

ESTRATEGIAS DE GLICOBIOLOGÍA CELL-FREE PARA LA MODIFICACIÓN ENZIMÁTICA DE GLUCANOS CON UNIDADES DE GLUCOSAMINA

Iglesias, Josefina

Instituto de Agrobiotecnología del Litoral CONICET-UNL

Director/a: Asencion Diez, Matías

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: glucosil-transferasas, oligosacáridos, glucógeno.

INTRODUCCIÓN

Los glicanos son biomoléculas vitales para el funcionamiento celular y están constituidos por unidades de monosacáridos unidos mediante enlaces glicosídicos. Los glicanos poseen distintas funciones, por ejemplo, actúan como fuente de energía, forman parte de diferentes macromoléculas y confieren propiedades biológicas particulares. La síntesis de glicanos se da por la glicosilación de un aceptor (aglicón) por un dador glicosídico. El aglicón no necesariamente es un carbohidrato. La conjugación de carbohidratos a otras biomoléculas afecta a sus propiedades fisicoquímicas, localización subcelular, inmunogenicidad y farmacodinámica. Los polisacáridos presentan una enorme variedad estructural debido a la diversidad de monosacáridos que pueden conformarlos, y también a que el enlace glicosídico puede darse de diferentes formas estéreo- y regio-selectivas. Los carbohidratos pueden ser modificados con grupos terminales como fosfato, sulfato o acetato. Estas variaciones en las cadenas de carbohidratos confieren a los glicanos variaciones en sus propiedades fisicoquímicas que ayudan a cumplir funciones biológicas o estructurales.

La glicobiología es la disciplina que estudia la estructura molecular y la función de los glicanos, así como las reacciones enzimáticas involucradas en su síntesis, modificación y degradación.

La producción de glicanos puede darse a partir de sus fuentes naturales, sin embargo, este método presenta la desventaja de obtener bajas cantidades, su aislamiento es dificultoso, y se obtienen mezclas heterogéneas y conjugadas. Una alternativa es la síntesis química, que permite la formación de carbohidratos de cadena corta mediante procesos tediosos y suele involucrar compuestos tóxicos para el medioambiente. Por otra parte, existe la síntesis basada en procesos biotecnológicos, la cual se clasifica en síntesis *in vivo* y síntesis *in vitro*. La síntesis *in vitro* se basa en sistemas libres de células, en los cuales se proporcionan las enzimas, los sustratos y las condiciones óptimas para que se forme la biomolécula. El estudio de estas reacciones de síntesis *in vitro* conforma un nuevo campo llamado glicobiología *cell-free* (libre de células), el cual permite el control en forma directa y precisa de la composición de un sistema, elimina el límite de la membrana biológica y las limitaciones de viabilidad de las células, facilita el monitoreo en tiempo real y la automatización.

En el presente trabajo se propuso un sistema acoplado de reacciones enzimáticas libre de

Título del proyecto: Glucosamina en actinobacterias de interés biotecnológico. Desde el metabolismo a la síntesis de precisión de oligo y polisacáridos

Instrumento: PICT

Año convocatoria: 2018

Organismo financiador: ANPCyT

Director/a: Asencion Diez, Matías

células capaces de transferir un grupo amino a una molécula de glucano. Este sistema de enzimas plantea la conversión de glucosa-1P y ATP por una ADP-glucosa pirofosforilasa bacteriana (GlgC) a ADP-glucosa, la cual es utilizada junto a glucosa-1P por la glucosil-transferasa GlgM para generar el disacárido fosforilado maltosa-1P. Luego, este producto es utilizado por la maltosil-transferasa GlgE para elongar un polisacárido aceptor. Se estudió la promiscuidad por los sustratos de las enzimas propuestas, buscando reemplazar la glucosa-1P por glucosamina-1P y, de esta forma, poder modificar el aglicón con grupos amino. Esta modificación podría conferir propiedades fisicoquímicas particulares al producto final. Se sabe que el almidón o el glucógeno modificados por unidades de glucosa sustituidas da lugar a compuestos de interés en nanotecnología, *delivery* de drogas y como biomateriales sustentables. Por su parte, los chito-oligo-sacáridos tienen potencial aplicación en biomedicina como reparadores de tejido óseo, cicatrizantes y/o antiinflamatorios, con las ventajas de ser biocompatibles, biodegradables y no-tóxicos. Nuestro proyecto plantea combinar las propiedades de ambos tipos de moléculas, sintetizándolas *in vitro* con una estrategia de glicobiología *cell-free*.

OBJETIVOS

- Desarrollar un sistema de enzimas acopladas libre de células para conseguir la elongación de oligo y polisacáridos de glucosa, como malto-tetraosa, malto-hexaosa y glucógeno.
- Estudiar la utilización de derivados de glucosamina como sustrato del sistema basado en la promiscuidad de las enzimas que lo conforman.
- Caracterizar cinéticamente las reacciones enzimáticas que forman cada uno de los pasos del sistema acoplado.

METODOLOGÍA

Las metodologías utilizadas para la medida de actividad enzimática fueron:

- i. Método colorimétrico con Verde de Malaquita: permite la medida de ortofosfato (Pi) liberado en una reacción enzimática por formación de un complejo coloreado que presenta un pico de absorbancia a 620 nm.
- ii. Método de acople enzimático utilizando piruvato quinasa (PK) y lactato deshidrogenasa (LDH): acopla la generación de ADP con el consumo de NADH, que puede ser cuantificado con la medida de absorbancia a 340 nm.

Cada una de las reacciones enzimáticas que constituyen el sistema completo fue estudiada por separado. Se midió la actividad enzimática de las reacciones utilizando los sustratos convencionales de las enzimas.

La primera reacción estudiada fue de la ADP-glucosa pirofosforilasa de *Geobacillus stearothermophilus*, enzima heterotetramérica denominada *BstGlgC/GlgD*. Esta reacción consiste en la formación de ADP-glucosa a partir de glucosa-1P y ATP, liberando una molécula de pirofosfato (PPi). Para la medida de actividad se agrega a la reacción una pirofosfatasa que transforma el PPi en Pi para ser cuantificado.

En segundo lugar, se realizó la medida de actividad enzimática de *BstGlgC/GlgD* junto con la glucosil-transferasa GlgM de *Rhodococcus jostii* (*RjoGlgM*). En esta reacción, la ADP-glucosa generada por *BstGlgC/GlgD* es utilizada por *RjoGlgM* junto con glucosa-1P para sintetizar maltosa-1P. La medida de actividad se realiza cuantificando el ADP generado por la segunda reacción mediante el método descrito con PK/LDH.

En tercer lugar, se estudió la reacción conjunta de *RjoGlgM* con la maltosil-transferasa GlgE de *Streptomyces coelicolor* (*ScoGlgE*). En este caso, los sustratos son ADP-glucosa, glucosa-1P y glucógeno. La maltosa-1P formada por *RjoGlgM* se transfiere a la molécula de polisacárido por acción de *ScoGlgE*, liberando una molécula de Pi que es cuantificado por el método del Verde de Malaquita.

Luego, se comprobó la utilización de glucosamina-1P como sustrato alternativo en cada una

de las etapas mencionadas anteriormente, reemplazando la glucosa-1P.

Por último, luego de estudiar por separado [*Bst*GlgC/GlgD + *Rjo*GlgM] y [*Rjo*GlgM + *Sco*GlgE], se sumaron ambos acoples para estudiar el sistema completo (Figura 1).

La medida de actividad se realizó por el método de Verde de Malaquita, midiendo la aparición del Pi liberado en la transferencia del disacárido al aglicón.

Los sustratos agregados al sistema son glucosa-1P, ATP y glucógeno de

hígado de conejo. Aquí se busca generar el dador glucosídico ADP-glucosa, utilizado por *Rjo*GlgM para obtener maltosa-1P que luego es transferida al glucano por acción de *Sco*GlgE. Se estudió la posibilidad de reemplazar glucosa-1P por glucosamina-1P y, por otro lado, reemplazar el glucógeno por otros oligo y polisacáridos como como maltosa, maltotriosa y almidón.

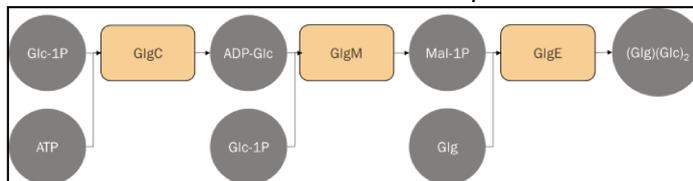


Figura 1: Esquema del sistema de reacciones enzimáticas.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

ADP-glucosa Pirofosforilasa (GlgC)

Los resultados obtenidos indican que la enzima heterotetramérica *Bst*GlgC/GlgD de *Geobacillus stearothermophilus* presenta promiscuidad respecto al uso de ATP y glucosamina-1P con la mayor eficiencia catalítica reportada hasta el momento, con un valor de k_{cat}/K_m de $22.46 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$. Por esta razón, se seleccionó esta enzima para continuar con el acople enzimático. Como resultado se estaría formando una molécula de ADP-glucosamina, la cual no ha sido reportada en la naturaleza y no se encuentra disponible de forma comercial.

ADP-glucosa pirofosforilasa GlgC + glucosil-transferasa GlgM

Resultados preliminares (figura 2) evidencian que el sistema enzimático es capaz de utilizar glucosamina-1P como sustrato. En este caso se estaría generando un disacárido-P formado por dos unidades de glucosamina.

El estudio de la actividad enzimática en presencia de glucosamina-1P y ATP en función del contenido proteico dio como resultado una actividad enzimática específica de 0.047 U/mg .

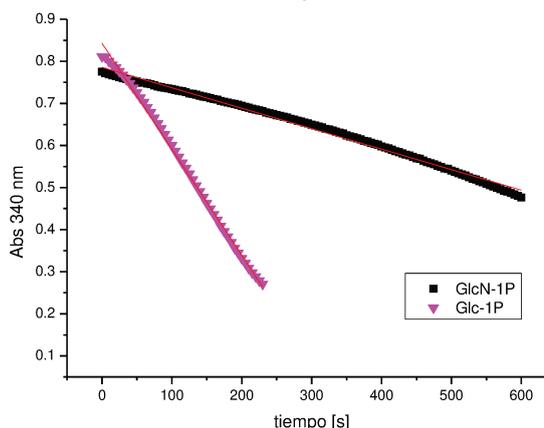


Figura 2. Actividad del sistema acoplado *Bst*GlgC/GlgD + *Rjo*GlgM utilizando glucosa-1P o glucosamina-1P

Glucosil-transferasa GlgM + maltosil-transferasa GlgE

La actividad enzimática específica obtenida como resultado de las medidas son de $2,8 \text{ U/mg}$ y $1,7 \text{ U/mg}$ para glucosa-1P y glucosamina-1P respectivamente. Los resultados obtenidos demuestran que el sistema *Rjo*GlgM + *Sco*GlgE funciona cuando es alimentado con glucosa-1P. Además, al demostrar que presenta actividad con glucosamina-1P podemos concluir que es capaz de elongar la molécula de glucógeno con un disacárido-P de glucosa y glucosamina.

ADP-glucosa pirofosforilasa GlgC + Glucosil-transferasa GlgM + maltosil-transferasa GlgE

En la Figura 3a se observan los resultados de la actividad enzimática relativa del sistema *Bst*GlgC/GlgD + *Rjo*GlgM + *Sco*GlgE utilizando como sustrato ATP,

glucógeno y glucosa-1P o glucosamina-1P. Esto indicaría que el acople de enzimas tiene la propiedad de generar un disacárido-P de glucosamina e incorporarlo a glucógeno. Por otro lado, en la Figura 3b se exponen las actividades relativas del sistema enzimático de diferentes glucanos en presencia de ATP y glucosa-1P, en relación a la actividad con glucógeno de hígado de conejo. Puede apreciarse que ScoGlgE es capaz de incorporar moléculas de maltosa-1P a diferentes oligo y polisacáridos con una elevada actividad relativa.

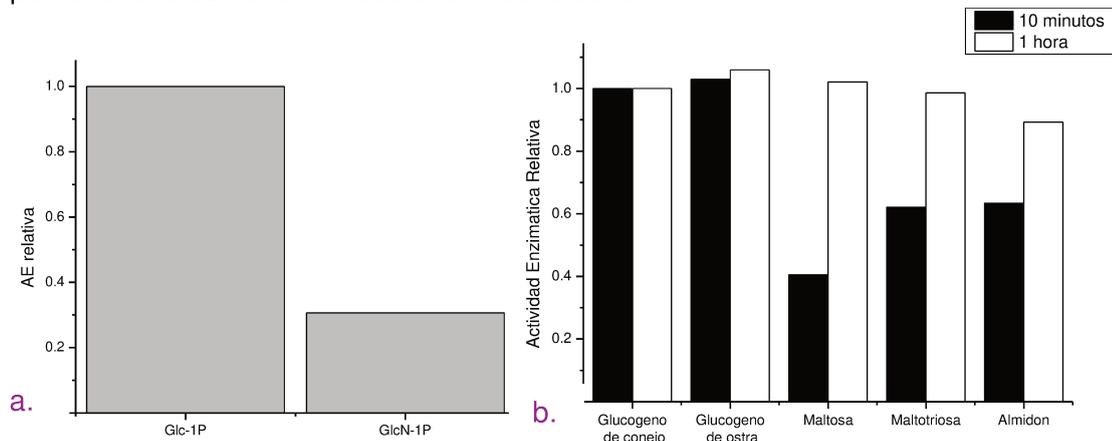


Figura 3. a. Actividad enzimática relativa del sistema en presencia de glucosa-1P y de glucosamina-1P b. Actividad enzimática relativa en presencia de diferentes oligo y polisacáridos.

El presente trabajo ha permitido desarrollar un sistema enzimático que permitiría modificar distintos aglicones, desde disacáridos a polisacáridos, con el agregado de residuos de glucosamina.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Kightlinger W, Warfel KF, Delisa MP, Jewett MC.** 2020. Synthetic Glycobiology: Parts, Systems, and Applications. *ACS Synthetic Biology* 9:1534–1562.
- Cereijo AE, Alvarez HM, Iglesias AA, Asencion Diez MD.** 2020. Glucosamine-P and rhodococcal ADP-glucose pyrophosphorylases: A hint to (re)discover (actino)bacterial amino sugar metabolism. *Biochimie* 176:158–161.
- Jaroentomeechai T, Taw MN, Li M, Aquino A, Agashe N, Chung S, Jewett MC, DeLisa MP.** 2020. Cell-Free Synthetic Glycobiology: Designing and Engineering Glycomolecules Outside of Living Cells. *Frontiers in Chemistry*. Frontiers Media S.A.
- Agatemor C, Buettner MJ, Ariss R, Muthiah K, Saeui CT, Yarema KJ.** 2019. Exploiting metabolic glycoengineering to advance healthcare. *Nature Reviews Chemistry*. Nature Publishing Group.
- Shafiq F, Akram NA, Mahmood A, Ahmad A, Ashraf M, Iqbal M, Raza SH.** 2020. Glycogen-based bionanocomposites, p. 259–266. *In Bionanocomposites*. Elsevier.
- Liaqat F, Eltem R.** 2018. Chitooligosaccharides and their biological activities: A comprehensive review. *Carbohydrate Polymers*. Elsevier Ltd.
- Syson K, Stevenson CEM, Rejzek M, Fairhurst SA, Nair A, Bruton CJ, Field RA, Chater KF, Lawson DM, Bornemann S.** 2011. Structure of *Streptomyces* maltosyltransferase GlgE, a homologue of a genetically validated anti-tuberculosis target. *Journal of Biological Chemistry* 286:38298–38310.
- Elbein AD, Pastuszak I, Tackett AJ, Wilson T, Pan YT.** 2010. Last step in the conversion of trehalose to glycogen: a mycobacterial enzyme that transfers maltose from maltose 1-phosphate to glycogen. *The Journal of biological chemistry* 285:9803–12.
- Syson K, Stevenson CEM, Lawson DM, Bornemann S.** 2020. Structure of the *Mycobacterium smegmatis* α -maltose-1-phosphate synthase GlgM. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications* 76:175–181.