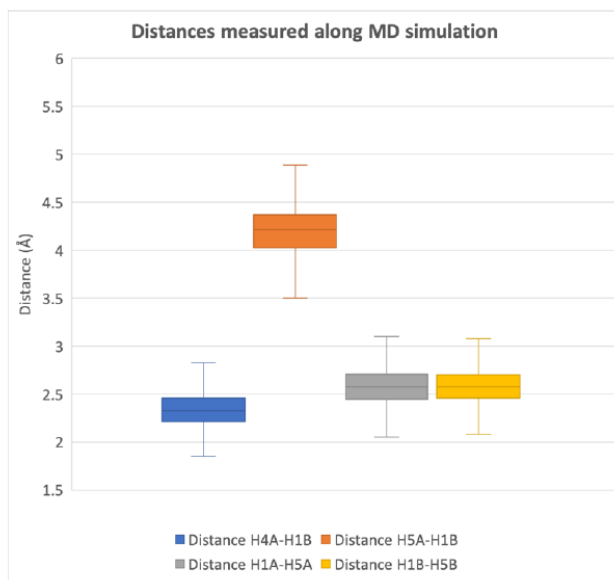


Figura 64. Simulación de dinámica molecular de M3N2-péptido. Distancias interatómicas medidas en 1 μ s de simulación de M3N2-péptido empezando en la conformación *syn*. Las distancias H1A-H5A y H1B-H5B se extrajeron como distancias de referencia para el cálculo de las distancias de los enlaces interglucosídicos.

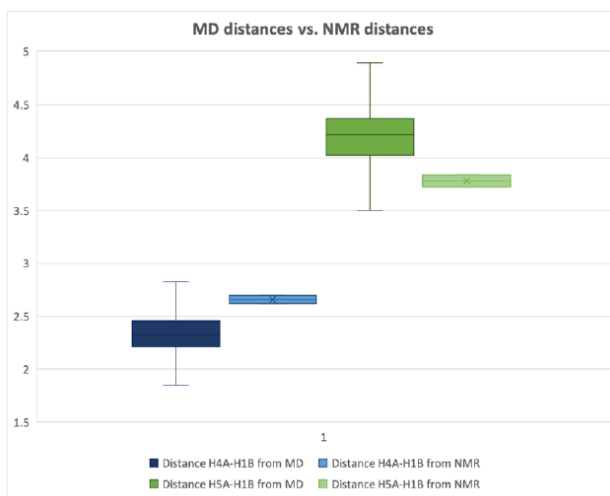


Figura 65. Determinación de la conformación de M3N2-péptido. Comparación de las distancias para H4A-H1B y H5A-H1B medidos de la conformación *syn*

en la simulación (azul y verde fuerte) y calculado de los datos de RMN (azul y verde claro).

4.2.5. ESPECTROSCOPIA DE RMN-STD DE FUT8 FRENTE A G0-PÉPTIDO, M3N2-PÉPTIDO, M3N2 Y EL PÉPTIDO SIN N-GLICANO

Habiendo establecido que el péptido no conduce a la conformación *anti* desfavorable en el estado libre, realizamos experimentos de RMN-STD para arrojar luz sobre el papel del péptido en la fucosilación de los N-glicanos. RMN-STD permite mapear los epítomos de unión de ligandos en complejos con grandes moléculas. Inicialmente, determinamos que el péptido en sí mismo no interactúa con FUT8 en ausencia o presencia de GDP, lo que implica que el péptido probablemente sea reconocido por FUT8 solo en el contexto de un N-glicopéptido (**Figura 66**).

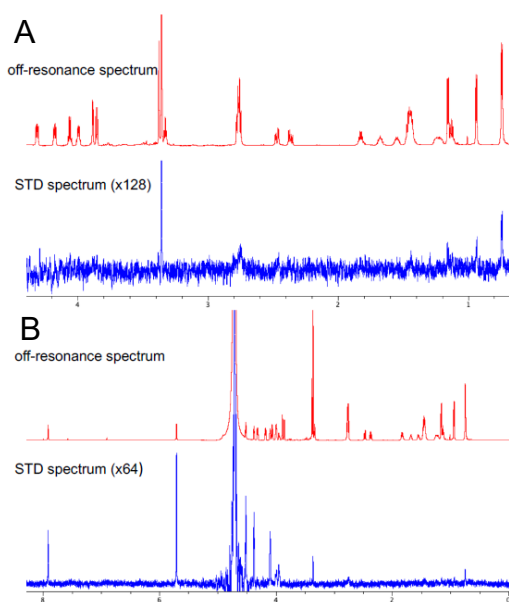


Figura 66. Análisis del espectro de RMN-STD para el péptido (KVANKT) en complejo con FUT8 en ausencia (A) y en presencia de GDP (B). El espectro

esta escalado tal y como se indica. La saturación de proteína se alcanzó mediante irradiación a -0,5 ppm.

A continuación, realizamos RMN-STD para FUT8 frente a M3N2 y M3N2-péptido en las mismas condiciones descritas anteriormente (**Figura 67-68**). Nuevamente, no se observaron señales de STD probablemente debido a la escasa afinidad de estos ligandos con FUT8. Dado que no pudimos obtener información sobre la interacción del péptido con FUT8 utilizando el péptido solo o M3N2-péptido, decidimos realizar experimentos de RMN-STD adicionales utilizando el G0-péptido. El G0-péptido mostró claramente señales de STD. Los efectos de STD para G0-péptido se midieron bajo tiempos de saturación de RMN crecientes, produciendo curvas de acumulación que se usaron para calcular las tasas de acumulación, que se normalizaron dándole al valor más alto el valor de 100% (**Figura 69**).

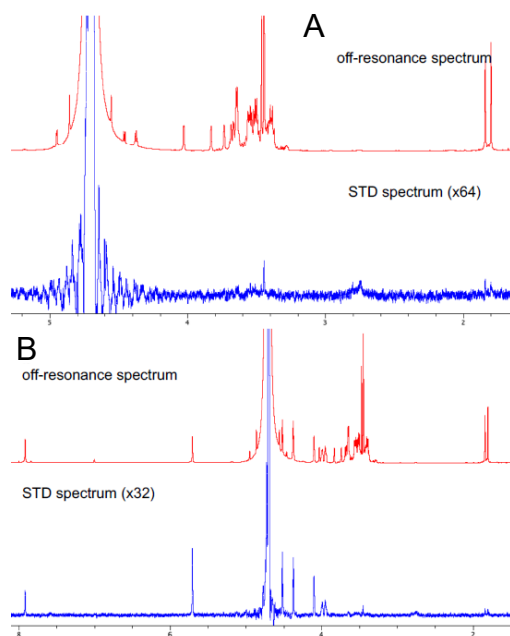


Figura 67. Análisis del espectro de RMN-STD para M3N2 en complejo con FUT8 en ausencia (A) y en presencia de GDP (B). El espectro está escalado

tal y como se indica. La saturación de proteína se alcanzó mediante irradiación a -0,5 ppm.

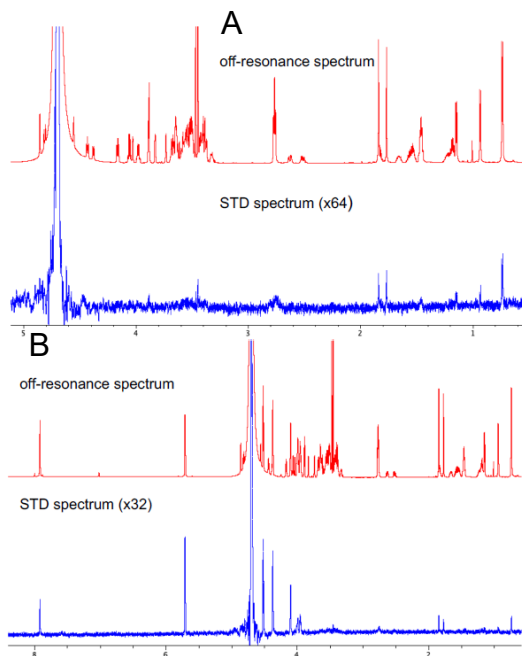


Figura 68. Análisis del espectro de RMN-STD para M3N2-péptido en complejo con FUT8 en ausencia (A) y en presencia de GDP (B). El espectro está escalado tal y como se indica. La saturación de proteína se alcanzó mediante irradiación a -0,5 ppm.

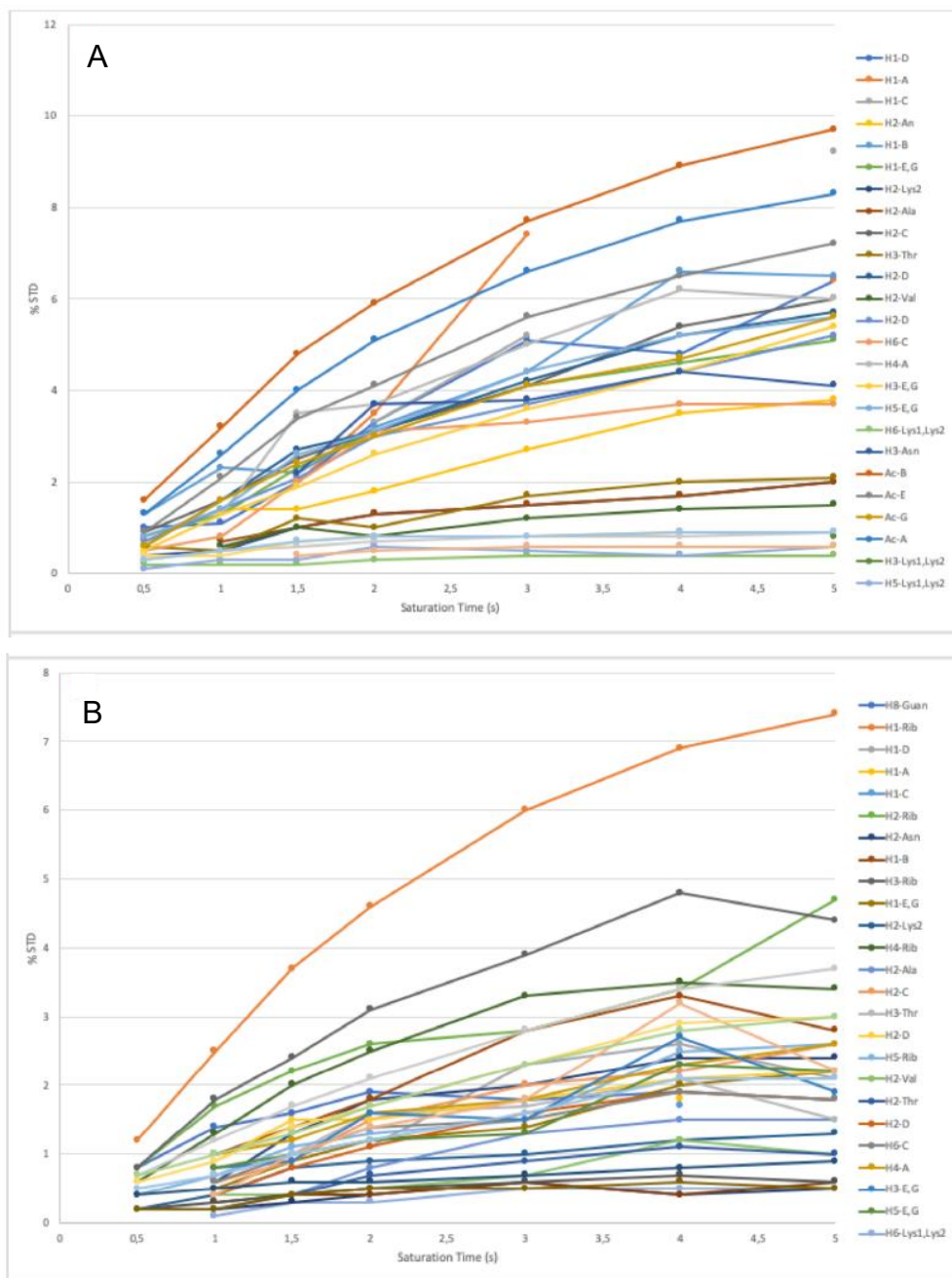


Figura 69. Reconstrucción de las curvas de RMN-STD para G0-péptido en complejo con FUT8 en ausencia (A) y presencia de GDP (B).

Este procedimiento se llevó a cabo en ausencia y presencia de GDP para determinar si la unión previa de GDP a FUT8 conduce a cambios en el reconocimiento de G0-péptido. En RMN-STD, cuanto mayor es el efecto de STD, más cerca está la distancia del protón observado a la proteína. (**Figura 70** y **Figura 71**). Como las señales de STD que surgen de los protones de GlcNAc^E y GlcNAc^G investigadas se superpusieron, el análisis se basa en el promedio de los efectos de STD de ambos residuos. En ausencia de GDP (**Figura 71A**), se observa un efecto STD moderado para cada anillo del azúcar, particularmente H1 y H4 en GlcNAc^A que muestra la saturación de transferencia más alta.

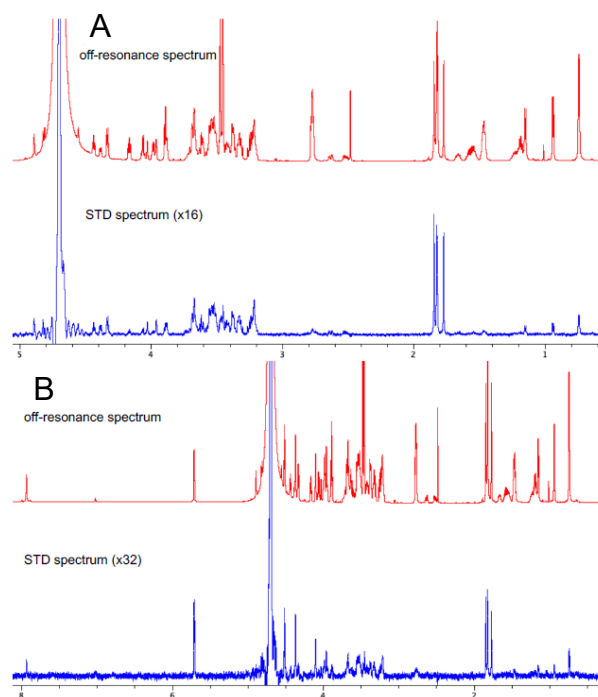


Figura 70. Análisis del espectro de RMN-STD para G0-péptido en complejo con FUT8 en ausencia (A) y en presencia de GDP (B). El espectro está escalado tal y como se indica. La saturación de proteína se alcanzó mediante irradiación a -0,5 ppm.

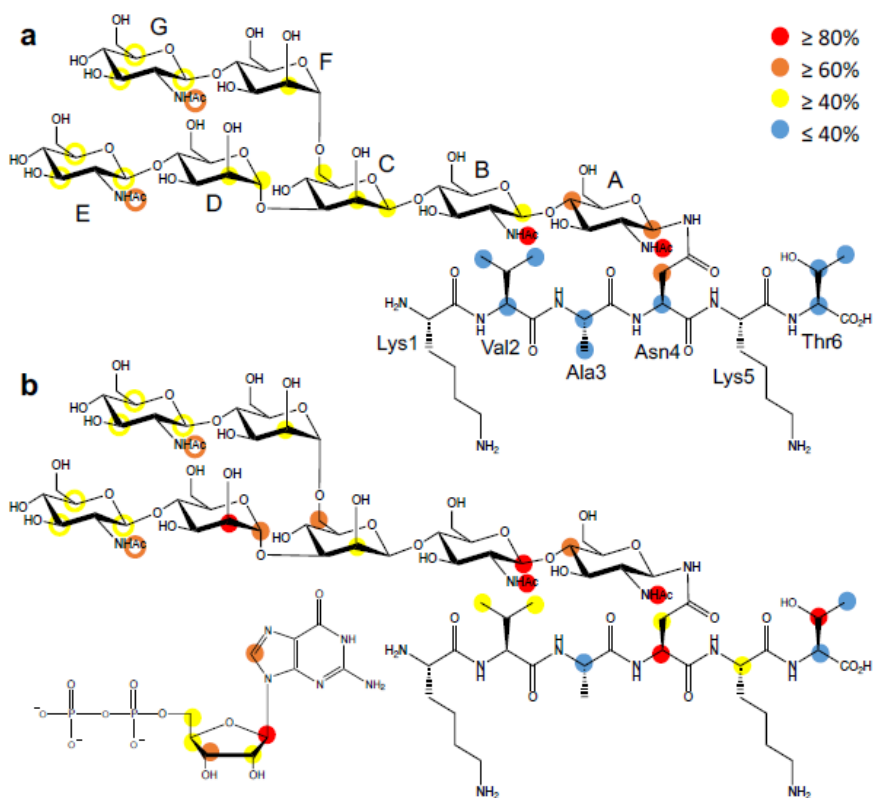


Figura 71. Mapeo del epítipo de unión a G0-péptido con FUT8 mediante STD y llevado a cabo en ausencia (A) y presencia (B) de GDP. La saturación de la proteína se alcanzó por irradiación a $-0,5$ ppm. Los círculos coloreados representan la intensidad STD normalizada. Solo se indican las respuestas STD de los protones que pudieron medirse apropiadamente. Los círculos vacíos indican la suma del solapamiento de intensidades STD entre GlcNac^E y GlcNac^G.

Sorprendentemente, los cuatro grupos acetilo mostraron valores elevados de STD, especialmente los de GlcNac^A y GlcNac^B. La estructura peptídica mostró valores bajos, a lo largo de todo el fragmento (KVANKT), con sólo señales de STD significativas en Asn4, el residuo glicosilado. El mapa del epítipo coincide cualitativamente con el que se infiere de la estructura cristalográfica de FUT8 en complejo con G0 (código PDB: 6TKV) donde todo el heptasacárido

encaja en un surco en forma de Y donde GlcNAc^A es el azúcar más íntimamente reconocido por FUT8.

Cuando el experimento de STD se adquiere en presencia de GDP (**Figura 71B**), se observa un aumento general del efecto STD para todas las señales de protones. Este aumento es particularmente notable para las unidades de azúcar A, B, C y D. Aunque del cristal inferimos que FUT8 reconocía GlcNAc^E mejor que GlcNAc^G, no pudimos inferir esos hallazgos del experimento de RMN-STD porque las señales de STD para GlcNAc^E y GlcNAc^G se superpusieron en los espectros.

Los protones del péptido también mostraron un aumento en los efectos de STD, especialmente para Asn4 y Thr6 y en menor medida Val2, lo que apunta a una interacción más cercana del péptido con FUT8 en presencia de GDP. Sin embargo, y como se mostró anteriormente, FUT8 no mostró diferencias en afinidad entre G0 y G0-péptido, lo que implica que el péptido no contribuyó a la unión óptima global de G0 hacia FUT8 (**Figura 71B**).

Los efectos de STD sobre el GDP mostraron un patrón similar al encontrado en la estructura cristalina del complejo FUT8-GDP-G0. Además, realizamos simulaciones de dinámica molecular de 0,5 μ s para G0-péptido y M3N2-péptido unido a FUT8 en presencia de GDP, mostrando que el péptido era relativamente flexible en ambos complejos. El enlace de hidrógeno más poblado entre el péptido y la enzima se estableció entre la cadena lateral del Asn4 glicosilado y Gly217. En G0-péptido, la cadena lateral de Lys5 interactúa con Glu373, y en M3N2-péptido, se encontró un puente de hidrógeno poco poblado entre la cadena lateral de Thr6 y Asp368. En particular, esta interacción podría estabilizar el *loop* flexible que comprende Asp368 y Glu373, el cual es clave para la catálisis y puede explicar por qué el fragmento peptídico en M3N2 mejora la fucosilación (**Figura 72 y 73**).

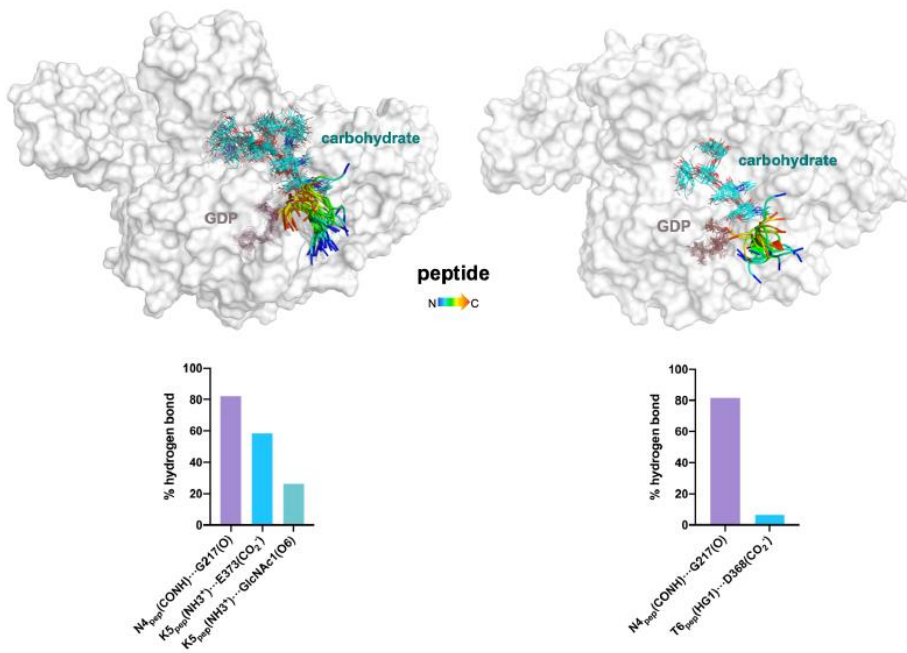


Figura 72. Ensamblaje estructural derivado de la simulación de 0,5 μ s llevada a cabo para FUT8 en complejo con G0-péptido (izquierda) y M3N2-péptido (derecha). En ambos, GDP está incluido en la simulación. Solo el primer *frame* de FUT8 se muestra en representación de superficie blanca. El glicano se muestra en *sticks* y el *backbone* del péptido como *cartoon*. Los enlaces de hidrógenos más poblados entre FUT8 y el péptido también están indicados (paneles inferiores).

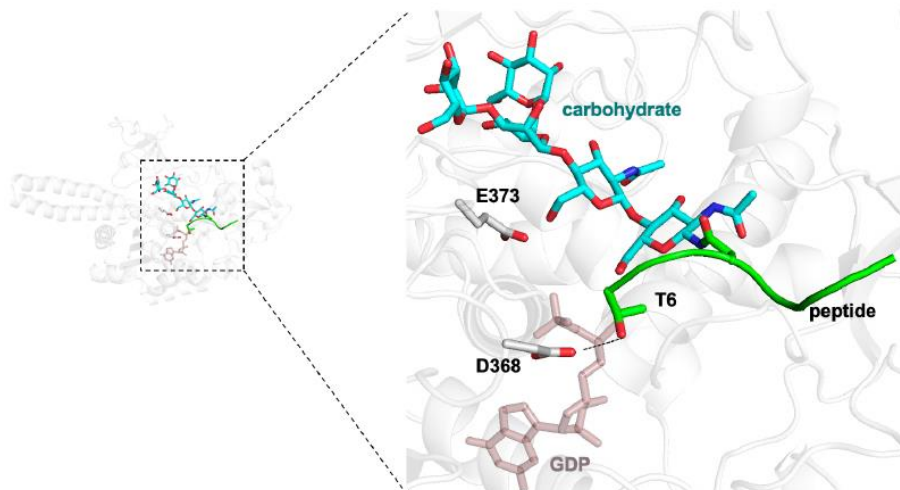


Figura 73. *Frame* representativa obtenida de la simulación de 0,5 μ s del complejo FUT8-GDP-M3N2-péptido, mostrando el puente de hidrógeno entre la cadena lateral de Thr6 y Asp368.

En resumen, nuestras mediciones de RMN-STD sugieren que las dos partes del N-glicopéptido pueden interactuar con FUT8. Sin embargo, el péptido mostró valores de STD mucho más bajos, indicando que hay distancias más largas a la superficie de la proteína, lo que implica que el péptido es más dinámico que el glicano como encontramos en nuestras simulaciones de MD. La presencia de GDP en el complejo no cambia drásticamente el epítipo del N-glicano. Sin embargo, mejora las interacciones de FUT8 con la mayoría de las unidades de azúcar y los residuos terminales del péptido, lo que respalda aún más las diferencias encontradas en K_d s para G0 en ausencia y presencia de GDP. Además, el hallazgo de que el péptido de M3N2-péptido es claramente reconocido por FUT8 proporciona una explicación plausible de por qué el péptido de M3N2-péptido podría mejorar su unión a FUT8 y, a su vez, promover la fucosilación central.

Curiosamente, FUT8 reconoce preferiblemente la secuencia peptídica Asn-Lys-Thr, que coincide con la de la OST, un complejo

multimérico que transfiere un oligosacárido preensamblado a residuos de asparagina seleccionados dentro de la secuencia consenso Asn-X-Ser/Thr (Mohorko *et al.*, 2011). Esto también implica que estas dos GTs, muy distantes con diferentes estructuras y distintos sustratos donadores/aceptores, compartan el mismo *sequon*.

4.2.6. FUCOSILACIÓN CENTRAL EN CÉLULAS

Primero examinamos un panel de N-glicoproteínas terapéuticas recombinantes estudiadas extensamente en células CHO modificadas por glicoingeniería. Incluimos una inmunoglobulina (IgG1) humana contra el virus de la rabia, eritropoyetina (EPO) y tres enzimas lisosomales, llamadas glucocerebrosidasa (GBA), α -galactosidasa (GLA) y aspartilglucosaminidasa (AGA) (**Figura 74**). Para obtener una perspectiva más global de la fucosilación central, también realizamos estudios de *knockout* (KO) dirigidos a una glicosiltransferasa clave (Mgat1) que produce N-glicanos con alto contenido de manosas, y la GlcNAc-1-fosfotransferasas (GNPTAB) que son responsables de marcar la M6P de un N-glicano con alto contenido de manosa para el direccionamiento lisosómico (**Figura 74A**). Luego realizamos el análisis de los sitios de N-glicosilación específicos para monitorear los efectos sobre la glicosilación de las proteínas purificadas secretadas por LC-MS, y solo el glicano más abundante en cada sitio se presenta en la **Figura 74** para demostrar los principales cambios entre las células de tipo silvestre (WT) y KO. Cuando se expresan en células CHO^{WT}, estas N-glicoproteínas llevan distintos repertorios de N-glicanos en los sitios de N-glicosilación seleccionados. Las enzimas lisosomales tienen uno o más tipos de N-glicanos complejos (principalmente biantenarios) con o sin núcleo de fucosa y uno o más marcados con M6P con alto contenido de manosa sin núcleo de fucosa (**Figura 74B**). Cuando la capacidad de etiquetar con M6P se elimina por el *knockout* del *gnptab*

(KO *gnptab*), los glicanos de manosas marcados con M6P se convierten en N-glicanos complejos dependiendo de donde esté el sitio de N-glicosilación con fucosilación central, como se describió anteriormente (Tian *et al.*, 2019b). Luego, eliminamos la capacidad para la formación de N-glicanos complejos (KO *mgat1*) para convertir todos los N-glicanos en estructuras con alto contenido de manosa (**Figura 74C**). Los N-glicanos en las enzimas lisosomales e IgG1 se convirtieron en N-glicanos con alto contenido de manosa sin núcleo de fucosa, sin embargo, curiosamente para la EPO, los dos sitios de finales de N-glicosilación tuvieron glicanos altos en manosa con núcleo de fucosa. Estos resultados confirman que FUT8 principalmente fucosila los N-glicanos complejos, pero también que de forma más aislada puede fucosilar determinados sitios de N-glicosilación con N-glicanos con alto contenido de manosas.

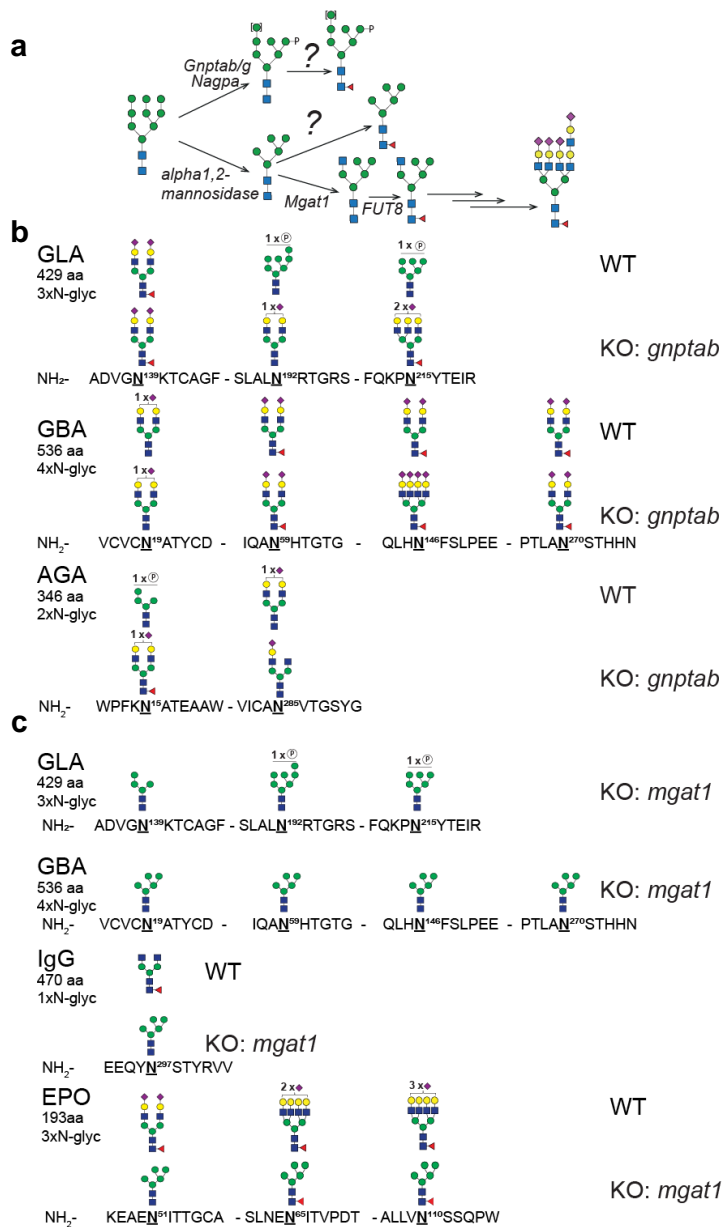


Figura 74. (A) Representación gráfica de los genes que participan en los primeros pasos de la síntesis de N-glicanos. (B y C) *In vivo* fucosilación central de los N-glicanos tras el análisis de los sitios específicos de las glicoproteínas recombinantes (IgG1, GLA, GBA, AGA y EPO) producidas en células CHO^{wt} y KO de *gnptab* y *mgat1*. Se muestran las estructuras de los glicanos más

abundantes para cada sitio de N-glicosilación de las proteínas producidas. Las estructuras de los glicanos se confirmaron por espectrometría de masas en tándem (MS/MS).

4.2.7. PAPEL DE LOS AMINOÁCIDOS MÁS CERCANOS AL N-GLICANO EN LA FUCOSILACIÓN CENTRAL

Nuestros hallazgos de que los sitios de N-glicosilación con N-glicanos complejos en Asn19^{GBA} y Asn285^{AGA} no están fucosilados implica que otros mecanismos distintos del azúcar terminal del brazo α (1,6) o del brazo α (1,3) están detrás de la fucosilación central. Para profundizar sobre la base molecular de esto, inspeccionamos las estructuras cristalinas de AGA, GLA y GBA. Además, también inspeccionamos los sitios aceptores de N-glicanos de la mieloperoxidasa humana (MPO) para los cuales se ha demostrado que Asn157/Asn317/Asn563 y Asn189/Asn225 son fucosilados y no fucosilados, respectivamente (**Figura 75**). La mayoría de estos sitios aceptores de N-glicanos están localizados en *loops*, tal y como se esperaba (Aebi, 2013).

La mayoría de los sitios aceptores de N-glicanos inspeccionados que estaban fucosilados en el núcleo, es decir, Asn59/Asn146/Asn270^{GBA}, Asn157/Asn317/Asn563^{MPO} y Asn215/Asn192^{GLA}, estaban expuestos al solvente, permitiendo así el acceso de FUT8 al N-glicano y, a su vez, la fucosilación central (**Figura 75**). Se podría esperar que la fucosilación del núcleo ocurriera solo en los *loops*. Sin embargo, Asn15^{AGA} y Asn192^{GLA} se encuentran en estructuras secundarias y son fucosilados (**Figuras 74 y 75**). En Asn15^{AGA}, aunque el OH6 del GlcNAc más interno está involucrado en un enlace de hidrógeno con el Glu44^{AGA} de uno de los monómeros que

forman el dímero, en el otro monómero, esta interacción no tuvo lugar. Esto implica que el OH6 del GlcNAc más interno quedaría accesible para ser fucosilado por FUT8. Sin embargo, no está del todo claro por qué Asn139^{GLA} es fucosilado ya que el grupo acetamida del GlcNAc más interno y el OH3 establecieron enlaces de hidrógeno con Asp175^{GLA}. Además, el metilo de la acetamida interaccionaba con Phe149^{GLA} por una interacción CH- π . Todas estas interacciones probablemente impiden la fucosilación central. Todos los demás sitios aceptores de N-glicanos no fucosilados, Asn19^{GBA}, Asn189/Asn225^{MPO} y Asn285^{AGA}, participan en diferentes interacciones con los aminoácidos circundantes de los sustratos aceptores. El GlcNAc más interno interactúa con los residuos de alrededor de la siguiente manera: a) el GlcNAc participa en una interacción CH- π con las cadenas laterales de Tyr22^{GBA} y Trp369^{MPO}; b) el grupo acetamido del GlcNAc estableció enlaces de hidrógeno con el *backbone* de Val199^{MPO} y la cadena lateral de Gln201^{MPO} y Thr287^{AGA}; y c) el OH6 del GlcNAc fue reconocido por enlaces de hidrógeno con las cadenas laterales Asp258^{AGA} y Ser227^{MPO} (**Figura 75**). Para estos casos particulares, es razonable que no puedan ser fucosilados ya que el acceso de FUT8 al sitio aceptor de N-glicanos está impedido. Además, los residuos que no interactúan con los sitios aceptores de N-glicanos, como Ile5^{GBA}, Asn192/Leu194/Leu196/Leu373^{MPO} y Val286^{AGA}, también impedirían la fucosilación del núcleo debido a choques estéricos con FUT8.

Finalmente, realizamos simulaciones en los N-glicanos de MPO, GLA, GBA y EPO presentes en las estructuras cristalinas. Hay que notar que, para EPO, Asn24, Asn38 y Asn83 en la estructura cristalina corresponden a Asn51, Asn65 y Asn110 en la secuencia completa. Además, en el caso de la proteína EPO, tres residuos de Lys de la estructura cristalina (Lys24, Lys38 y Lys83), que correspondía a residuos de Asn en la proteína de tipo silvestre, se cambiaron a Asn y

un resto GlcNAc se añadió manualmente para comprender cómo el azúcar podría afectar la unión de FUT8. Para MPO y GBA, no analizamos todos los N-glicanos porque no había azúcares unidos en todos los residuos de Asn. En general, encontramos que los residuos de GlcNAc más susceptibles a la fucosilación son aquellos que muestran el mayor nivel de área expuesta al solvente (SASA). Por lo tanto, el GlcNAc unido a Asn19^{GBA} proporciona un valor de SASA bajo, y esto está de acuerdo a la ausencia de fucosilación. Por otro lado, el GlcNAc unido a los residuos Asn317^{MPO}, Asn192^{GLA}, Asn139^{GLA}, Asn24^{EPO}, Asn38^{EPO} o Asn83^{EPO} exhibe valores altos de SASA, lo que explica la tendencia de estos residuos a sufrir fucosilación. La única excepción es el GlcNAc en Asn215^{GLA}, que presenta un valor bajo de SASA y muestra una clara preferencia por ser fucosilado (**Figura 76**).

En conclusión, no sólo la naturaleza del brazo α (1,3) o α (1,6) del N-glicano interviene en la fucosilación de FUT8, sino que además puede ser modulada por el entorno del N-glicano que rodea a los aminoácidos del sustrato aceptor. En particular, los residuos que interactúan con el GlcNAc más interno (por ejemplo, el azúcar per se o posiciones específicas como el grupo acetamido o el OH6) y los residuos que no interactúan con el N-glicano pueden bloquear el acceso de FUT8 al N-glicano, impidiendo la fucosilación del núcleo. Esto por tanto proporciona otra vía para regular la fucosilación central.

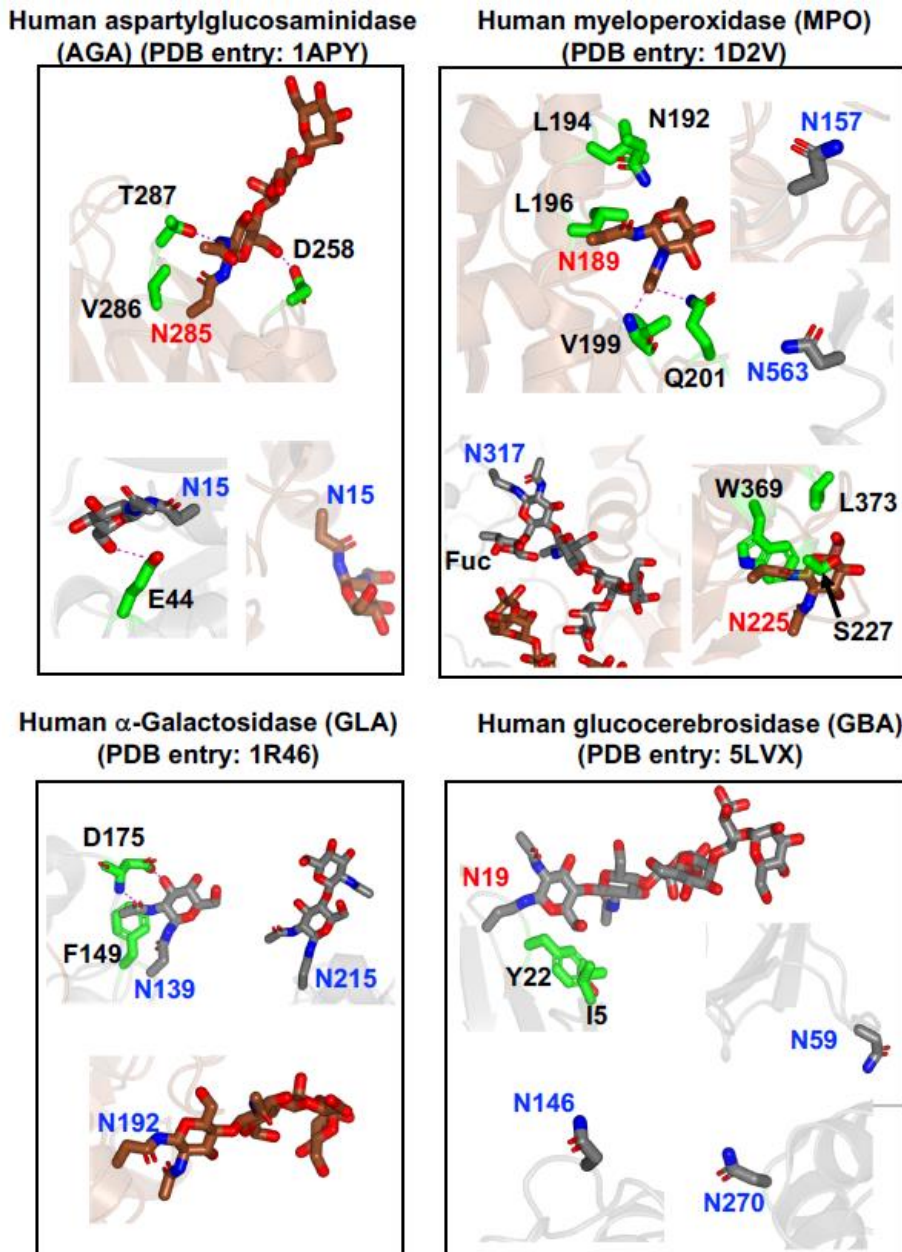


Figura 75. Estructuras amplificadas de los N-glicanos de GBA, MPO, AGA y GLA. Hay que prestar atención a que MPO, AGA y GLA son estructuras diméricas (representadas en color gris y marrón) mientras que GBA es monomérica (gris). Asn y los residuos alrededor del N-glicano se muestran como *sticks* con los átomos de carbono en gris/marrón y verde,

respectivamente. Las interacciones mediante enlace de hidrógeno se muestran como líneas punteadas de color magenta. La numeración de los residuos en las estructuras no se corresponde con la numeración de la proteína completa.

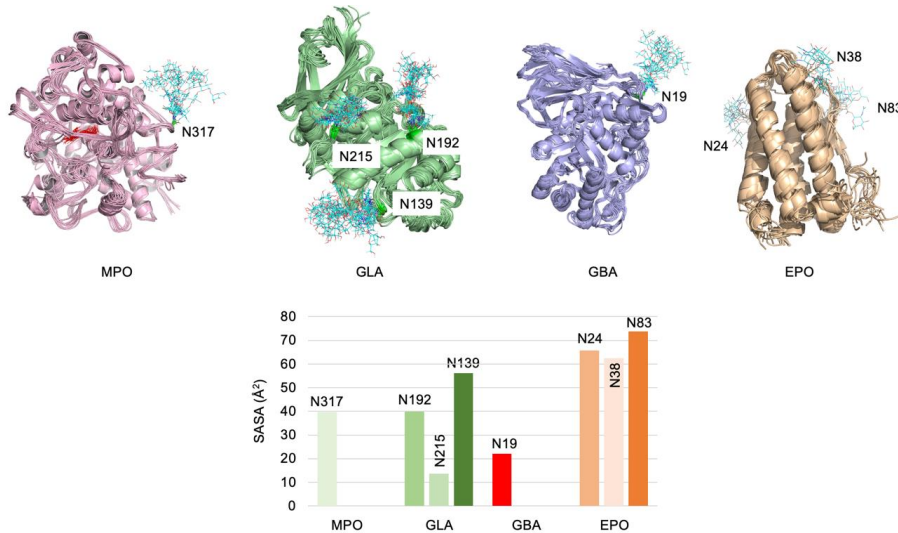


Figura 76. Ensamblaje estructural obtenido de la simulación de 0,5 μ s de MPO (código del PDB: 1D2V), GLA (código del PDB: 1R46), GBA (código del PDB: 5LVX) y EPO (código del PDB: 1CN4). Las proteínas se muestran en *cartoon* y los glicanos como *sticks*. El área de la superficie accesible al solvente (SASA) se muestra para el grupo hidroximetilo que es el grupo que será potencialmente fucosilado por FUT8. El GlcNAc del residuo Asn19, que muestra uno de los SASA más bajos no está fucosilado.

CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

5.1. EFECTORES DE LA FAMILIA NleB/SseK

Entender por qué *Salmonella entérica* presenta tres efectores que son ortólogos de la NleB es complicado ya que hay muchas diferencias tanto en los patógenos en sí (*Salmonella entérica*, *E.coli* EPEC/EHEC, *Citrobacter rodentium*), como en la localización de dichos efectores dentro de las células huésped. Con nuestro estudio, hemos podido elucidar la base molecular de la especificidad de sustrato que presentan y que recae en un único residuo, variable entre los efectores SseK y NleB, y que se localiza en la interfaz del complejo NleB/SseK-sustrato. La mutación de dicho residuo (Ser286^{SseK1} o Asn302^{SseK2} a Tyr^{NleB/NleB1}), confiere a dichos mutantes la capacidad de alcanzar parámetros cinéticos y termodinámicos óptimos. Además, con esta mutación conseguimos hacer activos a los mutantes S286Y^{SseK1} y N302Y^{SseK2} frente a sustratos que no lo son originalmente (FADD^{DD} para SseK1 y DR3^{DD} para SseK2). Gracias a esto, también se le confiere al patógeno *Salmonella* una mayor supervivencia y abundancia en la infección de macrófagos. Esto ocurre ya que este residuo que mutamos, confiere estabilidad a la interacción entre el residuo aceptor del sustrato (un residuo de arginina) con la base catalítica. Dentro de nuestro conocimiento, es la primera vez que una única mutación es capaz de activar una enzima con parámetros cinéticos óptimos frente a sustratos proteicos por los que no presenta ninguna actividad. En general, nuestro estudio proporciona las bases moleculares de las diferencias entre la especificidad de sustrato de los efectores NleB/SseK y ofrece pistas sobre la patogénesis molecular de los enteropatógenos.

Dentro del contexto en el que se ha desarrollado la presente tesis doctoral, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- Se han conseguido identificar los residuos clave de la interacción enzima-sustrato proteico del complejo NleB1^{EPEC}-UDP-FADD^{DD} para producir los mutantes seleccionados en este estudio.
- Se ha conseguido expresar y purificar dichos mutantes, y posteriormente caracterizarlos cinéticamente y termodinámicamente frente a los dos sustratos, FADD^{DD} y DR3^{DD}.
- En general, los residuos mutados confieren una mayor afinidad a dichos mutantes para FADD^{DD}, siendo una mutación simple en las posiciones Ser286 de SseK1 y Asn302 de SseK2 a Tyr la que conlleva a alcanzar los parámetros más óptimos de catálisis y unión asemejándose a los efectores NleB.
- Frente a FADD^{DD} en la posición Ser286^{SseK1} o Asn302^{SseK2} el mejor residuo es una tirosina, seguida de asparagina, y finalmente tanto un residuo de serina como de isoleucina inactivan a las enzimas. Para DR3^{DD}, el mejor residuo es también una tirosina, seguido de serina y de isoleucina, y finalmente un residuo de asparagina las inactiva.
- Los mutantes S286Y^{SseK1} y N302Y^{SseK2} expresados en una cepa de *Salmonella enterica* en las que los genes codificando para SseK1, SseK2 y SseK3 han sido eliminados presentan una mayor proliferación en la infección de macrófagos, y probablemente produce una cepa más virulenta si estas mutaciones fuesen presentes en las tres enzimas.

5.2. FUT8

FUT8 es la única enzima responsable de la fucosilación central en N-glicoproteínas de mamíferos. A pesar de muchos años de investigación sobre FUT8, su mecanismo de reacción permanecía desconocido y el requisito de un GlcNAc terminal en el brazo α (1,3) del N-glicano para una fucosilación óptima no se entendía bien. Con la resolución de la estructura apo, se elucidó la arquitectura de la enzima, sin embargo, esta estructura no ofrecía pistas sobre el mecanismo de reacción o el reconocimiento del sustrato.

A lo largo de la presente tesis, hemos conseguido determinar la estructura cristalina del complejo *HsFUT8*-GDP-G0, concluyendo que la enzima sufre grandes cambios conformacionales en presencia de los ligandos, GDP/GDP-Fucosa y el N-glicano. Lo especial de estos cambios conformacionales, se debe a que el movimiento inducido por GDP y probablemente GDP-Fucosa trae los residuos que son necesarios para el reconocimiento de GDP-Fucosa/GDP y en parte G0. En cuanto a las características del N-glicano, lo llamativo es la conformación anti- ψ que adopta la estructura de la quitobiosa, que es más inestable que la conformación syn- ψ encontrada en disolución.

El sitio de reconocimiento del N-glicano es un exosítio formado por los *loops* β 10- β 11 y el dominio SH3. Los dominios SH3 son dominios pequeños que no cumplen una función catalítica dentro de la proteína, se pueden encontrar en numerosas proteínas multidominio cuyas funciones pueden ser muy variadas. Generalmente actúan como sitios de anclaje para la unión de sustratos y la formación de complejos supra-macromoleculares, además es común que estén involucrados en transducción de señales en el citosol (Mayer, 2001). Según un estudio de Tomida *et al.*, este dominio es muy importante para la actividad, y nuestro trabajo explicaría el motivo de esa importancia. Además, con

nuestro trabajo demostramos por primera vez que el dominio SH3 de FUT8 interacciona con glicanos, lo cual no se había visto anteriormente y es un hallazgo que demuestra que estos dominios pueden ser versátiles y reconocer otras moléculas diferentes a proteínas.

La desregulación de FUT8 se relaciona con un gran número de diferentes patologías. Con la aplicación de nuestro estudio multidisciplinar hemos encontrado dos potenciales mecanismos que están detrás de las preferencias de sustrato de FUT8. En el primero, los residuos de los brazos α (1,3)/ α (1,6) determinan el reconocimiento de FUT8 en N-glicanos complejos o N-glicanos ricos o más pobres en manosas, siendo los primeros los preferidos por la enzima. El segundo modulador de la fucosilación está impulsado por la naturaleza de los residuos del entorno del sitio de N-glicosilación. Las interacciones mediante enlaces de hidrógeno junto con los residuos no interaccionantes de la proteína, bloquearían la unión de FUT8 a los N-glicanos, impidiendo la fucosilación.

Aunque FUT8 reconoce los aminoácidos subyacentes y, en particular, el sequon OST, este reconocimiento probablemente no sea importante en el proceso general de fucosilación en N-glicanos complejos. Por el contrario, encontramos que el reconocimiento de péptidos es clave para la fucosilación de N-glicanos ricos o más pobres en manosas. También descubrimos que algunos sitios aceptores de N-glicanos complejos no están fucosilados en las células debido a los residuos de aminoácidos circundantes, que pueden interactuar con el GlcNAc más interno de los N-glicanos o chocan estéricamente con FUT8.

Del trabajo realizado en esta parte de la tesis, se obtienen las siguientes conclusiones:

- Se ha conseguido expresar y purificar la enzima *HsFUT8* para posteriormente caracterizar su especificidad de sustrato.
- La obtención de la estructura cristalina del complejo *HsFUT8*-GDP-G0 ha permitido elucidar el mecanismo catalítico de la enzima.
- La quitobiosa del N-glicano adopta una conformación anti- ψ la cual es indispensable para la fucosilación de *HsFUT8*.
- La interacción CH- π entre Tyr498 y C^{G0} es crucial para la correcta orientación de los azúcares en el complejo.
- FUT8 sigue el típico mecanismo S_N2 encontrado para las GTs de inversión y en el que un residuo de glutamato actúa como base catalítica.
- La existencia del exosito formado por el *loop* β 10- β 11 y el dominio SH3 es responsable del íntimo reconocimiento del GlcNAc del brazo α (1,3). Los residuos de este exosito determinan el reconocimiento de los N-glicanos complejos, así como de aquellos son ricos y algo más pobres en manosas. Preferentemente este exosito determina las preferencias de *HsFUT8* sobre los N-glicanos complejos.
- Los residuos del entorno de los sitios de N-glicosilación determinan también la fucosilación ya que pueden impedir el acceso de FUT8 y por tanto bloquear este tipo de glicosilación.
- El péptido es solo importante *in vitro* y *in vivo* cuando se pretende glicosilar N-glicanos ricos y algo más pobres en manosas.

CAPÍTULO 6: REFERENCIAS

6. REFERENCIAS

- Aebi, M. (2013). N-linked protein glycosylation in the ER. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1833(11), 2430–2437. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.04.001>
- Afset, J. E., Bruant, G., Brousseau, R., Harel, J., Anderssen, E., Bevanger, L., & Bergh, K. (2006). Identification of virulence genes linked with diarrhea due to atypical enteropathogenic *Escherichia coli* by DNA microarray analysis and PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(10), 3703–3711. <https://doi.org/10.1128/JCM.00429-06>
- Agrawal, P., Fontanals-Cirera, B., Sokolova, E., Jacob, S., Vaiana, C. A., Argibay, D., Davalos, V., McDermott, M., Nayak, S., Darvishian, F., Castillo, M., Ueberheide, B., Osman, I., Fenyö, D., Mahal, L. K., & Hernando, E. (2017). A Systems Biology Approach Identifies FUT8 as a Driver of Melanoma Metastasis. *Cancer Cell*, 31(6), 804-819.e7. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.05.007>
- Angulo, J., & Nieto, P. M. (2011). STD-NMR: Application to transient interactions between biomolecules-a quantitative approach. *European Biophysics Journal*, 40(12), 1357–1369. <https://doi.org/10.1007/s00249-011-0749-5>
- Becker, D. J., & Lowe, J. B. (2003). Fucose: Biosynthesis and biological function in mammals. *Glycobiology*, 13(7). <https://doi.org/10.1093/glycob/cwg054>
- Biswas, T., & Tsodikov, O. V. (2010). An easy-to-use tool for planning and modeling a calorimetric titration. *Analytical Biochemistry*, 406(1), 91–93. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2010.06.050>
- Boruah, B. M., Kadirvelraj, R., Liu, L., Ramiah, A., Li, C., Zong, G.,

- Bosman, G. P., Yang, J. Y., Wang, L. X., Boons, G. J., Wood, Z. A., & Moremen, K. W. (2020). Characterizing human α -1,6-fucosyltransferase (FUT8) substrate specificity and structural similarities with related fucosyltransferases. *Journal of Biological Chemistry*, 295(50), 11727–11745.
<https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.014625>
- Brown, N. F., Coombes, B. K., Bishop, J. L., Wickham, M. E., Lowden, M. J., Gal-Mor, O., Goode, D. L., Boyle, E. C., Sanderson, K. L., & Finlay, B. B. (2011). Salmonella phage ST64B encodes a member of the SseK/NleB effector family. *PLoS ONE*, 6(3), 1–8.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017824>
- Brunelle, J. L., & Green, R. (2014). Chapter Twelve - One-dimensional SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (1D SDS-PAGE). In J. Lorsch (Ed.), *Laboratory Methods in Enzymology: Protein Part C* (Vol. 541, pp. 151–159). Academic Press.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420119-4.00012-4>
- Buckner, M. M. C., Croxen, M. A., Arena, E. T., & Brett Finlay, B. (2011). A comprehensive study of the contribution of salmonella enterica serovar typhimurium SPI2 effectors to bacterial colonization, survival and replication in typhoid fever, macrophage and epithelial cell infection models. *Virulence*, 2(3).
<https://doi.org/10.4161/viru.2.3.15894>
- Bugarel, M., Martin, A., Fach, P., & Beutin, L. (2011). Virulence gene profiling of enterohemorrhagic (EHEC) and enteropathogenic (EPEC) Escherichia coli strains: A basis for molecular risk assessment of typical and atypical EPEC strains. *BMC Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-142>
- Buven, G., & Piérard, D. (2012). Virulence profiling and disease

- association of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 and non-O157 isolates in Belgium. *Foodborne Pathogens and Disease*, 9(6), 530–535. <https://doi.org/10.1089/fpd.2011.1073>
- Calderon, A. D., Liu, Y., Li, X., Wang, X., Chen, X., Li, L., & Wang, P. G. (2016). Substrate specificity of FUT8 and chemoenzymatic synthesis of core-fucosylated asymmetric N-glycans. *Org. Biomol. Chem.*, 14(17), 4027–4031. <https://doi.org/10.1039/C6OB00586A>
- Chen, C. Y., Jan, Y. H., Juan, Y. H., Yang, C. J., Huang, M. S., Yu, C. J., Yang, P. C., Hsiao, M., Hsu, T. L., & Wong, C. H. (2013). Fucosyltransferase 8 as a functional regulator of nonsmall cell lung cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(2), 630–635. <https://doi.org/10.1073/pnas.1220425110>
- Cheng, L., Gao, S., Song, X., Dong, W., Zhou, H., Zhao, L., & Jia, L. (2016). Comprehensive N-glycan profiles of hepatocellular carcinoma reveal association of fucosylation with tumor progression and regulation of FUT8 by microRNAs. *Oncotarget*, 7(38), 61199–61214. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11284>
- Chung, C. Y., Majewska, N. I., Wang, Q., Paul, J. T., & Betenbaugh, M. J. (2017). SnapShot: N-Glycosylation Processing Pathways across Kingdoms. *Cell*, 171(1), 258-258.e1. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.014>
- Clynes, R. A., Towers, T. L., Presta, L. G., & Ravetch, J. V. (2000). Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nature Medicine*, 6(4), 443–446. <https://doi.org/10.1038/74704>
- Cong, L., & Zhang, F. (2015). Genome Engineering Using CRISPR-Cas9 System. In S. M. Pruetz-Miller (Ed.), *Chromosomal Mutagenesis* (pp. 197–217). Springer New York.

https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1862-1_10

- Cornick, N. A., Pitzer, J., Helgerson, A. F., Madsen, M. L., Kurth, K. T., Xiao, Q., & Minion, F. C. (2017). Use of signature-tagged mutagenesis to identify genes associated with colonization of sheep by *E. coli* O157:H7. *Veterinary Microbiology*, *201*, 177–182. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.01.031>
- Dahmani, A., & Delisle, J. S. (2018). TGF- β in T cell biology: Implications for cancer immunotherapy. *Cancers*, *10*(6), 1–21. <https://doi.org/10.3390/cancers10060194>
- Davies, D. R., & Segal, D. M. (1971). Protein crystallization: Micro techniques involving vapor diffusion. In *Enzyme purification and related techniques* (Vol. 22, pp. 266–269). Academic Press. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0076-6879\(71\)22027-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0076-6879(71)22027-9)
- De Boer, R. F., Ferdous, M., Ott, A., Scheper, H. R., Wisselink, G. J., Heck, M. E., Rossen, J. W., & Kooistra-Smid, A. M. D. (2015). Assessing the public health risk of shiga toxin-producing escherichia coli by use of a rapid diagnostic screening algorithm. *Journal of Clinical Microbiology*, *53*(5), 1588–1598. <https://doi.org/10.1128/JCM.03590-14>
- de Vries, T., & van den Eijnden, D. H. (1994). Biosynthesis of Sialyl-Oligomeric-LewisX and VIM-2 Epitopes: Site Specificity of Human Milk Fucosyltransferase. *Biochemistry*, *33*(33), 9937–9944. <https://doi.org/10.1021/bi00199a016>
- Deng, W., Puente, J. L., Gruenheid, S., Li, Y., Vallance, B. A., Vázquez, A., Barba, J., Ibarra, J. A., O'Donnell, P., Metalnikov, P., Ashman, K., Lee, S., Goode, D., Pawson, T., & Finlay, B. B. (2004). Dissecting virulence: Systematic and functional analyses of a pathogenicity island. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(10), 3597–3602.

<https://doi.org/10.1073/pnas.0400326101>

- Deribe, Y. L., Pawson, T., & Dikic, I. (2010). Post-translational modifications in signal integration. *Nature Structural and Molecular Biology*, 17(6), 666–672.
<https://doi.org/10.1038/nsmb.1842>
- Ding, J., Pan, X., Du, L., Yao, Q., Xue, J., Yao, H., Wang, D. C., Li, S., & Shao, F. (2019). Structural and Functional Insights into Host Death Domains Inactivation by the Bacterial Arginine GlcNAcyltransferase Effector. *Molecular Cell*, 74(5), 922-935.e6.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.03.028>
- Dube, D. H., & Bertozzi, C. R. (2005). Glycans in cancer and inflammation - Potential for therapeutics and diagnostics. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4(6), 477–488.
<https://doi.org/10.1038/nrd1751>
- El Qaidi, S., Chen, K., Halim, A., Siukstaite, L., Rueter, C., Hurtado-Guerrero, R., Clausen, H., & Hardwidge, P. R. (2017). NleB/SseK effectors from *Citrobacter rodentium*, *Escherichia coli*, and *Salmonella enterica* display distinct differences in host substrate specificity. *Journal of Biological Chemistry*, 292(27), 11423–11430. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.790675>
- El Qaidi, S., Scott, N. E., Hays, M. P., Geisbrecht, B. V., Watkins, S., & Hardwidge, P. R. (2020). An intra-bacterial activity for a T3SS effector. *Scientific Reports*, 10(1), 1–11.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-58062-y>
- El Qaidi, S., Zhu, C., McDonald, P., Roy, A., Maity, P. K., Rane, D., Perera, C., & Hardwidge, P. R. (2018). High-Throughput Screening for Bacterial Glycosyltransferase Inhibitors. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8(December), 435.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00435>

- Emsley, P., & Cowtan, K. (2004). Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 60(Pt 12 Pt 1), 2126–2132.
<https://doi.org/10.1107/S09074444904019158>
- Esposito, D., Günster, R. A., Martino, L., Omari, K. El, Wagner, A., Thurston, T. L. M., & Rittinger, K. (2018). Structural basis for the glycosyltransferase activity of the Salmonella effector SseK3. *Journal of Biological Chemistry*, 293(14), 5064–5078.
<https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.001796>
- Fasina, Y. O., Swaisgood, H. E., Garlich, J. D., & Classen, H. L. (2003). A semi-pilot-scale procedure for isolating and purifying soybean (*Glycine max*) lectin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(16), 4532–4538. <https://doi.org/10.1021/jf021125l>
- Ferdous, M., Friedrich, A. W., Grundmann, H., de Boer, R. F., Crougths, P. D., Islam, M. A., Kluytmans-van den Bergh, M. F. Q., Kooistra-Smid, A. M. D., & Rossen, J. W. A. (2016). Molecular characterization and phylogeny of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates obtained from two Dutch regions using whole genome sequencing. *Clinical Microbiology and Infection*, 22(7), 642.e1-642.e9.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.03.028>
- Ferentz, A. E., & Wagner, G. (2000). NMR spectroscopy: A multifaceted approach to macromolecular structure. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 33(1), 29–65.
<https://doi.org/10.1017/S0033583500003589>
- Gaberc-Porekar, V., & Menart, V. (2001). Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 49(1), 335–360.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0165-022X\(01\)00207-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0165-022X(01)00207-X)

- Galán, J. E. (2009). Common Themes in the Design and Function of Bacterial Effectors. *Cell Host and Microbe*, 5(6), 571–579. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.04.008>
- Gao, X., Pham, T. H., Feuerbacher, L. A., Chen, K., Hays, M. P., Singh, G., Rueter, C., Hurtado-Guerrero, R., & Hardwidge, P. R. (2016). *Citrobacter rodentium* NleB Protein inhibits tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor 3 (TRAF3) ubiquitination to reduce host type I interferon production. *Journal of Biological Chemistry*, 291(35), 18232–18238. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.738278>
- Gao, X., Wang, X., Pham, T. H., Feuerbacher, L. A., Lubos, M. L., Huang, M., Olsen, R., Mushegian, A., Slawson, C., & Hardwidge, P. R. (2013). NleB, a bacterial effector with glycosyltransferase activity, targets GADPH function to inhibit NF- κ B activation. *Cell Host and Microbe*, 13(1), 87–99. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.11.010>
- Geng, F., Shi, B. Z., Yuan, Y. F., & Wu, X. Z. (2004). The expression of core fucosylated E-cadherin in cancer cells and lung cancer patients: Prognostic implications. *Cell Research*, 14(5), 423–433. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290243>
- Goosney, D. L., Gruenheid, S., & Finlay, B. B. (2000). Gut Feelings: Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) Interactions with the Host. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 16(1), 173–189. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.16.1.173>
- Günster, R. A., Matthews, S. A., Holden, D. W., & Thurston, T. L. M. (2017). *crossm System Effectors Inhibit NF- κ B Signaling*. 85(3), 1–18.
- Hamilton, B. S., Wilson, J. D., Shumakovich, M. A., Fisher, A. C., Brooks, J. C., Pontes, A., Naran, R., Heiss, C., Gao, C., Kardish,

- R., Heimbürg-Molinaro, J., Azadi, P., Cummings, R. D., Merritt, J. H., & DeLisa, M. P. (2017). A library of chemically defined human N-glycans synthesized from microbial oligosaccharide precursors. *Scientific Reports*, 7(1), 15907. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15891-8>
- Holm, L., & Laakso, L. M. (2016). Dali server update. *Nucleic Acids Research*, 44(W1), W351–W355. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw357>
- Honma, R., Kinoshita, I., Miyoshi, E., Tomaru, U., Matsuno, Y., Shimizu, Y., Takeuchi, S., Kobayashi, Y., Kaga, K., Taniguchi, N., & Dosaka-Akita, H. (2015). Expression of fucosyltransferase 8 is associated with an unfavorable clinical outcome in non-small cell lung cancers. *Oncology (Switzerland)*, 88(5), 298–308. <https://doi.org/10.1159/000369495>
- Horvath, P., & Barrangou, R. (2010). CRISPR/Cas, the Immune System of Bacteria and Archaea. *Science*, 327(5962), 167–170. <https://doi.org/10.1126/science.1179555>
- Hu, P., Shi, B., Geng, F., Zhang, C., Wu, W., & Wu, X. Z. (2008). E-cadherin core fucosylation regulates nuclear β -catenin accumulation in lung cancer cells. *Glycoconjugate Journal*, 25(9), 843–850. <https://doi.org/10.1007/s10719-008-9144-6>
- Ihara, H., Ikeda, Y., & Taniguchi, N. (2005). Reaction mechanism and substrate specificity for nucleotide sugar of mammalian α 1,6-fucosyltransferase—a large-scale preparation and characterization of recombinant human FUT8. *Glycobiology*, 16(4), 333–342. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwj068>
- Ihara, H., Ikeda, Y., Toma, S., Wang, X., Suzuki, T., Gu, J., Miyoshi, E., Tsukihara, T., Honke, K., Matsumoto, A., Nakagawa, A., & Taniguchi, N. (2006). Crystal structure of mammalian α 1,6-

fucosyltransferase, FUT8. *Glycobiology*, 17(5), 455–466.

<https://doi.org/10.1093/glycob/cwl079>

Imai-Nishiya, H., Mori, K., Inoue, M., Wakitani, M., Iida, S., Shitara, K., & Satoh, M. (2007). Double knockdown of α 1,6-fucosyltransferase (FUT8) and GDP-mannose 4,6-dehydratase (GMD) in antibody-producing cells: A new strategy for generating fully non-fucosylated therapeutic antibodies with enhanced ADCC. *BMC Biotechnology*, 7, 1–13. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-7-84>

Ito, Y., Miyauchi, A., Yoshida, H., Uruno, T., Nakano, K., Takamura, Y., Miya, A., Kobayashi, K., Yokozawa, T., Matsuzuka, F., Taniguchi, N., Matsuura, N., Kuma, K., & Miyoshi, E. (2003). Expression of α 1,6-fucosyltransferase (FUT8) in papillary carcinoma of the thyroid: its linkage to biological aggressiveness and anaplastic transformation. *Cancer Letters*, 200(2), 167–172.

[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(03\)00383-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0304-3835(03)00383-5)

Kabsch, W. (2010). XDS. *Acta Crystallographica Section D*, 66(2), 125–132. <https://doi.org/10.1107/S0907444909047337>

Kadirvelraj, R., Yang, J.-Y., Sanders, J. H., Liu, L., Ramiah, A., Prabhakar, P. K., Boons, G.-J., Wood, Z. A., & Moremen, K. W. (2018). Human N-acetylglucosaminyltransferase II substrate recognition uses a modular architecture that includes a convergent exosite. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(18), 4637–4642. <https://doi.org/10.1073/pnas.1716988115>

Kang, X., Wang, N., Pei, C., Sun, L., Sun, R., Chen, J., & Liu, Y. (2012). Glycan-related gene expression signatures in human metastatic hepatocellular carcinoma cells. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 3(3), 415–422.

<https://doi.org/10.3892/etm.2011.430>

- Kawamoto, S., Moriwaki, K., Nakagawa, T., Terao, M., Shinzaki, S., Yamane-Ohnuki, N., Satoh, M., Mehta, A. S., Block, T. M., & Eiji, M. (2011). Overexpression of α 1,6-fucosyltransferase in a hepatoma enhances expression of Golgi phosphoprotein 2 in a fucosylation-independent manner. *International Journal of Oncology*, *39*(1), 203–208. <https://doi.org/10.3892/ijo.2011.1005>
- Kelly, M., Hart, E., Mundy, R., Marchès, O., Wiles, S., Badea, L., Luck, S., Tauschek, M., Frankel, G., Robins-Browne, R. M., & Hartland, E. L. (2006). Essential role of the type III secretion system effector NleB in colonization of mice by *Citrobacter rodentium*. *Infection and Immunity*, *74*(4), 2328–2337. <https://doi.org/10.1128/IAI.74.4.2328-2337.2006>
- Kötzler, M. P., Blank, S., Bantleon, F. I., Wienke, M., Spillner, E., & Meyer, B. (2013). Donor assists acceptor binding and catalysis of human α 1,6-fucosyltransferase. *ACS Chemical Biology*, *8*(8), 1830–1840. <https://doi.org/10.1021/cb400140u>
- Kudo, T., Fujii, T., Ikegami, S., Inokuchi, K., Takayama, Y., Ikehara, Y., Nishihara, S., Togayachi, A., Takahashi, S., Tachibana, K., Yuasa, S., & Narimatsu, H. (2007). Mice lacking α 1,3-fucosyltransferase IX demonstrate disappearance of Lewis x structure in brain and increased anxiety-like behaviors. *Glycobiology*, *17*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwl047>
- Kujat Choy, S. L., Boyle, E. C., Gal-Mor, O., Goode, D. L., Valdez, Y., Vallance, B. A., & Finlay, B. B. (2004). SseK1 and SseK2 are novel translocated proteins of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infection and Immunity*, *72*(9), 5115–5125. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.9.5115-5125.2004>
- Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., & Thornton, J. M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical

quality of protein structures. *Journal of Applied Crystallography*, 26(2), 283–291.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1107/S0021889892009944>

Li, S., Zhang, L., Yao, Q., Li, L., Dong, N., Rong, J., Gao, W., Ding, X., Sun, L., Chen, X., Chen, S., & Shao, F. (2013). Pathogen blocks host death receptor signalling by arginine GlcNAcylation of death domains. *Nature*, 501(7466), 242–246.

<https://doi.org/10.1038/nature12436>

Lin, H., Wang, D., Wu, T., Dong, C., Shen, N., Sun, Y., Sun, Y., Xie, H., Wang, N., & Shan, L. (2011). Blocking core fucosylation of TGF- β 1 receptors downregulates their functions and attenuates the epithelial-mesenchymal transition of renal tubular cells.

American Journal of Physiology - Renal Physiology, 300(4),

1017–1025. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00426.2010>

Lira-Navarrete, E., Valero-González, J., Villanueva, R., Martínez-Júlvez, M., Tejero, T., Merino, P., Panjkar, S., & Hurtado-Guerrero, R. (2011). Structural Insights into the Mechanism of Protein O-Fucosylation. *PLOS ONE*, 6(9), 1–14.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025365>

Lv, X., Song, J., Xue, K., Li, Z., Li, M., Zahid, D., Cao, H., Wang, L., Song, W., Ma, T., Gu, J., & Li, W. (2019). Core fucosylation of copper transporter 1 plays a crucial role in cisplatin-resistance of epithelial ovarian cancer by regulating drug uptake. *Molecular Carcinogenesis*, 58(5), 794–807.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/mc.22971>

Mayer, B. J. (2001). SH3 domains: complexity in moderation. *Journal of Cell Science*, 114(7), 1253–1263.

<https://doi.org/10.1242/jcs.114.7.1253>

Misyurina, O., Asper, D. J., Deng, W., Finlay, B. B., Rogan, D., &

- Potter, A. A. (2010). The role of Tir, EspA, and NleB in the colonization of cattle by Shiga toxin producing *Escherichia coli* O26:H11. *Canadian Journal of Microbiology*, 56(9), 739–747. <https://doi.org/10.1139/W10-059>
- Miyoshi, E., Moriwaki, K., & Nakagawa, T. (2008). Biological function of fucosylation in cancer biology. *Journal of Biochemistry*, 143(6), 725–729. <https://doi.org/10.1093/jb/mvn011>
- Mohorko, E., Glockshuber, R., & Aebi, M. (2011). Oligosaccharyltransferase: The central enzyme of N-linked protein glycosylation. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 34(4), 869–878. <https://doi.org/10.1007/s10545-011-9337-1>
- Molloy, S. (2013). Bacterial pathogenesis: A sweet interaction with death for EPEC. *Nature Reviews Microbiology*, 11(10), 659. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3127>
- Monahan, A. M., Callanan, J. J., & Nally, J. E. (2008). Proteomic Analysis of. *Microbiology*, 76(11), 4952–4958.
- Moremen, K. W., & Haltiwanger, R. S. (2019). Emerging structural insights into glycosyltransferase-mediated synthesis of glycans. *Nature Chemical Biology*, 15(9), 853–864. <https://doi.org/10.1038/s41589-019-0350-2>
- Moremen, K. W., Ramiah, A., Stuart, M., Steel, J., Meng, L., Forouhar, F., Moniz, H. A., Gahlay, G., Gao, Z., Chapla, D., Wang, S., Yang, J.-Y., Prabhakar, P. K., Johnson, R., Rosa, M. Dela, Geisler, C., Nairn, A. V, Seetharaman, J., Wu, S.-C., ... Jarvis, D. L. (2018). Expression system for structural and functional studies of human glycosylation enzymes. *Nature Chemical Biology*, 14(2), 156–162. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2539>
- Moynagh, P. N. (2005). The NF- κ B pathway. *Journal of Cell Science*, 118(20), 4589–4592. <https://doi.org/10.1242/jcs.02579>

- Müller, I. (2017). Guidelines for the successful generation of protein-ligand complex crystals. *Acta Crystallographica. Section D, Structural Biology*, 73(Pt 2), 79–92.
<https://doi.org/10.1107/S2059798316020271>
- Mundy, R., MacDonald, T. T., Dougan, G., Frankel, G., & Wiles, S. (2005). *Citrobacter rodentium* of mice and man. *Cellular Microbiology*, 7(12), 1697–1706. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00625.x>
- Murshudov, G. N., Skubák, P., Lebedev, A. A., Pannu, N. S., Steiner, R. A., Nicholls, R. A., Winn, M. D., Long, F., & Vagin, A. A. (2011). REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 67(Pt 4), 355–367.
<https://doi.org/10.1107/S0907444911001314>
- Nadler, C., Baruch, K., Kobi, S., Mills, E., Haviv, G., Farago, M., Alkalay, I., Bartfeld, S., Meyer, T. F., Ben-Neriah, Y., & Rosenshine, I. (2010). The type III secretion effector NleE inhibits NF- κ B activation. *PLoS Pathogens*, 6(1).
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000743>
- Newson, J. P. M., Scott, N. E., Chung, I. Y. W., Lung, T. W. F., Giogha, C., Gan, J., Wang, N., Strugnell, R. A., Brown, N. F., Cygler, M., Pearson, J. S., & Hartland, E. L. (2019). Salmonella effectors SseK1 and SseK3 target death domain proteins in the TNF and TRAIL signaling pathways. *Molecular and Cellular Proteomics*, 18(6), 1138–1156.
<https://doi.org/10.1074/mcp.RA118.001093>
- Newton, H. J., Pearson, J. S., Badea, L., Kelly, M., Lucas, M., Holloway, G., Wagstaff, K. M., Dunstone, M. A., Sloan, J., Whisstock, J. C., Kaper, J. B., Robins-Browne, R. M., Jans, D. A.,

- Frankel, G., Phillips, A. D., Coulson, B. S., & Hartland, E. L. (2010). The type III effectors NieE and NieB from enteropathogenic *E. coli* and Ospz from shigella block nuclear translocation of NF- κ B p65. *PLoS Pathogens*, *6*(5), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000898>
- Niwa, R., Hatanaka, S., Shoji-Hosaka, E., Sakurada, M., Kobayashi, Y., Uehara, A., Yokoi, H., Nakamura, K., & Shitara, K. (2004). Enhancement of the antibody-dependent cellular cytotoxicity of low-fucose IgG1 is independent of Fc γ RIIIa functional polymorphism. *Clinical Cancer Research*, *10*(18 I), 6248–6255. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-0850>
- Niwa, R., Sakurada, M., Kobayashi, Y., Uehara, A., Matsushima, K., Ueda, R., Nakamura, K., & Shitara, K. (2005). Enhanced natural killer cell binding and activation by low-fucose IgG1 antibody results in potent antibody-dependent cellular cytotoxicity induction at lower antigen density. *Clinical Cancer Research*, *11*(6), 2327–2336. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-2263>
- Niwa, R., Shoji-Hosaka, E., Sakurada, M., Shinkawa, T., Uehida, K., Nakamura, K., Matsushima, K., Ueda, R., Hanai, N., & Shitara, K. (2004). Defucosylated Chimeric Anti-CC Chemokine Receptor 4 IgG1 with Enhanced Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity Shows Potent Therapeutic Activity to T-Cell Leukemia and Lymphoma. *Cancer Research*, *64*(6), 2127–2133. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-2068>
- Noda, K., Miyoshi, E., Uozumi, N., Yanagidani, S., Ikeda, Y., Gao, C. X., Suzuki, K., Yoshihara, H., Yoshikawa, M., Kawano, K., Hayashi, N., Hori, M., & Taniguchi, N. (1998). Gene expression of α 1-6 fucosyltransferase in human hepatoma tissues: A possible implication for increased fucosylation of α -fetoprotein.

Hepatology, 28(4 I), 944–952.

<https://doi.org/10.1002/hep.510280408>

- Noda, M., Okayama, H., Kofunato, Y., Chida, S., Saito, K., Tada, T., Ashizawa, M., Nakajima, T., Aoto, K., Kikuchi, T., Sakamoto, W., Endo, H., Fujita, S., Saito, M., Momma, T., Ohki, S., & Kono, K. (2018). Prognostic role of FUT8 expression in relation to p53 status in stage II and III colorectal cancer. *PLoS ONE*, 13(7), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200315>
- Nothaft, H., & Szymanski, C. M. (2010). Protein glycosylation in bacteria: Sweeter than ever. *Nature Reviews Microbiology*, 8(11), 765–778. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2383>
- Ohtsubo, K., & Marth, J. D. (2006). Glycosylation in Cellular Mechanisms of Health and Disease. *Cell*, 126(5), 855–867. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.08.019>
- Okada, M., Chikuma, S., Kondo, T., Hibino, S., Machiyama, H., Yokosuka, T., Nakano, M., & Yoshimura, A. (2017). Blockage of Core Fucosylation Reduces Cell-Surface Expression of PD-1 and Promotes Anti-tumor Immune Responses of T Cells. *Cell Reports*, 20(5), 1017–1028. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.07.027>
- Osumi, D., Takahashi, M., Miyoshi, E., Yokoe, S., Lee, S. H., Noda, K., Nakamori, S., Gu, J., Ikeda, Y., Kuroki, Y., Sengoku, K., Ishikawa, M., & Taniguchi, N. (2009). Core fucosylation of E-cadherin enhances cell-cell adhesion in human colon carcinoma WiDr cells. *Cancer Science*, 100(5), 888–895. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2009.01125.x>
- Pan, X., Xue, J., Du, L., & Cai, X. (2019). Arginine-GlcNAcylation of death domain and NleB/SseK proteins is crucial for bacteria pathogenesis by regulating host cell death. *BioRxiv Microbiology*.

<https://doi.org/10.1101/746883>

- Park, J. B., Kim, Y. H., Yoo, Y., Kim, J., Jun, S. H., Cho, J. W., El Qaidi, S., Walpole, S., Monaco, S., García-García, A. A., Wu, M., Hays, M. P., Hurtado-Guerrero, R., Angulo, J., Hardwidge, P. R., Shin, J. S., & Cho, H. S. (2018). Structural basis for arginine glycosylation of host substrates by bacterial effector proteins. *Nature Communications*, *9*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06680-6>
- Párraga Martínez, J., D. C., R, D. C., & J, M. G. (2010). Práctica de cristalización de proteínas por técnicas de contradifusión en geles , para estudiantes de Farmacia Protein crystallization practice by gels counter-diffusion techniques for Pharmacy students . *ARS Pharmaceutica*, *51*(2), 316–323.
- Pearson, J. S., Giogha, C., Ong, S. Y., Kennedy, C. L., Kelly, M., Robinson, K. S., Lung, T. W. F., Mansell, A., Riedmaier, P., Oates, C. V. L., Zaid, A., Mühlen, S., Crepin, V. F., Marches, O., Ang, C. S., Williamson, N. A., O'Reilly, L. A., Bankovacki, A., Nachbur, U., ... Hartland, E. L. (2013). A type III effector antagonizes death receptor signalling during bacterial gut infection. *Nature*, *501*(7466), 247–251. <https://doi.org/10.1038/nature12524>
- Pereira, N. A., Chan, K. F., Lin, P. C., & Song, Z. (2018). The “less-is-more” in therapeutic antibodies: Afucosylated anti-cancer antibodies with enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity. *MAbs*, *10*(5), 693–711. <https://doi.org/10.1080/19420862.2018.1466767>
- Petty, N. K., Bulgin, R., Crepin, V. F., Cerdeño-Tárraga, A. M., Schroeder, G. N., Quail, M. A., Lennard, N., Corton, C., Barron, A., Clark, L., Toribio, A. L., Parkhill, J., Dougan, G., Frankel, G., &

- Thomson, N. R. (2010). The *Citrobacter rodentium* genome sequence reveals convergent evolution with human pathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, *192*(2), 525–538. <https://doi.org/10.1128/JB.01144-09>
- Pinho, S. S., & Reis, C. A. (2015). Glycosylation in cancer: Mechanisms and clinical implications. *Nature Reviews Cancer*, *15*(9), 540–555. <https://doi.org/10.1038/nrc3982>
- Ruchaud-Sparagano, M. H., Mühlen, S., Dean, P., & Kenny, B. (2011). The enteropathogenic *E. coli* (EPEC) Tir effector inhibits NF- κ B activity by targeting TNF α receptor-associated factors. *PLoS Pathogens*, *7*(12). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002414>
- Schneider, M., Al-Shareffi, E., & Haltiwanger, R. S. (2017). Biological functions of fucose in mammals. *Glycobiology*, *27*(7), 601–618. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwx034>
- Schulz, M. A., Tian, W., Mao, Y., Van Coillie, J., Sun, L., Larsen, J. S., Chen, Y.-H., Kristensen, C., Vakhrushev, S. Y., Clausen, H., & Yang, Z. (2018). Glycoengineering design options for IgG1 in CHO cells using precise gene editing. *Glycobiology*, *28*(7), 542–549. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwy022>
- Scott, E., Elliott, D. J., & Munkley, J. (2020). Tumour associated glycans: A route to boost immunotherapy? *Clinica Chimica Acta*, *502*(December 2019), 167–173. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2019.12.015>
- Scott, E., & Munkley, J. (2019). Glycans as Biomarkers in Prostate Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(6). <https://doi.org/10.3390/ijms20061389>
- Scott, N. E., Giogha, C., Pollock, G. L., Kennedy, C. L., Webb, A. I., Williamson, N. A., Pearson, J. S., & Hartland, E. L. (2017). The bacterial arginine glycosyltransferase effector NleB preferentially

- modifies Fas-associated death domain protein (FADD). *Journal of Biological Chemistry*, 292(42), 17337–17350.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M117.805036>
- Scott, N. E., & Hartland, E. L. (2017). Post-translational Mechanisms of Host Subversion by Bacterial Effectors. *Trends in Molecular Medicine*, 23(12), 1088–1102.
<https://doi.org/10.1016/j.molmed.2017.10.003>
- Serna, S., Yan, S., Martin-Lomas, M., Wilson, I. B. H., & Reichardt, N.-C. (2011). Fucosyltransferases as Synthetic Tools: Glycan Array Based Substrate Selection and Core Fucosylation of Synthetic N-Glycans. *Journal of the American Chemical Society*, 133(41), 16495–16502. <https://doi.org/10.1021/ja205392z>
- Shao, K., Chen, Z. Y., Gautam, S., Deng, N. H., Zhou, Y., & Wu, X. Z. (2015). Posttranslational modification of E-cadherin by core fucosylation regulates Src activation and induces epithelial-mesenchymal transition-like process in lung cancer cells. *Glycobiology*, 26(2), 142–154.
<https://doi.org/10.1093/glycob/cwv089>
- Shinkawa, T., Nakamura, K., Yamane, N., Shoji-Hosaka, E., Kanda, Y., Sakurada, M., Uchida, K., Anazawa, H., Satoh, M., Yamasaki, M., Hanai, N., & Shitara, K. (2003). The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Journal of Biological Chemistry*, 278(5), 3466–3473.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M210665200>
- Stanley, P., Schachter, H., and Taniguchi, N. (2009). N-Glycans. In A. Varki, R.D. Cummings, J.D. Esko, H.H. Freeze, P. Stanley, C.R. Bertozzi, G.W. Hart, and M.E. Etzler (Ed.), *In Essentials of*

Glycobiology (2nd ed.). Cold Spring Harbor.

- Sun, B., Bao, W., Tian, X., Li, M., Liu, H., Dong, J., & Huang, W. (2014). A simplified procedure for gram-scale production of sialylglycopeptide (SGP) from egg yolks and subsequent semi-synthesis of Man3GlcNAc oxazoline. *Carbohydrate Research*, 396, 62–69. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2014.07.013>
- Tada, K., Ohta, M., Hidano, S., Watanabe, K., Hirashita, T., Oshima, Y., Fujnaga, A., Nakanuma, H., Masuda, T., Endo, Y., Takeuchi, Y., Iwashita, Y., Kobayashi, T., & Inomata, M. (2020). Fucosyltransferase 8 plays a crucial role in the invasion and metastasis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Surgery Today*. <https://doi.org/10.1007/s00595-019-01953-z>
- The Human Protein Atlas*. (2021). <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000033170-FUT8>
- Thiery, J. P. (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumor progression. *Nature Reviews Cancer*, 2(6), 442–454. <https://doi.org/10.1038/nrc822>
- Tian, W., Ye, Z., Wang, S., Schulz, M. A., Van Coillie, J., Sun, L., Chen, Y.-H., Narimatsu, Y., Hansen, L., Kristensen, C., Mandel, U., Bennett, E. P., Jabbarzadeh-Tabrizi, S., Schiffmann, R., Shen, J.-S., Vakhrushev, S. Y., Clausen, H., & Yang, Z. (2019a). The glycosylation design space for recombinant lysosomal replacement enzymes produced in CHO cells. *Nature Communications*, 10(1), 1785. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09809-3>
- Tian, W., Ye, Z., Wang, S., Schulz, M. A., Van Coillie, J., Sun, L., Chen, Y.-H., Narimatsu, Y., Hansen, L., Kristensen, C., Mandel, U., Bennett, E. P., Jabbarzadeh-Tabrizi, S., Schiffmann, R., Shen, J.-S., Vakhrushev, S. Y., Clausen, H., & Yang, Z. (2019b). The

- glycosylation design space for recombinant lysosomal replacement enzymes produced in CHO cells. *Nature Communications*, 10(1), 1785. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09809-3>
- Tu, C. F., Wu, M. Y., Lin, Y. C., Kannagi, R., & Yang, R. B. (2017). FUT8 promotes breast cancer cell invasiveness by remodeling TGF- β receptor core fucosylation. *Breast Cancer Research*, 19(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s13058-017-0904-8>
- Uzzau, S., Brown, D. J., Wallis, T., Rubino, S., Leori, G., Bernard, S., Casadesús, J., Platt, D. J., & Olsen, J. E. (2000). Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*. *Epidemiology and Infection*, 125(2), 229–255. <https://doi.org/10.1017/S0950268899004379>
- Vidarsson, G., Dekkers, G., & Rispen, T. (2014). IgG subclasses and allotypes: From structure to effector functions. *Frontiers in Immunology*, 5(OCT), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00520>
- Wagner, S., Grin, I., Malmshemer, S., Singh, N., Torres-Vargas, C. E., & Westerhausen, S. (2018). Bacterial type III secretion systems: A complex device for the delivery of bacterial effector proteins into eukaryotic host cells. *FEMS Microbiology Letters*, 365(19), 1–13. <https://doi.org/10.1093/femsle/fny201>
- Wang, X., Chen, J., Li, Q. K., Peskoe, S. B., Zhang, B., Choi, C., Platz, E. A., & Zhang, H. (2014). Overexpression of α (1,6) fucosyltransferase associated with aggressive prostate cancer. *Glycobiology*, 24(10), 935–944. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwu051>
- Wang, X., Gu, J., Ihara, H., Miyoshi, E., Honke, K., & Taniguchi, N. (2006). Core fucosylation regulates epidermal growth factor receptor-mediated intracellular signaling. *Journal of Biological*

Chemistry, 281(5), 2572–2577.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M510893200>

Wang, X., Inoue, S., Gu, J., Miyoshi, E., Noda, K., Li, W., Mizuno-Horikawa, Y., Nakano, M., Asahi, M., Takahashi, M., Uozumi, N., Ihara, S., Lee, S. H., Ikeda, Y., Yamaguchi, Y., Aze, Y., Tomiyama, Y., Fujii, J., Suzuki, K., ... Taniguchi, N. (2005). Dysregulation of TGF- β 1 receptor activation leads to abnormal lung development and emphysema-like phenotype in core fucose-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(44), 15791–15796. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507375102>

Welinder-Olsson, C., & Kaijser, B. (2005). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 37(6–7), 405–416. <https://doi.org/10.1080/00365540510038523>

Wickham, M. E., Lupp, C., Mascarenhas, M., Vázquez, A., Coombes, B. K., Brown, N. F., Coburn, B. A., Deng, W., Puente, J. L., Karmali, M. A., & Finlay, B. B. (2006). Bacterial genetic determinants of non-O157 STEC outbreaks and hemolytic-uremic syndrome after infection. *Journal of Infectious Diseases*, 194(6), 819–827. <https://doi.org/10.1086/506620>

Winn, M. D., Ballard, C. C., Cowtan, K. D., Dodson, E. J., Emsley, P., Evans, P. R., Keegan, R. M., Krissinel, E. B., Leslie, A. G. W., McCoy, A., McNicholas, S. J., Murshudov, G. N., Pannu, N. S., Potterton, E. A., Powell, H. R., Read, R. J., Vagin, A., & Wilson, K. S. (2011). Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallographica Section D*, 67(4), 235–242. <https://doi.org/10.1107/S0907444910045749>

Wong Fok Lung, T., Giogha, C., Creuzburg, K., Ong, S. Y., Pollock, G.

- L., Zhang, Y., Fung, K. Y., Pearson, J. S., & Hartland, E. L. (2016). Mutagenesis and functional analysis of the bacterial arginine glycosyltransferase effector NleB1 from enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, *84*(5), 1346–1360. <https://doi.org/10.1128/IAI.01523-15>
- Wyman, C., & Kanaar, R. (2006). DNA Double-Strand Break Repair: All's Well that Ends Well. *Annual Review of Genetics*, *40*(1), 363–383. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.40.110405.090451>
- Xu, C., Liu, X., Zha, H., Fan, S., Zhang, D., Li, S., & Xiao, W. (2018). A pathogen-derived effector modulates host glucose metabolism by arginine GlcNAcylation of HIF-1 α protein. *PLoS Pathogens*. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007259>
- Yang, Q., & Wang, L. X. (2016). Mammalian α -1,6-fucosyltransferase (FUT8) is the sole enzyme responsible for the N-acetylglucosaminyltransferase I-independent core fucosylation of high-mannose N-glycans. *Journal of Biological Chemistry*, *291*(21), 11064–11071. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.720789>
- Yang, Zhang, Steentoft, C., Hauge, C., Hansen, L., Thomsen, A. L., Niola, F., Vester-Christensen, M. B., Frödin, M., Clausen, H., Wandall, H. H., & Bennett, E. P. (2015). Fast and sensitive detection of indels induced by precise gene targeting. *Nucleic Acids Research*, *43*(9), e59. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv126>
- Yang, Zhang, Wang, S., Halim, A., Schulz, M. A., Frödin, M., Rahman, S. H., Vester-Christensen, M. B., Behrens, C., Kristensen, C., Vakhrushev, S. Y., Bennett, E. P., Wandall, H. H., & Clausen, H. (2015). Engineered CHO cells for production of diverse, homogeneous glycoproteins. *Nature Biotechnology*, *33*(8), 842–844. <https://doi.org/10.1038/nbt.3280>
- Yang, Zhe, Soderholm, A., Lung, T. W. F., Giogha, C., Hill, M. M.,

Brown, N. F., Hartland, E., & Teasdale, R. D. (2015). SseK3 is a salmonella effector that binds TRIM32 and modulates the host's NF- κ B signalling activity. *PLoS ONE*, *10*(9), 1–20.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138529>

Zhang, R., Yang, Q., Boruah, B. M., Zong, G., Li, C., Chapla, D., Yang, J.-Y., Moremen, K. W., & Wang, L.-X. (2021). Appropriate aglycone modification significantly expands the glycan substrate acceptability of α 1,6-fucosyltransferase (FUT8). *Biochemical Journal*, *478*(8), 1571–1583.

<https://doi.org/10.1042/BCJ20210138>

Zhao, Y., Itoh, S., Wang, X., Isaji, T., Miyoshi, E., Kariya, Y., Miyazaki, K., Kawasaki, N., Taniguchi, N., & Gu, J. (2006). Deletion of core fucosylation on α 3 β 1 integrin down-regulates its functions.

Journal of Biological Chemistry, *281*(50), 38343–38350.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M608764200>

CAPÍTULO 7: ABREVIATURAS

7. ABREVIATURAS

NleB. *Non LEE effector B*

ADN. Ácido desoxirribonucleico

E. coli EHEC. *Escherichia coli* enterohemorrágica

E. coli EPEC. *Escherichia coli* enteropatógena

FADD^{DD}. *Fas-associated death domain*

DR3. *Death receptor 3*

S. entérica. *Salmonella enterica*

wt. *wild type* o silvestre

TEV. *Tobacco Etch Virus*

SOB. Medio súper óptimo (*Super optimal broth*)

SOC. Medio súper óptimo con represión de catabolitos (*Super optimal broth with*

catabolite repression)

LB. Caldo de Lisogenia (*Lysogeny broth*)

ARN. Ácido ribonucleico

IPTG. isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido

2xTY. 2x triptona de extracto de levadura

TRIS. Tris(hidroxietil)aminometano

SDS. Dodecilsulfato sódico

UDP. Uridín difosfato

ATP. Adenosín trifosfato

GDP. Guanosin difosfato

GlcNAc. N-Acetilglucosamina

PBS. Tampón fosfato salino

GFP. Proteína verde fluorescente (*Green fluorescent Protein*)

CHO. Células de ovario de hámster (*Chinese hamster ovary*)

HEK293. Células embrionarias de riñón humano 293 (*Human embryonic kidney*)

PMSF. Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

FUT8. Fucosiltransferasa 8

VPA. Ácido valpróico

DTT. Ditioneitol

TFA. Trifluoroacético

ACN. Acetonitrilo

APTS. Ácido p-toluensulfónico

CAPÍTULO 8: APÉNDICES

8. APÉNDICES

8.1. MEDIOS DE CULTIVO Y RECETAS

SOB (60 ml)

- 1,2 g triptona
- 0,3 g extracto de levadura
- 0,03 g NaCl

SOC (60 ml)

- 10 ml SOB
- 57,6 μ l MgCl₂ 2 M
- 200 μ l Glucosa 1 M

LB/Agar (400 ml)

- 4 g triptona
- 2 g extracto de levadura
- 4 g NaCl
- 6 g agar

LB (1 l)

- 10 g triptona
- 5 g extracto de levadura
- 10 g NaCl

2xTY (1 l)

- 15 g triptona
- 10 g extracto de levadura

-5 g NaCl

Tampón de carga de proteínas 4x (10 ml)

-2,4 ml Tris 1 M, pH 6,8

-0,8 g SDS

-4 ml 100% Glicerol

-1 mg azul de bromofenol

-1 ml β -mercaptoetanol

Gentamicina (10 ml)

-1 g ampicilina

-10 ml H₂O destilada

Ampicilina 100 mg/ml (10 ml)

-1 g ampicilina

-10 ml H₂O destilada

PBS (1 l)

-8 g NaCl

-0,2 g KCl

-1,44 g Na₂HPO₄

-0,24 g KH₂PO₄

Cocktail inhibidor de proteasas

-PMSF 20 mM

-Leupectina 1 mM

-Benzamidina 200 mM

8.2. PROPIEDADES DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Se recogen a continuación las propiedades de las proteínas recombinantes silvestres con las que se ha trabajado a lo largo de esta tesis. Si bien a nivel experimental se tuvieron en cuenta, no se incluyen las de los respectivos mutantes debido a que la diferencia es muy escasa y sólo conlleva sutiles variaciones en el valor de los diferentes parámetros.

8.2.1. SseK1

VTNRDIQFTSFNGKDYPLSFLDEKTPLLQWFERNPARFGKNDIPIIN
TEKNPYLNNIIKAATIEKERLIGIFVDGDFFPQKDAFSKLEYDYENIKV
IYRNDIDFSMYDKKLSEIYMENISKQESMPEEKRDCHLLQLLKELSDI
QEGNDSLKSYLLDKGHGWDFYRNMAMLKAGQLFLEADKVGSYDL
STNSGCIYLDADMIITEKLGGIYIPDGIHVHVERIDGRASMENGIIVDR
NNHPALLAGLEIMHTKFDADPYSDBGVCNGIRKHFNYSLNEDYNSFCD
FIEFKHDNIIMNTSQFTQSSWARHVQ

Número de aminoácidos: 316

Peso molecular: 36538,26 Da

pI teórico: 4,99

Número de residuos cargados positivamente (Asp + Glu): 50

Número de residuos cargados negativamente (Arg + Lys): 35

Coefficiente de extinción molar: 38850 M⁻¹cm⁻¹ (a 280 nm en agua, asumiendo que todas las cisteínas están reducidas)

8.2.2. SseK2

GGTLSPPSSGHVSFAGIDYPLLPLNHQTPLVFQWFERNPDRFGQNEI
PIINTQKNPYLNNIINAAIIEKERIIGIFVDGDFSKGQRKALGKLEQNYR
NIKVIYNSDLNYSMYDKKLTIIYLENITKLEAQSASERDEVLLNGVKKS
LEDVLKNNPEETLISSHNKDKGHLWFDYRNLFLFKGSDAFLEAGKP
GCHHLQPGGGCIYLDADMLLTDKLGTLYLPDGAIHVSRKDNHVSLE
NGIIAVNRSEHPALIKGLEIMHSPYGDYNDWLSKGLRHYFDGSHIQ
DYDAFCDFIEFKHENIIMNTSSLTASSWR

Número de aminoácidos: 317

Peso molecular: 35953,68 Da

pI teórico: 6,01

Número de residuos cargados positivamente (Asp + Glu): 40

Número de residuos cargados negativamente (Arg + Lys): 33

Coefficiente de extinción molar: 42860 M⁻¹cm⁻¹ (a 280 nm en agua, asumiendo que todas las cisteínas están reducidas)

8.2.3. NleB1^{EHEC}

SFAGKEYPLEIDEKTPILFQWFPEARPERYEKGEVPILNTKEHPYLSNI
INAAKIENERIIGVLVDGNFTYEQKKEFLSLENEYQNIAIYRADVDFSM
YDKKLSDIYLENIHKQESYPASERDNYLLGLLREELKNIPEGKDSLIES
YAEKREHTWFDFFRNLAMLKAGSLFTETGKTGCHNISPCSGCIYLDA
DMIITDKLGVLYAPDGIHVHDCNDEIKSLENGAIVVNRSNHPALLAGL
DIMKSKVDAHPYYDGLGKGIKRHFNYSSLHDYNAFCDFIEFKHENIIP
NTSMYTCSSW

Número de aminoácidos: 302

Peso molecular: 34680,18 Da

pI teórico: 5,07

Número de residuos cargados positivamente (Asp + Glu): 48

Número de residuos cargados negativamente (Arg + Lys): 32

Coefficiente de extinción molar: 43695 M⁻¹cm⁻¹ (a 280 nm en agua, asumiendo que todas las cisteínas están reducidas)

8.2.4. FADD^{DD}

GEEDLCAAFNVICDNVGGKDWRRRLARQLKVSDTKIDSIEDRYPRNLTE
RVRESLRIWKNTOKENATVAHLVGALRSCQMNLVADLVQEVEQQARD
LQNRSGA

Número de aminoácidos: 100

Peso molecular: 11439,89 Da

pI teórico: 6,79

Número de residuos cargados positivamente (Asp + Glu): 16

Número de residuos cargados negativamente (Arg + Lys): 16

Coefficiente de extinción molar: 12490 M⁻¹cm⁻¹ (a 280 nm en agua, asumiendo que todas las cisteínas están reducidas)

8.2.5. DR3^{DD}

GPQLYDVMDAVPARRWKEFVRTLGLREAEIEAVEVEIGRFRDQQYEMLKR
WRQQQPAGLGAVYAALERMGLDGCVEDLRSRLQRGP

Número de aminoácidos: 86

Peso molecular: 9976,41 Da

pI teórico: 6,51

Número de residuos cargados positivamente (Asp + Glu): 14

Número de residuos cargados negativamente (Arg + Lys): 14

Coefficiente de extinción molar: 15470 M⁻¹cm⁻¹ (a 280 nm en agua, asumiendo que todas las cisteínas están reducidas)

8.2.6. HsFUT8

RIPEGPIDQGPAIGRVRVLEEQLVKAKEQIENYKKQTRNGLGKDHEIL
 RRIENGAKELWFFLQSELKKLKNLEGNELQRHADEFLLDLGHHERS
 IMTDLYYLSQTDGAGDWREKEAKDLTELVQRRITYLQNPKDCSKAKK
 LVCNINKGCGYGCQLHHVVYCFMIAYGTQRTLILESQNWRYATGGW
 ETVFRPVSETCTDRSGISTGHWSGEVKDKNVQVVELPIVDSLHPRPP
 YLPLAVPEDLADRLVRVHGDPVWWVSQFVKYLIRPQPWLEKEIEEA
 TKKLGFKHPVIGVHVRRTDKVGTEAAFHPIEEYMVHVEEHFQLLARR
 MQVDKKRVYLATDDPSLLKEAKTKYPNYEFISDNSISWSAGLHNRYT
 ENSLRGVILDIHFLSQADFLVCTFSSQVCRVAYEIMQTLHPDASANFH
 SLDDIYYFGGQNAHNQIAIYAHQPRTADEIPMEPGDIIGVAGNHWDG
 YSKGVNRKLGRTGLYPSYKVREKIETVKYPTYPEAEK

Número de aminoácidos: 508

Peso molecular: 58499,47 Da

pI teórico: 6,92

Número de residuos cargados positivamente (Asp + Glu): 69

Número de residuos cargados negativamente (Arg + Lys): 67

Coefficiente de extinción molar: 90760 M⁻¹cm⁻¹ (a 280 nm en agua, asumiendo que todas las cisteínas están reducidas)

8.3. LOS AMINOÁCIDOS

En la **Figura 77** podemos ver todos los aminoácidos con las distintas nomenclaturas que podemos encontrar.

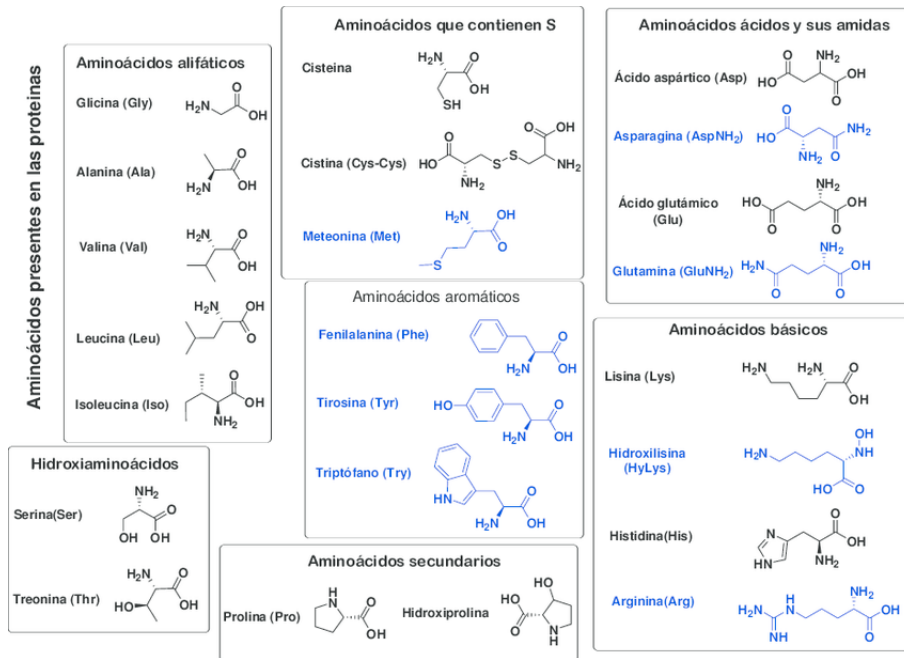


Figura 77. Clasificación de los aminoácidos según su estructura. Se muestran junto a cada uno el nombre y la nomenclatura de 3 letras que lo representa.