



**Universitat Ramon Llull**

## **TESIS DOCTORAL**

Título

**ANÁLISIS MUTACIONAL DEL EXTREMO C-TERMINAL DE LA  
 $\alpha$ -1,3-GALACTOSILTRANSFERASA BOVINA:  
ESTABILIDAD Y CATÁLISIS**

Realizada por

***Javier Antonino* Linares Pastén**

en el Centro

**Institut Químic de Sarrià**

y en el Departamento de

**Bioingeniería**

Dirigida por

**Dr. Antoni Planas i Sauter**

***A mis padres***

## Resumen

La  $\alpha$ -1,3-galactosiltransferasa ( $\alpha$ 3GT) está involucrada en la biosíntesis de oligosacáridos antigénicos responsables del rechazo inmunológico hiperagudo (HAR) en el xenotransplante de órganos de animales a humanos, por lo que ésta enzima tiene un particular interés en biomedicina. Por otra parte, la  $\alpha$ 3GT constituye un modelo enzimático para estudios mecanísticos y estructurales de glicosiltransferasas. La enzima transfiere galactosa (Gal) del UDP-Gal a la N-acetilactosamina (LacNAc), o a la lactosa (Lac).

Actualmente, los estudios cristalográficos han mostrado dos tipos de estructuras con diferentes conformaciones en la zona C-terminal (aa. 358-368). En la forma I, esta zona está altamente desordenada, pero en la forma II está bien definida, lo cual sugiere que funciona como tapa que cierra el sitio catalítico. Estos cambios conformacionales sugieren que el extremo C-terminal podría tener un rol clave en la actividad catalítica.

En la presente tesis doctoral se abordó el estudio estructural/funcional del extremo C-terminal desde un enfoque de análisis cinético y de estabilidad de mutantes de alanina de cada uno de los aminoácidos de las posiciones 358-368. De esta manera, la comparación entre eficiencia catalítica y estabilidad enzimática proporcionan un método que permite identificar los aminoácidos que tienen un rol importante en la unión de ligando o en el empaquetamiento estructural.

Para los mutantes K359A, Y361A, V363A y R365A no se ha detectado actividad, por lo cual, estas posiciones son fundamentales para la actividad  $\alpha$ 3GT. K359, Y361 y R365 interactúan con los fosfatos del UDP-Gal, además, K359A también interactúan con el hidroxilo 3 de la lactosa según modelización molecular, por lo cual se ha propuesto un rol de ácido/base general a la lisina 359. Por otra parte, los mutantes N367A y V368A resultaron ser de 2 a 3 veces más activos que *wt*, respectivamente.

Los estudios de estabilidad revelan que *wt* y mutantes de residuos no involucrados directamente en la interacción con los sustratos, presentan mayor estabilidad, que aquellos que según los modelos moleculares y las estructuras cristalográficas, interactúan directamente con el UDP o UDP-Gal. Por otra parte, se encontró, que la presencia de UDP estabiliza la enzima *wt*, mientras que este efecto estabilizador del UDP disminuye en mutantes de residuos directamente implicados en las interacciones con el UDP-Gal.

## Abreviaturas

$\alpha$ 3GT:	UDP-Gal:Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc $\beta$ -R $\alpha$ 3-galactosiltransferasa
aa:	Aminoácido
DNA:	Ácido desoxiribonucleico
ANTS:	Ácido 8-aminonaftalen-1,3,6-trisulfónico
BB 1x:	Tampón binding buffer 1x: 20mM Tris-HCl, 0.5M NaCl pH 7.9
BSA:	Albúmina de suero bovino
CCF:	Cromatografía de capa fina
cDNA:	ADN complementario
EOF:	Flujo electroosmótico
F:	Factor de respuesta
FACE:	Fluorophore Assisted Capillary Electrophoresis
GTs:	GlicosilTransferasas
HK:	Tampón HK 1x
HPCE:	High Performance Capillary Electrophoresis
HPLC:	High Performance Liquid Chromatography
IPTG:	Isopropiltiogalactósido
LDH:	Lactato DesHidrogenasa
LgtC:	$\alpha$ 4GT
MCS:	Multiple Cloning Site
MS:	Mass spectrometry
MW:	Molecular Weight
PK:	Pyruvate Kinase
PP:	Fracción periplasmática
Rf:	Parámetro cromatográfico
RNA :	Ácido ribonucleico
SDS-PAGE:	Electroforesis en gel de poliacrilamida, en condiciones desnaturalizantes (con SDS)
TEA:	Trietilamina
TMS:	Tetrametilsilano
TsPNa:	2,2,3,3-tetradeutero-3-(trimetilsilil)-propionato sódico
UDP:	uridin difosfato
Wt:	Wild Type (enzima salvaje)
UDP-Gal/Gal-UDP:	uridin difosfo galactosa
UDP-Gal*/Gal-UDP*:	Disolución de UDP-Gal en el que se ha mezclado una proporción de reactivo radioactivo con no radioactivo de 1:21 en volúmenes.

## **Agradecimientos**

A mi familia, que desde la distancia, en todo momento me ha brindado el apoyo moral necesario para realizar el presente trabajo.

Al Dr. Antoni Planas i Sauter, director de la presente tesis, por su dedicación científica que incentiva a la investigación, pero ante todo por su amistad.

A la Fundació Puig-Raposo y al Institut Químic de Sarrià por otorgarme la beca doctoral.

Al Dr. Enric Julià, director general del IQS por hacer posible el convenio de cooperación IQS – Bolivia.

A los doctores Joan Carles Ferrer y Carmen Benito de la Universitat de Barcelona, donde se realicé los ensayos radiactivos.

A los doctores Francesc Broto y Santiago Nonell de los laboratorio de análisis y fotoquímica del IQS, donde realicé los ensayos de HPCE y fluorescencia.

Al Dr. Francesc Canals del Laboratorio de Proteómica del Hospital Vall d'Hebron, por los espectros MALDI-TOF.

A la Dra. Ana Monegal, con quien he tenido el agrado de trabajar conjuntamente en el proyecto “gal T”, y sobre todo por su amistad.

A los compañeros del laboratorio de bioquímica por las experiencias y por todos los buenos momentos compartidos, Dr. Carlos Pelaez, Dra. Magda Faijes, Joan Nieto, Marc Saura, Xavi Pérez, Eduardo Andrés, Trevor Addintong, Nuria Martinez, Javier Martinez, Jordi Rivas, Mauro Querol, Ramón Jovè, Ramón La Parra, Marc Guell, Albert Martinez, Marta Palomo, David Riera y a todos los que pasaron por el laboratorio durante todo este tiempo.

De manera muy especial deseo agradecer al Rev. P. Javier Cerdà, S. J., un gran amigo y un gran maestro. Físicamente ya no está en este mundo, pero sus conocimientos, sus ideas y sus enseñanzas estarán presentes siempre.

# Contenido

<b>INTRODUCCIÓN GENERAL .....</b>	<b>1</b>
Glicosiltransferasas: estructuras moleculares .....	7
Mecanismos de reacción de glicosiltransferasas .....	15
La $\alpha$ -1,3-galactosiltransferasa en contexto biomédico .....	23
La $\alpha$ -1,3-galactosiltransferasa como prototipo de las glicosiltransferasas .....	25
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>26</b>
Objetivo general .....	27
Objetivos específicos .....	27
<b>RESULTADOS Y DISCUSIONES</b>	
<b>Capítulo 1.</b>	
<b>Modelización molecular de complejos de la</b>	
<b><math>\alpha</math>-1,3-galactosiltransferasa con sustratos y producto .....</b>	<b>28</b>
Introducción .....	29
Resultados y discusiones .....	32
Alineamiento de secuencias de la $\alpha$ 3GT de diferentes especies .....	32
Alineamiento de secuencias de la $\alpha$ 3GT, iGB <sub>3</sub> -S, Forss-S, GT-A y GT-B .....	36
Estructuras moleculares .....	39
Interacciones con sustratos .....	42
Propuesta mecanística .....	48
Conclusiones .....	51
<b>Capítulo 2.</b>	
<b>Mutagénesis dirigida de residuos del</b>	
<b>extremo C-terminal de la <math>\alpha</math>-1,3-galactosiltransferasa,</b>	
<b>expresión y purificación .....</b>	<b>52</b>
Introducción .....	53
Resultados y discusiones .....	55
Análisis mutacional .....	55
Diseño de primers mutagénicos .....	59

Puesta a punto del método .....	59
Expresión y purificación .....	65

### **Capítulo 3.**

<b>Método de electroforesis capilar para análisis de azúcar nucleótidos y ensayos enzimáticos de glicosiltransferasas .....</b>	<b>71</b>
Introducción .....	71
Resultados y discusiones .....	74
Validación del método electroforético .....	78
Aplicación a la monitorización de la reacción de la $\alpha$ 3GT .....	80
Conclusión .....	86

### **Capítulo 4.**

<b>Validación de ensayo radiométrico para estudios cinéticos de la <math>\alpha</math>-1,3-galactosiltransferasa .....</b>	<b>88</b>
Introducción .....	89
Resultados y discusiones .....	91
Actividad específica del sustrato radioactivo .....	92
Validación del método .....	93
Preparación de muestras y cromatografía de intercambio aniónico .....	94
Seguimiento de la reacción enzimática .....	96
Curva patrón enzimática .....	97
Conclusión .....	98

### **Capítulo 5.**

<b>Caracterización cinética de mutantes del extremo C-terminal de la <math>\alpha</math>-1,3-galactosiltransferasa .....</b>	<b>99</b>
Introducción .....	100
Reacciones bisustrato .....	100
Estudios cinéticos para glicosiltransferasas .....	102
Estudios cinéticos para mutantes de la $\alpha$ 3GT .....	104
Resultados y discusiones .....	109
Determinación de actividades específicas .....	110
Determinación de parámetros cinéticos .....	111

Parámetros cinéticos para el UDP-Gal .....	113
Parámetros cinéticos para la lactosa .....	116
Eficiencia catalítica para el sustrato donador versus aceptor .....	119

## **Capítulo 6.**

### **Análisis de estabilidad de mutantes del extremo**

<b>C-terminal de la <math>\alpha</math>-1,3-galactosiltransferasa .....</b>	<b>122</b>
Introducción .....	123
Resultados y discusiones .....	127
Condiciones de desnaturalización .....	127
Parámetros instrumentales .....	128
Estabilidad de mutantes .....	128
Efecto estabilizador del UDP-Gal o UDP .....	132

## **Capítulo 7.**

### **Discusiones entorno a la estabilidad, cinética y estructura de mutantes del extremo c-terminal**

<b>de la <math>\alpha</math>-1,3-galactosiltransferasa .....</b>	<b>136</b>
Introducción .....	137
Eficiencia catalítica y estabilidad .....	138
Mutantes del grupo A: V363A, V364A, N362A, T358A, N367A y V368A .....	142
Mutantes del grupo B: E360A y N366A .....	147
Mutantes del grupo C: K359A, Y361A y R365A .....	148

## **CONCLUSIONES .....**

## **MATERIALES Y MÉTODOS .....**

Capítulo 1 .....	155
Capítulo 2 .....	156
Capítulo 3 .....	168
Capítulo 4 .....	169
Capítulo 5 .....	171
Capítulo 6 .....	173

## **BIBLIOGRAFÍA .....**



## **ANEXOS EN CD**

### **Anexo I**

Modelización molecular de complejos de la  $\alpha$ -1,3-galactosiltransferasa con sustratos y producto

### **Anexo II**

Mutagénesis dirigida de residuos del extremo C-terminal de la  $\alpha$ -1,3-galactosiltransferasa, expresión y purificación

### **Anexo III**

Método de electroforesis capilar para análisis de azúcar nucleótidos y ensayos enzimáticos de glicosiltransferasas

### **Anexo IV**

Validación de ensayo radiométrico para estudios cinéticos de la  $\alpha$ -1,3-galactosiltransferasa

### **Anexo V**

Caracterización cinética de mutantes del extremo C-terminal de la  $\alpha$ -1,3-galactosiltransferasa

### **Anexo VI**

Análisis de estabilidad de mutantes del extremo C-terminal de la  $\alpha$ -1,3-galactosiltransferasa

# **INTRODUCCIÓN**

---

---

## INTRODUCCIÓN

Las glicosiltransferasas (GTs) son enzimas involucradas en la biosíntesis de oligosacáridos y glicoconjugados (EC 2.4.x.y). Están ampliamente distribuidas en todos los sistemas vivos, desde bacterias hasta el hombre, por lo que sus funciones pueden considerarse fundamentales para la vida.

Las glicosiltransferasas bacterianas están vinculadas con la biosíntesis de las paredes celulares y de importantes azúcares presentes en sus superficies. Tales como los lipopolisacáridos (LPS) de las bacterias Gram negativas, polisacáridos capsulares (CPS) o los lipoarabinomananos de micobacterias. En el caso de las bacterias patógenas, muchos de estos azúcares son los responsables de la virulencia (Benz y Schmidt, 2002). Algunas glicosiltransferasas bacterianas se han utilizado para la síntesis a gran escala de oligosacáridos que podrían tener interés farmacológico e industrial (Endo y Koizumi, 2000) (tabla 1).

Las glicosiltransferasas de las plantas participan en la biosíntesis de las complejas paredes celulares (Scheible y Pauly, 2004), además, en la glicosilación de pequeñas moléculas que podrían jugar roles importantes en la modulación de la germinación, inactivación de fitohormonas y otros procesos fisiológicos (Keegstra y Raikhel, 2001). El genoma recientemente secuenciado de *Arabidopsis thaliana* reveló la presencia de un gran

número de ORFs potencialmente codificadores de glicosiltransferasas (Li, *et al.* 2000).

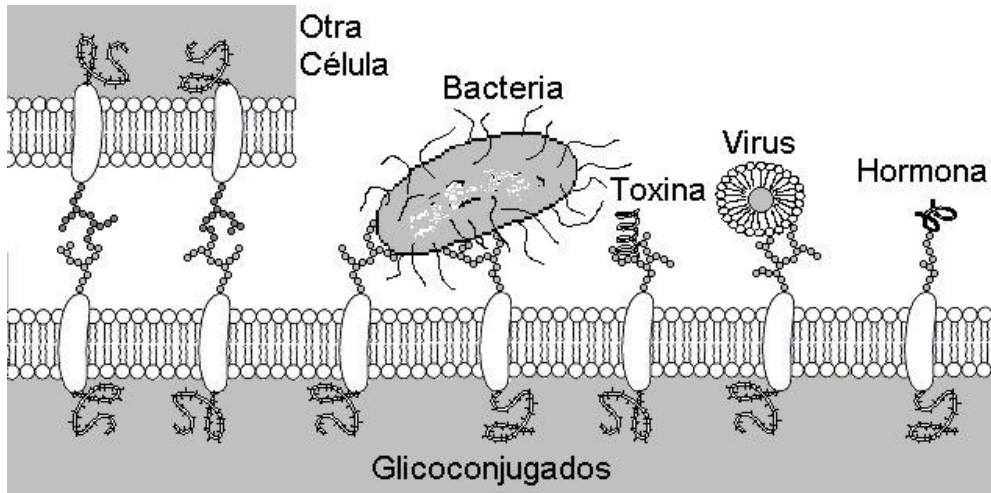
También han sido clonados genes y expresadas las correspondientes glicosiltransferasas de levaduras y de diversas especies de mamíferos incluyendo el hombre (Hennet, 2002) (tabla 2). Recientemente se ha construido una librería de 51 glicosiltransferasas humanas inmovilizadas en la superficie de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) (Shimma, *et al.* 2006). Esta librería fue satisfactoriamente utilizada para la síntesis de oligosacáridos humanos tales como sialil Lewis (x), Lewis (y) y el antígeno H.

**Tabla 1.** Algunas glicosiltransferasas clonadas de bacterias (fuente: *Endo y Koizumi, 2000*).

Enzima	Gen	Fuente bacteriana
GalT		
$\beta$ -1,4-galactosiltransferasa	<i>lgtB</i>	<i>Neisseria meningitidis, N. gonorrhoeae</i>
$\beta$ -1,4-galactosiltransferasa	<i>cps14J</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
$\beta$ -1,4-galactosiltransferasa	<i>hpgalT</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
$\beta$ -1,4-galactosiltransferasa	<i>cgtB</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
$\alpha$ -1,4-galactosiltransferasa	<i>lgtC</i>	<i>Neisseria meningitidis, N. gonorrhoeae</i>
GlcNAcT		
$\beta$ -1,3-N-acetilglucosaminiltransferasa	<i>lgtA</i>	<i>Neisseria meningitidis, N. Gonorrhoeae</i>
$\beta$ -1,4-N-acetilglucosaminiltransferasa	<i>nodC</i>	<i>Rhizobium leguminosarum</i>
GalNAcT		
$\beta$ -1,3-N-acetilgalactosaminiltransferasa	<i>lgtD</i>	<i>Neisseria meningitidis, N. Gonorrhoeae</i>
$\beta$ -1,4-N-acetilgalactosaminiltransferasa	<i>cgtA</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
FucT		
$\alpha$ -1,3-fucosiltransferasa	<i>HplucT</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
$\alpha$ -1,3-fucosiltransferasa	<i>fucT</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
$\alpha$ -1,2-fucosiltransferasa	<i>fucT2</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
$\alpha$ -1,3/4-fucosiltransferasa	<i>fucT</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
SiaT		
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa	<i>lst</i>	<i>Neisseria meningitidis, N. gonorrhoeae</i>
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa	<i>cst-I</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
$\alpha$ -2,3-sialiltransferasa	<i>cst-II</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
$\alpha$ -2,6-sialiltransferasa	<i>bst</i>	<i>Photobacterium damsela</i>
$\alpha$ -2,8/9-sialiltransferasa	<i>neuS</i>	<i>Escherichia coli</i>

**Tabla 2.** Galactosiltransferasas humanas, de ratón y de rata (fuente: *Henet, 2002*).

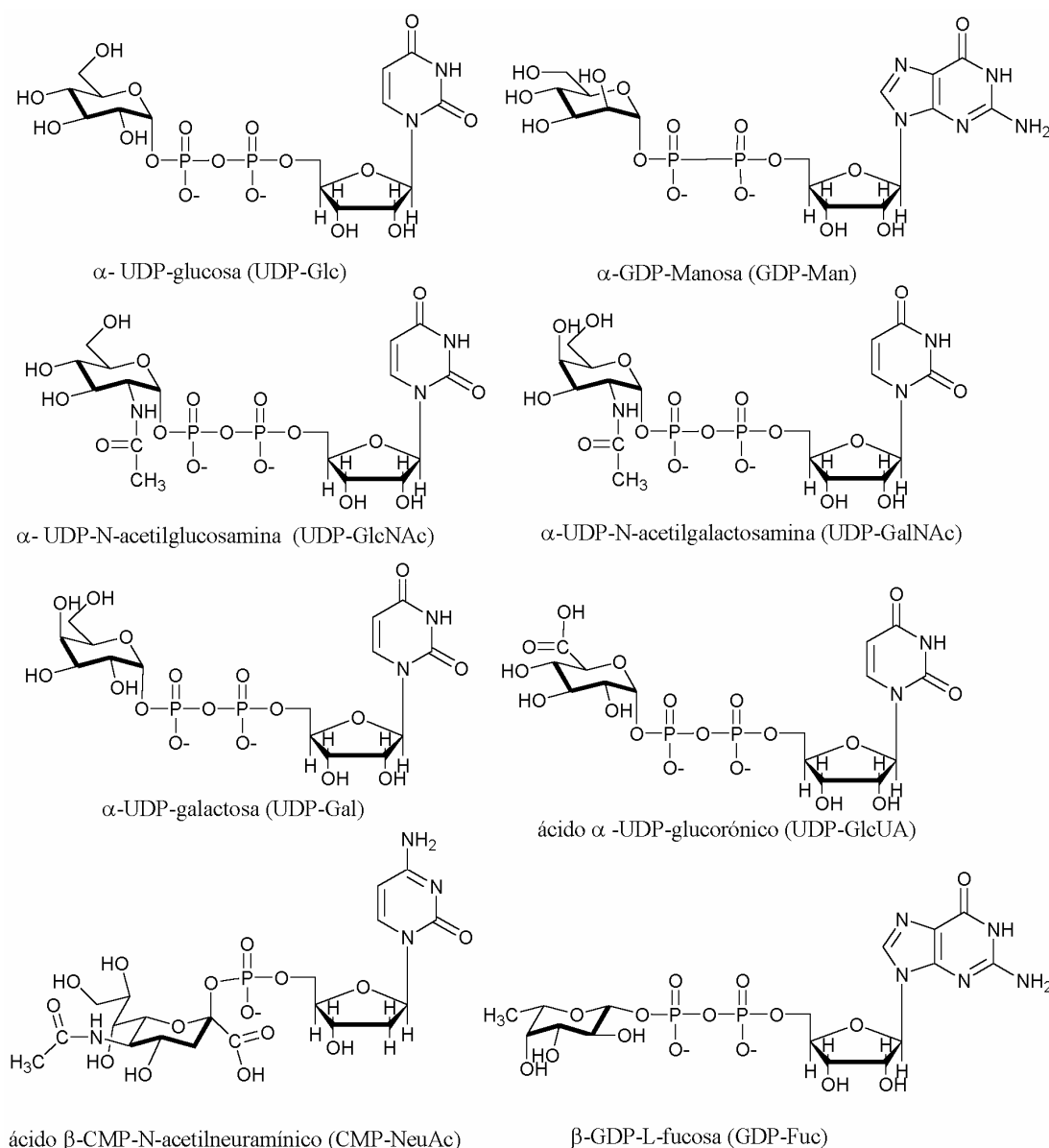
Enzima	Gen / Cromosoma Humano	Fuente
$\beta$ -1,4-galactosiltransferasa	B4GALT1 / 9p13	obicio
$\beta$ -1,4-galactosiltransferasa	B4GALT2 / 1p34-p33	obicio
$\beta$ -1,4-galactosiltransferasa	B4GALT3 / 1q21-q23	obicio
$\beta$ -1,4-galactosiltransferasa	B4GALT4 / 3q13	obicio
$\beta$ -1,4-galactosiltransferasa	B4GALT5 / 20q13	obicio
$\beta$ -1,4-galactosiltransferasa	B4GALT6 / 18q11	médula ósea, cerebro, mamas, pulmones, páncreas, piel, embrión.
$\beta$ -1,4-galactosiltransferasa	B4GALT7 / 5q35	obicio
$\beta$ -1,3-galactosiltransferasa	B3GALT1 / 2q14	células germinales, cerebro
$\beta$ -1,3-galactosiltransferasa	B3GALT2 / 1q31	sangre, huesos, cerebro, colon, corazón, páncreas, piel, embrión, pulmones, sistema nervioso, próstata.
$\beta$ -1,3-galactosiltransferasa	B3GALT3 / 3q25	vejiga, huesos, cerebro, mamas, colon, células germinales, corazón, riñones, pulmones, ovarios, próstata, testículos, prepucio, útero, embrión
$\beta$ -1,3-galactosiltransferasa	B3GALT4 / 6p21	cerebro, colon, pulmones, ovarios, páncreas, pulmones, testículos, riñones, estómago, próstata.
$\beta$ -1,3-galactosiltransferasa	B3GALT5 / 21q22	mamas, colon, páncreas, testículos, sistema nervioso.
$\beta$ -1,3-galactosiltransferasa	B3GALT6 / 1	obicio
$\beta$ -1,3-galactosiltransferasa	B3GALT7, C1GALT1 / 7	médula ósea, cerebro, colon, células germinales, riñones, páncreas, placenta, intestino delgado, estómago, útero.
$\alpha$ -1,3-galactosiltransferasa	ABO / 9q34	sangre, colon.
$\alpha$ -1,4-galactosiltransferasa	A4GALT1 / 22q13	obicio
Cer galactosiltransferasa	CGT / 4q26	cerebro, riñones
$\alpha$ -1,3-galactosiltransferasa	Ggta 1 / de ratón	embrión, corazón, pulmones, glándulas mamarias, páncreas, glándulas salivares, piel, útero, bazo.
$\alpha$ -1,3-galactosiltransferasa	(iGB3s) / de rata	pulmones, útero, pituitaria, timo, músculo esquelético, cerebro, bazo, riñones.



**Figura 1.** Los carbohidratos de la superficie celular actúan como sitios de unión para otras células, bacterias, virus, toxinas, hormonas y muchas otras moléculas.

Las glicosiltransferasas de los animales están vinculadas con la biosíntesis de azúcares de superficie que envuelven a la célula formando una capa llamada glicocálix. Estos azúcares sirven de sitios específicos de unión con otros receptores celulares, bacterias (De Angelis, 2002), virus (Markine-Goriaynoff *et al.* 2004), parásitos (Días Filho, *et al.* 2005), toxinas y hormonas (figura 1). Por otra parte, son importantes en las interacciones celulares durante la fertilización (Talbot, *et al.* 2003), desarrollo, diferenciación, transformación oncogénica (Hakomori, 2002; Couldrey y Green, 2000), inflamación (Becker y Lowe, 2003), defensa inmunológica (Rudd, *et al.* 2001) y muchas enfermedades.

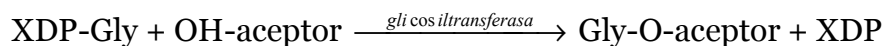
En este marco, la  $\alpha$ -1,3-galactosiltransferasa es clave en la biosíntesis de xenoantígenos consistentes en carbohidratos, que se expresan principalmente en las superficies de células endoteliales de mamíferos no humanos (Joziasse y Oriol, 1999). Por ello, ésta proteína es de especial interés en estudios de xenotransplatación de órganos y tejidos de animales al hombre. Pero además, ésta enzima ha llegado a constituirse en un prototipo para estudios estructurales y mecanísticos de las glicosiltransferasas.



**Figura 2.** Sustratos donadores de las glicosiltransferasas *tipo Leloir*.

Respecto a las reacciones que catalizan, las glicosiltransferasas son de dos tipos: (1) tipo *Leloir* y (2) tipo *no Leloir*. Las primeras utilizan como sustratos donadores monosacarídidos activados por nucleótidos, mientras que las segundas utilizan donadores activados por fosfato. Los enzimas tipo *Leloir* son los responsables de la síntesis de la mayoría de las glicoproteínas y de otros glicoconjugados en las células de mamíferos, y

utilizan ocho donadores primarios: UDP-Glu, UDP-GlcNAc, UDP-Gal, UDP-GalNAc, GDP-Man, GDP-Fuc, UDP-GlcUA y CMP-NeuAc (figura 2). La reacción general que catalizan estas enzimas es:



donde XDP-Gly es un nucleótido azúcar (sustrato donador) y *OH-aceptor* (sustrato aceptor) puede ser un oligosacárido libre, conjugado con un lípido (glicolípido), proteína (glicoproteína) u otro tipo de moléculas.

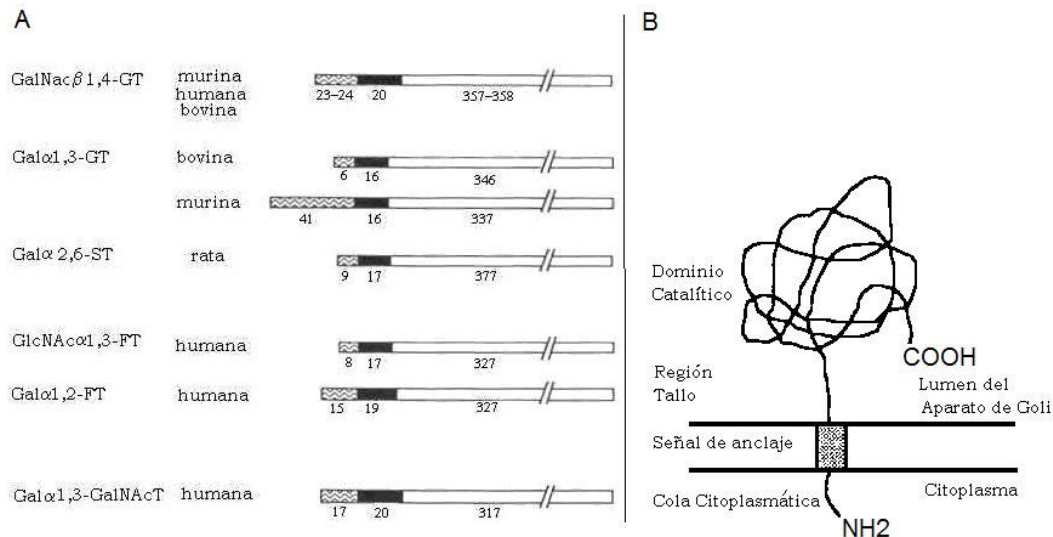
A pesar de que las reacciones que catalizan las glicosiltransferasas ya se conocen bien, aun no han quedado bien establecidos los mecanismos de reacción ni las relaciones entre sus estructuras y funciones. Dentro de este marco, el objetivo central del presente trabajo consiste en el estudio estructura/función de la  $\alpha$ 3GT, a través de análisis mutacional de aminoácidos del sitio activo y cercanos a el, en el extremo C-terminal (358-368). Región que por estudios cristalográficos previos, presenta dos formas (Gastinel *et al.*, 2001; Boix *et al.*, 2001; Boix *et al.*, 2002), sugiriendo cambios conformacionales asociados a la actividad.

### **Glicosiltransferasas: estructuras moleculares**

Inicialmente, la estructura de las glicosiltransferasas ha sido estudiada a partir de la comparación de secuencias de aminoácidos deducidas de cDNAs clonados, siendo de principal interés las de mamíferos. Estos estudios han revelado que las glicosiltransferasas no tienen secuencias homólogas, sin embargo comparten unidades estructurales comunes (Paulson, *et al.* 1989). En el caso de las glicosiltransferasas ancladas a membrana, éstas tienen una corta cola citoplasmática en el extremo *N*-terminal, un dominio de anclaje a membrana que puede ser de 16 a 20



aminoácidos o más, una región tallo (región *stem* o espaciadora) a la cual sigue un voluminoso dominio COOH-terminal catalítico soluble (figura 3). Esta topología de proteínas transmembrana corresponde al tipo II.



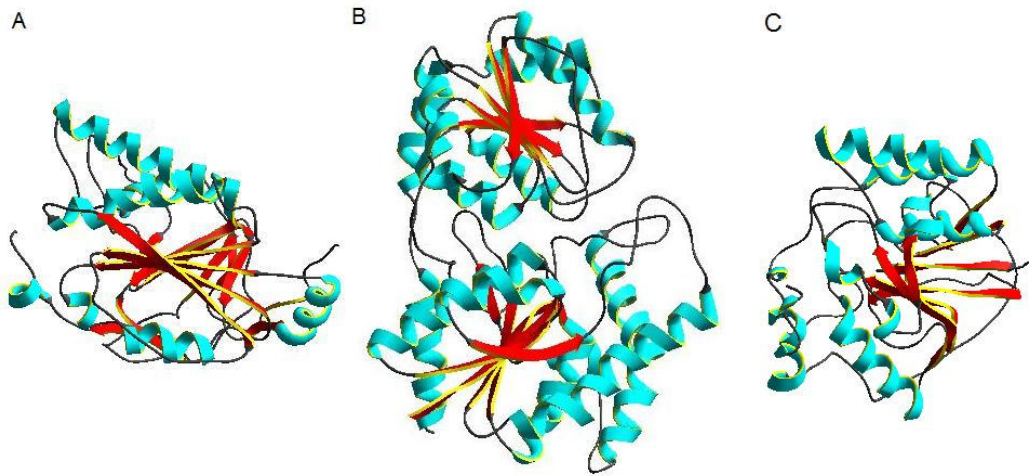
**Figura 3.** (A) Secuencias de aminoácidos de glicosiltransferasas de membrana, clonadas. En gris se muestra el dominio amino terminal, en negro la señal de anclaje y en blanco el dominio catalítico orientado a la región luminal del aparato de Golgi. (B) Topología común de glicosiltransferasas de membrana clonadas (Fuente: Paulson, *et al.*, 1989 )

En las glicosiltransferasas de membrana anteriormente descritas, el dominio de anclaje al parecer tiene dos funciones: la primera es que actúa como secuencia señal de anclaje no hidrolizable, y la segunda que contiene señales de retención específicas para el aparato de Golgi. Por otra parte, la estructura primaria de la región tallo no es conservada entre las glicosiltransferasas, pero existen muchas características compartidas que sugieren que esta región carece de estructura secundaria y es flexible, permitiendo al dominio catalítico glicosilar los grupos carbohidrato tanto de las glicoproteínas ancladas a membrana como de aquellas glicoproteínas de secreción cuya ruta es a través del aparato de Golgi. Además, la región tallo de algunas glicosiltransferasas contiene sitios

proteolíticos, los cuales, tras sufrir hidrólisis producen formas solubles enzimáticamente activas (Paulson, *et al.* 1989). Así, las formas solubles encontradas y purificadas de la leche, suero y otros fluidos corporales parecen provenir de proteínas inicialmente ancladas a membrana. Finalmente, el dominio catalítico es una unidad globular y compacta que representa un plegamiento independiente, y parece ser resistente a proteasas.

El advenimiento de la genómica ha permitido identificar numerosas secuencias codificantes para glicosiltransferasas en diversos organismos. De esta manera se empezó un nuevo sistema de clasificación en base a la similitud de secuencias de aminoácidos (Campbell *et al.* 1997), tal como ya se había hecho para glicosidasas. Esta forma de clasificación tiene ventajas sobre el tradicional sistema recomendado por la IUBM (International Union of Biochemistry and Molecular Biology), ya que según la IUBM se requiere la caracterización completa de los sustratos y productos antes de poder asignar un número EC (Enzyme Commission) al enzima. Otras limitaciones del sistema tradicional son el hecho de que muchas glicosiltransferasas actúan sobre diferentes sustratos y que esta clasificación no refleja las características estructurales y mecánicas de los enzimas.

La clasificación por secuencias está disponible en el servidor Carbohydrate Active Enzymes database (CAZy) (<http://www.cazy.org>) (Coutinho y Henrissat, 1999; Coutinho, *et al.* 2003). Incluye todas las glicosiltransferasas que utilizan como sustratos donadores azúcar difosfo nucleósidos, azúcar monofosfo nucleósidos, azúcares fosfato, dolicol fosfo azúcares, azúcares-1-fosfato y lípido-difosfo azúcares. Actualmente hay 89 familias con un total de más de 7200 secuencias (junio de 2007) . El mecanismo molecular se conserva dentro de cada familia y por ello puede extrapolarse información mecánica de los pocos enzimas que han sido caracterizados bioquímicamente a otros menos conocidos.

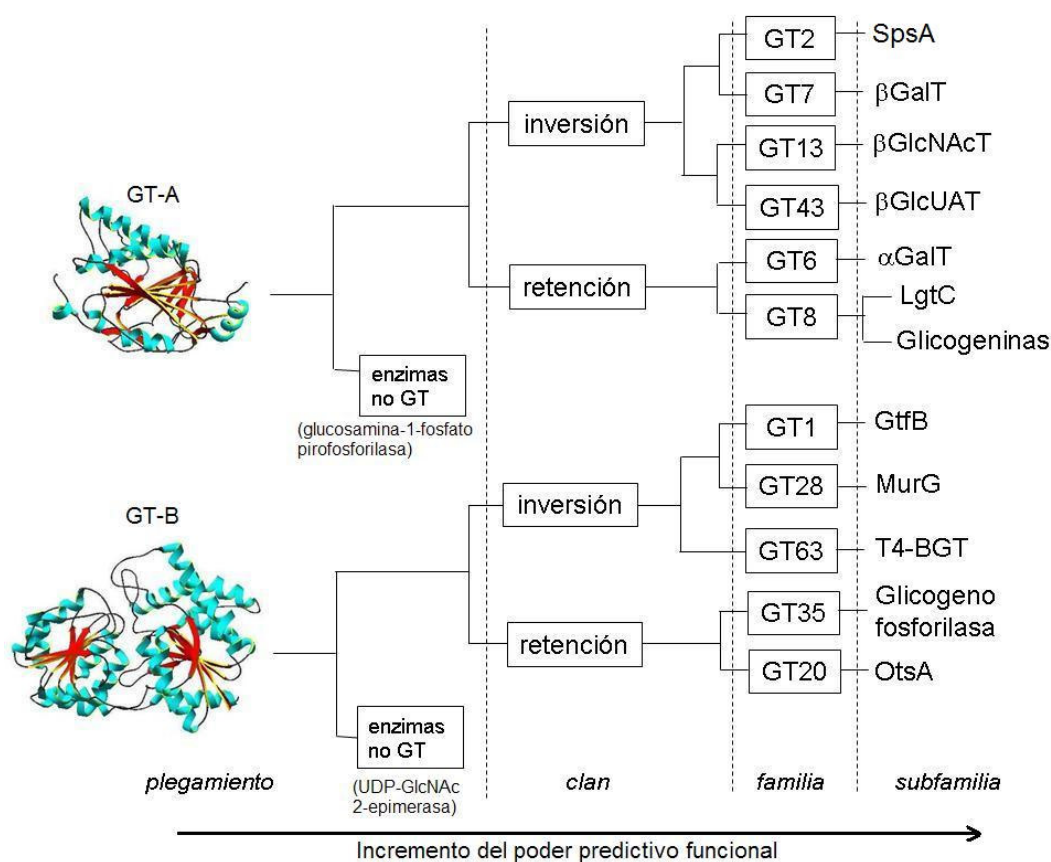


**Figura 4.** Topologías de las superfamilias de glicosiltransferasas. (A) GT-A,  $\alpha$ -1,3-galactosiltransferasa ( $\alpha$ 3GT- 1k4v.pdb). (B) GT-B, TDP-vancosaminiltransferasa (GtfD – 1rrv.pdb). (C) Sialil transferasa de *Campylobacter jejuni* (CstII – 1ro7.pdb).

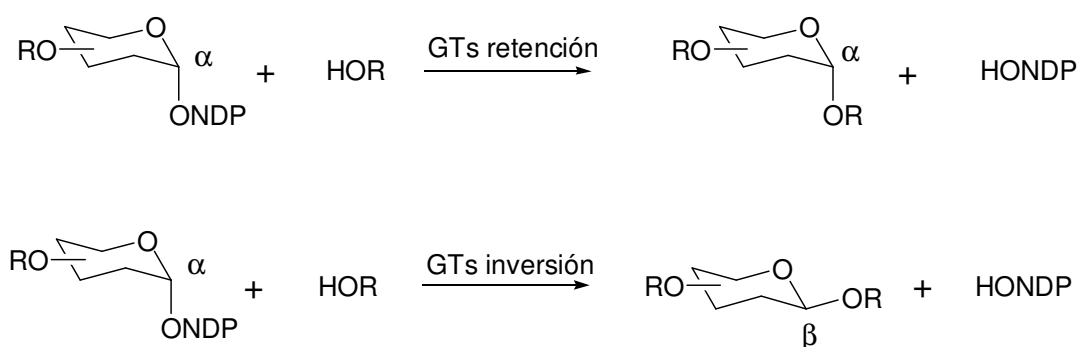
Los estudios cristalográficos han permitido establecer tres tipos de plegamientos para las glicosiltransferasas (figura 4). Inicialmente se han considerado dos plegamientos: GT-A y GT-B (Hu y Walter, 2002). Sin embargo, recientemente se ha cristalizado una sialil transferasa de *Campylobacter jejuni* (Chiu et al. 2004), que presenta un plegamiento diferente a los anteriores, de modo que ha dado lugar a una tercera superfamilia: CstII.

La superfamilia GT-A presenta plegamiento tipo sandwich  $\alpha/\beta/\alpha$  monodominio y son metalo dependientes ( $Mn^{+2}$  o  $Mg^{+2}$ ). Consisten en un arreglo central de láminas  $\beta$  paralelas rodeado de un número variable de hélices  $\alpha$  por ambos lados, recordando al motivo de enlace a mononucleótidos o plegamiento de Rossmann. Este dominio ha sido denominado UBD (*Uridine Binding Domine*) por Gastinel *et. al.* 2001, ya que un buen número de glicosiltransferasas utilizan como sustrato donador azúcar nucleótidos de uridina. El subdominio SGC (*SpsA GnT I core*), denominado así de estudios anteriores de las glicosiltransferasas

SpsA y GnT I (Unligil y Rini, 2000), se une a la porción nucleótido del sustrato donador y contiene un carboxilato (Asp o Glu) que actuaría como base catalítica (Tarabouriech *et al.* 2001) y al motivo DXD (Aspartato-X-Aspartato). Este motivo juega un rol importante en la unión del  $Mn^{+2}$ , necesario para la catálisis. Por otra parte, GT-B contiene dos dominios de tipo Rossmann orientados uno de cara al otro, y en medio está situado el sitio activo y son metaloindependientes. Esta topología se conoce menos que la GT-A.



**Figura 6.** Clasificación de las glicosiltransferasas según su estructura tridimensional y la configuración (retención/configuración) de los enlaces glicosídicos formados en sus respectivos productos (Coutinho *et al.* 2003). SpsA: glicosiltransferasa de *Bacillus subtilis*;  $\beta$ GalT:  $\beta$ -1,4-galactosil-transferasa;  $\beta$ GlcNAcT:  $\beta$ -1,2-N-acetil-glucosaminil-transferasa;  $\beta$ GlcUAT:  $\beta$ -1,3-gluconil-transferasa;  $\alpha$ GalT:  $\alpha$ -1,3-galactosil-transferasa; LgtC:  $\alpha$ -1,4-galactosil-transferasa; Glicogeninas:  $\beta$ -1,4-glucosil-transferasa; GtfB:  $\beta$ -1,4-glucosil-transferasa; MurG:  $\beta$ -N-acetilglucosaminil-transferasa; T4-BGT: DNA- $\beta$ -glucosil-transferasa; OtsA: trehalosa fosfato sintasa.



**Figura 5.** Reacciones catalizadas por las glicosiltransferasas con retención e inversión de configuración del carbono anomérico.

Por otra parte, CstII tiene un plegamiento similar a GT-A con algunas diferencias topológicas en el plegamiento tipo sandwich  $\alpha/\beta/\alpha$ . El sustrato donador es un nucleótido monofosfo azúcar (CMP-NeuAc) y no presenta el motivo de enlace al ión metálico DXD (Chiu et al. 2004).

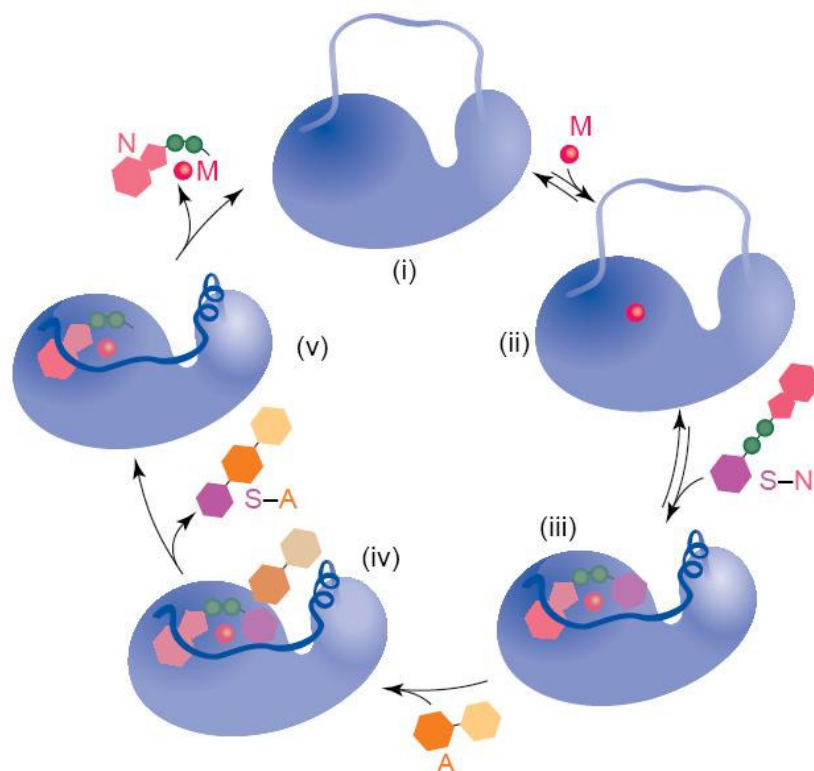
A pesar de que las superfamilias GT-A y GT-B parecen estar bien definidas, no existe correlación con la estereoquímica de sus productos. Dentro de cada superfamilia hay enzimas que retienen y que invierten la configuración del carbono anomérico del producto respecto al azúcar donador (figura 5). Así, las familias que tienen el mismo plegamiento y el mismo mecanismo de reacción se agrupan en clanes, y los clanes que tienen el mismo plegamiento se agrupan en la misma superfamilia (Coutinho *et al.* 2003). De esta manera, a medida que se adentra en la clasificación, aumenta el poder predictivo de la función (figura 6). Por otra parte, para la nueva superfamilia, CstII, de momento unifamiliar (GT42), el mecanismo de reacción es mediante inversión de configuración.

**Tabla 4.** Enlace al ión metálico y regiones flexibles de glicosiltransferasas estudiadas por difracción de rayos X (modificado de Qasba *et al.* 2005).

GTs	Tipo de plegamiento (familia CAZy)	Motivo de enlace a ión metálico	Región flexible	Enzima (especie)
<i>GTs de mamíferos con inversión de configuración</i>				
β4Gal-T1	A (GT7)	DXD	313-316, 345-365	β-1,4-galactosiltransferasa I ( <i>Bos taurus</i> )
GnT I	A (GT13)	EXD	318-330	β-1,2-GlcNAc transferasa ( <i>Oryctolagus cuniculus</i> )
GlcAT-I	A (GT43)	DXD	140-152	β-1,3-glucoroniltransferasa I ( <i>Homo sapiens</i> )
GlcAT-P	A (GT43)	DXD	150-162	β-1,3-glucoroniltransferasa P ( <i>Homo sapiens</i> )
<i>GTs de mamíferos con retención de configuración</i>				
EXTL2	A (GT64)	DXD	277-281	α-1,4-N-Acetilhexosaminiltransferasa ( <i>Mus musculus</i> )
α3GT	A (GT6)	DXD	358-368	α-1,3-galactosiltransferasa ( <i>Bos taurus</i> )
GT-A	A (GT6)	DXD	179-194	α-1,3-GalNAc transferasa A ( <i>Homo sapiens</i> )
GT-B	A (GT6)	DXD	179-194	α-1,3-galactosiltransferasa B ( <i>Homo sapiens</i> )
<i>GTs de microbios y bacteriofago con inversión de configuración</i>				
SpsA	A (GT2)	DXD	134-136, 218-231	Glicosiltransferasa putativa ( <i>Bacillus subtilis</i> )
CstII	CstII (GT42)	ninguno	155-188	α-2,3/2,8-sialiltransferasa ( <i>Campylobacter jejuni</i> )
BGT	B (GT63)	ninguno		β-glucosiltransferasa (fago T4)
MurG	B (GT28)	ninguno		β-1,4-GlcNAc transferasa ( <i>Escherichia coli</i> )
GtfB	B (GT1)	ninguno		β-glucosiltransferasa ( <i>Amycolaptosis orientalis</i> )
<i>GTs de microbios con retención de configuración</i>				
LgtC	A (GT8)	ninguno	75-80, 246-251	α-1,4-galactosiltransferasa ( <i>Neisseria meningitidis</i> )
Kre2p / Mnt1p	A (GT15)	EXD		α-1,2-manosiltransferasa ( <i>Saccharomices cerevisiae</i> )

Todas las estructuras cristalográficas de las glicosiltransferasas conocidas a la fecha (ver tabla 4), sugieren cambios conformacionales asociados con su actividad (Qasba *et al.* 2005). Estas proteínas tienen al menos un *loop* flexible cerca del sitio catalítico, que suele estar localizado cerca de la zona

de unión al azúcar nucleótido. En las estructuras carentes de sustrato, no se pueden determinar las coordenadas atómicas del *loop* flexible. Sin embargo, en las que contienen al sustrato donador, el *loop* puede aparecer tanto en conformación cerrada, cubriendo al sustrato, o en forma desordenada cerca del sitio de enlace al sustrato donador.



**Figura 7.** Ciclo catalítico de las glicosiltransferasas dependientes de ión metálico (Qasba *et al.* 2000). (i) Apoenzima, *loop* abierto. (ii) Complejo metal-enzima. (iii) Loop cerrado por entrada de sustrato donador. (iv) Catálisis y expulsión de producto. (v) Liberación de complejo metal-nucleótido.

En cada enzima, el *loop* actúa como una compuerta que permite la entrada del sustrato donador a la cavidad del sitio activo y la salida de productos (Qasba *et al.* 2005). En las glicosiltransferasas dependientes de ión metálico, tal como la  $\alpha$ 3GT, el ciclo catalítico (figura 7) empieza cuando la proteína presenta la conformación abierta del *loop*, que permite el enlace

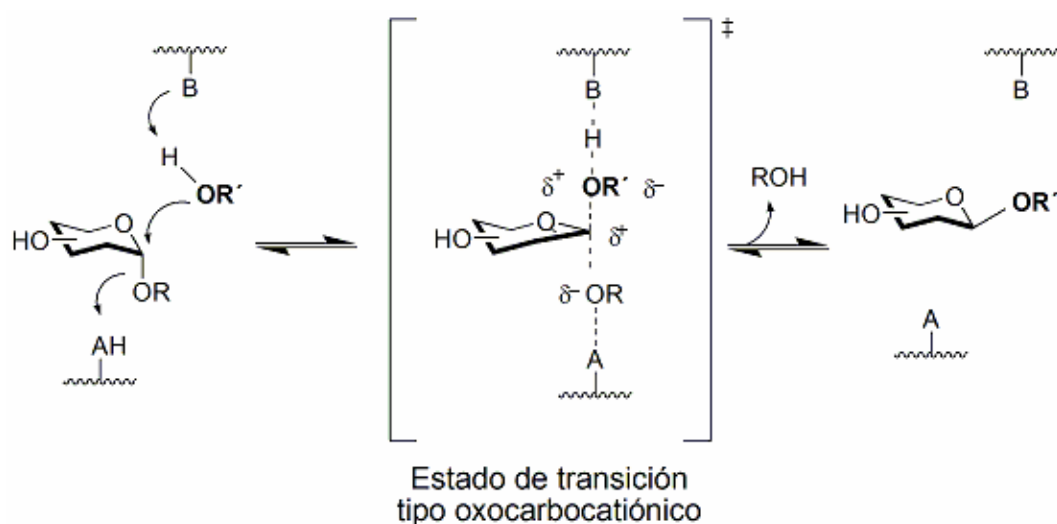
del ión metálico a la enzima. A continuación, el azúcar nucleótido se une al complejo metal-enzima induciendo un cambio conformacional en el *loop*, pasando así a la forma cerrada. Posteriormente, el sustrato aceptor se une en parte al sitio activo, y en parte, queda expuesto al disolvente. Después de la catálisis, en la cual se forma el enlace glicosídico, el producto es expulsado del sitio activo mientras el nucleótido permanece unido al complejo metal-enzima hasta que el *loop* cambia a la conformación abierta, facilitando así, la salida del complejo nucleótido-metal y permitiendo el inicio de un nuevo ciclo catalítico.

### **Mecanismos de reacción de glicosiltransferasas**

Como se ha mencionado anteriormente, aun no están totalmente definidos los mecanismos de reacción para las glicosiltransferasas, sin embargo, existen propuestas respaldadas por datos experimentales. Los mecanismos de reacción se pueden clasificar en dos grupos importantes: (1) para glicosiltransferasas que actúan con inversión de configuración y (2) para aquellas que retienen la configuración del carbono anomérico del azúcar donador (figura 5).

Las propuestas mecanísticas para las GTs que actúan con inversión de configuración han presentado menos problemas y están mejor apoyadas por datos experimentales. Se cree que estos mecanismos son análogos a los de glicosidasas que invierten configuración de carbono anomérico (Murray *et al*, 1997; Lairson y Withers, 2004). Consisten en un mecanismo  $S_N2$  donde una base general (B) desprotona al aceptor potenciando su actividad nucleofílica para atacar así al carbono anomérico del sustrato donador, mientras que un ácido (A) situado en la cara opuesta del azúcar facilita la formación del enlace glucosídico. El ácido (A) bien podría ser el ión metálico  $Mn^{+2}$  en el caso de las glicosiltransferasas con plegamiento GT-A, o podría actuar neutralizando la carga negativa del fosfato  $\beta$  del nucleótido, una vez hidrolizado el azúcar donador (figura 8).

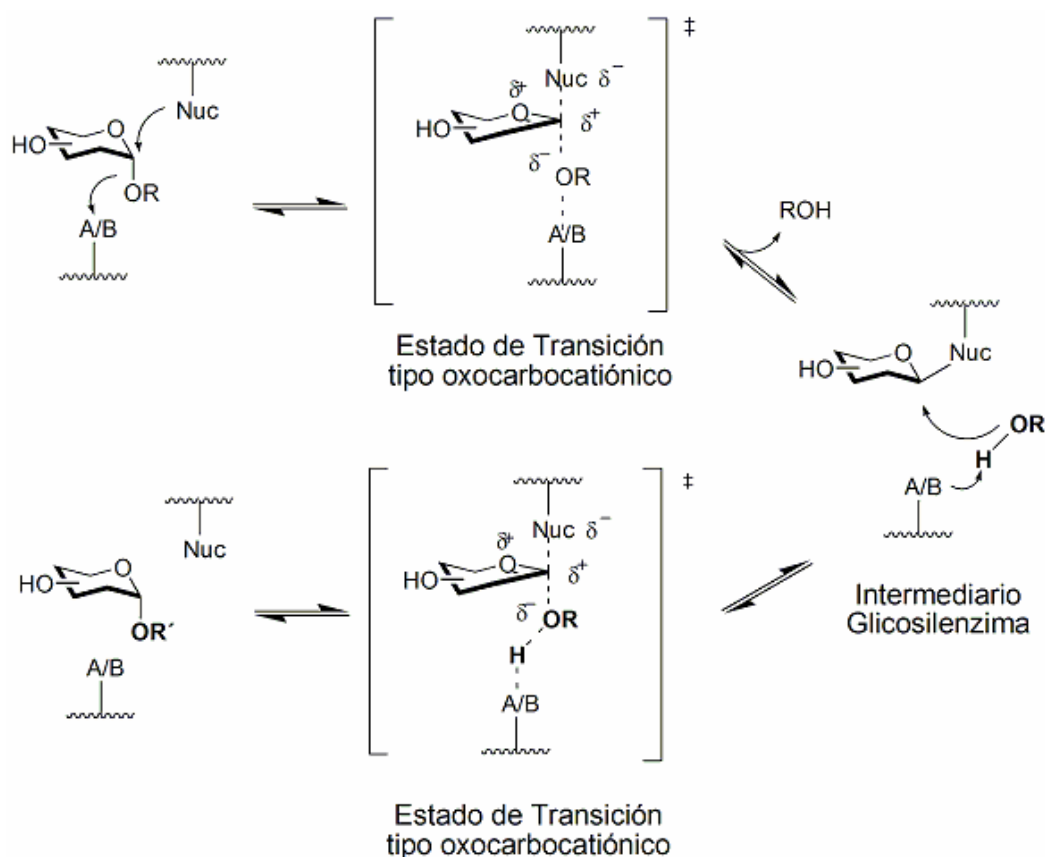




**Figura 8.** Mecanismo  $S_N2$  propuesto para glicosiltransferasas con inversión de configuración.

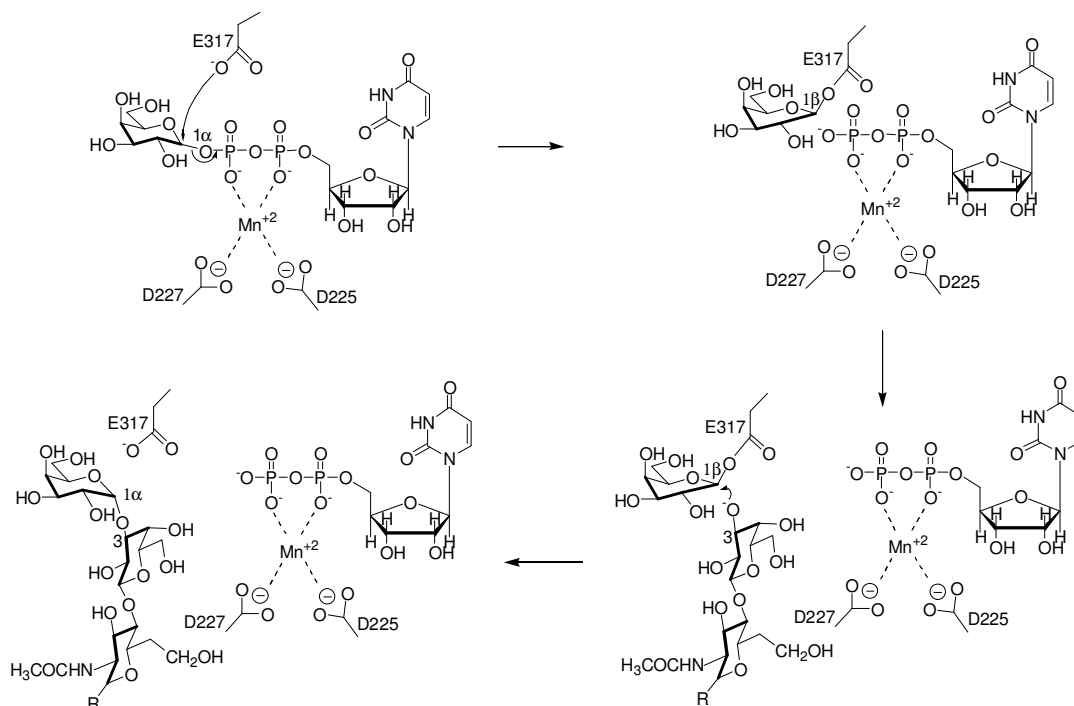
Para este mecanismo  $S_N2$  se propone un estado de transición de tipo oxocarbocatiónico. Estudios de efectos isotópicos cinéticos tanto del disolvente como del sustrato para la  $\beta$ -1,4-GalTI y  $\alpha$ -1,3-FucTV (Sung *et al.* 1988; Murray *et al.* 1997), y de inhibición (Burkart *et al.* 2000) son consistentes con la presencia de un estado de transición de carácter oxocarbocatiónico, e indican que el enlace glicosídico es escindido antes del ataque nucleófilo del sustrato aceptor, siendo por tanto una reacción con mecanismo intermedio entre la sustitución nucleofílica  $S_N2$  y la  $S_N1$ .

En el caso de las GTs que actúan con retención de configuración, las propuestas mecanísticas son menos claras. Sin embargo, por comparación con las glicosidasas con retención de configuración, se ha propuesto un mecanismo de doble desplazamiento que implica el ataque de un nucleófilo y la formación de un intermedio covalente glicosil enzima (Ünligil y Rini 2000; Bourne y Henrissat, 2001; Davies *et al.* 2001; Lairson y Withers, 2004).



**Figura 9.** Mecanismo de doble desplazamiento propuesto para glicosiltransferasas con retención de configuración.

Según esta propuesta, un nucleófilo ( $\text{Nuc}^-$ ) situado en el centro activo ataca al carbono anomérico del sustrato donador formando el intermedio covalente, a la vez que un residuo ácido general coadyuva la liberación del grupo saliente ( $\text{ROH}$ ). En una segunda etapa, una base general, que puede ser la base conjugada del ácido general, aumenta la nucleofilia del sustrato aceptor que ataca al carbono anomérico del intermedio glicosilenzima, dando lugar al producto (figura 9). En las GTs que requieren ión metálico, se sugiere que éste podría actuar como ácido general mediante catálisis electrofílica. Además, se propone que los fosfatos del UDP podrían actuar como la base general.



**Figura 10.** Mecanismo propuesto para la  $\alpha$ 3GT, prototipo de glicosiltransferasa de retención de configuración de la familia 6. (Gastinel et al. 2001)

Las pruebas experimentales para apoyar esta propuesta se han enfocado en la búsqueda del nucleófilo y del intermedio covalente, y hasta la fecha, no son concluyentes. Aunque muchas estructuras cristalográficas de glicosiltransferasas con retención de configuración de la familia 6 (CAZy) han sido resueltas, en la mayoría de ellas no se observa el sustrato donador íntegro, sino más bien, hidrolizado, lo cual es una limitación para identificar el nucleófilo. A pesar de ello, en la  $\alpha$ 3GT se puede observar que en la cavidad del sitio activo hay dos residuos, D316 y E317, que podrían actuar como posibles nucleófilos (figura 10) (Gastinell 2001). Sin embargo, éste mecanismo, tal como está propuesto, no explica cómo se activa el aceptor, puesto que para ello se requiere de catálisis básica que aumente la nucleofilia del hidroxilo que debe atacar al carbono anomérico.

Por otra parte, en estructuras cristalógráficas más recientes de la  $\alpha$ 3GT, que contienen sustrato aceptor (lactosa), se observa que el E317 interacciona con el OH-4 de la lactosa. Además, estudios mutacionales sobre este residuo (D317E y E317G) mostraron significativas variaciones en la constante de unión a lactosa, como resultado de las mutaciones (Zhang et al, 2003). Éstos resultados podrían poner en duda el rol de E317 como posible nucleófilo.

En otras estructuras cristalógráficas de GTs, correspondientes a la  $\alpha$ -galactosiltransferasa de *Neisseria meningitidis* (LgtC, familia GT-2), se han podido observar las estructuras de los sustratos donador y aceptor intactos (Persson *et al.* 2001). En estas estructuras no se han localizado aminoácidos carboxílicos cercanos al carbono anomérico del sustrato donador, y por tanto, la glutamina 189 fue tentativamente propuesta como nucleófilo enzimático. Sin embargo, esta propuesta ha sido descartada una vez que el mutante G189A mostró actividad (~3%) suficiente como para descartar el posible rol nucleofílico del residuo G189. Por otra parte, diferentes estrategias empleadas para glicosil hidrolasas para capturar un intermedio covalente, no han dado resultado para la LgtC. De modo que los autores han propuesto un nuevo mecanismo, poco usual y con precedentes químicas limitadas, que consiste en el ataque nucleofílico directo del grupo hidroxilo del aceptor al carbono anomérico del donador por la misma cara, por la cual el UDP se libera como grupo saliente, conduciendo a un estado de transición tipo ión oxocarbonio altamente disociativo (ver más adelante, figura 12). Este mecanismo, denominado  $S_Ni$  fue también propuesto par otras GTs, tales como la trehalosa-6-fosfato sintasa (OtsA) (Gibson *et al.* 2002), trehalosa fosforilasa (Goedl *et al.* 2006) y glicógeno fosforilasa (Watson *et al.* 1999).

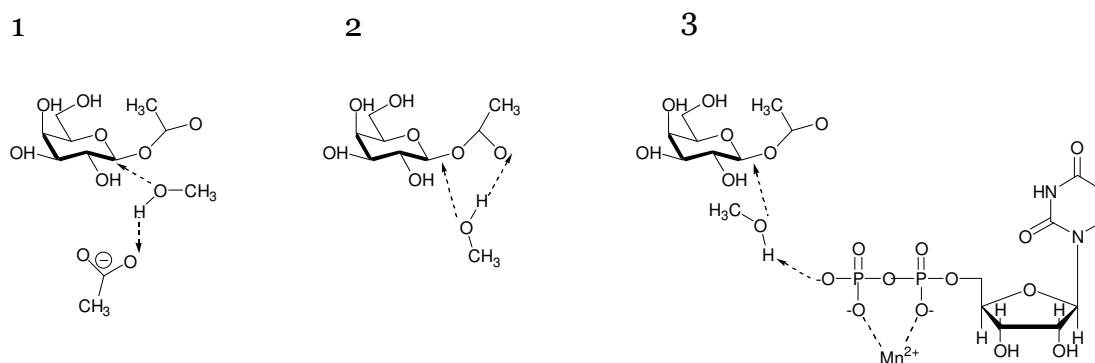
Sin embargo, en un trabajo reciente (Lairson *et al.* 2004) ha sido posible encontrar un intermedio covalente glicosil-enzima (LgtC) en un residuo de aspartato insospechado. Se substituyó la glutamina 189 por glutamato

para aumentar la supuesta nucleofilia del residuo, pero sorprendentemente, se capturó al intermedio covalente de galactosa unido al residuo contiguo aspartato 190. Además, la sustitución del aspartato 190 por alanina disminuyó 3000 veces la actividad de el enzima, sugiriendo por tanto que el posible nucleófilo es el D190 en lugar de la G189. De todas formas, D190 está situado a 9Å del carbono anomérico, esta distancia sugiere que el enzima tendría que sufrir un cambio conformacional importante para acercar el nucleófilo al sustrato donador.

A los estudios experimentales anteriormente descritos deben añadirse los estudios teóricos de modelización molecular con cálculos mecanocuánticos *ab initio* HF y DFT. André *et al.* 2003 basaron sus estudios en el mecanismo de doble desplazamiento en dos etapas. Para la primera etapa modelaron el ataque nucleofílico del aminoácido base catalítica (B-) al carbono anomérico del sustrato donador para formar un intermedio glicosil - enzima. Este primer modelo, además incluyó un segundo aminoácido catalítico ácido general (A), que podría facilitar la ruptura del enlace oxígeno - carbono anomérico atacando electrofílicamente al oxígeno. Los componentes del sistema incluyeron al sustrato donador completo (UDP-Gal), un metal divalente ( $Mg^{+2}$ ) y las partes esenciales del ácido catalítico (A) y la base catalítica (B-) están representadas por el ácido acético y acetato, respectivamente. Los cálculos de estabilidad energética dieron que la formación del intermedio glicosil - enzima requiere del ataque nucleofílico por parte de la base catalítica (B-) y que no es indispensable la transferencia de protón del ácido catalítico (A) para la ruptura del enlace oxígeno - carbono anomérico.

Para la segunda etapa, se modeló la desprotonación del hidroxilo 3 del sustrato aceptor, así como el ataque nucleofílico del mismo al intermedio glicosil - enzima en el carbono anomérico (André *et al.* 2003). Se tomaron en cuenta 3 posibles vías de desprotonación del OH: (1) presencia de un segundo residuo catalítico que actúe como base (A-), (2) participación de la base catalítica (B) covalentemente enlazada al azúcar donador del

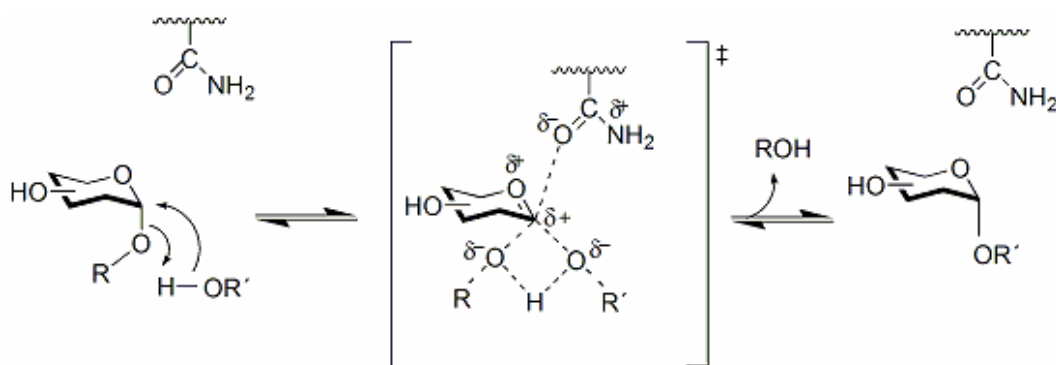
intermedio glicosil - enzima y (C) la transferencia de protón al fosfato del UDP saliente (figura 11). Los cálculos dieron que la desprotonación del OH por la base (B-) del intermedio glicosil - enzima es energéticamente desfavorable, en cambio, es favorable la transferencia de protón a una base adicional (A-) y ocurriría previamente al ataque nucleofílico del aceptor. Alternativamente, para enzimas que no presenten un segundo residuo catalítico (A-), sería también favorable la transferencia de protón al fosfato del UDP. En éste último caso, la acidez del grupo fosfato se vería modulada por la coordinación al metal divalente.



**Figura 11.** Representación esquemática de los modelos estructurales utilizados para describir la segunda etapa del mecanismo de doble desplazamiento (André *et al.* 2003). (1) Base catalítica adicional. (2) Base catalítica del intermedio covalente glicosil-enzima. (3) Fosfatos del UDP como base.

Alternativamente y en vista de que las pruebas experimentales no son concluyentes, otro mecanismo, por sustitución nucleofílica interna ( $S_Ni$ ), ha sido propuesto para las glicosiltransferasas con retención de configuración. Este mecanismo fue inicialmente propuesto para la glucógeno fosforilasa (Sinnott, 1990), posteriormente para la LgtC (Persson *et al.*, 2001) y finalmente para la  $\alpha$ 3GT (Boix *et al.* 2002). A pesar de todo, a la fecha aun no existen pruebas experimentales que lo apoyen. Este mecanismo consiste en un único estado de transición, en el cual, el ataque nucleofílico por parte del aceptor y la liberación del grupo saliente

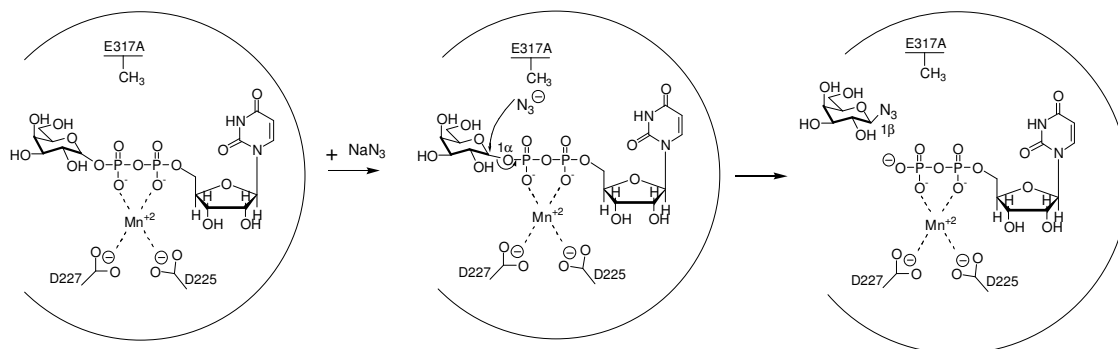
ocurren por la misma cara (figura 12). El estado de transición es inicialmente cíclico y posteriormente se desarrolla un fuerte carácter oxocarboniónico. En este mecanismo, el enzima actuaría como un andamio o molde que orienta y aproxima a los sustratos implicados, disminuyendo la energía de activación y estabilizando el estado de transición de tipo oxocarbocatiónico (Lairson y Whitters, 2004).



**Figura 12.** Mecanismo de sustitución nucleofílica interna ( $S_{Ni}$ ) propuesto para glicosiltransferasas.

El mecanismo  $S_{Ni}$  propuesto es respaldado por cálculos mecanocuánticos estructurales (Tvaroska, 2004; ver también revisión de Breton *et al.* 2006). Aplicando métodos basados en la Teoría de Funcionales de Densidad (DFT) sobre un modelo de sitio activo de LgtC basado en 136 átomos, se obtuvo que el mecanismo basado en un solo paso es energéticamente favorecido. Posteriormente, estos estudios teóricos fueron la base para la síntesis de posibles inhibidores análogos al estado de transición (Raab *et al.* 2005).

Actualmente ninguna de las propuestas mecanísticas para glicosiltransferasas con retención de configuración está probada. Los cambios conformacionales que sufren estas enzimas complican mucho la determinación de los residuos participantes en la unión a sustratos y consiguientemente en los mecanismos catalíticos.



**Figura 13.** Rescate químico del mutante E317A ( $\alpha$ 3GT) por azida, siguiendo un mecanismo análogo al de glicosidasas que actúan con retención de configuración (Monegal y Planas, 2006).

A pesar de estas ambigüedades, estudios mutacionales sobre el residuo E317, y de rescate químico con azida como nucleófilo exógeno (figura 13) del mutante inactivo E317A, realizados en nuestro laboratorio (Monegal y Planas, 2006), demuestran que el E317 es fundamental para la catálisis. En las mismas condiciones, no se observó rescate de la actividad enzimática para D316A, quedando demostrado así, que el residuo D316 no es esencial en la catálisis.

### La $\alpha$ -1,3-galactosiltransferasa en contexto biomédico

Uno de los principales intereses biomédicos para el estudio de la  $\alpha$ 3GT viene de su implicación en el xenotransplante. El xenotransplante es el transplante de órganos o tejidos entre especies diferentes. En biomedicina, se ha propuesto el transplante de órganos de cerdos a humanos como una alternativa al alotransplante, dada la escasez de donantes humanos frente a la demanda de órganos. Actualmente este tipo de transplantes no se realizan, y uno de los principales obstáculos es el rechazo inmunológico hiperagudo (HAR) mediado por el antígeno de galili presente en casi todos



los mamíferos con excepción del hombre. El epítipo del antígeno de galili (figura 1.1, capítulo 1) es un carbohidrato sintetizado por la  $\alpha$ 3GT.

Los epítopos tipo galili ( $\text{Gal}\alpha_{1,3}\text{Gal}\beta\text{-R}$ ) se expresan abundantemente en las superficies de las células endoteliales de todos los mamíferos no primates. Están presentes en forma de tricasáridos ( $\text{Gal}\alpha_{1,3}\text{-Gal}\beta_{1,4}\text{-Glc}\beta$ ,  $\text{Gal}\alpha_{1,3}\text{-Gal}\beta_{1,4}\text{-GlcNAc}\beta$ ) y pentasacáridos tal como el  $\text{Gal}\alpha_{1,3}\text{Gal}\beta_{1,4}\text{GlcNAc}\beta_{1,3}\text{Gal}\alpha_{1,4}\text{Glc}\beta$  (Janczunk *et al.*, 1990). Por otra parte, los humanos producen una gran cantidad de anticuerpos naturales anti-Gal, que se encuentran entre los más abundantes en el suero sanguíneo, representando del 1 al 2% de las IgG. Por consiguiente, en el xenotransplante de órganos provenientes del cerdo, el HAR empieza por la unión de anticuerpos naturales humanos al endotelio de los órganos transplantados, activando al complemento por la vía clásica (Joziase y Oriol, 1999). De esta manera, se destruyen los órganos transplantados en cuestión de minutos u horas y este tipo de rechazo no se puede evitar con drogas inmunosupresivas.

Para prevenir el HAR se han planteado una serie de alternativas. En un principio, la eliminación de anticuerpos anti-Gal por inmunoadsorción en columnas de afinidad o por perfusión de la sangre del receptor a través de los órganos del donante, estrategia que ha dado buenos resultados en alotransplantes. Recientemente se han obtenido cerdos transgénicos *knock-outs* heterocigotos para la  $\alpha$ 3GT, por consiguiente carentes de antígeno Gal. A pesar, de que estos cerdos transgénicos han dado resultados alentadores (Dai *et al.* 2002, Phelps *et al.* 2003, Yamada *et al.* 2005, Kuwaki *et al.* 2005), el problema no está solucionado. Una alternativa a los transgénicos es el diseño y síntesis de inhibidores de la  $\alpha$ 3GT, para los cual será necesario conocer su mecanismo de reacción. De todas maneras, el problema del xenotransplante se tendría que abordar considerando una combinación de las estrategias mencionadas, ya que cada una tiene sus ventajas e inconvenientes.

Las implicaciones biomédicas de la  $\alpha$ 3GT en el xenotransplante y el hecho de considerarse un modelo para el estudio de mecanismos de reacción de glicosiltransferasas, hace atractivo el estudio de este enzima desde el punto de vista estructural y funcional.

### **La $\alpha$ -1,3-galactosiltransferasa como prototipo de las glicosiltransferasas**

La  $\alpha$ 3GT es un prototipo para estudios estructurales y mecanísticos de las glicosiltransferasas por la disponibilidad de estructuras cristalográficas, sin embargo debido a la existencia de conformaciones abierta y cerrada en el sitio activo (específicamente, zona C-terminal), se requieren de estudios mutacionales para establecer la participación de cada uno de estos residuos en la actividad. Por tal motivo, la presente tesis doctoral pretende contribuir al conocimiento de la relación estructura/función de la  $\alpha$ 3GT a través del análisis mutacional del extremo C-terminal (358-368) y caracterización cinética como de estabilidad conformacional de cada uno de los mutantes de alanina de esta zona catalítica.

# **OBJETIVOS**

---

---

## OBJETIVOS

### Objetivo general

Estudiar la participación de cada uno de los residuos de la zona carboxilo terminal (residuos 358-368) de la  $\alpha$ -1,3-galactosiltransferasa en la estabilidad y cinética enzimática, mediante análisis mutacional por alanina.

### Objetivos específicos

- Estudiar las estructuras cristalográficas de la  $\alpha$ 3GT y en base a ellas construir modelos que muestren las posibles interacciones entre ligandos y residuos del sitio activo.
- Diseñar y obtener una serie de mutantes de la  $\alpha$ 3GT en el extremo C-terminal: T358A, K359A, E360A, Y361A, N362A, V363A, V364A, R365A, N366A, N367A y V368A.
- Desarrollar y validar un método para estudios cinéticos de glicosiltransferasas basado en HPCE sin derivatización de sustratos ni productos
- Validar el método de ensayo radiométrico para estudios cinéticos de la  $\alpha$ 3GT.
- Estudiar la estabilidad de las proteínas mutantes mediante equilibrio de desnaturalización con úrea.
- Caracterizar las actividades cinéticas de la serie de mutantes obtenidos:  $k_{cat}$  y  $K_M$ .

# CAPÍTULO 1

---

---

**MODELIZACIÓN MOLECULAR DE  
COMPLEJOS DE LA  
 $\alpha$ 1,3-GALACTOSILTRANSFERASA  
CON SUSTRATOS Y PRODUCTO**

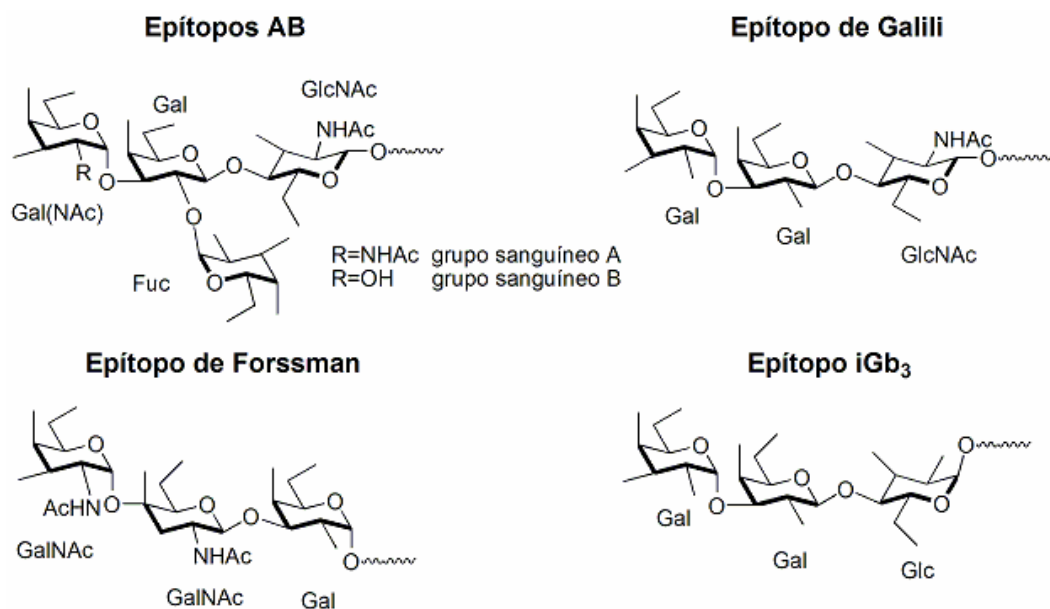
# MODELIZACIÓN MOLECULAR DE COMPLEJOS DE LA $\alpha$ 1,3-GALACTOSILTRANSFERASA CON SUSTRATOS Y PRODUCTO

## Introducción

Según la clasificación del servidor CAZy (Carbohydrate-Active Enzymes), la  $\alpha$ -1,3-galactosiltransferasa (2.4.1.87) pertenece a la familia 6, juntamente con otras proteínas con actividades  $\alpha$ -1,3-N-acetilgalactosaminiltransferasa (2.4.1.40);  $\alpha$ -galactosiltransferasa (2.4.1.37) y globosio  $\alpha$ -1,3-N-acetilgalactosaminiltransferasa (2.4.1.88). A la fecha (junio de 2007), las estadísticas indican el conocimiento de 102 secuencias diferentes de nucleótidos correspondientes tanto a proteínas completas como a fragmentos, incluyendo pseudogenes. De tales, muchas son repetidas, y 323 secuencias están depositadas en el servidor *GenBank/GenPept* y 79 en el servidor *Swissprot*. Sin embargo, solamente se conocen estructuras tridimensionales de 3 proteínas:  $\alpha$ -1,3-galactosiltransferasa bovina (13 estructuras) (Gastinel *et al.*, 2001; Boix *et al.*, 2001; Boix *et al.*, 2002),  $\alpha$ -1,3-N-acetilgalactosaminiltransferasa específica para la síntesis del antígeno A de los grupos sanguíneos humanos (19 estructuras), y la  $\alpha$ 1,3-galactosiltransferasa específica para el antígeno B de los grupos sanguíneos humanos (13 estructuras) (Patenaude *et al.*, 2002).

Las glicosiltransferasas de la familia 6 parecen estar especializadas en la síntesis de epítomos. Un núcleo de  $\alpha$ -galactosil(1-3)galactosa es la estructura común de muchos oligosacáridos antigénicos presentes en las superficies celulares de mamíferos. Los epítomos de tales antígenos hasta ahora caracterizados son: (1) los oligosacáridos de los grupos sanguíneos A y B localizados en las superficies de los eritrocitos y/o endotelios

vasculares de varios mamíferos (Oriol, 1987); (2) el epítipo de Forssman; (3) el isoglobósido 3 (iGb<sub>3</sub>) y (4) el epítipo de Galili (figura 1.1). Estos últimos 3 no están presentes en humanos. Los enzimas que los sintetizan presentan características muy similares estructuralmente y comparten algunas características comunes. Todas utilizan como sustratos donadores azúcares unidos a UDP, ya sea Gal o NAcGal; requieren de Mn<sup>2+</sup> y son altamente específicas. Sin embargo, poco se conoce sobre la especificidad por los sustratos aceptores. En la tabla 1.1 se resumen los enzimas, sus sustratos y productos.



**Figura 1.1.** Epítipos sintetizados por glicosiltransferasas de la familia 6 (CAZy).

La  $\alpha$ -1,3-galactosiltransferasa ( $\alpha$ 3GT) bovina fue una de las primeras proteínas de la familia en ser cristalizada y por ello llegó a constituirse en el modelo o prototipo de las glicosiltransferasas. Existen dos formas cristalinas, la *forma I* es la que inicialmente fue determinada por Gastinel *et al.*, 2001, y presenta un extremo C-terminal no muy bien definido. Posteriormente Boix *et al.*, 2001 determinaron una *forma II* donde el

extremo C-terminal fue resuelto como una corta hélice  $\alpha$  y parece ser muy importante en la catálisis. Además, estos estudios sugieren que la proteína sufre cambios conformacionales importantes en la zona C-terminal que complican la elucidación de las bases para el reconocimiento de sustratos y mecanismo de reacción, a pesar de que existen varias propuestas. Los cambios conformacionales en glicosiltransferasas han sido evidenciados por primera vez para la  $\beta$ 2-GlcNAc transferasa (Ünligil et. al. 2000) y para la  $\beta$ 4-Gal transferasa (Ramakrishnan y Qasba, 2001).

**Tabla 1.1.** Enzimas, sustratos y productos de glicosiltransferasas, familia 6 CAZy.

GT	Donador	Aceptor	Producto
$\alpha$ 3GT	UDP-Gal	$\beta$ Gal1,4 $\beta$ Glc(NAc)-R	$\alpha$ Gal1,3 $\beta$ Gal1,4 $\beta$ Glc(NAc)-R
iGb <sub>3</sub>	UDP-Gal	$\beta$ Gal1,4 $\beta$ Glc $\beta$ -ceramida	$\alpha$ Gal1,3 $\beta$ Gal1,4 $\beta$ Glc $\beta$ -ceramida
GT-B	UDP-Gal	$\alpha$ Fuc1,2 $\beta$ Gal1,4 $\beta$ GlcNAc-R	$\alpha$ Gal1,3 $\alpha$ Fuc1,2 $\beta$ Gal1,4 $\beta$ GlcNAc-R
GT-A	UDP-GalNAc	$\alpha$ Fuc1,2 $\beta$ Gal1,4 $\beta$ GlcNAc-R	$\alpha$ GalNAc1,3 $\alpha$ Fuc1,2 $\beta$ Gal1,4 $\beta$ GlcNAc-R
Forss-S	UDP-GalNAc	$\beta$ GalNAc1,3 $\alpha$ Gal-R	$\alpha$ GalNAc1,3 $\beta$ GalNAc1,3 $\alpha$ Gal-R

A pesar de las estructuras cristalográficas disponibles para glicosiltransferasas, aún no se tienen complejos que incluyan ambos sustratos, donador y aceptor, o con el producto, debido a dificultades experimentales. Esto impide comprender mejor las interacciones entre los sustratos y los residuos catalíticos, y por ende, los mecanismos de reacción. Ante esta situación, la modelización molecular de los complejos GT/sustratos donador y aceptor y GT/producto es una buena alternativa. Además, la complejidad del modelado de los complejos se ve favorecida por la disponibilidad de las coordenadas atómicas de estructuras cristalográficas de alta resolución que ya contienen al menos uno de los sustratos, especialmente para la  $\alpha$ 3GT bovina.

Heissigerova et al., 2003 generaron 5 modelos por mecánica molecular, de estructuras de las glicosiltransferasas de la familia 6, incluyendo sustratos.



Tales modelos son  $\alpha 3\text{GT}/\text{UDP-Gal}/\beta\text{Gal-1,4-Glc}/\text{Mn}$ ;  $\text{GTA}/\text{UDP-GalNAc}/\alpha\text{Fuc-1,2-}\beta\text{Gal-1,4-}\beta\text{GlcNAc}/\text{Mn}$ ;  $\text{GTB}/\text{UDP-Gal}/\alpha\text{Fuc-1,2-}\beta\text{Gal-1,4-}\beta\text{GlcNAc}/\text{Mn}$ ;  $\text{Forss-S}/\text{UDP-GalNAc}/\beta\text{GalNAc-1,3-}\alpha\text{Gal}/\text{Mn}$  y  $\text{iGb}_3/\text{UDP-Gal}/\beta\text{Gal1,4Glc}/\text{Mn}$ . De esta manera se propusieron una serie de residuos del sitio activo que interaccionan con los ligandos. Además, se propusieron residuos que determinan la especificidad por los sustratos.

Los objetivos del presente capítulo son describir, comparar y analizar las diferentes estructuras disponibles de la  $\alpha 3\text{GT}$ , y discutir sus principales interacciones con los sustratos y producto a partir de modelos, especialmente de la zona 358-268 C-terminal. Es así, que en el presente trabajo se generaron dos modelos de complejos, uno similar al ya obtenido por Heissigerova et al., 2003 ( $\alpha 3\text{GT}/\text{UDP-Gal}/\beta\text{Gal1,4Glc}/\text{Mn}$ ); y el otro que comprende  $\alpha 3\text{GT}/\text{UDP}/\text{epítipo}/\text{Mn}$ . En los modelos se ha observado la presencia cercana de la lisina 359 hacia los átomos involucrados en la síntesis del enlace glicosídico. Por otra parte, mediante estudios experimentales de mutagénesis dirigida realizados en la presente Tesis (capítulo 5), no se detectó actividad para el mutante K359A. Estos antecedentes han llevado a proponer un nuevo mecanismo implicando a la lisina 359 situada en el extremo C-terminal flexible.

## **Resultados y discusiones**

### *Alineamiento de secuencias de la $\alpha 3\text{GT}$ de diferentes especies*

La  $\alpha 3\text{GT}$  más estudiada es la bovina, sin embargo, la de cerdo es más interesante desde el punto de vista biomédico por sus implicaciones en el xenotransplante, tal como se ha descrito en la introducción. Ya que la  $\alpha 3\text{GT}$  bovina es el prototipo de esta familia de enzima, se la comparó a nivel de secuencias con las correspondientes a otras especies para determinar el grado de similitud, resaltando la conservación de residuos en la secuencia de la zona C-terminal flexible.

Se alinearon un total de 10 secuencias de  $\alpha$ 3GT, correspondientes a especies diferentes (figura 1.2), tales fueron monos del Nuevo Mundo (*Callithrix jacchus*, *C. sp.* y *Cebus apella*), cerdo (*Sus scrofa*), ratón doméstico (*Mus musculus*), gato doméstico (*Felis catus*), rata de laboratorio (*Rattus norvegicus* BDIX) y oveja (*Ovis aries*). La proteína bovina (*Bos taurus*) fue utilizada como referencia. La totalidad de la secuencias de aminoácidos fueron tomadas del *GenBank/GenPept* y fueron sometidas a un alineamiento múltiple con matriz *Blosum62*, mediante el programa *Multalin* versión 5.4.1 (Corpet, 1988).

Las similitudes fueron analizadas mediante alineamientos dobles con matriz *Blosum62* mediante el programa *SIM* del servidor *ExPasy* (tabla 1.2). La  $\alpha$ 3GT más similar a la bovina fue la de *Felis catus*, seguida del enzima porcino (*Sus scrofa*, AAA73558), mientras que la de *Ovis aries* fue la más diferente. Ésta última es una secuencia muy corta y posiblemente se trate de un fragmento en lugar de ser un enzima completo.

**Tabla 1.2.** Parámetros de semejanza de secuencias de aminoácidos de la  $\alpha$ -1,3-galactosiltransferasa de diferentes especies en relación con la bovina (*Bos taurus*).

Especie	GenBank /PepBank	Nº de residuos	% "Gaps"	Score	% de similitud
<i>Bos taurus</i>	AAA30558	368	0.0	2008.0	100,0
<i>Felis catus</i>	AAN86555	370	0.5	1732.0	86,3
<i>Sus scrofa</i>	AAA73558	371	1.3	1694.0	84,4
<i>Callithrix jacchus</i>	AAL93214	376	2.1	1687.0	84,0
<i>Cebus apella</i>	AAK56499	375	2.4	1679.0	83,6
<i>Callithrix sp.</i>	CAD19040	376	2.2	1675.0	83,4
<i>Sus scrofa</i>	AAA58775	359	4.6	1581.0	78,7
<i>Mus musculus</i>	AAA37711	371	0.8	1510.0	75,2
<i>Rattus norvegicus</i> BDIX	AAM74957	371	0.0	1319.0	65,7
<i>Ovis aries</i>	AAL85878	144	0.0	779.0	38,8

Especie	GenBank/PepBank				
	<i>Señal Anclaje a membrana</i>				
<i>Bos taurus</i>	MNVKGVILS	MLVVSTVIIV	FWEYIHSPEG	SLFWINPSRN	PEVGGSSIQK
<i>Callithrix jacchus</i>	MNVKGVILS	MLVVSTVIIV	FWEYINSPEG	SFLWIYHSKN	PEVDDSSAQK
<i>Callithrix sp.</i>	MNVKGVILS	MLVVSTVIIV	FWEYINSPEG	SFLWIYHSKN	PEVDDSSAQK
<i>Cebus apella</i>	MNVKGVILS	MLVVSTVIIV	FWEYINSPEG	SFLWIYHSKN	PEVDDSSAQK
<i>Felis catus</i>	MNVKGRVVL	MLVVSTVIIV	FWEYINSPEG	SFLWIYHSKN	PEVGDSSSTQK
<i>Sus scrofa</i>	MNVKGRVVL	MLLVSTVMV	FWEYIN....	.....RN	PEVG.SSAQR
<i>Sus scrofa</i>	MNVKGRVVL	MLLVSTVMV	FWEYINSPEG	SFLWIYQSKN	PEVG.SSAQR
<i>Mus musculus</i>	MNVKGVIL	MLIVSTVVV	FWEYVNSPDG	SFLWIYHTKI	PEVGENRWQK
<i>Rattus norvegicus</i> BDIX	.MVTMPQDLH	VKVSMSRSKS	ETSLSSRSRSG	SQEKIMNVKG	KIILSVLMVS
<i>Ovis aries</i>	.....	.....	.....	.....	.....
Consenso	mnvkg.v.l.	ml.vstv.vv	fwey..s.g	s...i...k.	pev.....q.
	<i>Dominio catalítico</i>				
	80->				
<i>Bos taurus</i>	GWLPRW.FN	NGYHE...ED	GDINEEK...	.EQRNED	...S. KLKLSDFWNP
<i>Callithrix jacchus</i>	GWVFPW.FN	NGIHNYQEE	EDTDEKRE	EEQRKEDDT	ELRLWDFWNP
<i>Callithrix sp.</i>	DWWFPGW.FN	NGIHNYQEE	EDTDEKRE	EEQRKEDDT	ELRLWDFWNP
<i>Cebus apella</i>	GWVFPDW.FN	NGIHNYQEE	EDIDKEKRE	EEQRKEDDT	ELQLWDFWNP
<i>Felis catus</i>	GWVFPW.FN	NRTHSYP.EE	EAVDEG....	DEQRKEN..SE	ELQLSDFWNP
<i>Sus scrofa</i>	GWVFPW.FN	NGTHSYHEEE	DAIGNEK...	.EQRKEDNRG	ELPLVDFWNP
<i>Sus scrofa</i>	GWVFPW.FN	NGTHSYHEEE	DAIGNEK...	.EQRKEDNRG	ELPLVDFWNP
<i>Mus musculus</i>	DWWFPSW.FK	NGTHSYQEDN	VEGRREK...	..GRNGDRIE	EPQLWDFWNP
<i>Rattus norvegicus</i> BDIX	TVLVVFWYV	NRTHSYQEE	IERAREK...	..GRNGDSIV	EPQLWDFWNP
<i>Ovis aries</i>	.....	.....	.....	.....	.....
Consenso	.ww.p.w.f.	n..h.y..e.	.....ek...	...r..d...	e..l.dwfnp
<i>Bos taurus</i>	FKRPEVVTMT	KWKAPVVWEG	TYNRAVLN	YAKQKITVGL	TVFAVGRYIE
<i>Callithrix jacchus</i>	KKRPEVVTVT	KWKAPVVWEG	TYNKAIEN	YAKQKITVGL	TVFAIGRYIE
<i>Callithrix sp.</i>	KKRPEVVTVT	QWKAPVVWEG	TYNKAIEN	YAKQKITVGL	TVFAIGRYIE
<i>Cebus apella</i>	KKRPEVVTVT	KWKAPVVWEG	TYNKAIEN	YAKQKITVGL	TVFAIGRYIE
<i>Felis catus</i>	QKRPDVVTVT	EWKAPVVWEG	TYNKAIEN	YARQKITVGL	TVFAVGRYIE
<i>Sus scrofa</i>	EKRPEVVTIT	RWKAPVVWEG	TYNRAVLN	YAKQKITVGL	TVFAVGRYIE
<i>Sus scrofa</i>	EKRPEVVTIT	RWKAPVVWEG	TYNRAVLN	YAKQKITVGL	TVFAVGRYIE
<i>Mus musculus</i>	KNRPDVLTVT	PWKAPIVWEG	TYDTALLEK	YATQKITVGL	TVFAVGRYIE
<i>Rattus norvegicus</i> BDIX	KNRPEVLTVT	PWKAPIVWEG	TYDTALLEK	YARQKITVGL	TVFAVGRYIE
<i>Ovis aries</i>	.....	.....	.....	.....	.....
Consenso	..rp.v.t.t	.wkap.vweg	ty..a.l.y	ya.qkitvgl	tvfavg.yie
<i>Bos taurus</i>	HYLEEFLTSA	NKHFVGHV	IFYIMVDDVS	RMPLIELGPL	RSFKVFKIKP
<i>Callithrix jacchus</i>	HYLEEFVTS	NRYFMVGHV	IFYMVDDVS	KVPFIELGPL	RSFKVFEVVP
<i>Callithrix sp.</i>	HYLEEFVTS	NRYFMVGHV	IFYMVDDVS	KVPFIELGPL	RSFKVFEVVP
<i>Cebus apella</i>	HYLEEFVTS	NRYFMVGHV	IFYMVDDVS	KVPFIELGPL	RSFKVFEVVP
<i>Felis catus</i>	HYLEEFLISA	NRYFMVGHV	IFYIMVDDVS	KMPLIELGPL	RSFKVFEIKP
<i>Sus scrofa</i>	HYLEEFLISA	NTYFMVGHV	IFYMVDDIS	RMPLIELGPL	RSFKVFEIKS
<i>Sus scrofa</i>	HYLEEFLISA	NTYFMVGHV	IFYMVDDIS	RMPLIELGPL	RSFKVFEIKS
<i>Mus musculus</i>	HYLEDFLESA	DMYFMVGHV	IFYVMIDDT	RMPVHNLNPL	HSLQVFEIRS
<i>Rattus norvegicus</i> BDIX	HYLEDFLESA	NKYFMVGHV	IFYVMIDDT	RMPAVHLSPL	HSLQVFEIRS
<i>Ovis aries</i>	.....	.....	.....	.....	.....
Consenso	hyle.fl.sa	n.yfmvgh.v	ify.m.dd.s	.mp...l.pl	.s..vfei..
	<i>motivo DVD</i>				
	D225 D227				
<i>Bos taurus</i>	EKRWDISMM	RMKTIGEIV	AHIQHEVDFL	FCMDVDQVFQ	DKFGVETLGE
<i>Callithrix jacchus</i>	EKRWDISMM	RMKTIGEIV	AHIQHEVDFL	FCMDVDQVFQ	DHFGVETLGE
<i>Callithrix sp.</i>	EKRWDISMM	RMKTIGEIV	AHIQHEVDFL	FCMDVDQVFQ	DHFGVETLGE
<i>Cebus apella</i>	EKRWDISMM	RMKTIGEIV	AHIQHEVDFL	FCMDVDQVFQ	DHFGVETLGE
<i>Felis catus</i>	EKRWDISMM	RMKTIGEIV	AHIQHEVDFL	FCMDVDQVFQ	DSFGVETLGE
<i>Sus scrofa</i>	EKRWDISMM	RMKTIGEIV	AHIQHEVDFL	FCMDVDQVFQ	NNFGVETLGE
<i>Sus scrofa</i>	EKRWDISMM	RMKTIGEIV	AHIQHEVDFL	FCMDVDQVFQ	NNFGVETLGE
<i>Mus musculus</i>	EKRWDISMM	RMKTIGEIV	AHIQHEVDFL	FCMDVDQVFQ	DNFGVETLGE
<i>Rattus norvegicus</i> BDIX	EKRWDISMM	RMKTIGEIV	AHIQHEVDFL	FCMDVDQVFQ	DNFGVETLGE
<i>Ovis aries</i>	.....	.....	....REVDL	FCMDVDQVFQ	DEFVETLGE
Consenso	ekrwdismm	rmktigeiv	ahiqhevdf	FCMDVDQVFQ	#.FGVETLGE

Figura 1.2. Alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos de la  $\alpha$ -1,3-galactosiltransferasas de diferentes especies (continúa en la página siguiente).



inmediatamente después del dominio de anclaje a membrana, sin embargo los restantes aminoácidos se alinean muy bien.

La secuencia de  $\alpha 3$ GT en *Rattus norvegicus*, tiene el extremo amino terminal muy modificado. Esta zona correspondería al dominio de anclaje a la membrana. Sin embargo, esta zona se encuentra muy conservada en las especies estudiadas exceptuando en *Ovis aries*, en la que no está presente.

El dominio catalítico de la  $\alpha 3$ GT está altamente conservado en la totalidad de las especies, sin tomar en cuenta la secuencia de *Ovis aries*, ya que por el reducido tamaño se puede considerar un fragmento de la proteína. El dominio DVD y el residuo catalítico E317 están presentes en todas las secuencias. Los últimos 10 residuos (358-368 en la  $\alpha 3$ GT bovina), son muy importantes en la catálisis, además corresponden al *loop* flexible. En esta zona, se puede observar que la lisina 359, tirosina 361 y arginina 365 que interaccionan directamente con el UDP están presentes en todas las especies. Los demás residuos de ésta zona, también están conservados o varían muy poco sin alterar las propiedades químicas de la cadena lateral. Así por ejemplo, una valina está en la posición 363 en la  $\alpha 3$ GT bovina, mientras que en las restantes especies está una leucina.

#### *Alineamiento de secuencias de la $\alpha 3$ GT, iGb<sub>3</sub>-S, Forss-S, GT-A y GT-B*

Se alinearon un total de 6 secuencias (figura 1.3). Dos de ellas corresponden a la glicosiltransferasa que sintetiza el epítipo de Frossman (Forss-S), pero son diferentes en un 70%; la primera corresponde al ratón doméstico (Forss-S(M)) (*Mus musculus*) y la otra al humano (Forss-S(H)). Sin embargo, ya que en el humano no se ha encontrado el epítipo Forssman, ésta secuencia podría derivar de la traducción de un pseudogen. Las otras secuencias son de la  $\alpha 3$ GT bovina (*Bos taurus*), iGb<sub>3</sub>-S de rata (*Rattus norvegicus*), GT-A y GT-B humanas. Todas estas secuencias de

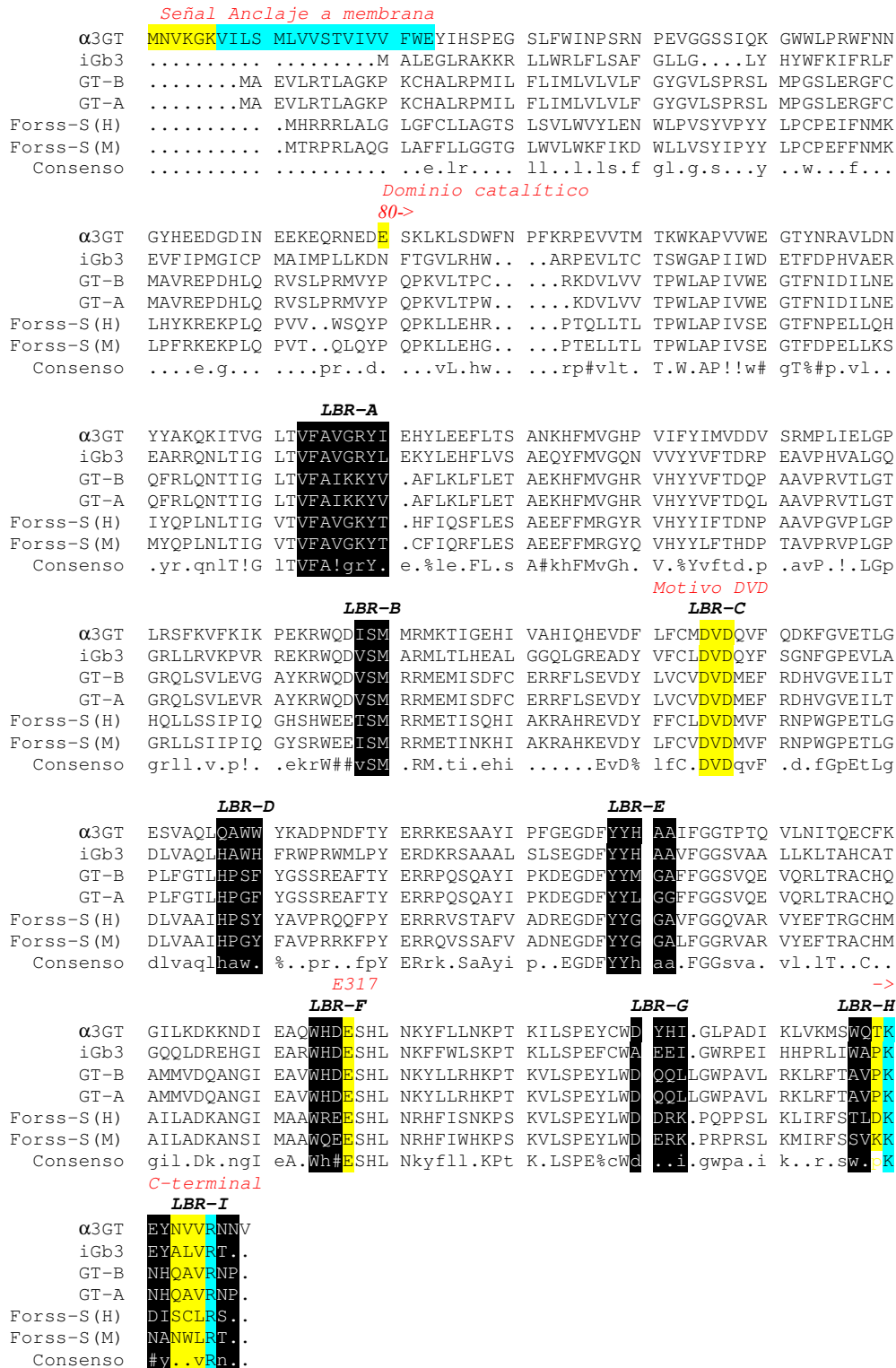
aminoácidos fueron tomadas del *GenBank/GenPept* y fueron sometidas a un alineamiento múltiple con matriz *Blosum62*, mediante el programa *Multalin* versión 5.4.1 (Corpet, 1988).

Las similitudes se analizaron mediante alineamientos dobles con matriz *Blosum62* mediante el programa *SIM* del servidor *Expasy* (tabla 1.3). Respecto a la  $\alpha 3GT$ , la similitud de las otras proteínas es alta (superior a 40%). La más similar es la  $iGb_3$  con 48,5%, mientras que la *Forss-S* humana es la que más difiere con un porcentaje de similitud de 42,8%. Además, la similitud entre la *GT-A* y *GT-B* es del 98%. La similitud entre las *Forss-S* humana y murina es de 78,8%. Por otra parte, la  $iGb_3$  es menos similar a *GT-A* (45,8%) que a  $\alpha 3GT$ , mientras que tanto la *Forss-S* (M) y *Forss-S* (H) son más similares a la *GT-A* en 50,9% y 49,5% respectivamente, que a  $\alpha 3GT$ . Por tanto, estos alineamientos sugieren que para un modelado por homología de la estructura tridimensional de la  $iGb_3$  es más adecuado utilizar como molde la estructura cristalográfica de la  $\alpha 3GT$ , mientras que para las sintetas de *Forssman* (*Forss-S*) van mejor las estructuras cristalográficas de la *GT-A*.

En el alineamiento múltiple (figura 1.3) se puede observar que el dominio catalítico está bien conservado en todas las proteínas de la familia, a pesar de que, las zonas correspondientes al tallo (*stem*) y de anclaje a membrana prácticamente no se conservan.

**Tabla 1.3.** Parámetros de semejanza de secuencias de aminoácidos de glicosiltransferasas pertenecientes a la familia 6 (CAZy), respecto de la  $\alpha 3GT$  bovina.

Especie	GenBank /PepBank	Nº de residuos	% "Gaps"	Score	% de similitud
$\alpha 3GT$	AAA30558	368	0.0	2008.0	100,0
$iGb_3$	AAF82757	272	0.0	719.0	48.5
<i>GT-B</i>	AAD26574	274	0.7	644.0	45.6
<i>GT-A</i>	AAA36792	272	0.7	643.0	45.2
<i>Forss-S(M)</i>	AAI06832	270	0.4	614.0	43.0
<i>Forss-S(H)</i>	AAF06145	271	0.4	621.0	42.8



**Figura 1.3.** Alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos de la  $\alpha$ 3GT, iGb3-S, Forss-S, GT-A y GT-B (LBR= regiones de unión a ligandos; ! = I ó V; \$ = L ó M; % = F ó Y; y # = N, D, Q, E, B ó Z.)

En el dominio catalítico se identificaron 9 regiones de unión a ligandos (LBRs) (Heissigerova et al., 2003). Estas regiones se conservan muy bien en todas las proteínas alineadas (figura 1.3). Así por ejemplo, LBR-C corresponde al motivo DVD, LBR-F incluye al residuo E317 y el extremo C-terminal flexible (358-368) contiene a LBR-H y LBR-I. En esta última zona se debe destacar la presencia de la K359 y R365 conservadas en todas las proteínas de la familia.

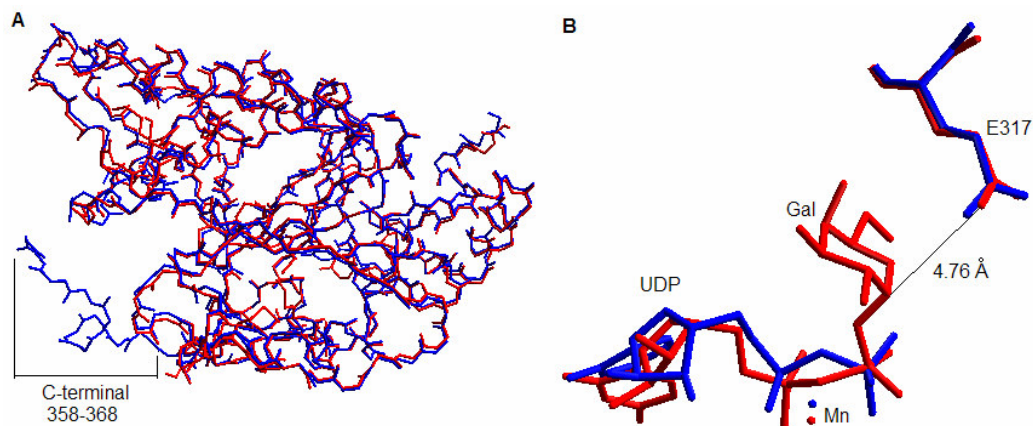
### *Estructuras moleculares*

Actualmente se conocen 13 estructuras atómicas correspondientes al dominio catalítico de la  $\alpha$ -1,3-galactosiltransferasa bovina, todas ellas obtenidas por difracción de rayos X. Inicialmente, Gastinel et al., 2001, resolvieron tres estructuras: una (1FG5) corresponde a el enzima libre y comprende del residuo 81 al 367 (2.3 Å de resolución), la segunda (1G93) es un complejo  $\alpha$ 3GT/UDP-Gal y comprende del residuo 82 al 358 (2.5 Å de resolución), mientras que la tercera (1G80) es un complejo  $\alpha$ 3GT/UMP y comprende del residuo 81 al 367 (2.8 Å de resolución). Todas estas estructuras han sido denominadas "forma I" y se caracterizan por corresponder a un grupo espacial tetragonal, están como monómeros y el extremo C-terminal, catalíticamente importante, presenta una organización poco clara para los últimos aminoácidos (358-368).

Posteriormente, se resolvieron estructuras que corresponden a un espacio cristalino monoclinico y como dímeros, las cuales han sido denominadas "forma II". La primera de éstas es un complejo  $\alpha$ 3GT/Mn+2/UDP (1K4V) obtenido por Boix et al., 2001, a 1.53 Å de resolución y revela un cambio conformacional en el extremo C-terminal, catalíticamente importante (figura 1.4). Seguidamente, Boix et al., 2002, resolvieron los siguientes complejos:  $\alpha$ 3GT/Mn+2/UDP/Gal (1GX0) del residuo 80 al 369 (1.8 Å de resolución),  $\alpha$ 3GT/Mn+2/UDP/Glu (1GWW) del residuo 80 al 369 (1.8 Å de resolución),  $\alpha$ 3GT/Mn+2/UDP/lactosa (1GWV) del residuo 80 al 368



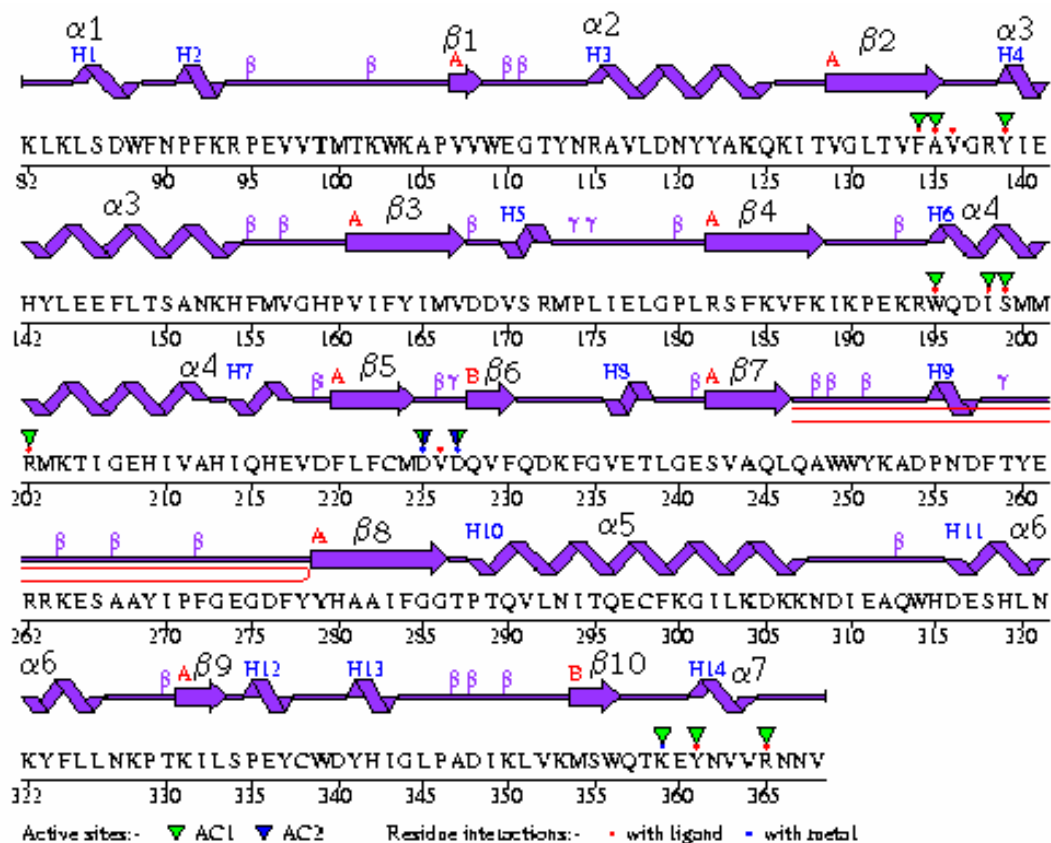
(2.5 Å de resolución) y  $\alpha$ 3GT/Mn+2/UDP/lactosamina (1GX4) del residuo 80 al 368 (1.46 Å de resolución).



**Figura 1.4.** Sobreposición de las estructuras cristalográficas de la  $\alpha$ 3GT. (A) en rojo la forma I y en azul la forma 2. (B) Detalle de los ligandos, en la forma I se muestra UDP-Gal, mientras que en la II, UDP.

El dominio catalítico de la  $\alpha$ 3GT (Ser81-Asn367) tiene forma globular y es de dimensiones 50 x 43 x 58 Å (Gastinel et al., 2001). El plegamiento es de tipo  $\alpha/\beta$  con 10 cadenas  $\beta$ , 7 hélices  $\alpha$  y 6 hélices  $3_{10}$  incluyendo la hélice  $\alpha$  encontrada en el extremo catalítico C-terminal de las estructuras forma II (Boix, et. al. 2001) de acuerdo con el programa PROMOTIF en el servidor PDBsum (<http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/pdbsum/>) a partir de coordenadas del PDB (figura 1.5). Las cadenas  $\beta$  forman una lámina  $\beta$  central rodeada de hélices  $\alpha$ . El dominio catalítico puede dividirse en dos porciones, una es el subdominio N-terminal que va desde la Val129 hasta la Met224 y está formado por cuatro cadenas  $\beta$  paralelas en el siguiente orden:  $\beta_4$ ,  $\beta_3$ ,  $\beta_2$  y  $\beta_5$ ; rodeadas por las hélices  $\alpha_3$  y  $\alpha_4$ . Éste subdominio es importante para la unión de la porción nucleótido del sustrato donador azúcar-nucleótido. La segunda porción consiste de dos cadenas  $\beta$  antiparalelas ( $\beta_8$  y  $\beta_1$ ) y dos hélices,  $\alpha_5$  y  $\alpha_6$ . Una segunda lámina  $\beta$ , más pequeña, está constituida por dos cadenas  $\beta$  antiparalelas ( $\beta_6$  y  $\beta_{10}$ ). En la forma I, la cadena  $\beta_{10}$  está seguida por una estructura desordenada

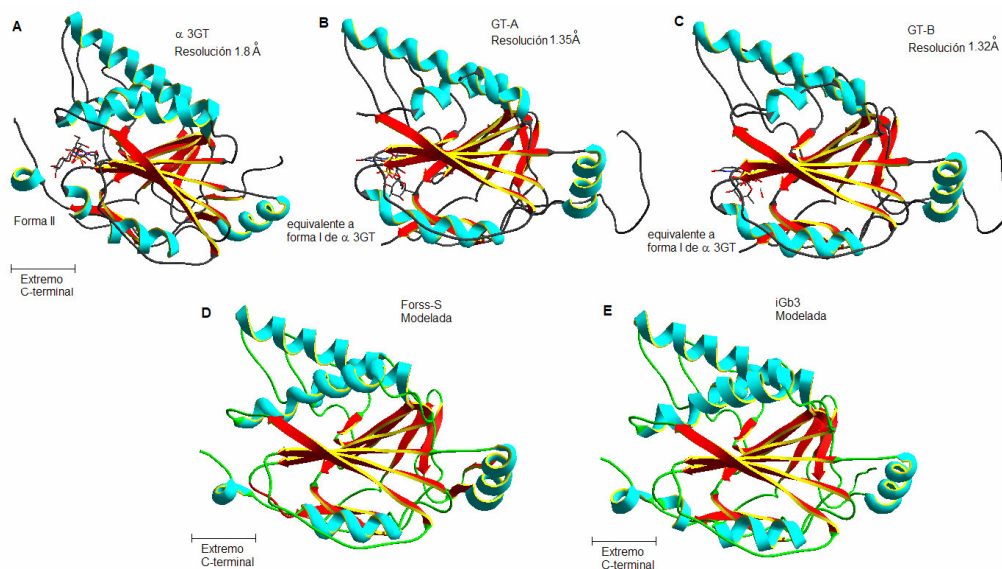
(residuos 358 - 368), mientras que en la forma II, los residuos 354 - 356 forman una corta lámina  $\beta$ , y los residuos 361 - 364 adoptan una hélice  $\alpha$  bien definida. Estas diferencias sugieren que existen cambios conformacionales en esta región de la proteína, asociados con la unión al sustrato.



**Figura 1.5.** Estructura secundaria de la  $\alpha$ 3GT bovina (forma II) obtenida con el programa PROMOTIF en el servidor PDBsum. Las hélices  $\alpha$  son  $\alpha$ 1=H1,  $\alpha$ 2=H3,  $\alpha$ 3=H4,  $\alpha$ 4=H6 y H7,  $\alpha$ 5=H10,  $\alpha$ 6=H11 y  $\alpha$ 7=H14. Las hélices  $\beta$  son H2, H5, H8, H9, H12 y H13. Las cadenas  $\beta$  indicadas con A constituyen la lámina  $\beta$  principal mientras que las marcadas con B, constituyen la lámina  $\beta$  pequeña.

El plegamiento de las proteínas de la familia 6 es prácticamente similar al de la  $\alpha$ 3GT. Otras estructuras cristalográficas correspondientes al dominio catalítico han sido resueltas para la GT-A y GT-B, mostrando la misma

topología que la  $\alpha 3GT$ . Además, la alta conservación de secuencias mostrada en el alineamiento de aminoácidos (figura 1.3) es la base para utilizar las estructuras cristalográficas ya conocidas para predecir la estructura molecular de aquellas glicosiltransferasas no estudiadas cristalográficamente, mediante modelado por homología. El alineamiento muestra que existen pocas inserciones y la mayoría de las variaciones ocurren en zonas correspondientes a *loops*. En esta Tesis, utilizando el programa Swiss-Model del servidor Expasy ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)) han sido obtenidos los modelos para las proteínas Forss-S e  $iGb_3$  (figura 1.6).



**Figura 1.6.** Estructuras de las glicosiltransferasas de la familia 6. Obsérvese que para las GT-A y GT-B no ha sido determinada la zona C-terminal por difracción de rayos X. Forss-S e  $iGb_3$  han sido obtenidas mediante modelado por homología en la presente tesis.

### *Interacciones con sustratos*

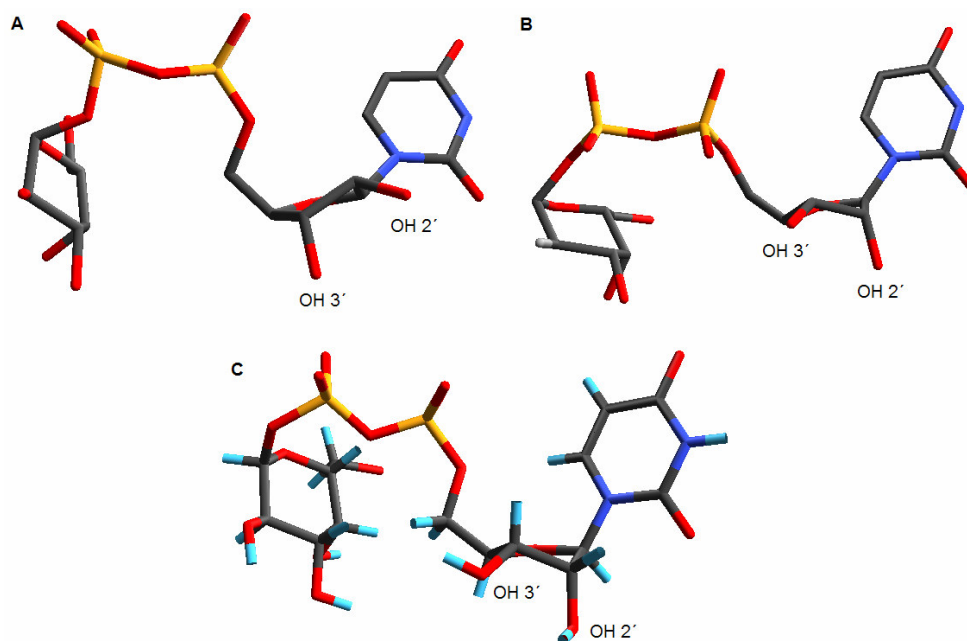
Para poder predecir las interacciones entre los sustratos y la  $\alpha 3GT$  se construyó un modelo del complejo  $\alpha 3GT/UDP-Gal/Lac/Mn$ , dado que experimentalmente es muy complicado obtener esta estructura. Se utilizaron las coordenadas de la estructura cristalográfica forma II 1GWV

obtenida por Boix, et al., (2001). El UDP-Gal fue anclado en el sitio activo en una conformación similar a la UDP-2F-G descrita para el complejo cristalizado LgtC/UDP-2F-Gal/Mn (1G9R) de *Neisseria meningitidis* (Persson et al., 2001), ya que a la fecha es el único complejo que contiene un análogo muy cercano de sustrato donador para la  $\alpha$ -1,3-glicosiltransferasa (tabla 1.4).

Cabe resaltar que otro complejo que contiene UDP-Gal es la estructura cristalográfica 1G93 (forma I) de Gastinell et al. (2001). Sin embargo, no se ha empleado las coordenadas del UDP-Gal de ésta estructura para el modelo por lo siguiente, en ésta estructura, la  $\alpha$ 3GT está truncada en el extremo C-terminal, justamente en el residuo 358, por lo cual no se pueden establecer las interacciones del UDP-Gal con la zona catalíticamente importante (aa. 358-368), además, ésta zona que une al UDP-Gal sería determinante para conferir la conformación del donador en el complejo, a pesar de ello, comparando la configuración del UDP-Gal de 1G93 y UDP-2F-Gal, ambas son muy similares con variaciones en el anillo de ribosa del UDP (1G9R), donde en 1G93 el OH'2 es axial y el OH'3 ecuatorial, mientras que en 1G9R, OH'2 es ecuatorial y OH'3 es axial. En cuanto a la porción galactosa, la conformación es igual en ambos sustratos (figura 1.7).

Por otra parte, existen algunas estructuras cristalográficas con otros donadores, los cuales en general adoptan una configuración similar (figura 1.8). Para el sustrato aceptor, se utilizaron las coordenadas atómicas de la lactosa presente en el complejo cristalizado (forma II, 1GWV), así también para el Mn (figura 1.9A).

El modelo construido fue sometido a varios ciclos de optimización mediante mecánica molecular en un radio de 12 Å alrededor del centro del sitio activo. El algoritmo de minimización empleado fue *Steepest Descent* con un gradiente de optimización de 0.1kcal/(Åmol). Se utilizó el campo de fuerzas CHARMM con parametrización para azúcares.

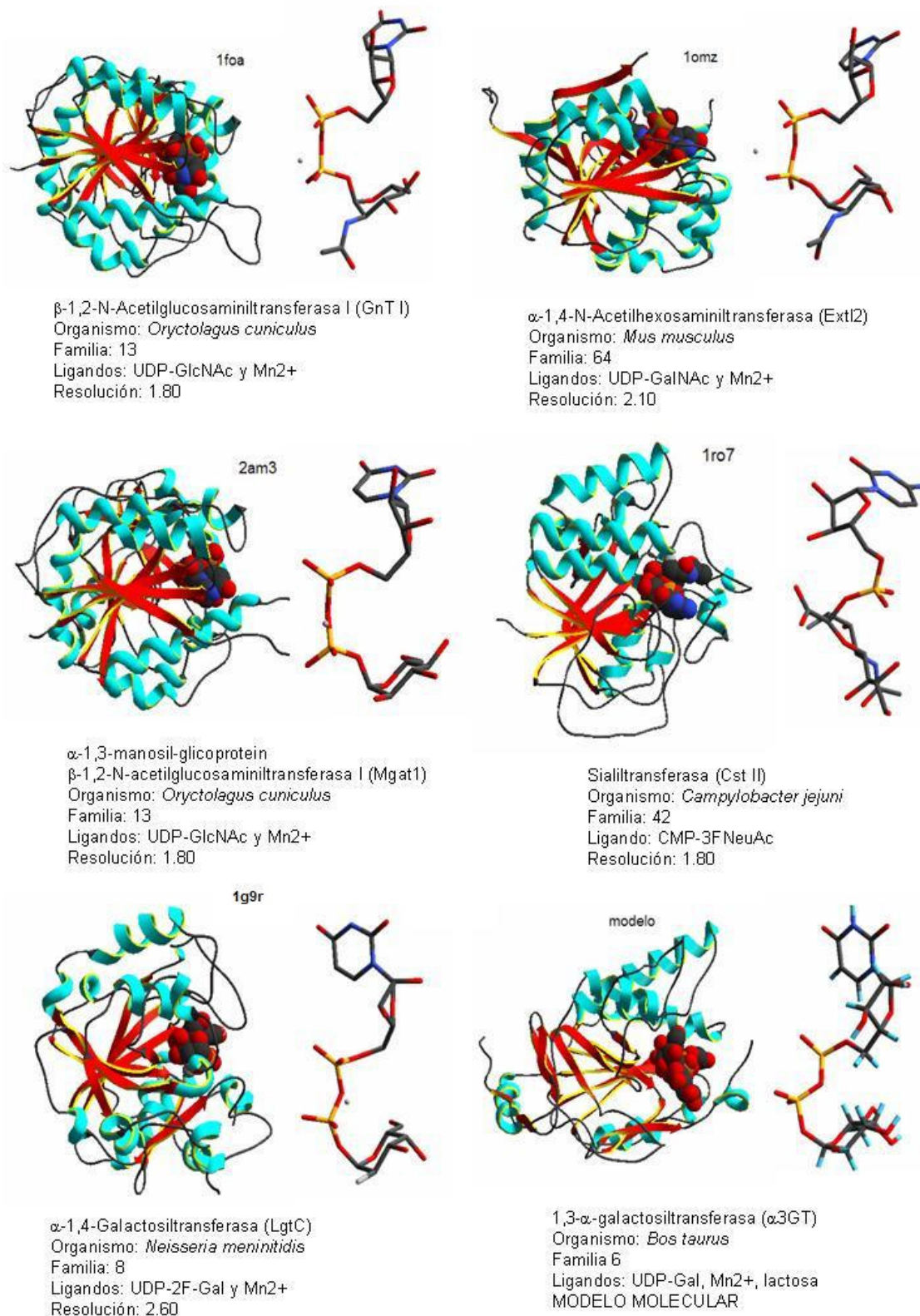


**Figura 1.7.** Comparación de las variaciones conformacionales en la ribosa de donadores de glicosiltransferasas. (A) UDP-Gal de la estructura cristalográfica  $\alpha$ 3GT/Mn/UDP-Gal (forma I, 1G93) (Gastinell et al., 2001). (B) UDP-2F-Gal de la estructura cristalográfica LgtC/UDP-2F-Gal/Mn (1G9R) (Persson et al., 2001) y (C) UDP-Gal del modelo molecular obtenido en la presente tesis.

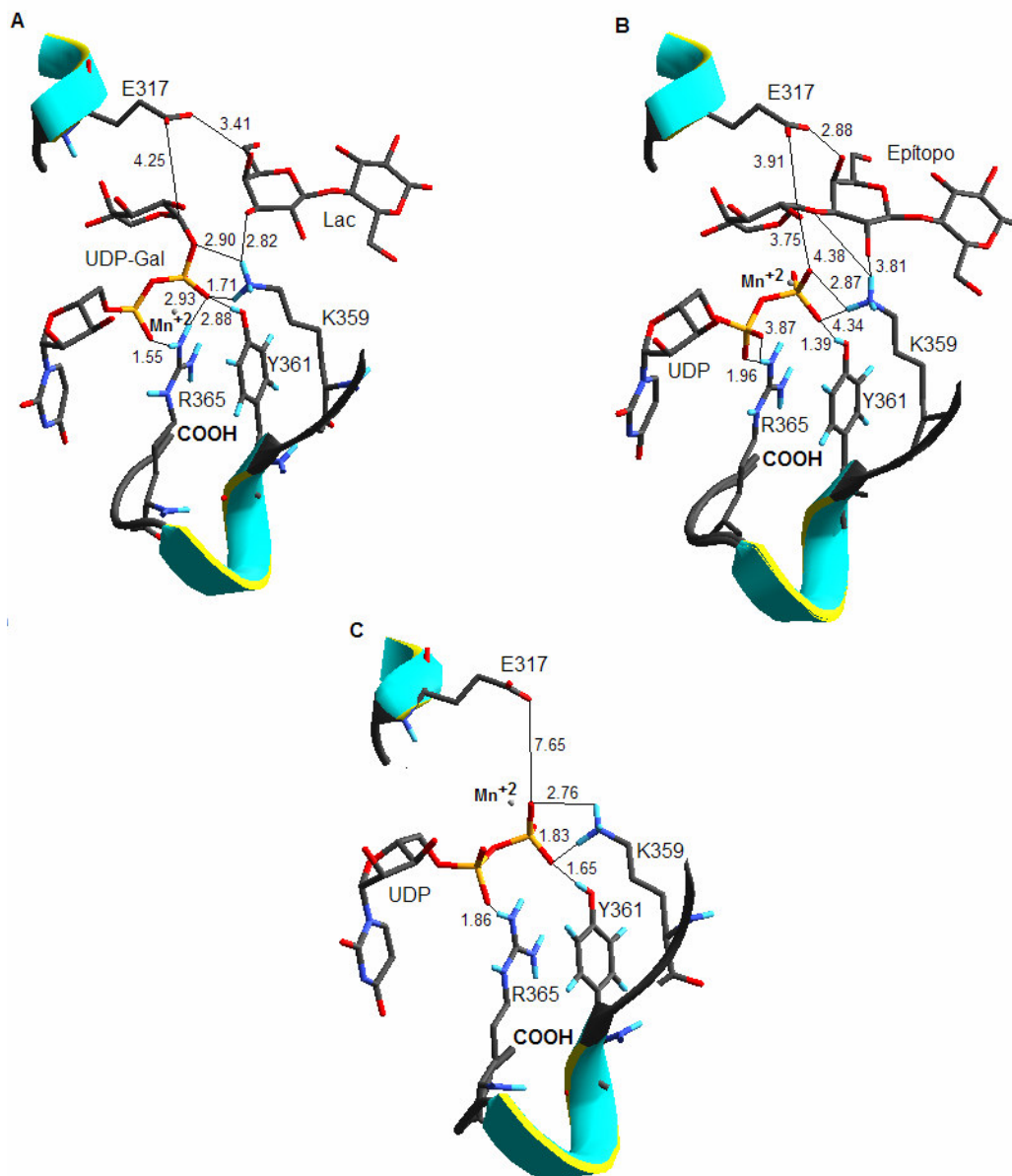
En cuanto al aceptor, se modeló con lactosa, de la cual la porción correspondiente a la galactosa presenta la mayor cantidad de interacciones, mientras que la porción glucosa está parcialmente expuesta al disolvente. Las regiones LBR-D, -F, -G, -H y -E parecen estar en contacto con el aceptor (figura 1.3). Se destaca la interacción del Glu317 con el O4 y las His280/O4 y Lys359/O3 que también interaccionan con la galactosa del donador en O2 y O $\alpha$  respectivamente.

**Tabla 1.4.** Estructuras cristalográficas utilizadas para construir los modelos.

Estructura	Componentes	Coordenadas Utilizadas en el modelo
1GWV (resolución 2.5Å)	$\alpha$ 3GT, UDP, Mn <sup>+2</sup> , Lac	$\alpha$ 3GT, Mn <sup>+2</sup> y Lac. Las coordenadas atómicas del UDP fueron substituídas por UDP-Gal.
1G9R (resolución 2Å)	LgtC, UDP-2F-Gal, Mn <sup>+2</sup>	UDP-2F-Gal. El flúor de la posición 2 fue substituido por hidrógeno para obtener UDP-Gal. Este donador Así obtenido fue anclado en 1GWV, en lugar de UDP.



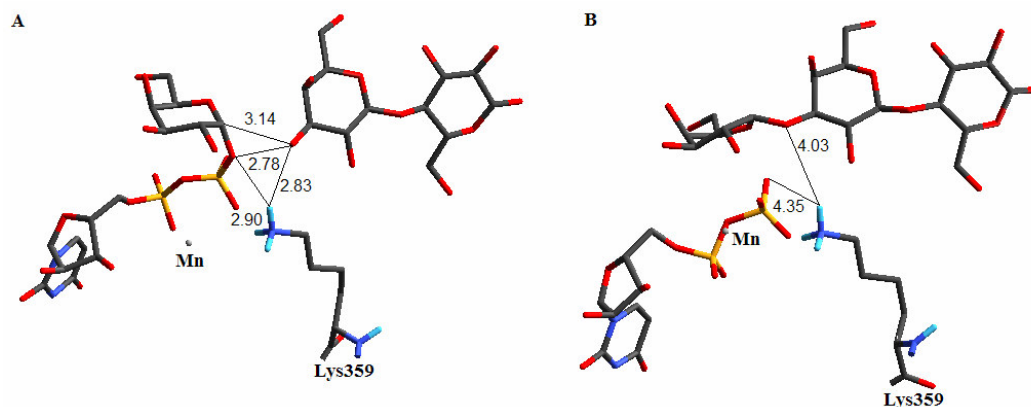
**Figura 1.8.** Estructuras cristalográficas con donadores y modelo  $\alpha$ 3GT, éste último, obtenido en la presente tesis. Obsérvese que los azúcar nucleótidos adoptan en todos los casos configuraciones muy similares.



**Figura 1.9.** (A) Modelo  $\alpha 3GT/UDP-Gal/Lac/Mn$ . (B) Modelo  $\alpha 3GT/UDP/producto/Mn$ . (C) Estructura cristalográfica  $\alpha 3GT/UDP/Mn$ .

El modelo construido no modifica significativamente las coordenadas atómicas de los aminoácidos respecto a la estructura cristalográfica 1GWV. La superposición de ambas estructuras dan una desviación cuadrática media (RMS) de 0.09 Å para los átomos del esqueleto, mientras que para la totalidad de los átomos la RMS es de 0.17. Por tanto, las distancias

interatómicas entre los aminoácidos y los ligandos varía poco entre el modelo y la estructura cristalográfica, tal como puede apreciarse en la figura 1.8.



**Figura 1.10.** Detalle del posicionamiento de los sustratos (A) y producto (B) en los modelos obtenidos. En (A) nótese que el O3 del aceptor está adecuadamente orientado hacia el carbono anomérico por la cara  $\alpha$ .

A partir del modelo  $\alpha$ 3GT/UDP-Gal/Lac/Mn se ha construido el modelo con producto  $\alpha$ 3GT/UDP/producto/Mn (figura 1.9B). En el primero de estos modelos se puede apreciar que el donador está situado de manera adecuada respecto al aceptor para poder formar el enlace  $\alpha$ 1,3, puesto que el oxígeno 3 del aceptor está orientado justamente por la cara  $\alpha$  hacia el carbono anomérico del donador. Este posicionamiento ha facilitado la posibilidad de modelar el complejo  $\alpha$ 3GT/UDP/producto/Mn, simplemente trazando el enlace  $\alpha$ 1,3 y escindiendo el enlace con el UDP (figuras 1.9A, 1.9B y 1.10). Igual que en el caso anterior, este modelo fue sometido a varios ciclos de optimización en un radio de 12 Å, utilizando el campo de fuerzas CHARMM con parametrización para azúcares.

En el modelo que contiene al producto se puede observar que la galactosa transferida sufre un cambio conformacional por inversión de la silla. Sin embargo, no se ha observado cambios importantes en la porción lactosa.



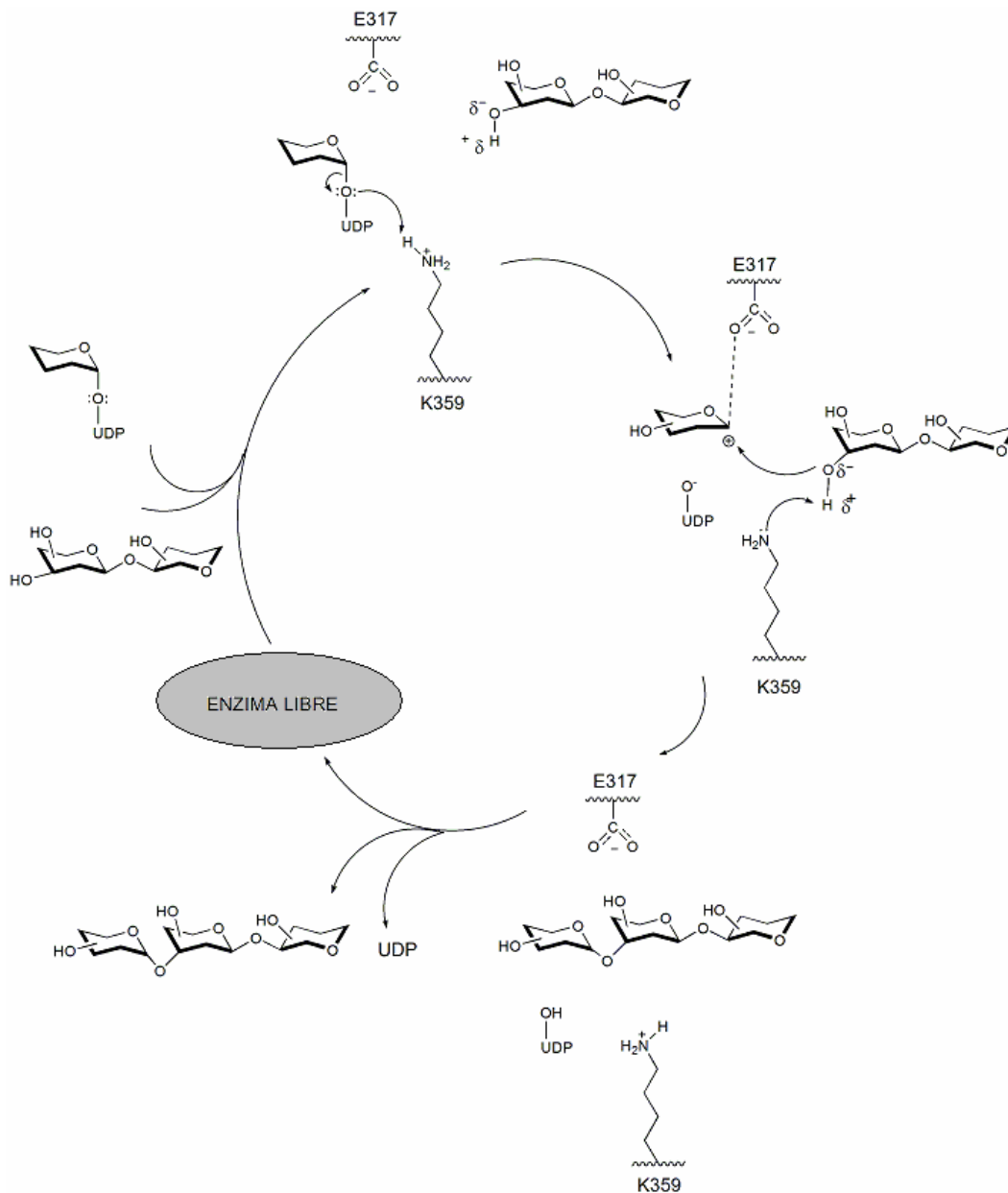
Otros cambios observados son un ligero desplazamiento ( $\sim 1 \text{ \AA}$ ) del ión  $\text{Mn}^{+2}$  y del UDP, respecto al modelo  $\alpha 3\text{GT}/\text{UDP-Gal/Lac/Mn}$  y la estructura cristalográfica  $\alpha 3\text{GT}/\text{UDP/Mn}$ . La superposición del modelo y la estructura cristalográfica no muestran cambios significativos en las coordenadas atómicas de los aminoácidos, la RMS para la totalidad de los átomos es de  $1.17 \text{ \AA}$  y para los átomos del esqueleto es  $0.09 \text{ \AA}$ . Por otra parte, el modelo que contiene al producto es la base para posteriores estudios de dinámica molecular que podrían aportar mucha información sobre los cambios conformacionales de la zona C-terminal que implicarían la salida del producto del sitio activo.

### *Propuesta mecanística*

Tanto en las estructuras cristalográficas como en los modelos obtenidos por mecánica molecular, se observa que el residuo más cercano a los sustratos es la lisina 359. Además, este aminoácido está orientado y próximo a los átomos implicados en la formación del enlace  $\alpha 1,3$ , de ambos sustratos (figura 1.10). Por otra parte, este residuo está altamente conservado en todos los enzimas de la familia 6. En este contexto, se sugiere la participación directa de la lisina 359 en catálisis, proponiendo así, un nuevo mecanismo de reacción para glicosiltransferasas emparentadas con la  $\alpha 3\text{GT}$ .

La nueva propuesta mecanística consiste en una catálisis ácido base donde la lisina 359 actuaría como una lanzadera de protones (figura 1.11). Inicialmente, la lisina protona el oxígeno del enlace galactosa –O– UDP del sustrato donador, lo cual induce la escisión del enlace glicosídico con la consiguiente liberación de UDP desarrollando un estado de transición con carácter oxocarbocatiónico estabilizado electrostáticamente por el glutamato 317. Aquí se debe resaltar que no es necesario la formación de un intermedio covalente, ya que el glutamato está lo suficientemente lejos del  $\text{C}\alpha$  para dar lugar a dicho enlace, sin embargo se propone que es una

distancia ( $\sim 4 \text{ \AA}$ ) prudencial para una interacción electrostática con el carbocatión. En una segunda etapa, la misma lisina actúa como base capturando el protón del OH-3 del aceptor, convirtiéndolo en el nucleófilo adecuado para atacar al carbocatión. Como ya se ha descrito anteriormente, la orientación del aceptor es adecuada para atacar al donador por la cara  $\alpha$ . De esta manera, se forma el enlace  $\alpha 1,3$  y la lisina recupera el protón inicial para iniciar un nuevo ciclo catalítico.



**Figura 1.11.** Nueva propuesta mecanística para la catálisis de la  $\alpha 3GT$  y glicosiltransferasas emparentadas.

El rol de la lisina 359 como base es comparable con el fosfato  $\beta$  del UDP. Anteriormente André et al, 2003 (ver figura 12 de la introducción), en base a cálculos mecanocuánticos han propuesto que el fosfato  $\beta$  del UDP podría actuar como base general, de igual manera que se propone para la lisina en esta tesis, substrayendo el protón del hidroxilo 3' del aceptor, de modo que éste quede activado nucleofílicamente para atacar al carbono anomérico del azúcar donador. La principal diferencia está en que la lisina podría también actuar como ácido protonando el oxígeno del carbono anomérico del donador induciendo la liberación del UDP. En cualquiera de los casos, no se requiere la formación de intermedios covalentes, lo cual se sustenta en que a la fecha no ha sido posible la captura de ningún intermedio covalente a pesar de la utilización de diversas estrategias, que si dieron resultado en el caso de las glicósido hidrolasas, de las que ahora se conoce que actúan por mecanismo de doble desplazamiento con formación de un intermedio covalente.

El mecanismo propuesto en el presente trabajo a partir del análisis de estructuras cristalográficas y modelos moleculares obtenidos por mecánica molecular, podría estar respaldado por algunas pruebas experimentales. En primer lugar, no se ha conseguido atrapar un intermedio covalente con residuos del sitio activo, a pesar de muchos intentos en diferentes laboratorios, lo cual apoyaría la propuesta de que el glutamato 317 no forma un intermedio covalente, pero es fundamental para estabilizar al intermedio carbocatiónico. Los experimentos de rescate químico con azida en el mutante E317A (Monegal y Planas, 2006) demuestran la importancia catalítica de éste residuo, por lo que la estabilización del carbocación podría darse con la azida que ocupa el lugar del residuo glutamato en el mutante, durante el rescate. Finalmente, en este mismo trabajo (ver más adelante), el mutante K359A no mostró actividad, lo cual demuestra la importancia de la lisina en la catálisis.

## Conclusiones

El alineamiento de secuencias de  $\alpha$ 3GT de diferentes especies muestra que el dominio catalítico está altamente conservado. Además, la  $\alpha$ 3GT de cerdo (*Sus scrofa*) difiere tan solo en un 14% de la bovina (*Bos taurus*), lo cual permite extrapolar los estudios realizados sobre la  $\alpha$ 3GT bovina a las implicaciones en el xenotransplante de órganos del cerdo al humano.

Las estructuras moleculares cristalográficas y las modeladas han permitido predecir las principales interacciones de los residuos del sitio activo con los sustratos aceptor y donador. En la zona C-terminal se encuentra el aminoácido más cercano a los átomos participantes en la formación del enlace  $\alpha$ 1,3, por lo que se ha propuesto a la lisina 359 como residuo catalítico dando lugar a una nueva propuesta mecanística por catálisis ácido/base.

La elucidación del mecanismo de reacción para glicosiltransferasas es uno de los principales problemas en glicobiología estructural, especialmente para las que retienen la configuración del carbono anomérico. La presencia de *loop* flexible en la zona C-terminal de la  $\alpha$ 3GT complica aún más el problema. La modelización molecular de los complejos de  $\alpha$ 3GT con ambos sustratos y con el producto pretenden contribuir a la predicción de las interacciones proteína/ligandos y consiguientemente al mecanismo de reacción.

# CAPÍTULO 2

---

---

**MUTAGENESIS DIRIGIDA DE  
RESIDUOS DEL EXTREMO  
C-TERMINAL DE LA  
 $\alpha$ -1,3-GALACTOSILTRANSFERASA,  
EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN**

**MUTAGENESIS DIRIGIDA DE RESIDUOS DEL  
EXTREMO C-TERMINAL DE LA  
 $\alpha$ -1,3-GALACTOSILTRANSFERASA,  
EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN**

**Introducción**

El gen de la  $\alpha$ 3GT bovina (*Bos taurus*) fue clonado y secuenciado por primera vez por Joziase *et al.*, (1989). Una inspección de la secuencia completa del gen permite determinar que codifica para una proteína de 368 aminoácidos, con las siguientes zonas: (1) un dominio C-terminal voluminoso posiblemente glicosilado, (2) un único dominio transmembrana de 16 aminoácidos y (3) un pequeño dominio N-terminal de 6 aminoácidos (figura 3B).

El dominio N-terminal se extiende desde el residuo 7 al 22, está inmediatamente precedido por dos aminoácidos básicos y seguidos por un residuo de ácido glutámico en su extremo C-terminal. Por otra parte, se han localizado dos sitios potenciales de N-glicosilación en los aminoácidos Asn36 y Asn293, sin embargo la presencia de un residuo de prolina inmediatamente después de la Asn36 sugiere que éste sitio no estaría glicosilado.

Por otra parte, Milland *et al.*, 2002 han determinado que la secuencia MNVKGR aminoterminal de la  $\alpha$ -1,3-galactosiltransferasa de cerdo, participaría en la localización y retención de la proteína en el complejo de Golgi. Esta secuencia se encuentra también presente en la  $\alpha$ -1,3-galactosiltransferasa bovina, pero en lugar de la R está la V (figura 1.2).

El dominio catalítico está constituido por los últimos 286 aminoácidos del extremo C-terminal (80-368), aproximadamente (Henion *et al.*, 1994). Se halla separado del dominio transmembrana por una región *stem*, por donde las proteasas hidrolizan la proteína liberando el enzima soluble catalíticamente activo.

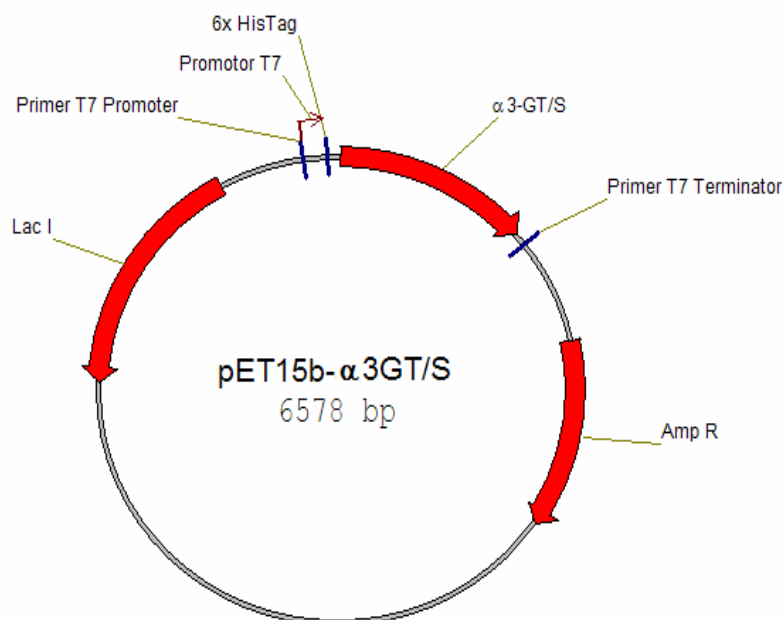
El dominio catalítico (80-368) fue subclonado y expresado en *E. coli*, inicialmente por Fang *et al.*, 1998. Posteriormente, se realizaron estudios cristalográficos (Gastinel *et al.*, 2001; Boix *et al.*, 2001; Boix *et al.*, 2002) que sugieren que los últimos diez aminoácidos del extremo C-terminal (358-368) podrían estar involucrados en cambios conformacionales asociados a la unión de los ligandos. Particularmente, en la unión del UDP-Gal, lo cual es consistente con un trabajo anterior de Henion *et al.*, 1994, en el cual se determinó la inactivación enzimática por eliminación de los últimos tres aminoácidos del extremo C-terminal de una  $\alpha$ GT de mono del Nuevo Mundo (*Callithrix*).

Con el propósito de estudiar el rol de cada uno de los aminoácidos del extremo C-terminal en la actividad enzimática, se realizó en la presente tesis un análisis mutacional de esta zona. El objetivo fue obtener mutantes de alanina de cada uno de los residuos 358 a 368, para su posterior caracterización bioquímica. Cada una de estas proteínas mutantes ha sido expresada y purificada por cromatografía de afinidad. La estabilidad frente a condiciones de desnaturalización y caracterización cinética se describen en los capítulos 5 y 6 respectivamente.

## Resultados y discusiones

### *Análisis mutacional*

Se obtuvieron los mutantes T358A, K359A, E360A, Y361A, N362A, V363A, V364A, R365A, N366A, N367A y V368A, correspondientes al extremo C-terminal de la  $\alpha$ 3GT. La mutagénesis dirigida se realizó a partir de un plásmido pET15b- $\alpha$ 3GT/wt previamente construido en nuestro laboratorio (figura 2.1) (Monegal *et al.* 2005). El plasmido contiene un gen de resistencia a la ampicilina ( $\beta$  lactamasa), el gen lac I y el gen codificante del dominio catalítico de la  $\alpha$ 3GT bovina (aa. 82-368) situado detrás del promotor T7 y de una secuencia codificante para la cola de histidinas en el extremo N-terminal. Esta cola de histidinas permite la purificación de la proteína por cromatografía de afinidad por unión a níquel, además está presente una diana de proteólisis por trombina si se desea eliminar las histidinas una vez purificada la proteína.



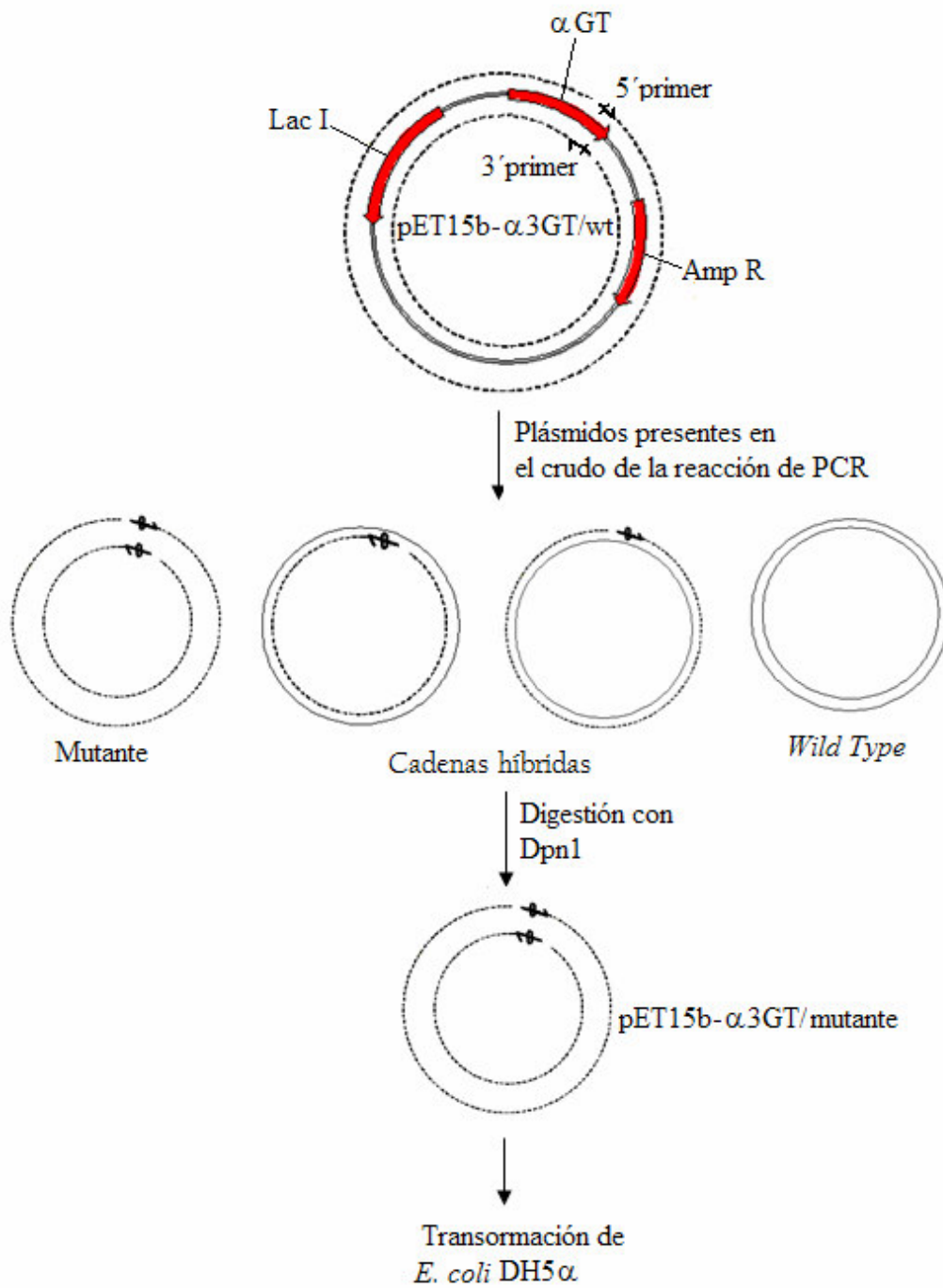
**Figura 2.1.** Mapa del plásmido pET15b- $\alpha$ 3GT. Donde 6x His Tag es la secuencia codificadora de la cola de histidinas, Nco I y Eco RI son enzimas de restricción, lac I es el gen que codifica para el represor del operon lactosa y Amp R es el gen que codifica para la  $\beta$ -lactamasa. Se muestran también los sitios de unión para los primers T7 promotor y T7 terminador.



La mutagénesis dirigida se realizó mediante síntesis de completa de plásmidos por PCR, donde los *primers* empleados se diseñaron conteniendo la mutación deseada. De esta manera se obtiene la mutación deseada en un solo paso, sin necesidad de realizar digestiones y ligación de fragmentos (figura 2.2). Los plásmidos mutados obtenidos de esta manera son de doble cadena pero mellados (*nicked*), lo cual no los hace aptos como moldes para la síntesis de otros plásmidos, de manera que este tipo de PCR no es exponencial, sino mas bien lineal y consiguientemente la producción es relativamente baja.

Las mutaciones deseadas se consiguen mediante *primers* mutagénicos. Éstos son complementarios entre sí y con el gen de la proteína, con excepción del codón que se desea mutar, el cual se substituye por el codón adecuado para introducir la mutación requerida. Así en el presente trabajo se introdujeron codones de alanina en lugar de cada uno de los residuos del extremo C-terminal de la  $\alpha 3GT$ .

Una vez concluidos los ciclos de reacción, se eliminan los plásmidos (*wild type*) empleados como molde, dejando únicamente los sintéticos que pueden contener la mutación esperada. Esta selección es posible gracias a que los plásmidos moldes provenientes directamente de bacterias están metilados, a diferencia de los obtenidos por PCR. El enzima de restricción Dpn1 reconoce selectivamente sitios metilados y digiere las cadenas que los contengan. Ambas cadenas de los plásmidos molde son digeridas, mientras que en los plásmidos híbridos, la cadena procedente del molde inicial está metilada y por tanto es digerida, mientras que la cadena sintética resulta intacta y sirve de molde para las replicaciones siguientes. De esta manera la población final de plásmidos está constituida prácticamente solamente por plásmidos sintéticos, los cuales están listos para transformar bacterias. En el presente trabajo se partió de plásmidos molde pET15b- $\alpha 3GT$ /wt.



**Figura 2.2.** Técnica de mutagénesis dirigida empleada para obtener mutantes del extremo C-terminal de la  $\alpha 3GT$ .

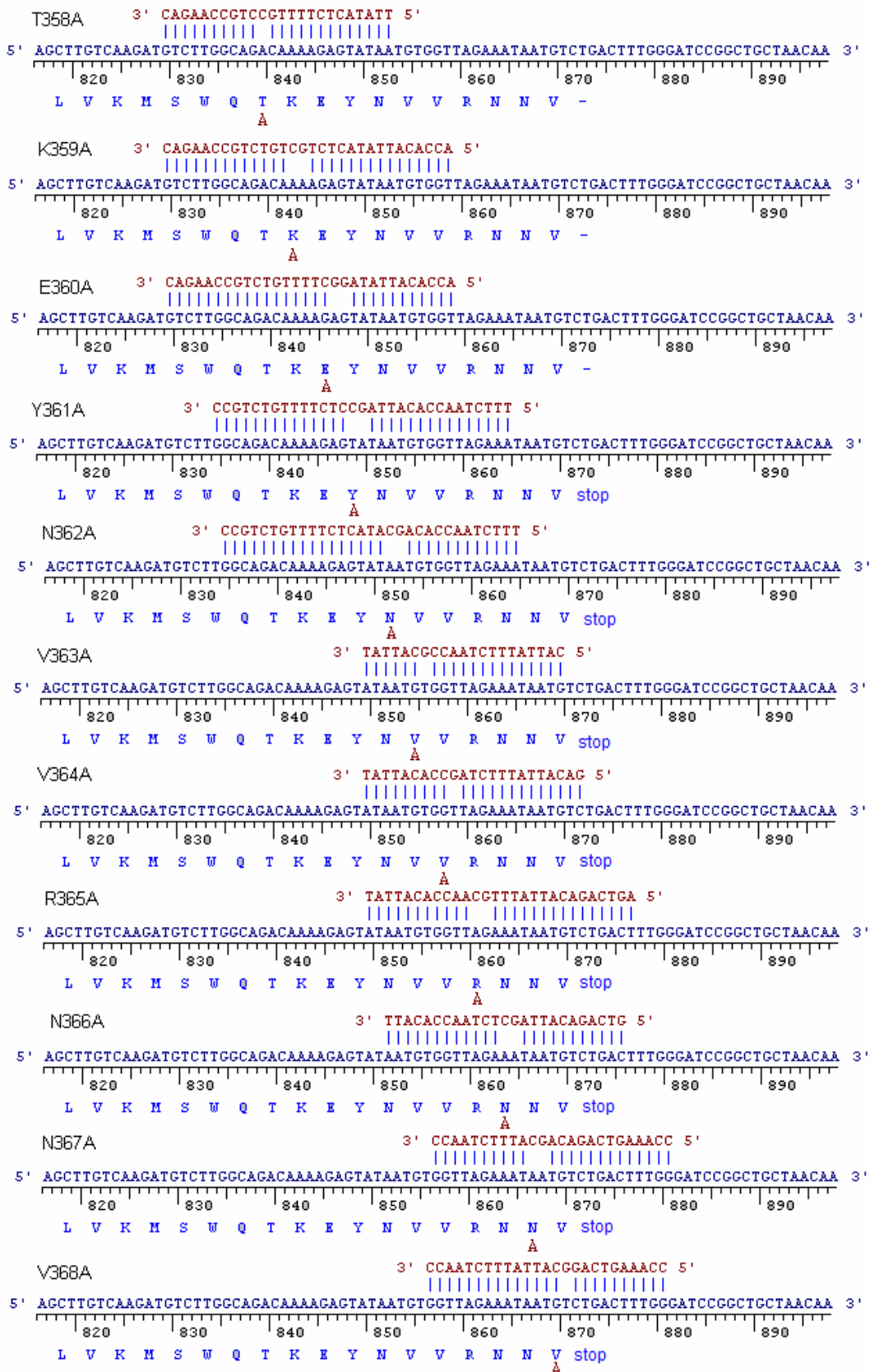


Figura 2.3. Primers mutagénicos diseñados.

Con la mezcla de la reacción de mutagénesis se transforman células *E. coli* DH5 $\alpha$ . Estas bacterias tienen el sistema necesario para reparar la mella de los plásmidos sintetizados por PCR, además de replicarlos. Sin embargo, se observó que no todas las colonias contienen el plásmido con la mutación deseada, algunas resultaron *wild type*, mientras que otras contenían un plásmido mutante pero con repeticiones en tandem de la secuencia que contenía la mutación. La verificación de los mutantes deseados se realizó por secuenciación de los plásmidos por los extremos flanqueantes al gen, utilizando primers *T7 promotor* y *T7 terminador*.

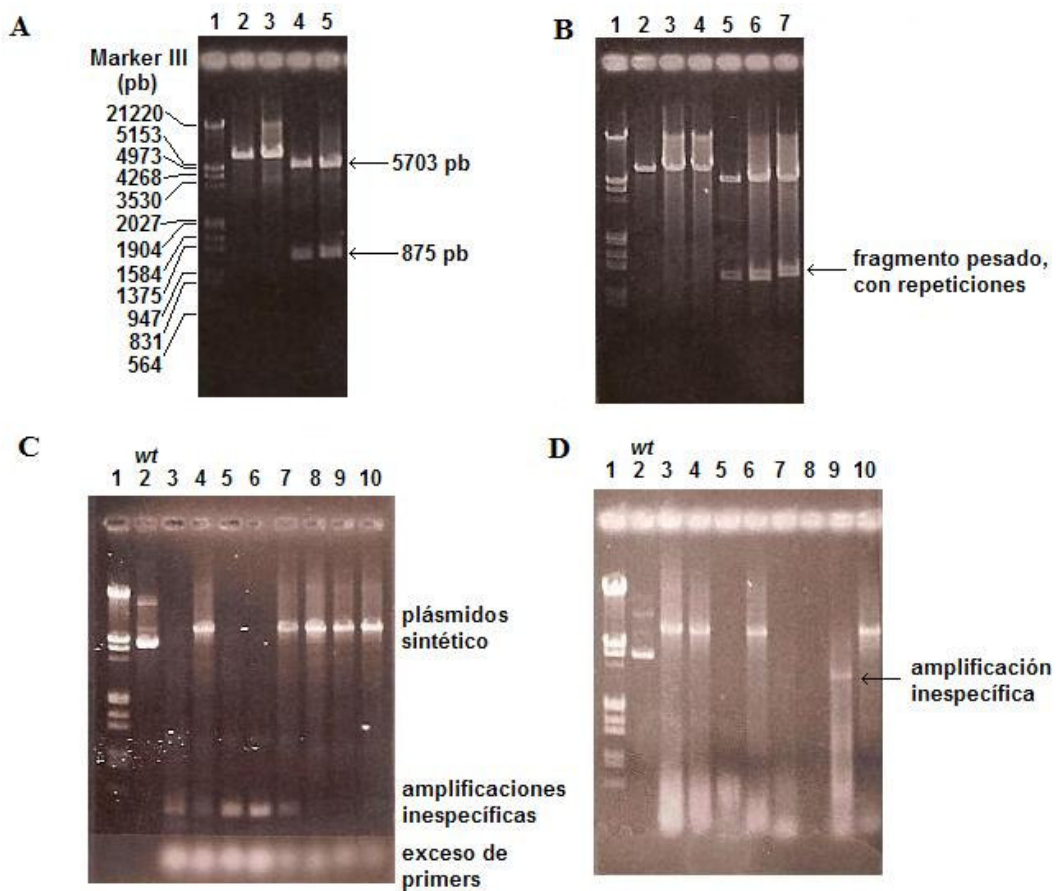
### *Diseño de primers mutagénicos*

Los *primers* mutagénicos diseñados están comprendidos por oligonucleótidos entre 25 a 45 pares de bases de longitud que se presentan en la figura 2.3. El codón mutante está situado en el centro de cada uno de los *primers*. La selección del codón mutagénico, que para todos los casos fue el correspondiente al de alanina, tomando en cuenta que sea el más frecuentemente utilizado por *E. coli* y que su substitución por el codón *wild type* implique el menor número de cambios posibles en las bases. También se ha considerado que la base del extremo 3' del primer sea adenina, ya que algunas polimerasas introducen por defecto ésta base al iniciar la reacción de polimerización. Finalmente se comprobó que ninguno de los *primers* diseñados forme estructuras secundarias, tales como *hairpins*, *loops*, dímeros u otras que interfieran en la PCR.

### *Puesta a punto del método*

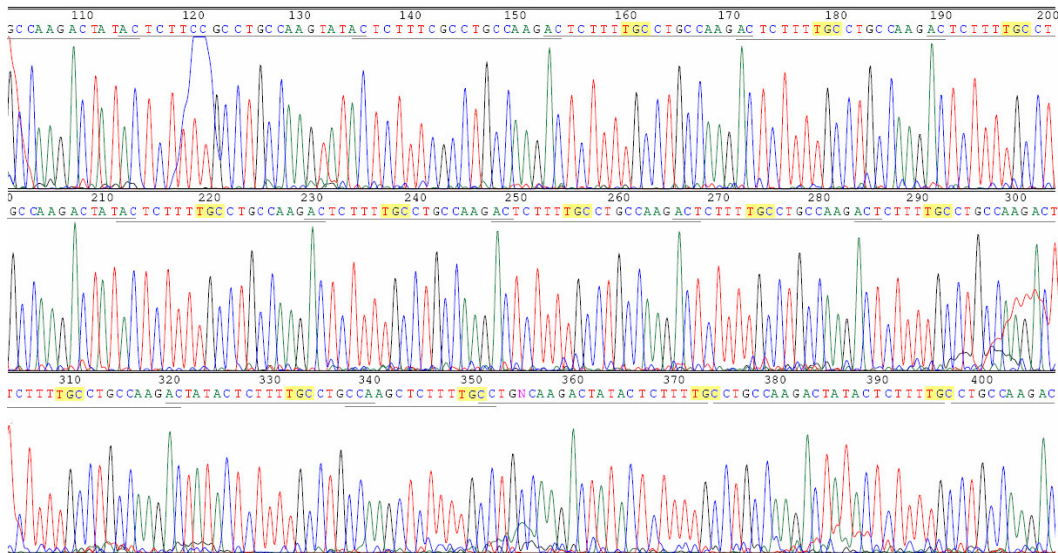
Se determinaron las condiciones más adecuadas para la obtención de plásmidos mutantes por PCR. Para empezar se diseñaron primer mutagénicos y se ajustaron sus correspondientes temperaturas de hibridización. Seguidamente se probaron DNA polimerasas de alta fidelidad, sin actividad exonucleasa y capaces de extender la cadena de nueva síntesis hasta más de 6600 pares de bases, ya que es el tamaño

aproximado del plásmido pET15b- $\alpha$ 3GT. Así, las nuevas polimerasas utilizadas fueron *PftTurbo* y *EcoZyme*. Finalmente, se probó la transformación de *E. coli* con la mezcla resultante de la PCR, por electroporación y shock térmico de células competentes preparadas químicamente.



**Figura 2.4.** Electroforesis de plásmidos. (A) pET15b- $\alpha$ rGT/wt (2 y 4) y pET15b- $\alpha$ rGT/mutante (3 y 5); linearizados con NcoI (2 y 3) y doblemente digeridos con NcoI y EcoRI, donde el fragmento de 875 pb corresponde al gen  $\alpha$ 3GT y el de 5703 pb al vector pET15b- $\alpha$ rGT. (B) El fragmento del plásmido mutante (7) es ligeramente más pesado debido a repeticiones introducidas durante la PCR. (C y D) Productos crudos de PCR después de 12 horas de digestión con Dpn1. El plásmido *wt* (2) con 3 conformaciones en equilibrio debido al superenrolamiento, nótese que la banda intermedia coincide con la retención de los plásmidos sintéticos (3-10) que presentan una única conformación.

A pesar de obtener plásmidos sintéticos, incluso visibles en gel electroforético de agarosa, figuras 2.4C y D, algunos de los mutantes obtenidos han mostrado repeticiones en *tandem*, indeseables (figura 2.5). Éstas repeticiones corresponden a secuencias del óligo mutagénico, se han encontrado plásmidos hasta con 10 repeticiones consecutivas. Se destaca también que en el cribado de colonias, muy pocas o ninguna resulto ser *wild type*, por lo que el problema se ha centrado en solucionar las repeticiones. No se ha establecido claramente el mecanismo por el cual se generan estas repeticiones, pero en principio se las ha vinculado con la calidad, concentración y sobre todo temperatura de hibridación de los *primers*.



**Figura 2.5.** Sección de un electroferograma de secuenciación mostrando repeticiones en *tandem*, indeseables. A pesar de las repeticiones, la mutación ha sido introducida.

Los resultados obtenidos respecto a la temperatura de hibridación sugieren que ésta debe estar como mucho 2°C por debajo de la temperatura teórica de fusión del *primer* ( $T_m$ ). La  $T_m$  de los primers mutagénicos empleados es muy superior a 50°C (tabla 2.1). A pesar de ello, a esta temperatura de hibridación se obtuvieron los mutantes T358A, R365A y V368A. Para cada uno de los restantes mutantes se tuvo

que ajustar la temperatura de hibridación para evitar repeticiones indeseables. La  $T_m$  de los *primers* mutagénicos implicados se calculó según la ecuación:

$$T_m = 81.5 + 0.41(\%GC) - \frac{675}{N} - (\% \text{ bases desapareadas}) \quad (1)$$

donde N es la longitud del *primer* mutagénico.

**Tabla 2.1.** Temperaturas de fusión de los *primer* mutagénicos utilizados, proporcionada por la casa comercial y la calculada. Además se muestra la temperatura de hibridación utilizada en la PCR total. Todas las temperaturas están en °C.

	$T_m$ Calculada	$T^{\circ}$ de hibridación empleada
T358A	65,6	50
K359A	68,6	66,6
E360A	69,1	67,1
Y361A	70,8	68,8
N362A	69,0	67,0
V363A	77,5	75,5
V364A	61,3	59,3
R365A	59,6	50
N366A	59,5	57,5
N367A	66,8	64,8
V368A	63,6	50

La concentración de *primers* mutagénicos parece no influir en la introducción de repeticiones. Para la obtención del mutante T358A se partió de 25ng/50µl de plásmido molde pET15b-α3GT/wt. Se utilizaron dos concentraciones de *primers*, una de 2,25µM (figura 2.5C, carriles 3-5) y otra de 0,25µM (figura 2.5C, carriles 6-10). En ambos casos se obtuvieron los mutantes esperados, sin repeticiones. Sin embargo, en los geles electroforéticos (figura 2.5C) se puede apreciar que a altas concentraciones de *primers* (carriles 3-5) hay amplificaciones inespecíficas, que de todas maneras, no afectan al plásmido mutante.

En cuanto a las polimerasas, se obtuvieron mutantes con *PfuTurbo* y *EcoZyme*, sin embargo ningún mutante pudo obtenerse con *DeepVent*<sup>®</sup>. Tanto *PfuTurbo* como *EcoZyme* son polimerasas de alta fidelidad y no tienen actividad exonucleasa, además no añaden adenina ni ningún otro nucleótido adicional al finalizar la polimerización, lo cual las hace muy adecuadas para mutagénesis dirigida. *PfuTurbo* es componente del kit para mutagénesis dirigida *QuickChange* de *Stratagene*, y ésta establecido que 2.5U/μl es la cantidad adecuada para la reacción, además ya lleva la cantidad de magnesio óptima. En cambio, para *EcoZyme* se utilizó en la misma cantidad que *PfuTurbo*, pero se tuvo que determinar la concentración de magnesio que diera mejores resultados. Para ello se utilizaron tres concentraciones (1.5, 2 y 2.5mM), siendo la de 2.5mM, la óptima.

Respecto a la transformación de *E. coli* con el crudo de reacción de PCR se utilizaron las técnicas de *shock* térmico y electroporación, dando ambas buenos resultados. Para el *shock* térmico se empleó la cepa *DH5α*, mientras que para la electroporación, *XL10 Gold*. El rendimiento por electroporación en la mayoría de los casos fue superior a 10 veces al obtenido por *shock* térmico. Sin embargo, solamente para la obtención del mutante N367A ha sido necesario recurrir a la electroporación. Finalmente, las condiciones más adecuadas encontradas, para la mutagénesis dirigida se resumen en las tablas 2.2 y 2.3.

**Tabla 2.2.** Condiciones óptimas de la mezcla de reacción en la PCR para mutagénesis dirigida.

<i>Componente</i>	<i>Cantidad</i>
Tampón de reacción	1X
pET15b-3αGT/wt (plásmido molde)	25ng
primer mutagénico #1	0.25uM
primer mutagénico #2	0.25uM
DNA polimerasa <i>PfuTurbo</i>	2.5U
* DNA polimerasa <i>EcoZyme</i>	2.5U
Cloruro de magnesio	2.5mM

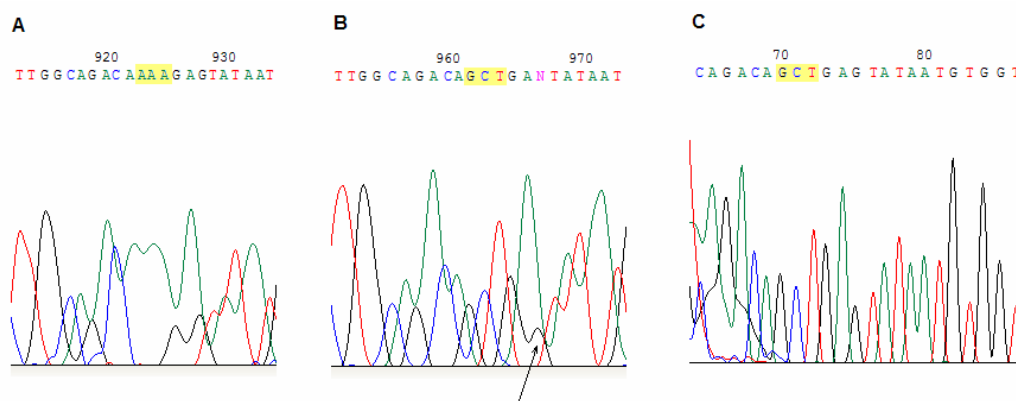
\* Cuando se utiliza *EcoZyme* es necesario añadir cloruro de magnesio.



**Tabla 2.3.** Condiciones óptimas para los ciclos de reacción en la PCR para mutagénesis dirigida.

<i>Etapa de la reacción</i>	<i>temperatura °C</i>	<i>tiempo</i>
Desnaturalización inicial	95	30s
Desnaturalización cíclica	95	30s
Hibridación	depende del primer (ver tabla 2.1)	1min
*Elongación <i>PfuTurbo</i>	68	15min
*Elongación <i>EcoZyme</i>	72	15min
Vuelta a Desnaturalización cíclica	25 veces	
Conservación	4	Indefinido

\* *PfuTurbo* incorpora cada kb en dos minutos, mientras que *EcoZyme* incorpora 10nmoles en 30 minutos, y por el tamaño del molde, 6578 pb (pET15b-3 $\alpha$ GT), se establece un tiempo prudente de 15min para asegurar la elongación completa del plásmido por cualquiera de las dos polimerasas.



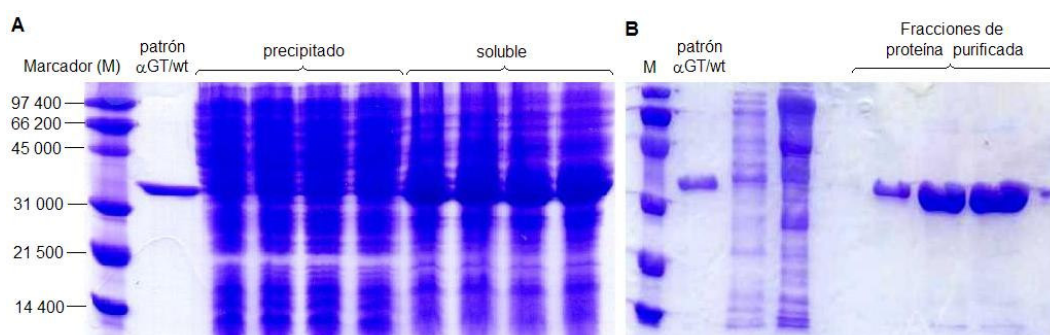
**Figura 2.6.** Electroferogramas de secuenciación. (A) *Wt* secuenciado con primer T7 promotor. (B) Mutante K359A secuenciado con el *primer* T7 promotor y (C) el mismo K359A secuenciado con *primer* de secuenciación diseñado para obtener mejores señales para los últimos nucleótidos del gen.

Las mutaciones introducidas fueron determinadas por secuenciación. Se ha secuenciado la zona correspondiente al gen  $\alpha$ 3GT del plásmido pET15b- $\alpha$ 3GT (figura 2.1) en ambos sentidos. Se utilizó el *kit BigDye Terminator v3.1* y los *primers* de secuenciación T7 promotor y T7 terminador. En general, se han obtenido señales con buena resolución hasta secuencias de 900 bases, cubriendo la totalidad del gen  $\alpha$ 3GT. Sin embargo, para

secuenciar algunos mutantes, sobre todo los más próximos al extremo T7 terminador, se ha diseñado un *primer* de secuenciación complementario a la zona media del gen de la  $\alpha$ 3GT, de tal manera que las señales de los últimos nucleótidos tengan mejor resolución (figura 2.6). Los electroferogramas obtenidos fueron analizados a fin de verificar que no existan inserciones, deleciones u otras mutaciones indeseables.

### *Expresión y purificación*

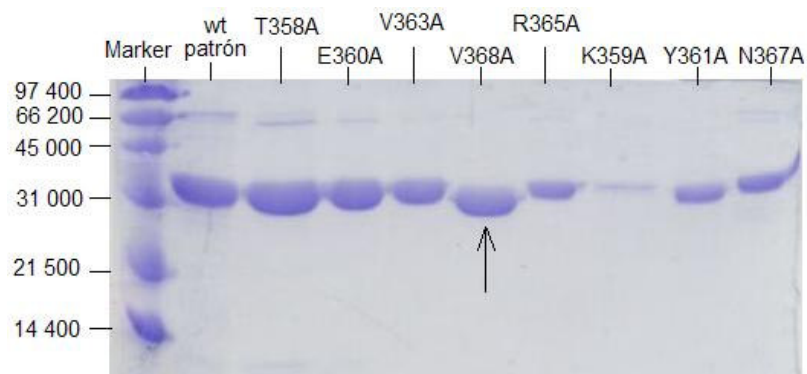
Todos los mutantes obtenidos fueron expresados mediante el sistema pET en *E. coli* BL21(DE3). Este sistema permite controlar la inducción de la expresión añadiendo isopropiltiogalactósido (IPTG), un análogo de la lactosa no metabolizable, que se une a los represores liberándolos de los correspondientes operadores, lo cual permite el inicio de la expresión de la RNA polimerasa T7 en el cromosoma de *E. coli* BL21(DE3) que a su vez transcribe el gen de la proteína recombinante bajo el control del promotor T7 en el vector, dando lugar a la sobreexpresión. La expresión fue intracelular y para el análisis de la expresión y purificación se partió de extractos celulares obtenidos por sonicación.



**Figura 2.7.** Electroforesis de proteínas SDS-PAGE correspondiente a la expresión (A) y purificación (B) del mutante E360A.

La mayor parte de la proteína expresada, precipita (figura 2.7A). Las proteínas precipitadas no son funcionales, seguramente debido a cambios en el plegamiento y desaturalización. A pesar de ello, la cantidad de proteína soluble es más que suficiente para poder realizar estudios de actividad y otras pruebas de caracterización bioquímica.

A partir de la fase acuosa se purificaron las proteínas mutantes y *wt* expresadas. La purificación se realizó mediante cromatografía de afinidad para proteínas de fusión con colas de histidina ya que las proteínas de interés expresan una secuencia adicional de 6 histidinas en el extremo *N*-terminal. Esta técnica permite la purificación de proteínas en una sola etapa. Se utilizaron columnas empaquetada con 1 ml de *Sefarosa* quelante de alta eficacia (*High Performance Chelating Sepharose*), la cual consiste en un lecho de agarosa con numerosos enlaces cruzados, a la cual se encuentra unido el ácido iminodiacético por un espaciador de 7 átomos y mediante un enlace éter estable. El ácido iminodiacético une al Ni, y el metal une selectivamente a la cola de histidinas de la proteína. La elución se realizó con un tampón conteniendo imidazol, el cual compite con las histidinas, liberando de esta manera a la proteína. Los rendimientos obtenidos muestran una amplia variación que va de 3 hasta 35mg y para N362A 108mg de proteína (tabla 2.4 y figura 2.7B) por litro de medio de cultivo. Los gels electroforéticos SDS-PAGE muestran que el sistema de purificación es muy eficiente, dando proteínas de alta pureza (figura 2.8).

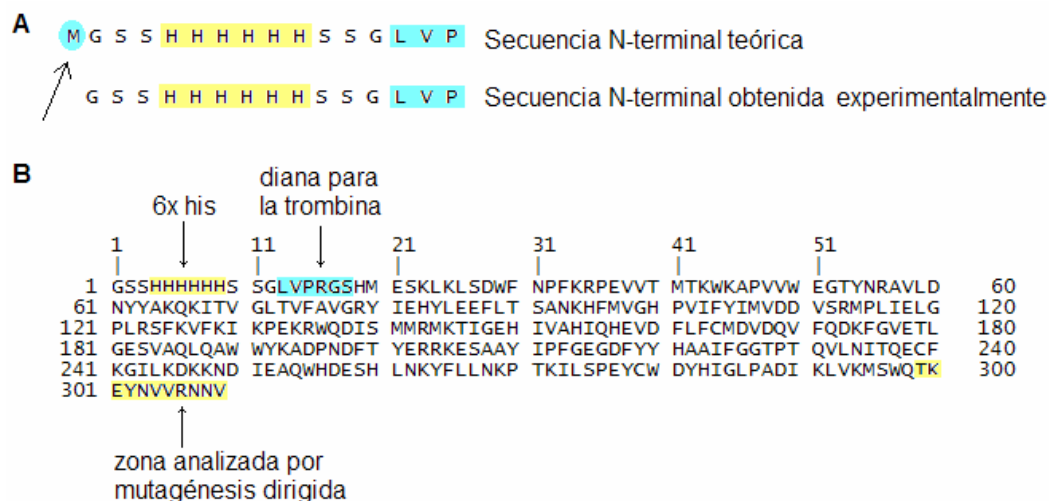


**Figura 2.8.** Electroforesis SDS-PAGE de algunas de las proteínas  $\alpha$ 3GT mutantes purificadas. Nótese que el mutante V368A ha sufrido degradación.

La proteína *wt* purificada se analizó por secuenciación N-terminal por el método de Edman. Así, se determinó que existe procesamiento de la metionina N-terminal durante la expresión (figura 2.9). Los espectros MALDI-TOF dan pesos moleculares que son consistentes con el tamaño de los mutantes sin metionina N-terminal, lo cual refleja ésta modificación postraduccional para toda la serie de mutantes. Por otra parte, se calcularon los pesos moleculares teóricos de cada uno de los mutantes, además de otras propiedades fisicoquímicas (tabla 2.5), utilizando el programa *ProtParam* del servidor *Expasy* ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)).

**Tabla 2.4.** Rendimientos obtenidos en la purificación de proteínas.

proteína	g/Lt de cultivo	proteína	g/Lt de cultivo
WT	29	V363A	33
T358A	16	V364A	35
K359A	3	R365A	12
E360A	10	N366A	12
Y361A	8	N367A	8
N362A	108	V368A	18



**Figura 2.9.** (A) Secuenciación N-terminal con el método Edman que muestra el procesamiento de la metionina. (B) Secuencia base de las proteínas purificadas y utilizada para los cálculos de peso molecular con *ProtParam*. En la figura se muestra *wt*, y para cada mutante se sustituyó el aminoácido correspondiente en la zona de análisis mutagénico.

**Tabla 2.5.** Parámetros fisicoquímicos teóricos de las proteínas estudiadas. Datos calculados a partir de secuencias de aminoácidos con el programa *ProtParam* (www.expasy.org).

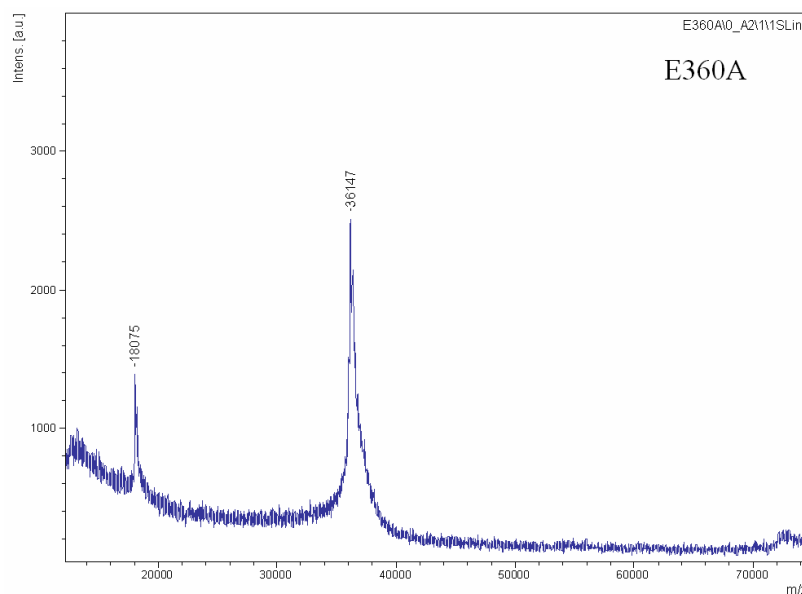
<i>Proteína</i>	<i>Peso Molecular</i>	<i>pI</i>	<i>Nº átomos</i>	<i>Inestabilidad (II)</i>	<i>Índice Alifático</i>	<i>Hidrofobicidad (GRAVY)</i>	<i>Coefficiente De extinción Molar (280nm)</i>
<i>wt</i>	36207,5	7,4	5059	47,93	77,54	-0,405	70530
T358A	36177,5	7,4	5055	47,93	77,86	-0,396	70530
K359A	36150,4	7,1	5048	47,93	77,86	-0,386	70530
E360A	36149,5	7,9	5053	47,93	77,86	-0,387	70530
Y361A	36115,4	7,4	5048	47,93	77,86	-0,394	69250
N362A	36164,5	7,4	5055	48,69	77,86	-0,387	70530
V363A	36179,4	7,4	5053	47,93	76,93	-0,412	70530
V364A	36179,4	7,4	5053	47,93	76,93	-0,412	70530
R365A	36122,4	7,1	5046	47,53	77,86	-0,384	70530
N366A	36164,5	7,4	5055	47,53	77,86	-0,387	70530
N367A	36164,5	7,4	5055	47,93	77,86	-0,387	70530
V368A	36179,4	7,4	5053	47,93	76,93	-0,412	70530

**Tabla 2.6.** Pesos moleculares de las proteínas wt y mutantes obtenidos por MALDI-TOF.

<i>Mutante</i>	<i>MALDI-TOF</i>	<i>Teórico</i>	<i>diferencia</i>	<i>error %</i>
<i>wt</i>	36205,00	36207,5	2,27	0,01
T358A	36182,64	36177,5	5,14	0,01
K359A	36157,00	36150,0	7,00	0,02
E360A	36147,00	36149,5	2,50	0,01
Y361A	36127,00	36115,0	12,00	0,03
V363A	36184,00	36179,0	5,00	0,01
N367A	36163,50	36164,5	1,00	0,00
V368A	36188,20	36179,4	8,79	0,02

Los pesos moleculares calculados teóricamente fueron comparados con los experimentales obtenidos por espectrometría de masas MALDI-TOF (figura 2.10). Para algunas proteínas la relación señal ruido del espectro de masas no fue muy buena (V364A y R365A), por lo que para estos casos se tomo una alícuota del cultivo justamente después de la inducción de la expresión y se secuenció el gen correspondiente al mutante de interés para verificar la presencia de la mutación. Otras proteínas mutantes sufrieron degradación antes del análisis MALDI-TOF, y para éstas se procedió de la

misma manera que para V364 y R365A. Los pesos moleculares obtenidos por MALDI-TOF dieron valores muy cercanos a los teóricos, con errores inferiores al máximo aceptable de 0.05% (tabla 2.6), demostrando la expresión de la proteína mutante esperada.



**Figura 2.10.** Espectro de masas MALDI-TOF correspondiente a la  $\alpha$ 3GT/E360A.

Se ha conseguido obtener los mutantes deseados a partir del plásmido pET15b- $\alpha$ 3GT: T358A, K359A, E360A, Y361A, N362A, V363A, V364A, R365A, N366A, N367A y V368A, correspondientes al extremo C-terminal de la  $\alpha$ 3GT. Las correspondientes proteínas fueron expresadas en *E. coli* BL21(DE3) y purificadas por cromatografía de afinidad. Se determinó por secuenciación N-terminal que hay procesamiento de la metionina inicial y los pesos moleculares de las proteína mutantes fueron determinados por MALDI-TOF, siendo consistentes con los obtenidos teóricamente con el programa *ProtParam*. El rendimiento de cada una de las proteínas obtenidas (4 a 8mg/L de cultivo) es suficiente para realizar estudios cinéticos y de estabilidad, tal como se explica en los capítulos 5 y 6.

# **CAPÍTULO 3**

---

---

**MÉTODO DE ELECTROFORESIS  
CAPILAR PARA ANÁLISIS DE  
AZÚCAR NUCLEÓTIDOS Y ENSAYOS  
ENZIMÁTICOS DE  
GLICOSILTRANSFERASAS**

## **MÉTODO DE ELECTROFORESIS CAPILAR PARA ANÁLISIS DE AZÚCAR NUCLEÓTIDOS Y ENSAYOS ENZIMÁTICOS DE GLICOSILTRANSFERASAS**

### **Introducción**

Los ensayos enzimáticos para glicosiltransferasas pueden monitorear la degradación de los sustratos donadores o la formación de los productos. Al respecto, una variedad de métodos han sido desarrollados, tales como radiométricos, cromatográficos, inmunológicos, espectrofotométricos, y más recientemente por electroforesis capilar con posterior derivatización con ANTS (Monegal, *et al.* 2005).

La electroforesis capilar (CE) ha llegado a constituirse en una herramienta analítica muy poderosa. Esta técnica tiene una alta capacidad de resolución, requiere de baja cantidad de muestras, la detección es altamente sensible y es un método automatizado. Así por ejemplo, su aplicación al análisis de nucleótidos y sobre todo de oligonucleótidos ha permitido desarrollar métodos altamente automatizados para la secuenciación de genomas, que en la actualidad son de uso rutinario en muchos laboratorios de biología molecular.

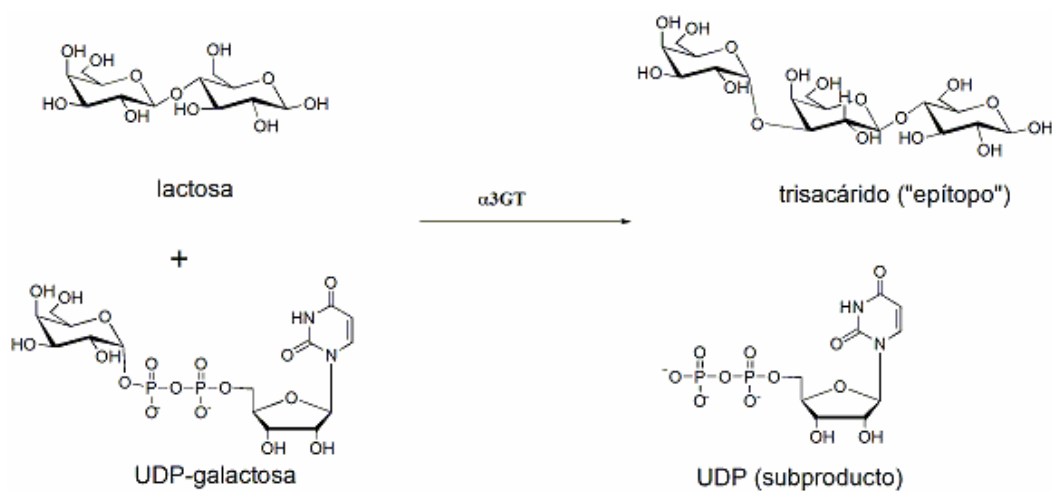
La electroforesis capilar aplicada al estudio de reacciones de glicosiltransferasas ha sido enfocada tomando en cuenta el análisis de los carbohidratos participantes (Lee, *et al.* 1992; Le, *e. al.* 1997; Kanie, *et. al.* 1998; Snow, *et. al.* 1999; Wakarchuk y Cunningham, 2003). De esta manera se han tenido que solventar dos dificultades: (1) ausencia de grupo



funcional con carga en carbohidratos neutros y (2) ausencia de grupos cromofóricos o fluorofóricos, necesarios para la detección espectrofotométrica (El Rassi, 2003; Suzuki y Honda, *et. al.* 1998; Paulus y Klockow, 1996). Por tanto, las estrategias empleadas han consistido en complejar los carbohidratos con boro (Hoffstetter-Kuhn, *et. al.* 1991; Honda, 1996) o derivatizarlos con grupos funcionales que aporten carga y cromóforos o fluoróforos. Las reacciones de derivatización más típicas son la aminación reductiva con aminas aromáticas, tales como 2-aminopiridina, ácido p-aminobenzoico o ácido 8-aminonaftaleno-1,3,6-sulfónico (ANTS) (Klockow, *et. al.* 1995; Kakehi, *et. al.* 1999; O'shea, *et. al.* 1998; Evangelista, *et. al.* 1995; Chiesa y O'Neill, 1994).

Las reacciones de derivatización de los carbohidratos requieren de un tiempo mínimo y condiciones adecuadas para obtener buenos rendimientos, y por otra parte, si se derivatizan los sustratos, estos pueden perder la capacidad de unirse al enzima. Un método recientemente desarrollado en nuestro grupo consiste en la derivatización posterior a la reacción enzimática, de esta manera se evita la alteración de los sustratos y además se pueden estudiar diferentes sustratos (Monegal *et al.* 1995). Siguiendo esta línea en la búsqueda de métodos versátiles de electroforesis capilar para monitorizar ensayos de actividad de glicosiltransferasas, se ha desarrollado uno nuevo que no requiere derivatización.

Las reacciones que catalizan las glicosiltransferasas tipo *Leloir* incluyen azúcar nucleótidos como donadores (figura 2, en la introducción). La parte nucleotídica de estos sustratos consiste en una base nitrogenada, que en la mayoría de los casos es uridina, y actúa como cromóforo con absorción máxima a 270nm. Además, los grupos fosfato confieren carga negativa. De esta manera, están presentes los dos requerimientos para realizar análisis por electroforesis capilar, monitorizando tanto el consumo de azúcar nucleótido (donador) como la producción de nucleótido libre (producto secundario), sin necesidad de ninguna derivatización.

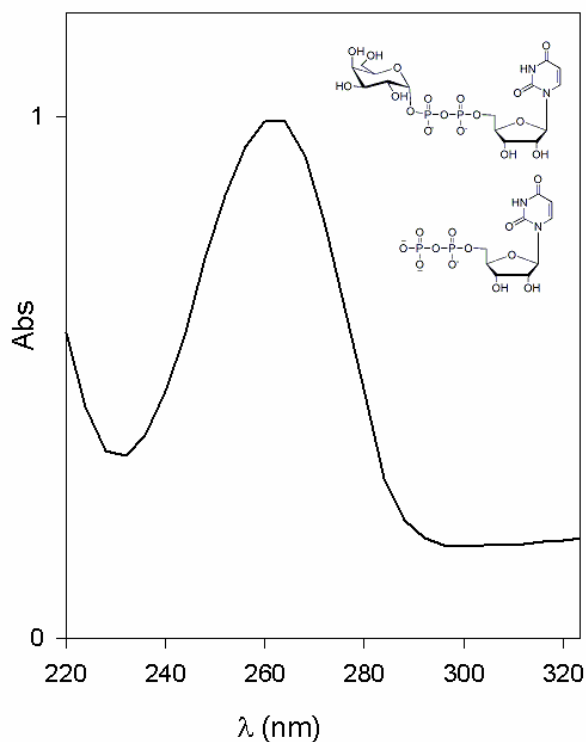


**Figura 3.1.** Reacción catalizada por la  $\alpha$ -1,3-galactosiltransferasa.

El objetivo del presente trabajo es el desarrollo de un método versátil y rápido de electroforesis capilar de alta resolución (HPCE) sin derivatización de ninguno de los sustratos, que permita el análisis de una amplia variedad de sustratos tanto aceptores como donadores. La actividad enzimática es monitorizada en un ensayo discontinuo, donde se toman alícuotas de la mezcla de reacción a diferentes intervalos de tiempo, las cuales se calientan a 98°C por 30s para detener la reacción. Posteriormente, las alícuotas se inyectan para ser analizadas directamente por HPCE.

El enzima empleado para el desarrollo y aplicación de este nuevo método es la  $\alpha$ -1,3-galactosiltransferasa (EC 2.4.1.151). Esta enzima transfiere la galactosa del UDP-Gal a un aceptor que puede ser N-acetilactosamina o lactosa (figura 3.1), y sintetiza la secuencia terminal Gal $\alpha$ 3Gal $\beta$ 4GlcNAc de carbohidratos de glicoproteínas y glicolípidos de las superficies celulares de muchos mamíferos, con excepción del hombre y monos del Viejo Mundo (Galili, *et. al.* 1988). La estructura del disacárido terminal Gal $\alpha$ 3Gal se conoce como epítipo de Galili y es el principal xenoantígeno

implicado en el rechazo inmunológico hiperagudo en el xenotransplante de órganos o tejidos del cerdo al hombre (Joziase y Oriol, 1999; Galili, 2001; Chen, *et. al.* 1999). Por tal motivo, la  $\alpha$ -1,3-galactosiltransferasa es de mucho interés biomédico en la actualidad.



**Figura 3.2.** Espectro de absorción de UDP-Gal y UDP.

## Resultados y discusiones

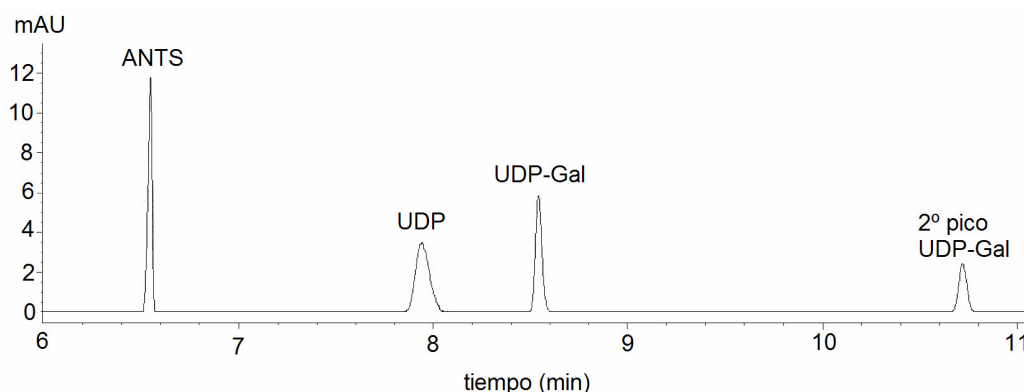
Se implementó un nuevo método de HPCE para monitorizar la actividad de la  $\alpha$ -1,3-galactosiltransferasa, sin derivatizar ningún sustrato ni producto. El nucleótido presente en el sustrato donador (UDP-Gal) y presente también en el subproducto (UDP) posee la carga para la movilidad electroforética, a través de los grupos fosfato; y la uridina aporta el cromóforo para la detección por absorbancia a 270nm (figura 3.2).

**Tabla 2.1.** Condiciones de electroforesis capilar empleadas. Se utiliza un equipo de electroforesis capilar Hewlett-Packard HP<sup>3D</sup> CE USO-I-0034 1R-96 y las muestras son analizadas en las siguientes condiciones y etapas.

1. Acondicionamiento inicial del capilar:	30 min NaOH 0.1 N 10 min H <sub>2</sub> O Milli-Q 10 min tampón de electroforesis
2. Análisis de la muestra en las siguientes condiciones:	
Capilar de burbuja:	de sílica fundida y $\varnothing_{\text{burbuja}} = 3 \varnothing_{\text{interno}}$ $L_{\text{total}} = 80.5 \text{ cm}$ $L_{\text{efectiva}} = 72 \text{ cm}$ $\varnothing_{\text{interno}} = 50 \mu\text{m}$
Tampón de electroforesis:	fosfato de TEA a pH 2.5
Inyección hidrodinámica:	40 mbar durante 12 s de muestra 4 mbar durante 6 s de tampón
Voltaje de separación:	-30 kV (rampa inicial: 0-30 kV en 1 min.)
Temperatura	30°C
Detección:	270, 20 nm//Ref. 450, 80 nm 224, 20 nm//Ref. 450, 80 nm
Acondicionamiento entre inyecciones:	5 min tampón de electroforesis
3. Limpieza del sistema al finalizar la sesión:	15 min H <sub>2</sub> O Milli-Q 15 min aire

En base a estudios anteriores de separación electroforética de carbohidratos derivatizados con ANTS (Monegal, *et. al.* 2005; Chiesa y Horvath, 1993), y dado que el pKa y el máximo de absorbancia del UDP se asemejan mucho a los del ANTS, se ensayó el mismo método de HPCE para la separación de nucleótidos. En el desarrollo del método de separación de carbohidratos derivatizados con ANTS se analizaron mezclas equimolares de glucosa, lactosa, celobiosa, maltosa, maltotriosa y maltotetraosa. Los flujos electroosmóticos (EOF) empleados fueron de tipos directo (pH 9), suprimido (pH 2.5) e invertido (pH 2.5) con tampón de trietilamina (TEA). Éste último proporcionó mejores resultados y tiene

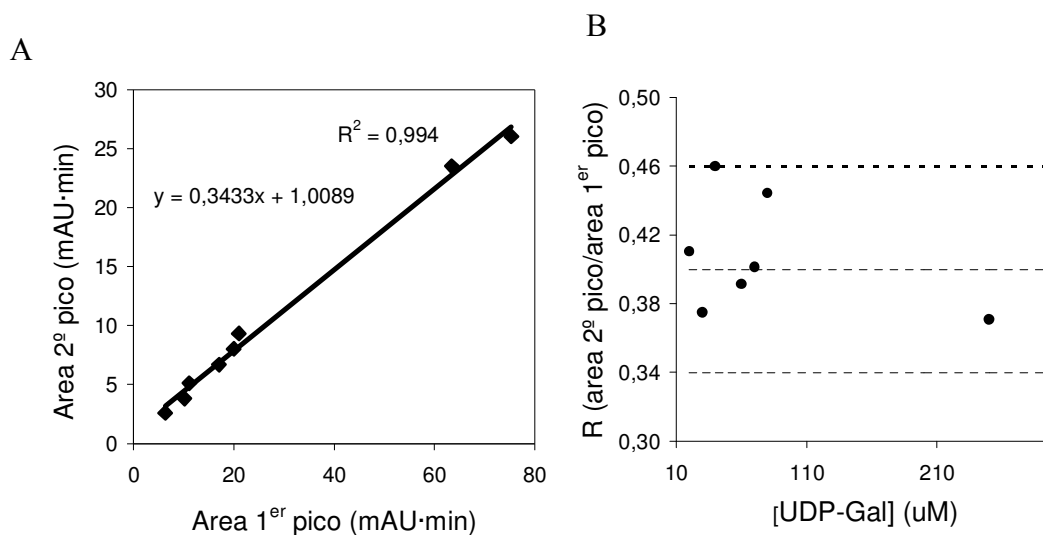
la ventaja de que la TEA tiene baja movilidad electroforética, lo cual permite la aplicación de altos voltajes al mismo tiempo que mantiene baja la intensidad de corriente, confiriendo así, mayor eficiencia al método. Por tal motivo, en el presente trabajo se emplearon las condiciones de EOF invertido (detección anódica). El tampón de electroforesis se preparó con ácido fosfórico 50 mM y ajustando el pH a 2.5 con TEA. Las condiciones de electroforesis capilar se detallan en la Tabla 2.1.



**Figura 3.3.** Electroferograma (condiciones de EOF invertido) de ANTS, UDP y UDP-Gal.

Los azúcar nucleótidos analizados (sustratos donadores) fueron UDP-Gal, UDP-Glc y UDP-NAcGal, y el UDP (producto secundario). Además se utilizó ácido 8-aminonaftalen-1,3,6-trisulfónico (ANTS) como patrón interno. Se realizaron mezclas equimolares de cada uno de ellos con UDP y entre ellos, disueltos en el mismo tampón que se utilizará en las reacciones enzimáticas (50 mM HEPES pH 7, 50 mM KCl, 13 mM  $\text{MnCl}_2$ , 0.13  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  BSA). Se obtuvieron resoluciones eficientes entre el UDP y cada uno de los azúcar nucleótidos (Figura 3.3). El ANTS eluye a los 6.6 min, el UDP a los 7.9, mientras que el UDP-Gal está presente en dos especies, la primera y mayoritaria con un tiempo de migración de 8.5 min, y la segunda (segundo pico) a los 10.7 min. La UDP-Glc presentó tiempos de migración similares a la UDP-Gal, en cambio, la UDP-NAcGal muestra un solo pico a los 8.5 min.

Con patrones comerciales de UDP-Gal y UDP-Glc se ha observado que estos azúcares nucleótido dan lugar a dos picos, el primero a 8.55 y el segundo a 10.72 min. Este comportamiento es más evidente cuando el UDP-Gal o UDP-Glc están en disoluciones tampón y, dependiendo del pH y de la concentración de otros electrolitos presentes, uno de los picos puede tener mayor área que el otro. La existencia de los dos picos se atribuye a dos especies con cargas diferentes del mismo UDP-Gal o UDP-Glc, aunque se desconoce la naturaleza de ambas especies. Por ello se determinó su relación en las condiciones de trabajo (20-300  $\mu\text{M}$  UDP-Gal, 50 mM HEPES pH 7, 50 mM KCl, 13 mM  $\text{MnCl}_2$ , 0.13  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  BSA, 30°C), definida como el cociente del área del segundo pico por el área del primero (Figura 3.4).



**Figura 3.4.** (A) Correlación de áreas del 1<sup>o</sup> pico y 2<sup>o</sup> pico correspondientes a las dos

En estas condiciones, el segundo pico representa un área de aproximadamente el 40% de la del primer pico. Existe una alta correlación lineal de las áreas entre ambos picos (figura 3.4A), considerando que la relación de áreas entre ambos picos está dentro de un  $\pm 15\%$  del valor promedio para todo el intervalo de concentración de UDP-Gal (figura 3.4B). La relación entre ambas especies es del 0.4.

### Validación del método electroforético

La repetibilidad de los tiempos de migración y área de los picos para cada uno de los analitos fue determinada a partir de 12 y 8 inyecciones, respectivamente (Tabla 2.2). En todos los casos, los coeficientes de variación porcentuales (C.V. %) fueron muy inferiores al 5%, lo cual indica una alta repetibilidad tanto de los tiempos de migración como en las inyecciones de las muestras

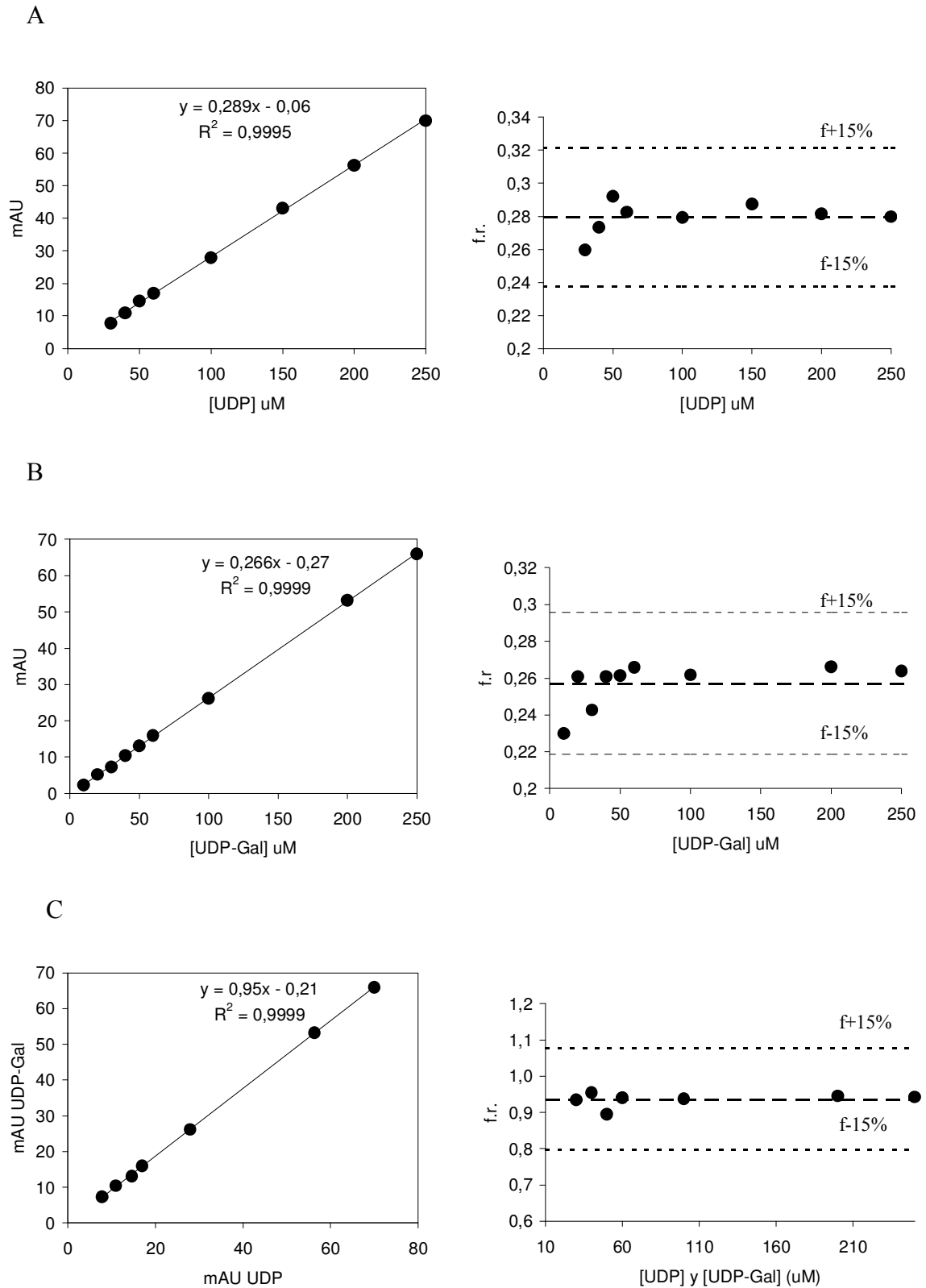
Se estableció el límite de detección como tres veces la altura del pico del analito respecto del ruido de la línea base, mientras que límite de cuantificación se estableció como 10 veces la altura del ruido de la línea base. Así, el límite de detección determinado fue de 2  $\mu\text{M}$ , mientras que el de cuantificación fue de 15  $\mu\text{M}$ , para los analitos estudiados (UDP, UDP-Gal, y UDP-NAcGal).

Para evaluar la linealidad del método, se realizaron las curvas patrón para el UDP y UDP-Gal. Las disoluciones de estos analitos se prepararon juntamente con los otros componentes de la mezcla de reacción. Para el UDP-Gal se sumaron las áreas de los dos picos que presenta en el electroferograma. En estas condiciones se obtuvo que los factores de respuesta de cada uno de los analitos son similares y el método es lineal en el intervalo estudiado de 10 a 250  $\mu\text{M}$  (figura 3.5).

**Tabla 2.2.** Repetibilidad de tiempos de migración y de áreas de los analitos.

		<i>ANTS</i>	<i>UDP</i>	<i>UDP-Gal</i> (1 <sup>o</sup> pico)	<i>UDP-Gal</i> (2 <sup>o</sup> pico)
Tiempo de migración <sup>(a)</sup>	Promedio (min)	6.56	7.94	8.55	10.72
	Desviación estándar	0.02	0.05	0.05	0.08
	C.V. (%)	0.29	0.64	0.58	0.73
Área <sup>(b)</sup>	Promedio (mAU·min)	20,956	20,979	16,490	8,545
	Desviación estándar	0,052	0,044	0,118	0,036
	C.V. (%)	0,248	0,210	0,714	0,423

<sup>(a)</sup> Parámetros estadísticos para el tiempo de migración obtenidos a partir de 12 inyecciones. <sup>(b)</sup> A concentración 80  $\mu\text{M}$  de analito. Parámetros estadísticos obtenidos a partir de 8 inyecciones



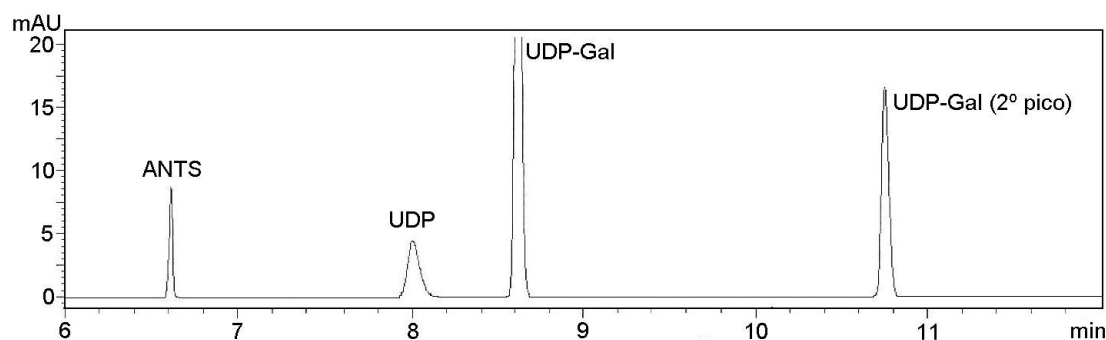
**Figura 3.5.** Curvas patrón y correspondientes factores de respuesta (f.r) de los analitos: (A) UDP, (B) UDP-Gal y (C) Linealidad y factor de respuesta de las mAU de UDP-Gal respecto a las de UDP.



### **Aplicación a la monitorización de la reacción de la $\alpha$ -1,3-galactosiltransferasa**

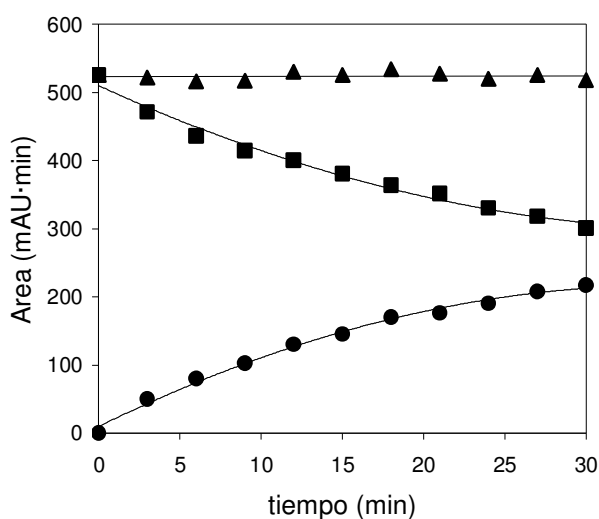
El enzima empleado es una  $\alpha$ -1,3-galactosiltransferasa bovina recombinante, expresada en *E. coli* como una proteína truncada (dominio catalítico, aminoácidos 80-368), y purificada por cromatografía de afinidad tal como se describe en Monegal *et al.* 2005. La reacción catalizada por este enzima consiste en la transferencia de galactosa del UDP-Gal a la lactosa o N-acetilactosamina (figura 3.1). El producto formado es el trisacárido Gal $\alpha$ 3Gal $\alpha$ 4Glc o Gal $\alpha$ 3Gal $\alpha$ 4GlcNAc respectivamente (Hokke, *et al.* 1996; Baisch, *et al.* 1998).

Las condiciones de reacción fueron 50 mM HEPES pH 7, 50 mM KCl, 13 mM MnCl<sub>2</sub>, 0.13 mg·mL<sup>-1</sup> BSA, 30°C. El seguimiento de la reacción es discontinuo, tomando alícuotas de 20  $\mu$ l de la reacción a diferentes intervalos de tiempo, se añade el patrón interno ANTS y se para la actividad enzimática por calentamiento a 98°C durante 30s. Con este tratamiento térmico se inactiva el enzima (actividad residual no detectable) y el UDP-Gal no experimenta hidrólisis espontánea (verificado sobre patrones). Las muestras así preparadas se analizaron por HPCE obteniéndose electroferogramas como el mostrado en la figura 3.6 donde sustrato y producto de reacción se identifican por su tiempo de migración referido a patrones (figura 3.3).



**Figura 3.6.** Electroferograma de una muestra de reacción enzimática de la  $\alpha$ -1,3-galactosiltransferasa.

Durante la monitorización de la reacción, la suma de áreas de las señales correspondientes al UDP y UDP-Gal (que tienen un factor de respuesta similar (95%) figura 3.5C)) se mantiene constante (figura 3.7), con un coeficiente de variación cercano al 1%, lo que indica que no se produce ninguna reacción secundaria.



**Figura 3.7.** Curva de progreso de la reacción de la  $\alpha$ -1,3-galactosiltransferasa a pH 7 y 30°C. Áreas de los picos en los electroferogramas para el UDP (●), UDP-Gal (■) y suma de áreas (UDP-Gal + UDP) (▲).

En la monitorización de la cinética enzimática, los cálculos para la determinación de la concentración de producto formado (UDP) en cada intervalo de tiempo se pueden realizar de dos maneras:

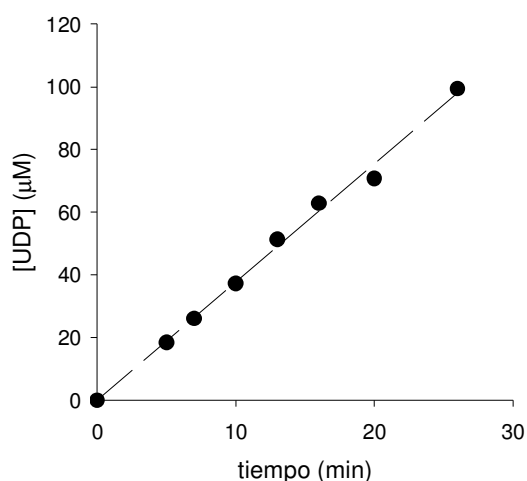
(1) Por normalización interna, que consiste en el cociente del área del pico del producto (UDP) por la suma total de áreas de producto + sustrato (UDP-UDP-Gal):

$$[\text{UDP}]_t = [\text{UDP} - \text{Gal}]_0 \times \left( \frac{\text{Area UDP}}{\text{Area UDP} + \text{Area UDP - Gal}} \right) \quad (1)$$

donde  $[\text{UDP-Gal}]_0$  es la concentración inicial de UDP-Gal utilizada en la reacción.

(2) Por interpolación directa del área de producto en la recta patrón de UDP (Figura 3.5). Ambos métodos proporcionan resultados similares con variaciones inferiores al 0,5%. Como el área del patrón interno (ANTS) se mantiene constante en las diferentes muestras del curso de reacción ( $\text{CV} < 0.2\%$ ), se utiliza el primer método de normalización interna para el cálculo de la concentración de producto en función del tiempo de reacción.

La velocidad inicial de reacción enzimática se define como aquella en la cual la formación de producto no supera el 10% de rendimiento. Así, se determinó la velocidad inicial de la  $\alpha$ -1,3-galactosiltransferasa a concentraciones altas (saturación) de sus sustratos UDP (1 mM) y lactosa (10 mM) (figura 3.8, tabla 3.3). Estos valores de concentración fueron establecidos como niveles de saturación en experimentos radiométricos (ver capítulos 4 y 5).



**Figura 3.8.** Velocidad inicial para la reacción de la  $\alpha$ -1,3-galactosiltransferasa en condiciones de saturación de sustratos.  $V_0 = 3.76 \text{ mM} \cdot \text{min}^{-1}$ .

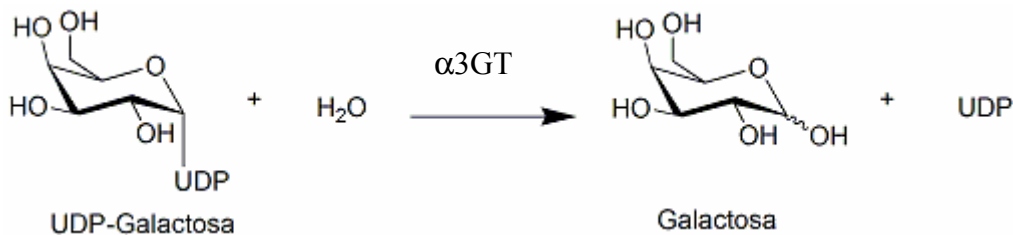
La actividad enzimática específica (cociente de la velocidad inicial por la concentración de enzima en la reacción) obtenida mediante el método de HPCE para  $\alpha$ -1,3-galactosiltransferasa fue  $1.46\text{s}^{-1}$ . Este valor es consistente con valores de velocidad máxima obtenidos en condiciones de saturación de sustratos mediante el método radiométrico, más sensible, que rindió  $1.62\text{s}^{-1}$  (ver capítulo 5).

**Tabla 3.3.** Monitorización de la velocidad inicial de reacción de la  $\alpha$ -1,3-galactosiltransferasa.

<i>t</i> (min)	ANTS (mAU)	UDP (mAU)	UDP-Gal (mAU)	*UDP (mAU corregido)	*UDP-Gal (mAU Corregido)	Suma de áreas corregidas	[UDP] ( $\mu\text{M}$ )	R (%)
5	18,530	7,923	256,844	0,428	13,861	14,288	29,926	2,993
7	13,359	7,377	222,156	0,552	16,629	17,181	32,137	3,214
10	13,748	10,083	211,729	0,733	15,401	16,134	45,458	4,546
13	13,211	12,701	214,365	0,961	16,226	17,187	55,933	5,593
16	14,140	16,239	201,628	1,148	14,260	15,408	74,535	7,453
20	16,847	21,526	203,731	1,278	12,093	13,371	95,562	9,556
26	12,491	21,762	198,273	1,742	15,873	17,615	98,902	9,890

\* Las áreas corregidas se obtuvieron dividiendo el área observada por el área del patrón interno (ANTS). [UDP] fue obtenido con la ecuación (1). R es el rendimiento de la reacción.

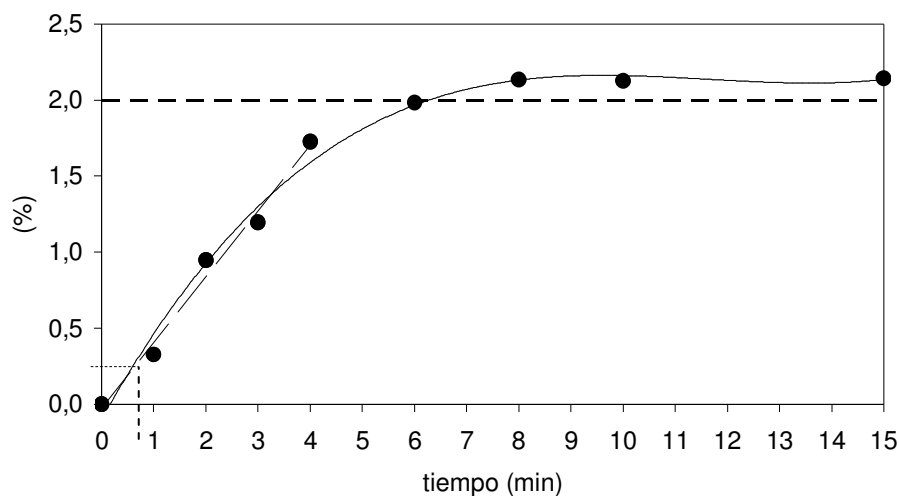
El método de HPCE sin derivatizar azúcares es rápido y directo. Las alícuotas tomadas en cada intervalo de tiempo, únicamente se someten a temperatura para parar la reacción enzimática, y no se requiere ningún otro tratamiento químico para su análisis, son directamente inyectadas al equipo de HPCE. Sin embargo, no se cuantifica el producto principal, que es el trisacárido  $\text{Gal}\alpha_3\text{Gal}\beta_4\text{Glc}$ , sino el secundario (UDP). El UDP puede ser producido también, por una reacción paralela o por hidrólisis térmica del UDP-Gal el momento de parar la reacción calentando, de modo que el UDP cuantificado no es exactamente el involucrado en la reacción de síntesis del trisacárido.



**Figura 3.9.** Hidrólisis del UDP-Gal catalizada por la  $\alpha$ -1,3-galactosiltransferasa ( $\alpha$ 3GT).

La hidrólisis del UDP-Gal (figura 3.9) catalizada por la  $\alpha$ -1,3-galactosiltransferasa es una actividad residual. Zhang et. al (2001) determinaron que la  $K_{cat}$  para ésta hidrólisis representa el 0.25% de la reacción principal, de transglucosidación, valor consistente con el obtenido en nuestro laboratorio por método radiométrico (~1%) (Monegal, 2004). Estos valores son prácticamente insignificantes, pero deben tomarse en cuenta en la monitorización de la transglucosilación por cuantificación de UDP.

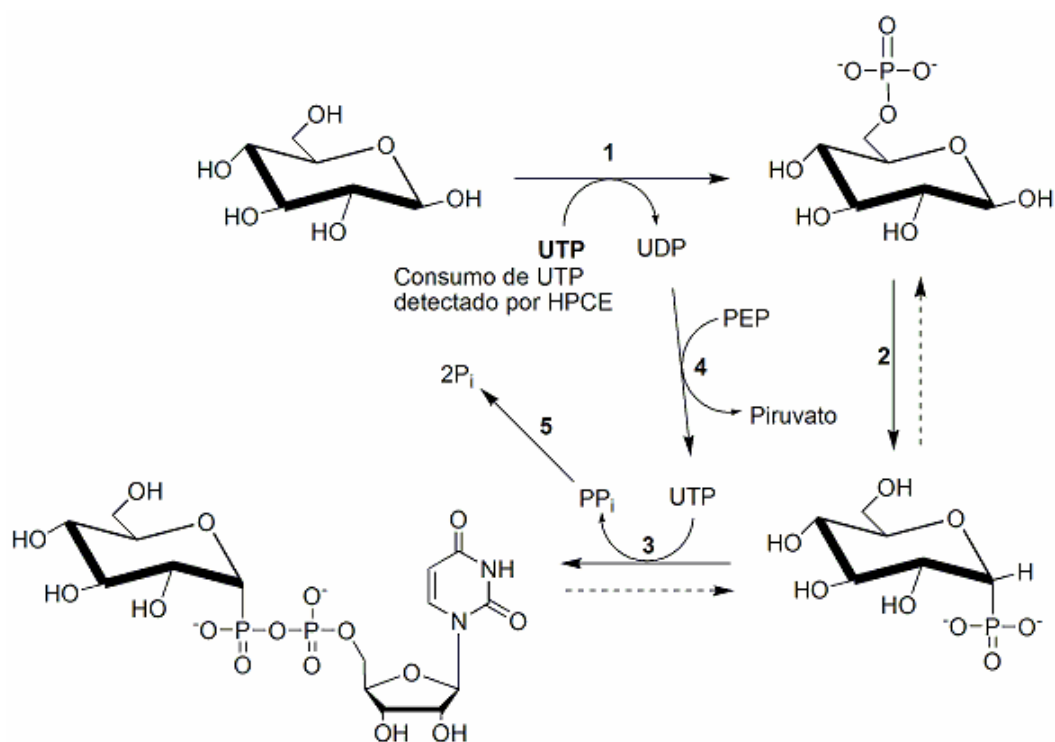
Para detener la reacción enzimática se empleó temperatura a 98°C por 30 segundos. Se ha seleccionado esta manera de parar la actividad enzimática y no la utilización de ácidos, bases o sales, ya que estos iones podrían influir en las condiciones de electroforesis capilar establecidas. Se ha observado que los tiempos de retención de los azúcar nucleótidos así como su resolución respecto del UDP pueden alterarse con cambios de pH o de la fuerza iónica del medio. La  $\alpha$ -1,3-galactosiltransferasa pierde actividad al ser calentada a 98°C por 30 segundos, posteriormente no recupera al enfriarse a temperatura de HPCE (30°C). El UDP-Gal hidrolizado a UDP y galactosa, a 98°C por 30 segundos representa únicamente cerca del 0.25% de rendimiento, según se determinó mediante ensayos radiactivos (figura 3.9) (capítulo 4). Entre los 6 y 7 minutos de calentamiento, el rendimiento de UDP se estabiliza en un máximo de 2%.



**Figura 3.10.** Curva de progreso de la hidrólisis térmica de UDP-Gal. Rendimiento de la producción de UDP (%) a 98°C durante 15 minutos.

Tal como ya se ha explicado en los párrafos anteriores, tanto la hidrólisis enzimática ( $\alpha$ 3GT) como la térmica del UDP-Gal a UDP dan valores muy bajos. Por tanto, podrían considerarse despreciables y poco influyentes en la monitorización de la actividad glicosiltransferasa por HPCE sin derivatización.

Aparte de la rapidez y sencillez de éste método, otra ventaja es que permite evaluar la especificidad enzimática por cualquiera de los posibles sustratos donadores donadores que se muestran en la figura 2 de la introducción. Así por ejemplo, se evaluó si la  $\alpha$ -1,3-galactosiltransferasa podía utilizar como sustratos, también, UDP-Glc y UDP-NacGal. Por HPCE no se detectó la formación de UDP, por tanto, estos azúcares nucleótidos no son sustratos para la  $\alpha$ -1,3-galactosiltransferasa. Este método, también se está empleando en nuestro laboratorio para determinar actividades glicosiltransferasa en extractos bacterianos y para el seguimiento de síntesis quimioenzimática de azúcar nucleótidos, tal como el UDP-Gal (figura 3.11). En éste último caso, el método permite monitorizar la formación de UDP-Gal.



**Figura 3.11.** Síntesis enzimática de UDP-Glc monitorizada por HPCE. Se detecta el consumo del UTP en la reacción de la

## CONCLUSIÓN

Se ha desarrollado un nuevo método de HPCE sin derivatización ni ningún otro tipo de marcaje, y validado para la cuantificación de UDP y azúcar nucleótidos en un intervalo de concentración de 10 a 250  $\mu\text{M}$ . El método ha sido aplicado a la monitorización de la actividad de la  $\alpha$ -1,3-galactosiltransferasa. La ventaja de éste método sobre el método radiométrico es que no se requiere manipular compuestos radiomarcados. En comparación con otros métodos de HPCE descritos para glicosiltransferasas no requiere reacciones de derivatización de sustratos y/o productos, lo cual tiene las siguientes ventajas: (1) se evita la síntesis preparativa y purificación de sustratos aceptores marcados, (2) la reacción enzimática se lleva a cabo en condiciones normales sin interferencia de

marcas añadidas en sustratos aceptores, (3) se evita las etapas de liofilización - derivatización – liofilización posteriores a la reacción enzimática. Por otra parte, este método se está empleando en nuestro laboratorio para determinar actividad de glicosiltransferasas a partir de extractos crudos, lo cual constituye una ventaja sobre los métodos espectrofotométricos basados en ensayos acoplados (consumo de NADH acoplado a la formación de UDP mediante los enzimas piruvato quinasa y lactato deshidrogenasa) (Palcic y Supino, 2001) en los que otros componentes celulares interfieren. Este método simple, rápido y directo, no solamente es aplicable a la determinación y caracterización de glicosiltransferasas, sino también para la monitorización de síntesis enzimática de azúcar nucleótidos.



# CAPÍTULO 4

---

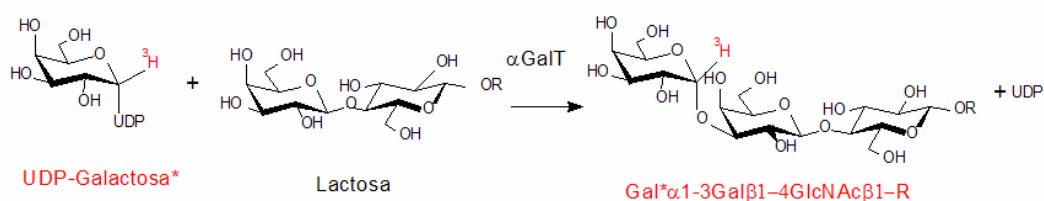
---

**VALIDACIÓN DE ENSAYO  
RADIOMÉTRICO PARA  
ESTUDIOS CINÉTICOS DE LA  
 $\alpha$ -1,3-GALACTOSILTRANSFERASA**

## VALIDACIÓN DE ENSAYO RADIOMÉTRICO PARA ESTUDIOS CINÉTICOS DE LA $\alpha$ -1,3-GALACTOSILTRANSFERASA

### Introducción

A pesar de que existen una variedad de ensayos para estudiar cinéticamente las glicosiltransferasas, tal como se ha mencionado en el capítulo 3, los más sensibles son los radiactivos. Muchas glicosiltransferasas tienen constantes cinéticas que deben ser determinadas a muy bajas concentraciones de sustratos o de productos, por lo que los métodos analíticos deben tener límites de detección y cuantificación lo suficientemente sensibles. Este es el caso de la  $\alpha$ -1,3-galactosiltransferasa, que por ejemplo tiene una  $K_M$  inferior a  $12\mu\text{M}$  para el donador UDP-Gal. Además, para la obtención de velocidades iniciales considerando grados de conversión inferiores al 10% de rendimiento, se requieren análisis de concentraciones que pueden llegar a ser, incluso, inferiores a  $1\mu\text{M}$  para el sustrato donador.



**Figura. 4.1.** Reacción catalizada por la  $\alpha$ 3GT utilizando el dador marcado con tritio ( $^3\text{H}$ ).

**Tabla 4.1.** Actividades enzimáticas para la  $\alpha$ 3GT y mutantes, determinadas por ensayo radiométrico desarrollado en nuestro grupo (Monegal et al. 2005).

	$[E]$ ( $\mu$ M)	$V_0/[E]$ ( $s^{-1}$ )	% actividad
WT		0,90	100,0%
H315A	0,12	0,13	14,9%
A282G	2,02	$3,77 \cdot 10^{-4}$ *	0,042%
D316A	1,87	$3,63 \cdot 10^{-4}$	0,040%
E317A	1,24	$1,86 \cdot 10^{-5}$	0,002%
D225A	0,65	$<7,04 \cdot 10^{-6}$	$< 0,0008\%$

Los análisis radiométricos han sido ampliamente utilizados en estudios cinéticos de la  $\alpha$ 3GT (Chen et. al. 2000; Zhang et al. 2001 y Shah et al. 2000). Además de la alta sensibilidad, otra ventaja es la disponibilidad comercial de todos los azúcares nucleótidos (figura 2 de la introducción) marcados radioisotópicamente en el azúcar. Básicamente, el ensayo consiste en incubar la mezcla de reacción enzimática conteniendo al sustrato marcado, parar la reacción, tomar una alícuota, separar el exceso de sustrato marcado y cuantificar la radiactividad procedente del producto que ha incorporado la marca (figura 4.1). La separación del exceso de donador marcado se realiza por cromatografía de intercambio aniónico, aprovechando las cargas negativas conferidas por los fosfatos del azúcar nucleótido.

En nuestro grupo ha sido desarrollado un método de ensayo radiactivo (Monegal et al. 2005) para caracterizar la actividad cinética de la  $\alpha$ 3GT y determinar la actividad de algunos mutantes del sitio activo (tabla 4.1). Sin embargo, cambios en la instalación radiactiva, y una notable disminución de la relación señal/ruido han requerido de un necesario ajuste de las condiciones y consiguientemente una nueva validación para poder caracterizar cinéticamente la  $\alpha$ 3GT *wt* y la serie de mutantes de alanina del extremo C-terminal (358-366) (capítulo 2).

## Resultados y Discusiones

El estudio de la reacción de la  $\alpha$ 3GT implica una mezcla relativamente compleja. El sustrato donador UDP-Gal es el que lleva la marca radiactiva en forma de tritio en el carbono anomérico de la galactosa (1-<sup>3</sup>H-galactosa), y como sustrato aceptor se utilizó lactosa. El enzima requiere el cofactor metálico Mn<sup>2</sup> que en la mezcla de reacción está presente como MnCl<sub>2</sub>. Además, se utilizó albúmina sérica bovina como agente estabilizante (tabla 1). Las reacciones se llevaron a cabo a 30°C y a pH 7, conferido por el tampón HK (HEPES-KCl) (Tabla 4.2).

**Tabla 4.2.** Condiciones para el estudio cinético de la  $\alpha$ 3GT.

Lactosa	10	mM
UDP-(1- <sup>3</sup> H-galactosa)	50	uM
MnCl <sub>2</sub>	13	mM
BSA	0,13	mg/ml
tampón HK	1	X
pH	7	
T°	30	°C
Volumen Total	90	ul
Temperatura	30	°C
pH	7	

El seguimiento del progreso de la actividad  $\alpha$ 3GT es discontinuo. Se toman alícuotas de 20 $\mu$ l en diferentes intervalos de tiempo. En cada alícuota se para la reacción secuestrando el cofactor enzimático, Mn<sup>+2</sup>, con 100 $\mu$ l de EDTA 0.1M, y se procede con la cuantificación del producto formado, 1-<sup>3</sup>H-galactosa $\alpha$ 1,3lactosa.

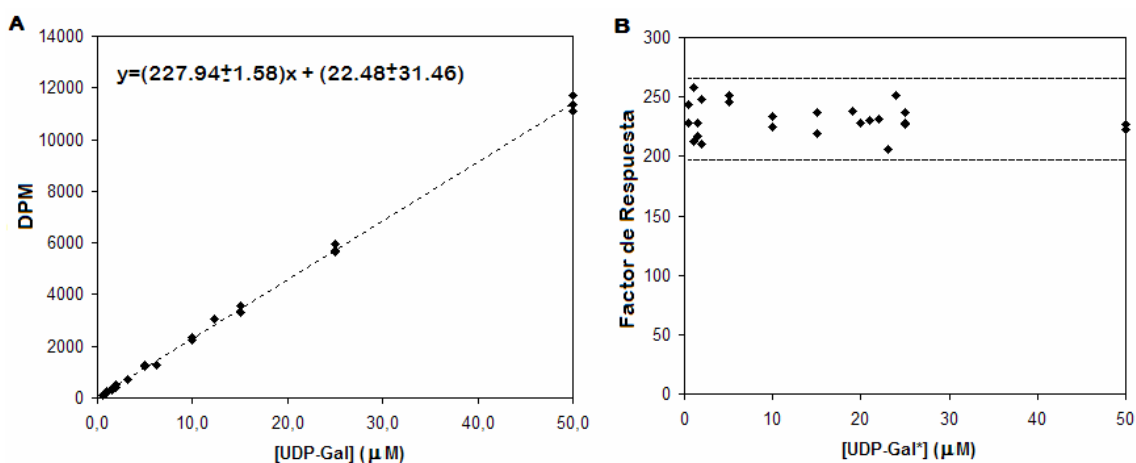
La 1-<sup>3</sup>H-galactosa $\alpha$ 1,3lactosa se cuantifica por contaje radiactivo con detector de centelleo líquido. El exceso de sustrato UDP-1-<sup>3</sup>H-galactosa se separa por cromatografía de intercambio aniónico con resina Dowex Cl-. El producto se eluye con agua sobre un vial conteniendo líquido de centelleo. La cuantificación se realiza por interpolación del número de

desintegraciones por minuto (DPMs) en una recta patrón elaborada con diferentes concentraciones de UDP-1-<sup>3</sup>H-galactosa.

#### *Actividad específica del sustrato radiactivo*

Se trabajó con actividad específica de 9.1 mCi/mmol (UDP-Gal\*/1000UDP-Gal; \* denota radiactivo) según el método desarrollado (Monegal y Planas, 2005). Esta actividad ha dado una relación señal/ruido 12430/22 (en DPMs) para 50μM de UDP-Gal\*. Este amplio margen es adecuado para los análisis requeridos para los estudios cinéticos de la α3GT y sus mutantes.

Algunos cambios introducidos en esta etapa del método han sido el tiempo de contaje, que de 2 ha pasado ser de 3 minutos. Por otra parte, se ha sustituido el líquido de centelleo *Wallac WinSpectral™* por el biodegradable *EcoLite*, cambios establecidos según protocolos generales de la nueva instalación radiactiva.



**Figura 4.2.** (A) Recta patrón y (B) intervalo de linealidad obtenido a partir del factor de respuesta para diferentes concentraciones de UDP-Gal\*.

**Tabla 4.3.** Repetibilidad evaluada a partir del coeficiente de variabilidad (C.V %) de variaciones de la señal en DPMs.

<i>UDP-Gal* (uM)</i>	<b>0,5</b>	<b>25</b>	<b>50</b>
Promedio	118,33	5768,33	11383,00
Desv. Est.	4,04	144,93	291,44
C.V (%)	3,42	2,51	2,56

### *Validación del método*

#### *Linealidad*

Se preparó una dilución stock de UDP-Gal\* 50µM con un ratio radiactivo /no radiactivo de 1:1000, a partir de la cual se realizaron diluciones (0.4, 0.5, 0.8, 1.5, 3.0, 6.0, 10, 12, 15, 25 y 50µM) para obtener el intervalo de linealidad y recta patrón. Éstas diluciones se prepararon por triplicado en diferentes experimentos, y de cada una se tomaron alícuotas de 20µl, que se añadieron a 4ml de líquido de centello. El margen de linealidad obtenido fue de 0.5 a 50µM (figura 4.2).

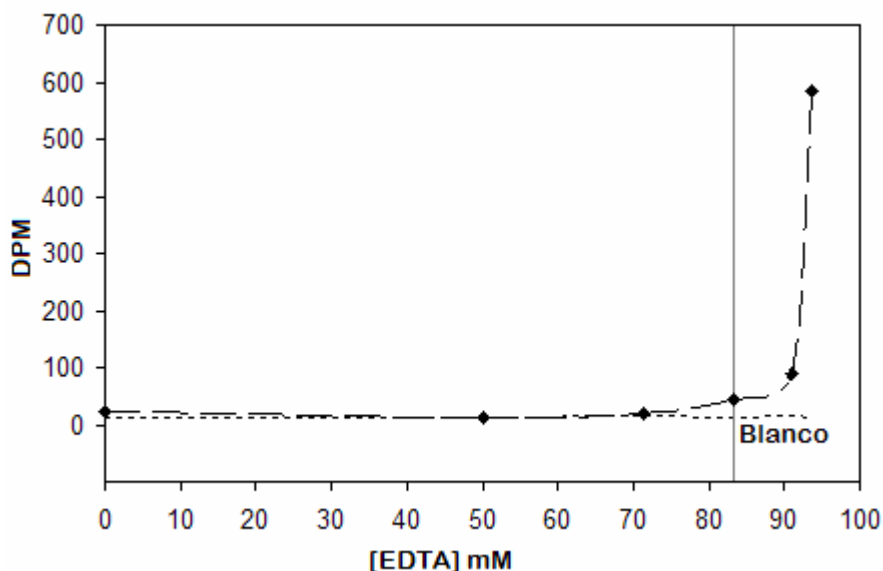
#### *Repetibilidad*

La repetibilidad se evaluó para tres concentraciones de UDP-Gal\* dentro del margen de linealidad. Se evaluaron resultados de tres experimentos diferentes para una concentración mínima (0.5µM), media (25µM) y máxima (50µM). Los coeficientes de variación obtenidos fueron 3,42%, 2,51% y 2,56% respectivamente (tabla 4.3). Estos valores podrían considerarse altos si provinieran de un mismo experimento, pero dado que provienen de diferentes experimentos, son aceptables y además expresan su reproducibilidad.

#### *Límites de detección y cuantificación*

El límite de detección definido como 3 veces la señal del ruido y el de cuantificación como 10 veces la señal del ruido, fueron calculados a partir del

promedio de 4 blancos de agua. El promedio dio 22.3, siendo por tanto, los límites de detección y cuantificación de  $0.19\mu\text{M}$  y  $0.28\mu\text{M}$  respectivamente.

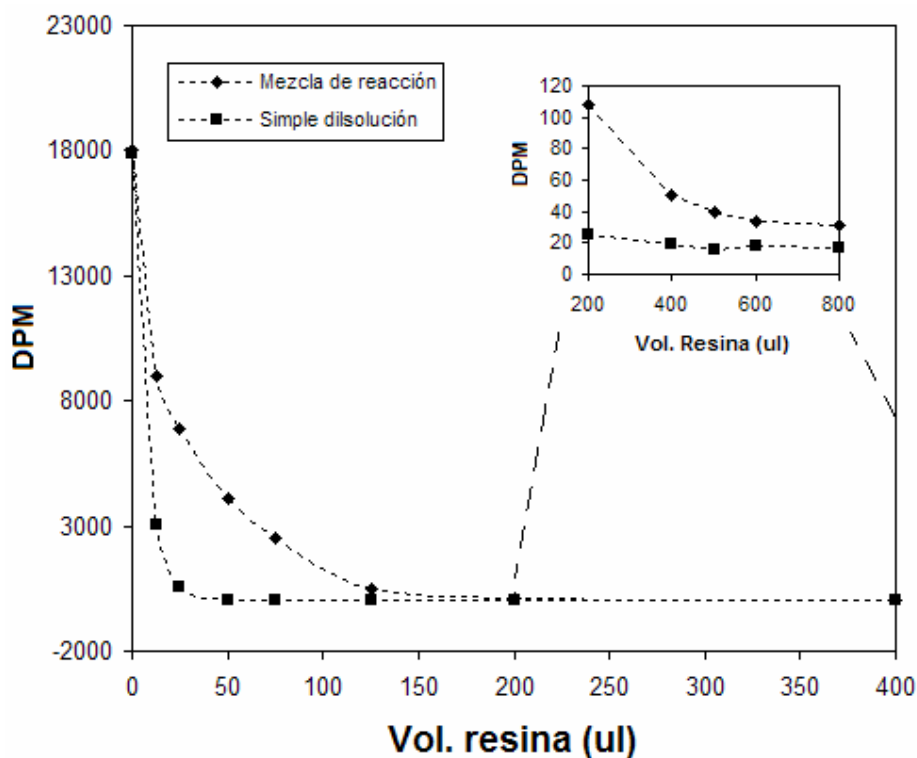


**Figura 4.3.** Señales obtenidas para diferentes muestras de UDP-Gal\* en mezcla de reacción con adición de diferentes concentraciones de EDTA. 83.33mM corresponden a la adición de 100 $\mu\text{l}$  de EDTA a 20 $\mu\text{l}$  de muestra. Nótese que a esta concentración, columnas con 400 $\mu\text{l}$  de resina no retienen la totalidad del exceso de UDP-Gal\*. Por ello se ha incrementado la cantidad de resina a 600 $\mu\text{l}$  (ver figura 4.4.).

#### *Preparación de muestras y cromatografía de intercambio aniónico*

Las alícuotas tomadas de las reacciones contienen el producto formado marcado y el exceso de sustrato, también marcado. Por tanto, para realizar el seguimiento de la reacción enzimática, se separa el exceso de UDP-Gal\* que no ha reaccionado, reteniéndolo en la resina de intercambio aniónico. El procedimiento comprende las etapas de (1) empaquetamiento de la resina, (2) acondicionamiento de la columna, (3) carga de la muestra y (4) elución.

La retención del UDP-Gal\* se ve notablemente afectada cuando se encuentra en la mezcla de reacción respecto a encontrarse en simple disolución acuosa (figura 4.3). Los otros iones presentes en la mezcla de reacción compiten con el UDP-Gal\*, disminuyendo su retención, especialmente el EDTA (figura 4.4) añadido para detener la reacción enzimática. Consiguientemente, para éstas condiciones, se ha determinado que la cantidad de resina adecuada para retener el exceso de UDP-Gal\* es de 600 $\mu$ l (corresponde a 2400 $\mu$ l de suspensión) (figura 4.4).



**Figura 4.4.** Señales obtenidas para muestras de UPD-Gal\* 125 $\mu$ M en mezcla de reacción (tabla 4.2) y en disolución acuosa simple, filtradas a través de diferentes volúmenes de resina de intercambio aniónico.

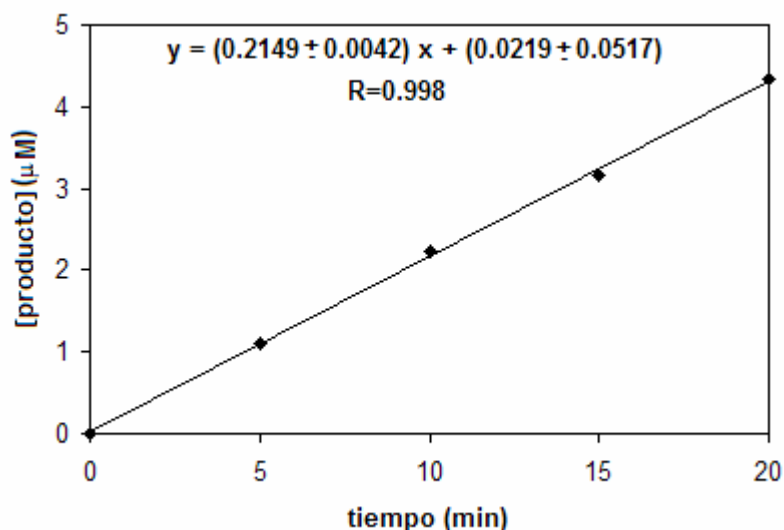
El empaquetamiento se realizó a partir de una suspensión de 10g de resina DOWEX 1x8 en 40ml de agua *milli Q*. En una columna de 1ml se introdujo como soporte fibra de vidrio y a continuación se empaquetaron diferentes



volúmenes de resina (figura 4.4) hasta determinar la cantidad adecuada para retener el exceso de UDP-Gal\* en mezcla de reacción sin enzima (tabla 4.2). Las columnas empaquetadas se acondicionaron con 1000µl de agua *milli Q*. Se cargaron 120µl de cada muestra (100µl corresponden al EDTA añadido) y se eluyó con volúmenes de 200+300+400 µl de agua *milli Q*, sobre viales con líquido de centelleo, para luego realizar el contaje radiactivo.

#### *Seguimiento de la reacción enzimática*

La reacción se inicia con la adición del enzima ( $\alpha$ 3GT) a la mezcla previamente preparada (tabla 4.2). En intervalos de 4 o 5 minutos se tomaron alícuotas de 20µl, a las que se añadió 100µl de EDTA (100mM) frío (en hielo) para parar la reacción. Cada una de estas muestras se llevó a cromatografía de intercambio aniónico, tal como se explicó en el apartado anterior, a continuación se realizó el contaje radiactivo del producto eluido. La concentración de producto para cada intervalo de tiempo se calculó a partir de la curva patrón (figura 4.2).

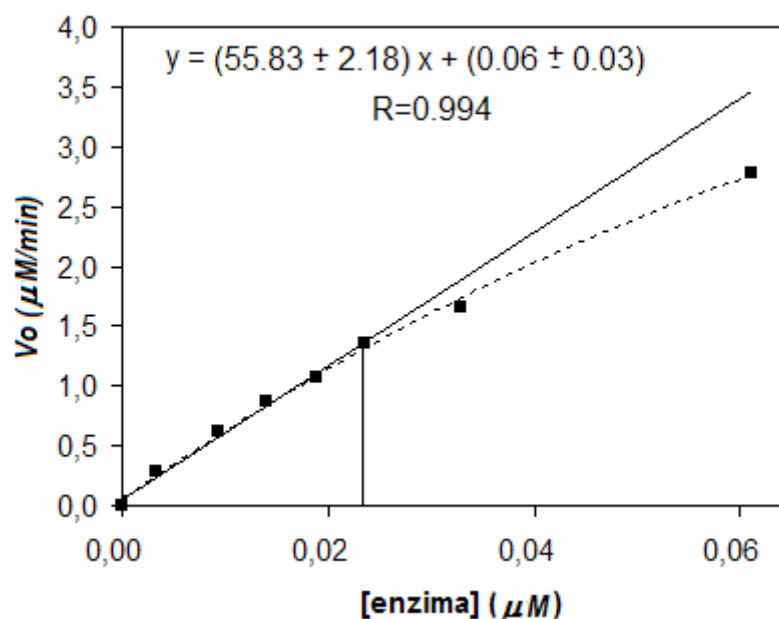


**Figura 4.5.** Velocidad inicial obtenida para la  $\alpha$ 3GT/wt.

**Tabla 4.2.** Datos obtenidos para el seguimiento de la velocidad inicial de la  $\alpha$ 3GT/wt

Tiempo (min)	DPM-Blanco	[producto] ( $\mu$ M)	Rendimiento (%)
0	0	0,000	0,000
5	253	1,110	2,220
10	510	2,237	4,475
15	720	3,159	6,317
20	991	4,348	8,695

La velocidad inicial a dado  $0.2149 \pm 0.0042 \mu\text{M}/\text{min}$  (ver figura 4.5) y la actividad específica correspondiente  $1.053 \pm 0.021 \text{ s}^{-1}$ .



**Figura 4.6.** Recta patrón enzimática. El intervalo de linealidad va de 0 a  $0.24 \mu\text{M}$  de enzima  $\alpha$ 3GT.

Las velocidades iniciales se calcularon tomando en cuenta la definición de que, velocidad inicial ( $v_o$ ) es aquella alcanzada hasta la formación del 10% de producto (tabla 4.4, figura 4.5). La actividad específica ( $v_o/[E]$ ) se obtuvo como el cociente de la velocidad inicial por la concentración de enzima.

La actividad específica obtenida para *wt* en este trabajo ( $1.053 \pm 0.021 \text{ s}^{-1}$ ) es ligeramente superior a la obtenida anteriormente ( $0.90 \text{ s}^{-1}$ ) en nuestro laboratorio (ver tabla 4.1). La  $\alpha$ 3GT pierde actividad con el tiempo, y en el

presente trabajo se ha utilizado proteína inmediatamente después de purificarse, lo cual podría explicar la mayor actividad registrada.

#### *Curva patrón enzimática*

En condiciones de reacción estándar (tabla 4.2) se obtuvieron velocidades iniciales para diferentes concentraciones de  $\alpha$ 3GT. La curva de la concentración de enzima en función de la velocidad inicial (figura 4.6) ha dado un intervalo de linealidad que va de 0 a 0.024 $\mu$ M de enzima. Dentro de este margen se utilizaron concentraciones de  $\alpha$ 3GT para diferentes estudios cinéticos. Además, la curva patrón permite determinar la concentración de enzima en una muestra, a partir de la velocidad inicial obtenida.

#### **CONCLUSION**

Se ha validado un ensayo radiométrico para cuantificar UDP-Gal y el producto de transglicosilación de la  $\alpha$ 3GT en un rango de 0,28 a 50  $\mu$ M. Este método es altamente sensible en comparación con otros tales como los de electroforesis capilar o espectrofotométricos, lo cual permite caracterizar cinéticamente glicosiltransferasas con parámetros cinéticos de difícil cuantificación con otros métodos, tal es el caso de la  $\alpha$ 3GT. El método ha sido aplicado a la monitorización de la actividad de la  $\alpha$ 3GT y se ha establecido un margen de linealidad de actividad para la  $\alpha$ 3GT que va de 0 a 0.024 $\mu$ M de enzima.

# CAPÍTULO 5

---

---

**CARACTERIZACIÓN CINÉTICA  
DE MUTANTES DEL  
EXTREMO C-TERMINAL DE LA  
 $\alpha$ -1,3-GALACTOSILTRANSFERASA**

## CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DE MUTANTES DEL EXTREMO C-TERMINAL DE LA $\alpha$ -1,3-GALACTOSILTRANSFERASA

### Introducción

Los estudios cinéticos son fundamentales para la elucidación de los mecanismos de reacción de enzimas, y muchos han sido realizados para diferentes glicosiltransferasas. A pesar de ello, aun no se conocen bien sus mecanismos catalíticos. Además, los parámetros cinéticos encontrados en la bibliografía pueden llegar a diferir ampliamente para el mismo enzima, lo cual demuestra la complejidad de caracterizar cinéticamente esta familia de enzimas.

Las glicosiltransferasas son enzimas bisustrato. Las reacciones bisustrato constituyen aproximadamente el 60% de las reacciones bioquímicas conocidas y casi todas consisten en la transferencia de un grupo funcional. Según el modelo cinético se clasifican en tres tipos: (1) Reacciones secuenciales al azar o tipo random, (2) reacciones secuenciales ordenadas y (3) reacciones pong pong (Segel, 1993).

### *Reacciones bisustrato*

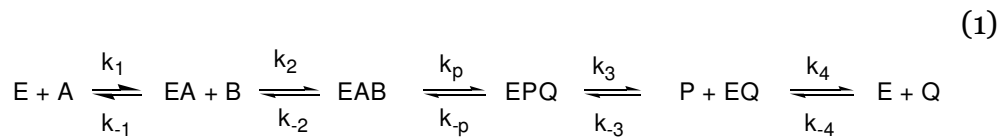
En las reacciones *secuenciales*, ya sean ordenadas o al azar, los sustratos se combinan con el enzima antes de que la reacción tenga lugar y se liberan los productos. Mientras que en las reacciones *ping pong*, se libera uno o más productos, antes de que se hayan incorporado todos los sustratos (tabla 5.1).

**Tabla 5.1.** Resumen de las reacciones enzimáticas bisustrato (Segel, 1993).

<b>Reacciones secuenciales al azar</b>	
<p>Los sustratos A y B se unen al enzima aleatoriamente, el primero en unirse cambia la constante de disociación del segundo por un factor <math>\alpha</math>. De igual manera los productos P y Q podrían liberarse al azar y el primero de ellos cambiaría la constante de disociación del segundo por un factor <math>\beta</math>.</p>	<p><b>Ecuación del sistema</b></p> $\frac{v}{V_{\max}} = \frac{[A][B]}{\alpha K_A K_B + \alpha K_A [B] + \alpha K_B [A] + [A][B]}$ <p><b>Dependencia del sustrato A</b></p> $\frac{v}{V_{\max}} = \frac{[A]}{\alpha K_A \left(1 + \frac{K_B}{[B]}\right) + [A] \left(1 + \frac{\alpha K_B}{[B]}\right)}$ <p><b>Dependencia del sustrato B</b></p> $\frac{v}{V_{\max}} = \frac{[B]}{\alpha K_B \left(1 + \frac{K_A}{[A]}\right) + [B] \left(1 + \frac{\alpha K_A}{[A]}\right)}$
<b>Reacciones secuenciales ordenadas</b>	
<p>Los sustratos se combinan con el enzima en un orden obligado. Primero se une el <i>sustrato activador</i>, A, y posteriormente el <i>segundo sustrato</i>, B, y éste solamente puede unirse una vez formado el complejo EA.</p>	<p><b>Ecuación del sistema</b></p> $\frac{v}{V_{\max}} = \frac{[A][B]}{K_A K_B + K_B [A] + [A][B]}$ <p><b>Dependencia del sustrato A</b></p> $\frac{v}{V_{\max}} = \frac{[A]}{\left(K_A \frac{K_B}{[B]}\right) + [A] \left(1 + \frac{K_B}{[B]}\right)}$ <p><b>Dependencia del sustrato B</b></p> $\frac{v}{V_{\max}} = \frac{[B]}{K_B \left(1 + \frac{K_A}{[A]}\right) + [B]}$
<b>Reacciones ping pong</b>	
<p>Uno o más productos se liberan antes de que se hayan incorporado todos los sustratos. En una primera etapa (<i>ping</i>), un grupo funcional del primer sustrato A es desplazado del sustrato por el enzima E, dando lugar al primer producto P y una forma estable de el enzima F. En una segunda etapa (<i>pong</i>), la forma enzimática F une al segundo sustrato B, lo cual da lugar al segundo producto Q y regenerando la forma inicial de el enzima, E.</p>	<p><b>Ecuación del sistema</b></p> $\frac{v}{V_{\max}} = \frac{[A][B]}{K_B [A] + K_A [B] + [A][B]}$ <p><b>Dependencia del sustrato A</b></p> $\frac{v}{V_{\max}} = \frac{[A]}{K_A + [A] \left(1 + \frac{K_B}{[B]}\right)}$ <p><b>Dependencia del sustrato B</b></p> $\frac{v}{V_{\max}} = \frac{[B]}{K_B + [B] \left(1 + \frac{K_A}{[A]}\right)}$

*Estudios cinéticos para glicosiltransferasas*

Estudios cinéticos realizados para algunas glicosiltransferasas, permiten evidenciar que catalizan las reacciones según el modelo secuencial ordenado. Una aproximación más real de este modelo implica la constante de disociación del sustrato A,  $K_{iA}$ , y la correspondiente constante de Michaelis-Menten,  $K_{mA}$ . El equilibrio puede considerarse rápido siempre que  $K_{mA} \ll K_{iA}$ . De esta manera, el modelo secuencial en estado estacionario es el siguiente:



Con la respectiva ecuación:

$$\frac{v}{v_{\max}} = \frac{[A][B]}{K_{iA}K_M^B + K_M^B[A] + K_M^A[B] + [A][B]} \quad (2)$$

Donde  $K_{mA}$  y  $K_{mB}$  son las constantes de Michaelis-Mente para los sustratos A y B,  $K_{iA}$  corresponde a la constante de disociación del sustrato A ( $K_{iA} = k_{-1}/k_1$ ). En condiciones de velocidad inicial ( $[P]=[Q]=0$ ), las constantes son (Segel, 1993):

$$K_{m^A} = \frac{k_3k_4k_p}{k_1(k_3k_4 + k_3k_p + k_4k_p + k_4k_{-p})} \quad (3)$$

$$K_{m^B} = \frac{k_4(k_{-2}k_3 + k_{-2}k_{-p} + k_3k_p)}{k_2(k_3k_4 + k_3k_p + k_4k_p + k_4k_{-p})} \quad (4)$$

$$\frac{v_{\max}}{[E]_t} = \frac{k_3k_4k_p}{k_3k_4 + k_3k_p + k_4k_p + k_4k_{-p}} \quad (5)$$

Las glicosiltransferasas más estudiadas son la  $\alpha$ -1,4-galactosiltransferasa ( $\alpha$ 4GT) (Ly, et al. 2002, Persson, et al. 2002), las que sintetizan los epítomos antigénicos A y B de los grupos sanguíneos (GT-A y GT-B respectivamente) (Seto, et al. 1997; Seto, et al. 1999) y la  $\alpha$ 3GT (Zhang et al. 2001; Shah et al, 2000). Los parámetros cinéticos correspondientes se resumen en la tabla 5.2. En general, se puede establecer que unen más fuertemente al sustrato donador ( $K_m$  del orden micromolar) que al aceptor ( $K_m$  orden milimolar).

La bibliografía muestra diferencias importantes en los parámetros cinéticos de la  $\alpha$ 3GT (tabla 5.2). A pesar de que el método más utilizado es el radiactivo, las diferencias podrían deberse a factores experimentales, tales como el pH ya que por ejemplo Shah et al., 2000 utilizan tampón Tris 5mM a pH 7 y  $MnCl_2$  5mM, mientras que Zhang et al., 2001 utilizan tampón MES a pH 8 con  $MnCl_2$  10mM. En los dos trabajos citados se emplea una temperatura de 37°C, en cambio, Monegal y Planas, 2005 llevan a cabo las reacciones a 30°C, tampón HEPES/ $KCl_2$  pH 7, y  $MnCl_2$  10mM. También hay diferencias en el ajuste de los datos al modelo matemático, puesto que Shah et al., 2000 asignan el parámetro A al aceptor y B a donador, de manera inversa lo hacen los otros autores citados. A pesar de todo lo mencionado, los resultados dan una clara evidencia de que el modelo más adecuado es el secuencial.

Estudios termodinámicos mediante valoración microcalorimétrica isotérmica (ITC) han revelado que es necesario que se una primero el sustrato donador en presencia de  $Mn^{+2}$  a la  $\alpha$ 3GT, para que seguidamente se una el aceptor (Boix et. al. 2002). Estos resultados permiten asignar el mecanismo catalítico de la  $\alpha$ 3GT al modelo secuencial ordenado tipo bi-bi. Así, ha quedado demostrado que tanto el UDP-Gal como el UDP requieren de  $Mn^{+2}$  para unirse a la  $\alpha$ 3GT y que la lactosa no se une al enzima con tan solo la presencia de  $Mn^{+2}$ , sino que requiere de la unión previa de UDP-Gal o de UDP (Tabla 5.3).



**Tabla 5.2.** Parámetros cinéticos de algunas glicosiltransferasas.

Donador	Aceptor	Parámetros cinéticos				
<b>*<math>\alpha</math>3GT (Shah et. al. 2000)</b>		$K_{mB}$ ( $\mu$ M)	$K_{mA}$ (mM)	$K_{iB}$ ( $\mu$ M)	$K_{iA}$ (mM)	$k_{cat}$ ( $min^{-1}$ )
UDP-Gal	NAcLac	78	1.1	2.9	0.04	38
UDP-Gal	Lac	35	2.1	5.2	0.3	17
UDP-Gal	$\beta$ -O-metilgalactosa	15	37	9.4	23	9
UDP-Gal	Galactosa	53	1010	8.3	157	26
<b>*<math>\alpha</math>3GT (Zhan et. al. 2001)</b>		$K_A$ (mM)	$K_B$ (mM)	$K_{iA}$ (mM)	$K_{iA}$ (mM)	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )
UDP-Gal	Lac	0.43	19.9	0.14	6.5	6.4
UDP-Gal	NAcLac	0.52	19.0	0.09	3.3	3.8
UDP-Gal	$\beta$ -azido lactosa	0.28	2.3	0.25	2.05	4.9
<b>Hidrólisis</b>		$k_{cat} \times 10^3$ ( $s^{-1}$ )	$K_A$ (mM)	$k_{cat}/K_m$ ( $s^{-1} \cdot mM^{-1}$ )		
UDP-Gal	H <sub>2</sub> O	16 $\pm$ 1.4	0.103 $\pm$ 0.001	155 $\pm$ 13		
<b>*<math>\alpha</math>3GT (Monegal y Planas, 2005)</b>		$K_{mA}$ (mM)	$K_{mB}$ (mM)	$K_{iA}$ (mM)	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	
UDP-Gal	Lac	0.031 $\pm$ 0.005	1.24 $\pm$ 0.26	0.020 $\pm$ 0.014	2.00 $\pm$ 0.10	
<b>Parámetros aparentes</b>		$K_{mA}^{app}$ ( $\mu$ M)	$K_{mB}^{app}$ (mM)	$K_{cat-A}^{app}$	$K_{cat-B}^{app}$	
UDP-Gal	Lac	12.5 $\pm$ 1.4	1.55 $\pm$ 0.15	1.09 $\pm$ 0.03	1.16 $\pm$ 0.03	
<b>Hidrólisis</b>		$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$K_m$ (mM)	$k_{cat}/K_m$ ( $s^{-1} \cdot mM^{-1}$ )		
UDP-Gal	H <sub>2</sub> O	0.022 $\pm$ 0.001	12.17 $\pm$ 2.48	155 $\pm$ 13		
<b><math>\alpha</math>4GT (Persson et. al. 2002)</b>		$k_{catA}$ ( $s^{-1}$ )	$K_{mA}$ ( $\mu$ M)	$k_{catB}$ ( $s^{-1}$ )	$K_{mB}$ ( $\mu$ M)	
UDP-Gal	lactosa	14.2	18	24.0	20	
<b>GT-A (Seto et. al. 1997)</b>		$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$K_{mA}$ (mM)	$K_{iA}$ (mM)	$K_{mB}$ (mM)	$k_{cat}/K_{mA}$ (mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )
UDP-Gal	Fuc $\alpha$ (1-2)Gal $\beta$ -O-(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CH <sub>3</sub> .	0.02	0.023	0.023	0.006	0.87
UDP-GalNAc	Fuc $\alpha$ (1-2)Gal $\beta$ -O-(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CH <sub>3</sub> .	4.9	0.015	0.005	0.013	330
<b>GT-B (Seto et. al. 1997)</b>		$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$K_{mA}$ (mM)	$K_{iA}$ (mM)	$K_{mB}$ (mM)	$k_{cat}/K_{mA}$ (mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )
UDP-Gal	Fuc $\alpha$ (1-2)Gal $\beta$ -O-(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CH <sub>3</sub> .	6.5	0.054	0.027	0.034	120
UDP-GalNA	Fuc $\alpha$ (1-2)Gal $\beta$ -O-(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CH <sub>3</sub> .	0.3	0.281	0.122	0.285	1.1

\* Los parámetros cinéticos fueron obtenidos por análisis multivariante a diferentes concentraciones de aceptor como de dador, uno respecto del otro y viceversa; y también a concentraciones saturadas de aceptor y dador (parámetros aparentes). La  $\alpha$ 3GT analizada corresponde a la forma *wt* aa: 80-368.

### Estudios cinéticos para mutantes de la $\alpha$ -1,3-glicosiltransferasa

Una serie de mutantes de aminoácidos del sitio activo fueron estudiados cinéticamente con el propósito de determinar sus posibles interacciones con los ligandos y funciones en el mecanismo catalítico. En la tabla 5.4. se resumen los resultados de Zhang et al., 2001, Boix et al., 2001 y Zhang et.

at., 2003, para los mutantes Q247E, H280Q, E317Q, R365K y V226A, tanto en análisis cinéticos de transglicosidación como hidrólisis.

**Tabla 5.3.** Parámetros termodinámicos para la unión de sustratos e inhibidores de la  $\alpha$ -1,3-galactosiltransferasa bovina (Boix et al., 2002).

Sustratos	Otros ligandos	$K_d$ (mM)	$\Delta G$ (kcal/mol)	$\Delta H$ (kcal/mol)	$-T \Delta S$ (kcal/mol)
UDP (2mM)	Mn <sup>2+</sup> (2mM)	0.053 ± 0.004	-5.93 ± 0.01	-17.40 ± 0.14	+ 11.50 ± 0.14
UDP (2mM)		n.d.			
UDP-Glc (5mM)	Mn <sup>2+</sup> (2mM)	0.258 ± 0.008	-4.96 ± 0.04	-8.38 ± 0.16	+ 3.42 ± 0.20
UDP-Gal (5mM)	Mn <sup>2+</sup> (2mM)	0.060 ± 0.002	-5.86 ± 0.01	-13.81 ± 0.22	+ 7.95 ± 0.22
Lac (100mM)	Mn <sup>2+</sup> (2mM)	n.d.			
Lac (100mM)	UDP 2mM + Mn <sup>2+</sup> (2mM)	2.68 ± 0.06	-3.57 ± 0.02	-9.47 ± 0.13	+ 5.88 ± 0.13
LacNAc (10mM)	UDP 2mM + Mn <sup>2+</sup> (2mM)	0.580 ± 0.013	-4.49 ± 0.01	-11.25 ± 0.15	+ 6.76 ± 0.15

n.d. no detectado

El aminoácido que más atención ha recibido es el glutamato 317, que desde un principio fue postulado como nucleófilo esencial, en un mecanismo en dos etapas análogo a glicosidasas (Gastinel et. al. 2001). La  $k_{cat}$  de transglicosidación para el mutante E317Q es 2400 veces menor que para *wt*, mientras que la  $K_m$  para la lactosa se incrementa a 10 veces (Zhang et. al. 2003). En estudios más recientes realizados en nuestro grupo, se encontró que el mutante E317A presenta una actividad de 0.002% respecto de *wt*. Además, mediante rescate químico con azida se ha revelado su importancia catalítica (figura 11 de la introducción general) (Monegal y Planas, 2006).

La Arg365 presenta un especial interés ya que forma parte de los residuos del extremo C-terminal (aa. 358-368). El mutante R365K ha sido el único estudiado en esta zona flexible, hasta la fecha. La mutación no ha tenido un efecto importante en la afinidad por UDP-Gal y en la reacción de transglicosidación la  $k_{cat}$  se ha reducido únicamente 38 veces. La poca variación respecto a los parámetros cinéticos se debe a que es una mutación conservativa, en la que la arginina es sustituida por un

aminoácido con propiedades muy similares, como lo es la lisina. En la presente tesis se ha estudiado otro mutante, la R365A, que como se discutirá más adelante, no ha presentado actividad detectable.

**Tabla 5.4.** Datos cinéticos publicados para diversos mutantes de la  $\alpha$ 3GT bovina (Zhang *et al.* 2003).

<b>Transglucosidación</b>	<b>WT</b>	<b>Q247E</b>	<b>H280Q</b>	<b>E317Q</b>	<b>R365K<sup>e</sup></b>	<b>V226A<sup>i</sup></b>
$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$6.4 \pm 0.7$	$0.14 \pm 0.07^c$	$0.77 \pm 0.08$	$(27 \pm 7) \times 10^{-4}^d$	$0.17 \pm 0.01$	$3.0 \pm 0.3$
$K_m^A$ (mM)	$0.43 \pm 0.07$	$0.66 \pm 0.02^b$	$1.02 \pm 0.22$	$0.13 \pm 0.05^b$	$0.72 \pm 0.06$	$2.6 \pm 0.5$
$K_m^B$ (mM)	$19.9 \pm 3.4$	$20.2 \pm 1.9^c$	$33.6 \pm 7.6$	$233 \pm 85^d$	$23.8 \pm 1.9$	$1.0 \pm 0.45$
$K_{iA}$ (mM)	$0.14 \pm 0.03$	$0.15 \pm 0.01$	$0.89 \pm 0.25$	$0.16 \pm 0.03^f$	$0.14 \pm 0.03$	$30.5 \pm 6.5$
$k_{cat}/K_{iA}K_m^B$ ( $\times 10^6 s^{-1}M^{-2}$ )	$2.3 \pm 0.7$	$0.046 \pm 0.023$	$0.03 \pm 0.02$	$7.2 \times 10^{-5}$	$0.05 \pm 0.01$	$11.7 \pm 6.2$
<b>Hidrólisis</b>						
$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ ) $\times 10^3$	$16 \pm 1$	$11 \pm 0.2$	$< 2^g$	$0.13 \pm 0.01$	$1.4 \pm 0.0$	$4.8 \pm 0.7$
$K_m^A$ (mM)	$0.10 \pm 0.00$	$0.15 \pm 0.01$	n.d. <sup>h</sup>	$0.16 \pm 0.03$	$0.14 \pm 0.02$	$1.0 \pm 0.3$
$k_{cat}/K_m^A$ ( $\times 10^3 s^{-1}M^{-1}$ )	0.16	0.073	n.d.	0.00069	0.01	$4.8 \pm 1.6$
$k_{cat}$ transgl/hidrol eficiencia catalítica transgl/hidrol	400 14000	12 630	$> 385$ n.d.	51 104	121 5000	625 2438

<sup>b</sup>Los valores de  $K_m$  (aparente) para UDP-Gal se determinaron variando la [UDP-Gal] a concentración fija de lactosa, 25mM. <sup>c</sup>Los valores de  $K_m$  y  $k_{cat}$  aparentes para lactosa se determinaron variando la concentración de lactosa a concentración fija de UDP-Gal de 1mM. La  $k_{cat}$  aparente se corrigió por  $(1+KMA/[UDP-Gal])$ . <sup>d</sup>Se determinó variando la concentración de lactosa a concentración fija de 1.2mM UDP-Gal. <sup>e</sup>Valores publicados en (Boix *et al.* 2001). <sup>f</sup>Son valores de  $K_m$  de UDP-Gal de hidrólisis. <sup>g</sup>Actividad hidrolítica muy baja, bajo los límites de cuantificación. La  $k_{cat}$  aparente se midió a 1mM UDP-Gal. <sup>h</sup>n.d.: no determinado. <sup>i</sup>Valores publicados en (Zhang *et al.* 2001)

En nuestro grupo también se estudiaron los mutantes H315A, A282G y D316A (Monegal *et al.*, 2005). Estos mutantes fueron seleccionados a partir de las estructura cristalográfica I (Gastinell *et al.* 2001), única disponible en aquel tiempo. Los dos primeros presentaron menor  $k_{cat}$  que *wt* y una  $K_m$  más alta (tabla 5.4). En las estructuras moleculares disponibles, ambos residuos quedan orientados lejos de los ligandos, por lo que los mutantes podrían alterar la actividad indirectamente a través de cambios en la estabilidad conformacional de la proteína. En cambio, el mutante D316A ha mostrado una significativa disminución de la actividad

específica. En las estructuras cristalográficas disponibles no ha sido posible identificar una clara interacción con alguno de los ligandos, aunque si una proximidad al donador.

**Tabla 5.5.** Parámetros cinéticos de mutantes H315A, A22G y D316A de la  $\alpha$ 3GT obtenidos con método HPCE con derivatización y radiométrico (Monegal, 2005).

	<i>WT</i>	<i>H315A</i>	<i>A282G</i>	<i>D316A</i>
<i>Método: HPCE con derivatización</i>				
$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	1,78 $\pm$ 0,05	0,40 $\pm$ 0,02		n.d.
$K_m$ (mM)	0,88 $\pm$ 0,10	7,0 $\pm$ 1,2		n.d.
$k_{cat}/K_M$ ( $s^{-1}mM^{-1}$ )	2,02 $\pm$ 0,29	0,057 $\pm$ 0,01	0,0140 $\pm$ 7 $\cdot$ 10 <sup>-4</sup>	
% $k_{cat}/K_M$	100%	2,8%	0,7%	
<i>Método radiométrico</i>				
$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	1,16 $\pm$ 0,03			(7,6 $\pm$ 0,6) $\cdot$ 10 <sup>-4</sup>
$K_m$ (mM)	1,55 $\pm$ 0,15			3,62 $\pm$ 0,56
$k_{cat}/K_m$ ( $s^{-1}mM^{-1}$ )	7,52 $\cdot$ 10 <sup>-1</sup>			2,10 $\cdot$ 10 <sup>-4</sup>
% $k_{cat}/K_M$	100%			2,10 $\cdot$ 10 <sup>-4</sup>

Condiciones en el ensayo por HPCE: 4mM UDP-Gal, 0 < Lac < 30mM Lac, 0.13mg/ml BSA, 13mM MnCl<sub>2</sub>, 13mM HEPES y 50mM KCl pH 7.0. Condiciones en el ensayo radiométrico: 50 $\mu$ M UDP-Gal\* 1/1000, 0 < Lac < 10mM, MnCl<sub>2</sub> 13mM, BSA 0.13mg/ml, tampón HK 1X, pH 7.0 y T=30 °C. n.d. No determinado.

Otra serie de mutantes corresponde a los aminoácidos que constituyen el motivo DVD. Los mutantes estudiados fueron D225N, V226A y D227N. Las mutaciones en ambos aspartatos dio proteína sin actividad detectable (Zhang et. al. 2001). En nuestro grupo se ha estudiado el mutante D225A, dando resultados similares. De esta manera, se demuestra la importancia fundamental del dominio DVD en la actividad  $\alpha$ 3GT, sin embargo es necesario realizar experimentos que demuestren claramente que este dominio participa de manera directa en la unión al Mn<sup>2</sup> y/o en la catálisis.

**Tabla 5.6.** Parámetros cinéticos de los mutantes de triptófanos del sitio activo de la  $\alpha 3$ GT (Zhang et al., 2004).

Transglucosidación	WT	W249G	W250Y	W250F	W314Y	W356T
$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$6.4 \pm 0.7$	2.3	$8.2 \pm 0.6$	$16.5 \pm 0.29$	$0.22 \pm 0.006^b$	$0.52 \pm 0.02^b$
$K_m^A$ (mM)	$0.43 \pm 0.07$	$0.84 \pm 0.17^a$	$2.24 \pm 0.27$	$4.00 \pm 0.33$	$0.72 \pm 0.07^a$	$0.85 \pm 0.03^a$
$K_m^B$ (mM)	$19.9 \pm 3.4$	$> 200^c$	$9.8 \pm 1.2$	$21.5 \pm 1.8$	$9.7 \pm 0.8^b$	$126 \pm 8^b$
$K_{iA}$ (mM)	$0.14 \pm 0.03$	$0.21 \pm 0.04^e$	$0.15 \pm 0.09$	$0.07 \pm 0.05$	$0.14 \pm 0.01^e$	$0.25 \pm 0.02^e$
$k_{cat}/K_{iA}K_m^B$ ( $\times 10^6 s^{-1}M^{-2}$ )	$2.3 \pm 0.7$	$\sim 0.019$	$5.5 \pm 4.6$	$6.1 \pm 3.6$	$0.16 \pm 0.02$	0.017
<b>Hidrólisis</b>						
$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ ) $\times 10^3$	$16 \pm 1$	$16 \pm 1$	$29 \pm 1$	$23 \pm 0.2$	$18 \pm 0.3$	1.1
$K_m^A$ (mM)	$0.10 \pm 0.00$	$0.21 \pm 0.04$	$0.23 \pm 0.01$	$0.15 \pm 0.02$	$0.14 \pm 0.01$	$0.25 \pm 0.02$
$k_{cat}/K_m^A$ ( $\times 10^3 s^{-1}M^{-1}$ )	0.16	0.076	0.13	0.15	0.16	0.0044
$k_{cat}$ transgl/hidrol	400	$> 140$	283	717	12	473

<sup>a</sup> Los valores de  $K_m$  aparente para el UDP-Gal ( $K_A$ ) se obtuvieron variando la concentración de UDP-Gal a concentración constante de lactosa, 25mM. <sup>b</sup> La  $k_{cat}$  y  $K_m$  aparentes para la lactosa ( $K_B$ ) fueron obtenidas variando la concentración de lactosa a concentración constante de UDP-Gal, 1mM. La  $k_{cat}$  fue corregida utilizando  $(1+K_A/[UDP-Gal])$ , sin embargo, para W314Y la alta actividad hidrolasa respecto a la transglucosidasa incrementa la incertidumbre de estos valores. <sup>c</sup> La  $K_m$  para el aceptor está fuera del rango cuantificable, pero  $k_{cat}/K_B$ , determinado a partir de la curva de  $v$  versus [lactosa] a 1mM de UDP-Gal, da 80 veces mayor que *wt*. <sup>d</sup> Determinado variando la concentración de lactosa a 1.2mM de UDP-Gal. <sup>e</sup> Valores vinculados a la hidrólisis de UDP-Gal.

Una serie de mutantes recientemente estudiada corresponde a los triptófanos situados en el sitio activo (tabla 5.6) (Zhang et al., 2004). Los aminoácidos aromáticos son frecuentes en lectinas y enzimas que enlazan carbohidratos. En el sitio activo de la  $\alpha 3$ GT están presentes 4 triptófanos: 249, 250, 314 y 356. El mutante W249G incrementa la  $K_m$  para el aceptor, lo cual es consistente con las estructuras cristalográficas donde se observa que este triptófano interacciona con la N-acetilactosamina por la cara  $\beta$ .

El mutante W314Y disminuye la  $k_{cat}$  de la transglucosidación, pero no afecta la hidrólisis del UDP-Gal. En las estructuras moleculares se puede observar que el W314 interacciona con la porción  $\beta$ -galactosilo del aceptor y con el donador. Consiguientemente, se puede deducir que el W314, altamente conservado, estabilizaría el estado de transición para la

transferencia de la galactosa del UDP-Gal al aceptor, pero no así hacia el agua. Mientras que mutaciones en W250 no han producido cambios importantes, el mutante W356T ha reducido la actividad catalítica tanto para la transglicosidación como para la hidrólisis del UDP-Gal. Es de destacar que el triptófano 356 está muy cerca del extremo flexible C-terminal.

Finalmente, existe un grupo de mutantes de la histidina 280 (H280N, H280T, H280R, H280A, H280G, H280L y H280P) que no pudieron ser caracterizados cinéticamente ya que resultaron insolubles a concentraciones mayores a 1mg/L o por rendimientos de expresión muy bajos (<1mg/L) (Zhang *et al* 2003). Sin embargo, mutantes para la histidina 271 han sido obtenidos para la  $\alpha$ 3GT porcina (*Sus scrofa*). Esta histidina es equivalente a la H280 bovina. Lazarus *et al.*, 2002 han encontrado que los mutantes H271A, H271AL y H271G no muestran actividad, mientras que el mutante H271R es activo. Estos resultados cualitativos sugieren que el residuo H271 ( $\alpha$ 3GT porcina) o H280 ( $\alpha$ 3GT bovina) es importante para la catálisis.

A pesar de que existen numerosos mutantes del sitio activo estudiados, hasta ahora solamente el R365K corresponde al extremo C-terminal flexible, zona clave para la actividad enzimática de la  $\alpha$ 3GT. Por tal motivo se ha realizado la caracterización cinética de mutantes de alanina de los aminoácidos de esta zona: T358A, K359A, E360A, Y361A, N362A, V363A, V364A, R365A, N366A, N367A, y V368A.

## **Resultados y discusiones**

Las proteínas mutantes fueron obtenidas tal como se ha descrito en el capítulo 2. Los análisis cinéticos se realizaron mediante ensayo radiométrico tal como se explica en el capítulo 4.

### Determinación de actividades específicas

La actividad específica se define en la presente tesis como la velocidad inicial del enzima a concentración de saturación de los sustratos por concentración de enzima. Se obtuvieron las actividades específicas para la serie de mutantes de la  $\alpha$ 3GT a partir de velocidades iniciales de reacción monitorizadas en las siguientes condiciones de reacción: lactosa 10mM, UDP-(1-<sup>3</sup>H-galactosa) 50 $\mu$ M, MnCl<sub>2</sub> 13mM, BSA 0,13mg/ml, tampón HK pH 7, temperatura 30 °C, volumen total 90 $\mu$ l.

**Tabla 5.7.** Actividades específicas y relativas para la  $\alpha$ 3GT wt y mutantes.

enzima	Vo/[E] (s <sup>-1</sup> )	Actividad Relativa (%)
<i>wt</i>	1,4 ± 0,02	100
T358A	1,4 ± 0,02	100
K359A	Actividad no detectada	
E360A	1,8 ± 0,02	130
Y361A	Actividad no detectada	
N362A	0,7 ± 0,06	53
V363A	Actividad no detectada	
V364A	0,2 ± 0,01	13
R365A	Actividad no detectada	
N366A	1,4 ± 0,06	101
N367A	1,4 ± 0,07	102
V368A	1,0 ± 0,04	72

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 5.7. El mutante E360A presenta la actividad específica más alta (130%) respecto a *wt*. Los mutantes N366A, N367A y T358A presentan actividades similares a *wt*. V368A tiene una actividad específica 72% inferior a *wt*, mientras N362A y V364A son los menos activos. Finalmente no se ha detectado actividad para los mutantes K359A, Y361A, V363A y R365A. Para los mutantes activos se determinaron la constante de velocidad máxima, la constante de Michaelis – Menten y la eficiencia catalítica, tal como se explica a continuación.

*Determinación de parámetros cinéticos*

Los parámetros cinéticos determinados para cada mutante fueron  $k_{cat}$  y  $K_m$  aparentes, tanto para el donador UDP-Gal como para el aceptor lactosa.

Considerando que las reacciones enzimáticas estudiadas siguen el modelo bi sustrato secuencial ordenado se tiene:

$$\frac{v}{V_{\max}} = \frac{[\text{UDP - Gal}][\text{Lac}]}{K_{Lac}[\text{UDP - Gal}] + K_{\text{UDP-Gal}}[\text{Lac}] + [\text{UDP - Gal}][\text{Lac}]} \quad (6)$$

Reordenando la ecuación anterior reflejando la dependencia de la velocidad inicial de la concentración del sustrato aceptor se obtiene:

$$\frac{v}{V_{\max}} = \frac{[\text{Lac}]}{K_{Lac} \left( 1 + \frac{K_{\text{UDP-Gal}}}{[\text{UDP - Gal}]} \right) + [\text{Lac}]} \quad (7)$$

A concentraciones de saturación del donador se asume que:

$$\frac{K_{\text{UDP-Gal}}}{[\text{UDP - Gal}]} \approx 0 \quad (8)$$

por lo que la ecuación (7) resulta en un modelo tipo Michaelis – Menten, donde las constantes cinéticas vienen a ser aparentes:

$$v_{Lac} = \frac{k_{catLac}^{app} [\text{Lac}]}{K_{mLac}^{app} + [\text{Lac}]} \quad (9)$$

De igual manera se deduce la ecuación para obtener las constantes cinéticas aparentes para el UDP-Gal a concentración constante de saturación de lactosa:



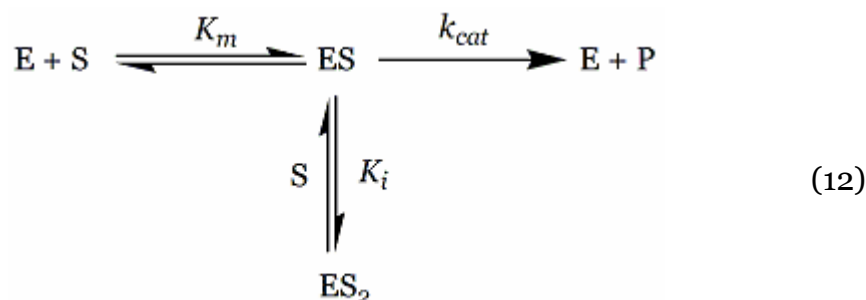
$$v_{UDP-Gal} = \frac{k_{cat}^{app} [UDP-Gal]}{K_{mUDP-Gal}^{app} + [UDP-Gal]} \quad (10)$$

Para obtener las constantes aparentes correspondientes al UDP-Gal, se ha mantenido constante la concentración de lactosa a nivel de saturación (10mM) y se variaron las concentraciones de UDP-Gal en un rango de 8 a 250µM; mientras que para la obtención de las constantes aparentes correspondientes a la lactosa, se ha mantenido constante la concentración de UDP-Gal a nivel de saturación (50µM) y se ha variado la concentración de lactosa en un intervalo de 0.5 a 15mM. Para cada caso se obtuvieron las velocidades iniciales por ajuste lineal, tal como se ha descrito en el capítulo anterior.

Los parámetros cinéticos aparentes para la lactosa para la mayoría de los mutantes se obtuvieron por ajuste al modelo que incluye inhibición por exceso de sustrato:

$$v_{Lac} = \frac{k_{cat}^{app} [Lac]}{K_{mLac}^{app} + [Lac] + \frac{[Lac]^2}{K_{iLac}^{app}}} \quad (11)$$

Este modelo representa un tipo de inhibición reversible bastante frecuente (Nuñez de Castro, 2001; Segel, 1993; Rivas-Lopez, *et al.* 2006), tal como se estudió también en la β-glucanasa en nuestro grupo (Malet y Planas, 1997). Puede ocurrir por la unión de dos moléculas de sustrato a la misma molécula de enzima provocando la pérdida de actividad. La unión de la segunda molécula de sustrato tiene una constante de disociación diferente a  $K_m$ , que se representa por  $K_i$ , tal como se muestra a continuación:



*Parámetros cinéticos para UDP-Gal*

Las correspondientes cinéticas enzimática (a 10mM de Lac) se presentan en la figura 5.5, y los parámetros cinéticos calculados en la tabla 5.8. Las eficiencias catalíticas relativas permiten establecer 4 grupos de mutantes (tabla 5.8). El primero está constituido por aquellos para los cuales no se ha detectado actividad en las condiciones estudiadas: K359A, Y361A, V363A y R365A. En un segundo grupo están los mutantes que tienen eficiencias catalíticas inferiores al 50% en relación a *wt*. En este grupo están N362A y V364A. En ambos mutantes, las  $K_m^{app}$  son similares a la de *wt*, pero las  $k_{cat}^{app}$  son notablemente inferiores, lo cual determina que tengan eficiencias catalíticas bajas. En el tercer grupo están los mutantes con eficacias catalíticas ligeramente superiores que *wt*, hasta un 120%. En este grupo están E360A y N366A. El primero de éstos mutantes presenta una  $k_{cat}^{app}$  superior a *wt*, mientras que la  $K_m^{app}$  es muy similar, mientras que para el segundo mutante ocurre lo contrario, por lo que se puede deducir que N366A tiene una mayor eficacia catalítica debido a su mayor afinidad por el sustrato. Finalmente, están los mutantes con eficacias catalíticas muy altas, tales son T358A, N367A y V368A. El primero de éstos presenta una  $k_{cat}^{app}$  similar a *wt*, pero la  $K_m^{app}$  es la mitad. N367A tiene una eficacia catalítica de 2.7 veces superior a *wt*, a pesar de tener una  $k_{cat}^{app}$  ligeramente más baja, la  $K_m^{app}$  es cuatro veces inferior que la de *wt*, mostrando una mayor afinidad por el sustrato. V368A es el mutante con la más alta eficacia catalítica, superando en más de 3.7 veces la de *wt*. Este mutante tiene una  $k_{cat}^{app}$  superior a *wt* pero una  $K_m^{app}$  4 veces más baja.

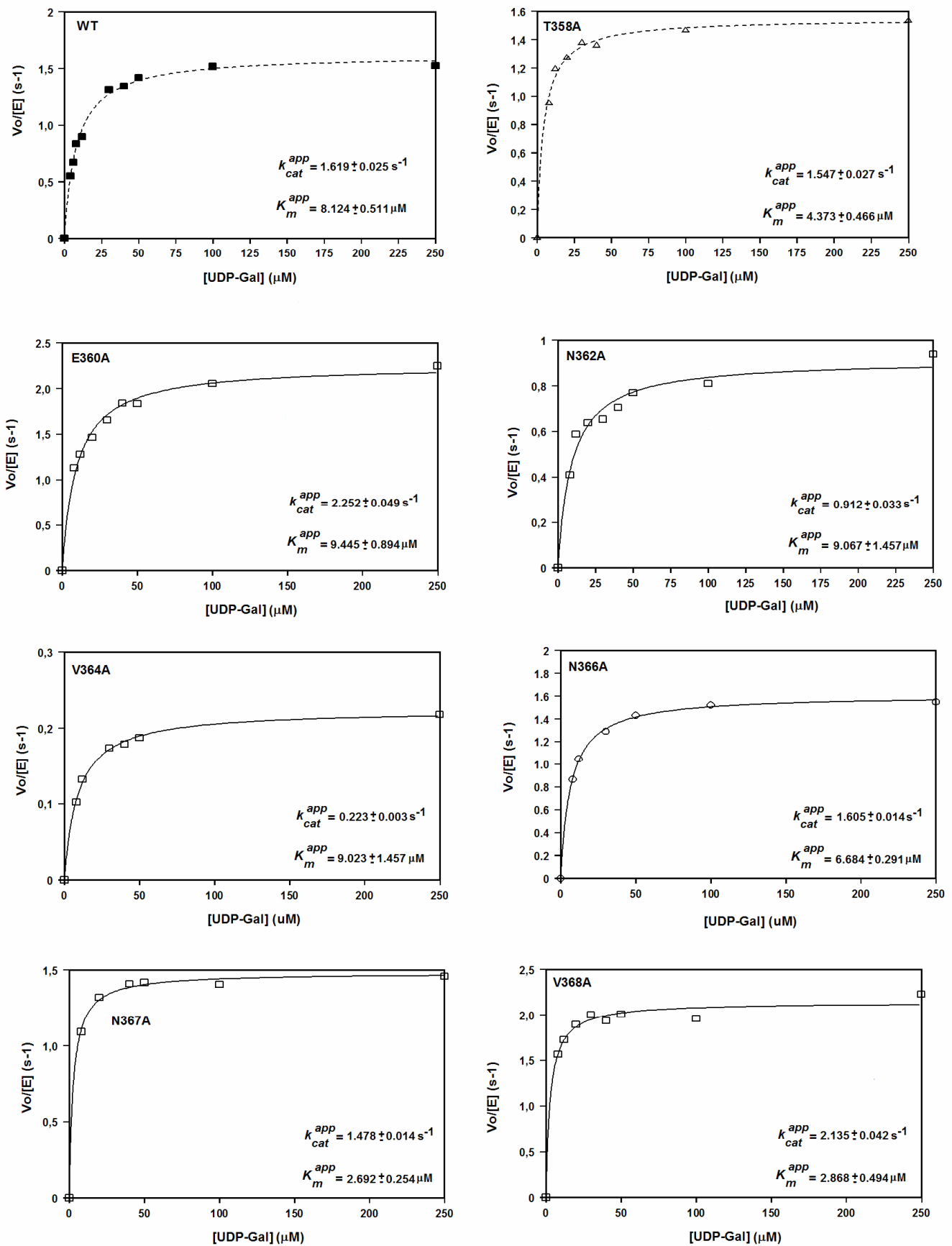
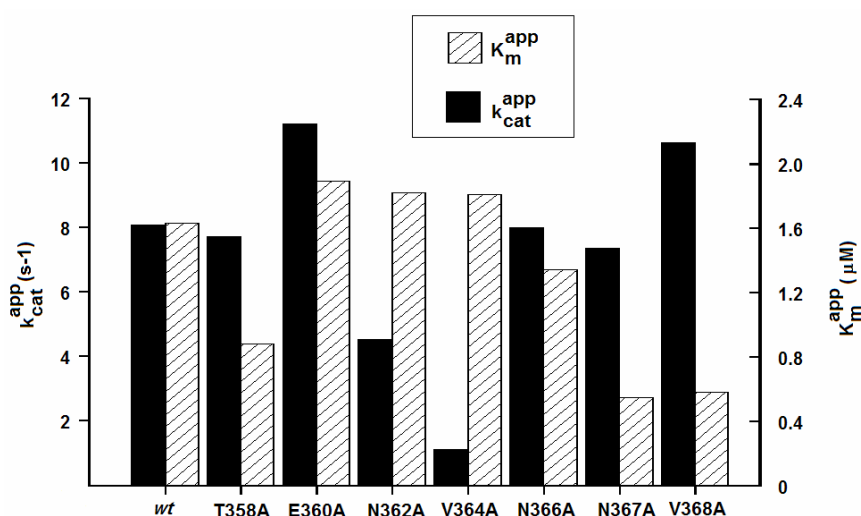


Figura 5.5. Gráficas de los parámetros cinéticos  $k_{cat}^{app}$  y  $K_m^{app}$  para el UDP-Gal.

**Tabla 5.8.** Parámetros cinéticos obtenidos para el UDP-Gal correspondientes a la  $\alpha$ 3GT *wt* y mutantes C-terminal (aa. 358-368).

	$k_{cat}^{app}$ ( $s^{-1}$ )	$K_m^{app}$ ( $\mu M$ )	$k_{cat}^{app}/K_m^{app}$ ( $s^{-1}\mu M^{-1}$ )	$k_{cat}^{app}/K_m^{app}$ (%)
WT	$1,6 \pm 0,03$	$8,1 \pm 0,5$	$0,2 \pm 0,02$	100
T358A	$1,5 \pm 0,03$	$4,4 \pm 0,5$	$0,4 \pm 0,04$	178
K359A	no se detectó actividad			0,0
E360A	$2,3 \pm 0,05$	$9,4 \pm 0,9$	$0,2 \pm 0,03$	120
Y361A	no se detectó actividad			0,0
N362A	$0,9 \pm 0,03$	$9,1 \pm 1,5$	$0,1 \pm 0,02$	51
V363A	no se detectó actividad			0,0
V364A	$0,2 \pm 0,003$	$9,0 \pm 0,5$	$0,03 \pm 0,002$	12
R365A	no se detectó actividad			0,0
N366A	$1,6 \pm 0,01$	$6,7 \pm 0,3$	$0,2 \pm 0,01$	121
N367A	$1,5 \pm 0,01$	$2,7 \pm 0,5$	$0,5 \pm 0,06$	276
V368A	$2,1 \pm 0,04$	$2,9 \pm 0,5$	$0,7 \pm 0,1$	374

Desde un punto de vista de la afinidad por el sustrato donador, se pueden comparar las  $K_m^{app}$  de los mutantes. Afinidades por UDP-Gal similares a *wt* tienen N362A y V364A, sin embargo V364A tiene una actividad muy baja. N366A y T358A presentan mayor afinidad por el sustrato, pero N367A y V368A son los que mayor afinidad muestran. Es interesante resaltar que éstos mutantes son los dos últimos del extremo C-terminal flexible. Solamente el mutante E360A presenta una  $K_m^{app}$  algo superior que *wt*. Las  $K_m^{app}$  en la mayoría de los mutantes determina que algunos tengan mayor eficacia catalítica (figura 5.6).



**Figura 5.6.** Comparación de parámetros cinéticos aparentes obtenidos para el sustrato donador (UDP-Gal), para mutantes de la  $\alpha$ 3GT.

**Tabla 5.9.** Parámetros cinéticos obtenidos para la lactosa correspondientes a la  $\alpha$ 3GT *wt* y mutantes C-terminal (aa. 358-368).

	$k_{cat}^{app}$ ( $s^{-1}$ )	$K_m^{app}$ (mM)	$k_{cat}^{app} / K_m^{app}$ ( $s^{-1}mM^{-1}$ )	$k_{cat}^{app} / K_m^{app}$ (%)	$K_{iLac}^{app}$ (mM)
WT	$0,9 \pm 0,02$	$0,7 \pm 0,06$	$1,4 \pm 0,2$	100	
T358A	$1,5 \pm 0,04$	$0,9 \pm 0,1$	$1,7 \pm 0,2$	120	
K359A	no se detectó actividad				
E360A	$2,4 \pm 0,3$	$1,7 \pm 0,4$	$1,4 \pm 0,4$	101	$21,4 \pm 6,3^*$
Y361A	no se detectó actividad				
N362A	$1,1 \pm 0,1$	$1,2 \pm 0,3$	$0,9 \pm 0,3$	64	$21,6 \pm 6,6^*$
V363A	no se detectó actividad				
V364A	$> 0,6 \pm 0,1$	$> 19,3 \pm 5,6^{**}$	$0,03 \pm 0,02$	2	
R365A	no se detectó actividad				
N366A	$2,1 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,1$	$2,8 \pm 0,6$	202	$43 \pm 12^*$
N367A	$2,3 \pm 0,4$	$1,6 \pm 0,7$	$1,4 \pm 0,9$	103	$50 \pm 47^*$
V368A	$1,9 \pm 0,2$	$0,9 \pm 0,2$	$2,1 \pm 0,7$	152	$117 \pm 110^*$

\* Parámetros cinéticos obtenidos con el modelo de inhibición por exceso de sustrato (ecuación 19).

\*\* No se alcanza saturación (ver figura 5.7).

### Parámetros cinéticos para la lactosa

El comportamiento cinético de la serie de mutantes estudiados permite establecer dos grupos según el modelo de ajuste (figura 5.7, tabla 5.9). El primero está comprendido por *wt* y los mutantes T358A, y V364A, cuyos comportamientos se ajustan al modelo de Michaelis – Menten (ecuación 9). En el segundo grupo están E360A, N362A, N366A, N367A y V368A, cuyos comportamientos se ajustan al modelo que incluye inhibición por exceso de sustrato, según las ecuaciones (11) y (12).

La inhibición por exceso de sustrato no es muy alta, según revelan las constantes de inhibición aparentes ( $K_{iLac}^{app}$ ). E360A y N362A presentan las  $K_{iLac}^{app}$  más bajas de la serie, pero son más de 10 y 18 veces superiores a las respectivas  $K_m^{app}$  (tabla 5.9). En los mutantes N366A, N367A y V368A, la inhibición por exceso de sustrato es menos significativa, con  $K_{iLac}^{app}$  que son 61, 31 y 130 veces superiores a las respectivas  $K_m^{app}$  (tabla 5.9).

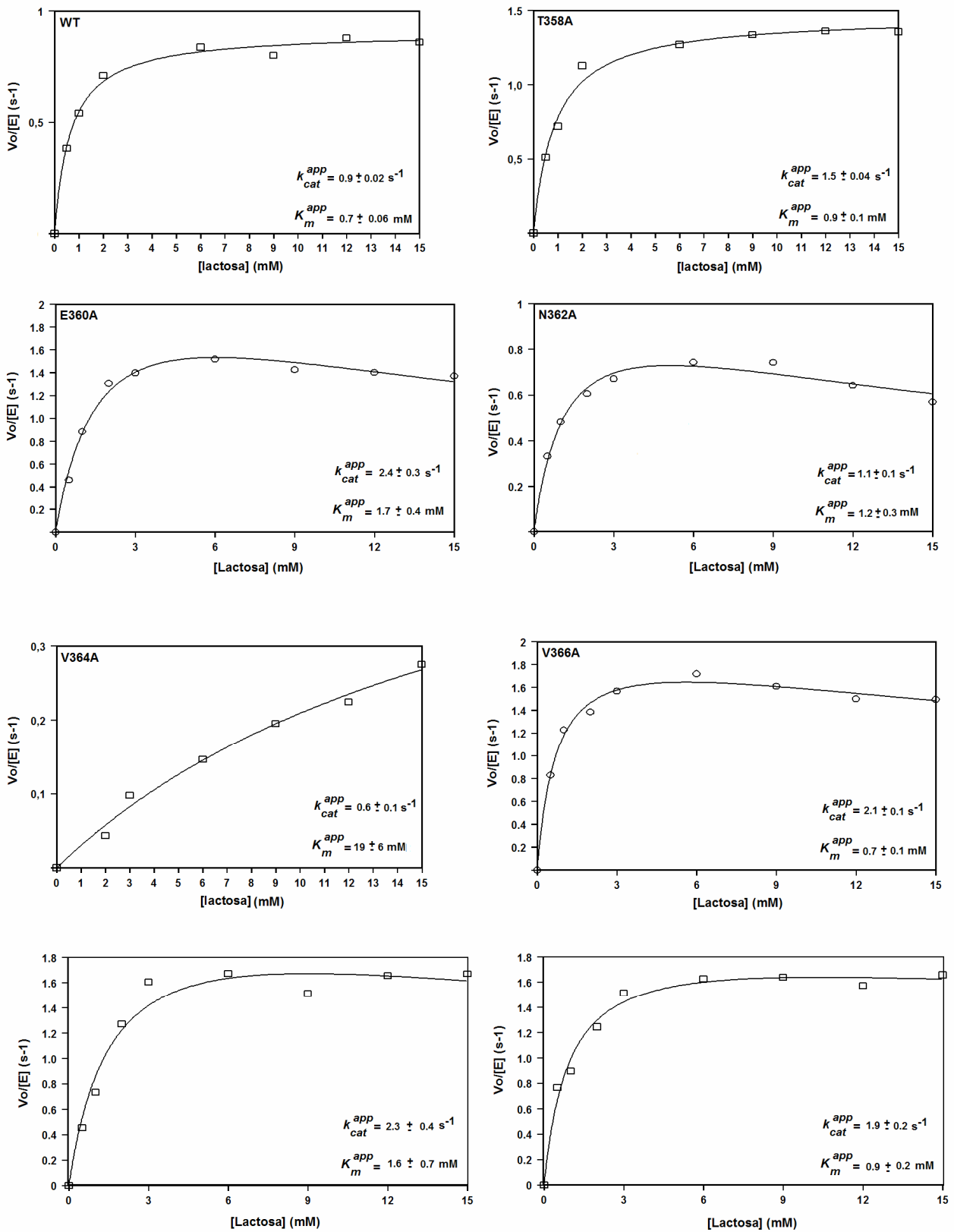


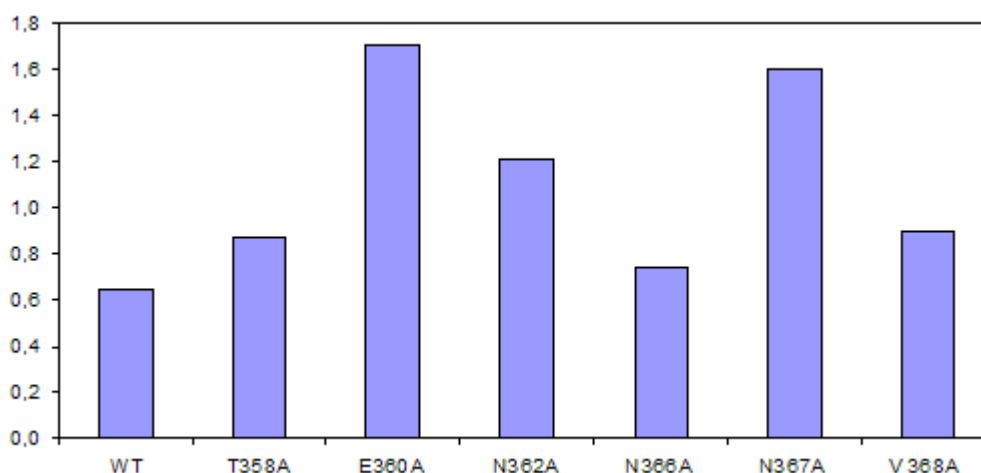
Figura 5.7. Gráficas de los parámetros cinéticos  $k_{cat}^{app}$  y  $K_m^{app}$  para la lactosa.

Por otra parte, las actividades de *wt* y del mutante T358A son las que mejor se ajustan al modelo de Michaelis – Menten, mientras que para V364A se puede observar que no alcanza una velocidad máxima en las condiciones de estudio (figura 5.7).

Los mutantes V364A y N362A tienen las eficiencias catalíticas más bajas. V364A presenta la menor eficiencia catalítica de la serie, entorno a un 2% respecto a *wt*. La  $K_m^{app}$  para este mutante es muy alta ( $> 19$  mM), lo cual significa que la afinidad por la lactosa es baja, pero también, la  $k_{cat}^{app}$  es menor que la de *wt* (tabla 5.8). N362A tiene una  $k_{cat}^{app}$  similar a *wt*, pero su baja afinidad por lactosa, reflejada en la alta  $K_m^{app}$  (cerca del doble de *wt*) disminuye su eficacia catalítica hasta un 64%.

T358A, E360A y N367A son los mutantes que presentan las eficacias catalíticas más similares a *wt*, de toda la serie (tabla 5.9). T358A muestra una eficiencia catalítica (1.2 veces) ligeramente superior a *wt*. A pesar de tener una  $k_{cat}^{app}$  en más de 1.6 veces superior a *wt*, la  $K_m^{app}$  para el mutante T358A es 1.3 veces mayor. E360A y N367A tienen  $k_{cat}^{app}$  que superan el doble de la correspondiente a *wt*, sin embargo, las respectivas  $K_m^{app}$  son también, superiores al doble de la de *wt*. En todos estos mutantes se puede observar una clara disminución de la afinidad por lactosa respecto a *wt*.

Las eficiencias catalíticas más altas las tienen los mutantes N366A y V368A. N366A tiene la eficiencia catalítica más alta de toda la serie y es dos veces superior que la de *wt*. Éste mutante tiene igual afinidad que *wt* por la lactosa, tal como queda reflejado por la  $K_m^{app}$ , pero su  $k_{cat}^{app}$  supera el doble que la de *wt*. V368A presenta una eficiencia catalítica de 150%, debida a su elevada  $k_{cat}^{app}$  que supera el doble de la correspondiente a *wt*, a pesar de tener una  $K_m^{app}$  que refleja una ligera disminución de la afinidad por lactosa.



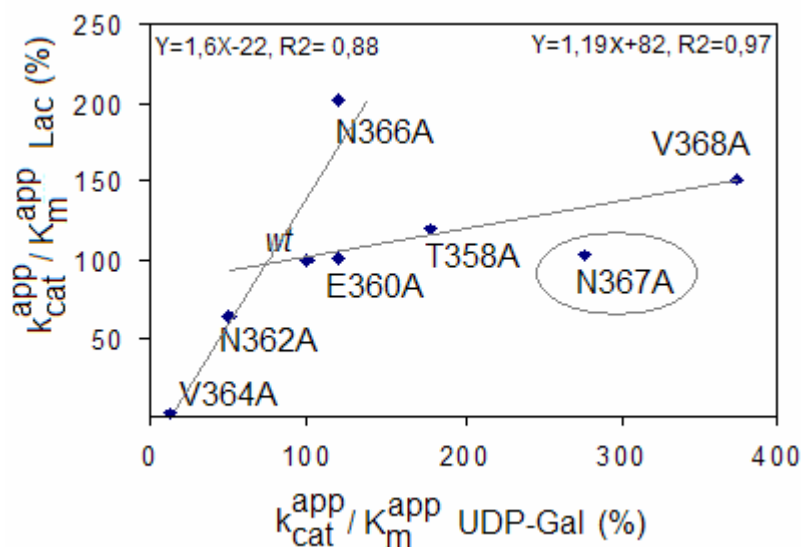
**Figura 5.8.** Comparación de las constantes de Michaelis-Menten aparentes (mM) para la lactosa. No se muestra el mutante V364A, que presenta una  $K_m^{app}$  muy alta ( $> 19\text{mM}$ ) (tabla 5.8).

#### *Eficiencia catalítica para el sustrato donador versus aceptor*

La representación gráfica de la eficiencia catalítica para el sustrato donador versus la eficacia catalítica para el aceptor permite agrupar a los mutantes en tres grupos (figura 5.9). Sin embargo, en la gráfica (figura 5.9) no está representado el mutante V364A, ya que no alcanza la saturación de sustrato y consiguientemente sus constantes cinéticas son muy altas. Dos grupos están compuestos por mutantes cuyas eficiencias catalíticas correlacionan linealmente, mientras que el tercero está compuesto únicamente por el mutante N367A.

En el primer grupo, la correlación lineal tiene una pendiente mayor que en el segundo grupo. Lo cual sugiere que en el primer grupo, un incremento de la eficacia catalítica para el sustrato donador implica un mayor incremento de la eficacia catalítica para el aceptor, que para los mutantes del segundo grupo. Además, ambas rectas tienen un punto de intersección muy cercano a *wt*, por lo que ésta proteína está incluida en ambos grupos. En el primero está N362A, V364A y V366A, y en el segundo T358A, E360A y V368A.





**Figura 5.9.** Eficiencia catalítica relativa (% respecto a *wt*) de sustrato donador (UDP-Gal) versus aceptor (Lactosa) para *wt* y mutantes. No se representan los parámetros cinéticos correspondientes a V364A ya que no alcanza la saturación de sustrato y consiguientemente sus constantes cinéticas son muy altas.

Las eficiencias catalíticas para el mutante N367A no correlacionan adecuadamente con ninguno de los ajustes lineales de la figura 5.9, sin embargo se aproxima claramente al segundo grupo de mutantes. Pero se distingue de ellos porque un importante aumento de la eficiencia catalítica para el sustrato donador no implica un incremento de la eficiencia catalítica para el aceptor. Mientras que la  $k_{cat}^{app} / K_m^{app}$  relativa para el UDP-Gal es 2.7 veces mayor que para *wt*, éste mismo parámetro es igual al de *wt*, para la lactosa.

También se puede observar en el caso del mutante N366A (figura 5.9), que mientras la eficiencia catalítica para el UDP-Gal no varía mucho respecto de *wt*, si lo hace la eficiencia catalítica para la lactosa, incrementándose en más del doble que para *wt*.

Finalmente, los mutantes con mayor eficiencia catalítica son: V368A para el UDP-Gal y N366A para lactosa. Los menos eficientes son N362A y V364A.

Antes de analizar estructuralmente el efecto de las mutaciones con objeto de inferir un papel funcional en catálisis, se estudia la estabilidad de cada mutante (capítulo 6) para discutir efectos en catálisis y en estabilidad y poder realizar un análisis global del efecto de las mutaciones (capítulo 7).

# CAPÍTULO 6

---

---

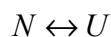
**ANÁLISIS DE ESTABILIDAD  
DE MUTANTES DEL EXTREMO  
C-TERMINAL DE LA  
 $\alpha$ -1,3-GALACTOSILTRANSFERASA**

---

## ANÁLISIS DE ESTABILIDAD DE MUTANTES DEL EXTREMO C-TERMINAL DE LA $\alpha$ -1,3-GALACTOSILTRANSFERASA

### Introducción

Se estudió la estabilidad conformacional de mutantes de alanina (Cunningham y Wells, 1989) del *loop* C-terminal (358-368) de la  $\alpha$ 3GT bovina, y de los mutantes D225A y E317A del sitio activo. Para cada una de los enzimas, se ha determinado el efecto del sustrato donador (UDP-Gal) o del inhibidor homólogo UDP en la estabilidad. El enfoque aquí empleado se ha basado en el equilibrio de plegamiento de proteínas donde se consideran únicamente dos estados, plegado o nativo (N) y desplegado (U) (Clarke y Fersht, 1993), puesto que éste explica sistemáticamente las curvas de desnaturalización experimentales obtenidas.



$$K_{UN} = \frac{[U]}{[N]} \quad (13)$$

La constante de equilibrio permite, entonces, calcular la energía libre estándar de los dos estados:

$$\Delta G = -RT \ln K_{UN} \quad (14)$$

En este marco, la medida de estabilidad de las proteínas estudiadas se ha realizado induciendo el desplegamiento por desnaturalización química reversible con urea.

La desnaturalización química reversible permite determinar la energía libre, la entalpía y la entropía del plegamiento. Para determinar la estabilidad conformacional se ha registrado la intensidad de fluorescencia a distintas concentraciones de urea.

El análisis de los datos obtenidos fue realizado considerando la constante de equilibrio  $K_{UN}$  a cada concentración de urea (Clarke y Fresh, 1993). De manera que:

$$K_{UF} = \frac{(F_N - F)}{(F - F_U)} \quad (15)$$

Donde  $F_N$  es la fluorescencia de la forma plegada,  $F_U$  es la fluorescencia de la forma desplegada, y  $F$  es la fluorescencia registrada a una determinada concentración de urea.

Por otra parte, se ha demostrado experimentalmente que la energía libre de desplegamiento de proteínas en presencia de desnaturalizante es linealmente dependiente de la concentración de desnaturalizante (Pace, 1986):

$$\Delta G_{UN}^D = \Delta G_{UN}^{H_2O} - m[D] \quad (16)$$

Donde  $\Delta G_{UN}^{H_2O}$  es la energía libre aparente en ausencia de desnaturizante.  $[D]$  es la concentración de desnaturizante, y  $m$  la pendiente de transición. Combinando las ecuaciones (15) y (16), y asumiendo que tanto  $F_U$ , como  $F_N$  son linealmente dependientes de la concentración de desnaturizante (Horovitz *et al.* 1992), se pueden calcular  $\Delta G_{UN}^{H_2O}$  y  $m$ :

$$F = \frac{(\alpha_N + \beta_N [D]) + (\alpha_U + \beta_U [D]) \exp\{(m[D] - \Delta G_{UN}^{H_2O}) / RT\}}{1 + \exp\{(m[D] - \Delta G_{UN}^{H_2O}) / RT\}} \quad (17)$$

Donde  $\alpha_N$  y  $\alpha_U$  son los interceptos de la función, mientras que  $\beta_N$  y  $\beta_U$  son las pendientes de las líneas de base a concentraciones altas (N) y bajas (U) de concentración de desnaturizante, respectivamente. Sin embargo, para comparar la estabilidad de proteínas mutantes con *wt*, es más práctico calcular la concentración de desnaturizante  $[D]_{50\%}$  a la cual el 50% de la proteína está desplegada, parámetro que se obtiene a partir de la ecuación (16):

$$\Delta G_{UN}^D = m([D]_{50\%} - [D]) \quad (18)$$

Sustituyendo la ecuación (18) en (17) se obtiene:

$$F = \frac{(\alpha_N + \beta_N [D]) + (\alpha_U + \beta_U [D]) \exp\{(m[D] - [D]_{50\%}) / RT\}}{1 + \exp\{(m[D] - [D]_{50\%}) / RT\}} \quad (19)$$

Los datos fueron ajustados a ésta ecuación por regresión no lineal, obteniéndose así, los valores experimentales de  $m$  y  $[D]_{50\%}$  con sus respectivos errores estándar.

La diferencia de estabilidad conformacional entre la proteína *wt* y mutantes ( $\Delta\Delta G_{UN}$ ) se ha calculado a partir de la diferencia de los correspondientes parámetros  $\Delta[D] = [D]_{50\%} - [D]_{50\%}$ , que son medidas muy reproducibles:

$$\Delta\Delta G_{UN}^{H_2O} = \langle m \rangle \Delta[D]_{50\%} \quad (20)$$

Donde  $\langle m \rangle$  es el promedio de  $m$  para mutantes y *wt* (Kellis et al. 1989; Pons et al. 1997). El valor promedio  $\langle m \rangle$  es apropiado cuando los errores estándar son grandes, por lo que en el presente trabajo se empleó el promedio para los análisis y cálculos. El valor de  $m$  refleja la cooperatividad de transición y la exposición del estado desnaturalizado al disolvente en relación al estado nativo.

El cálculo de  $\Delta\Delta G_{UN}^{H_2O}$  se obtuvo por extrapolación a cero molar de desnaturalizante y según la ecuación:

$$\Delta\Delta G_{UN}^{H_2O} = \Delta G_{UN}^{H_2O} - \Delta G'_{UN}^{H_2O} \quad (21)$$

Finalmente, los errores introducidos en los cálculos de energías libres de estabilidad conformacional a cualquier concentración de desnaturalizante pueden ser calculados con las siguientes ecuaciones (Clarke y Fresht, 1993):

$$\Delta G_{UN}^D = m([D]_{50\%} - [D]) \pm \sqrt{se_m^2 ([D]_{50\%} - [D])^2 + m^2 se_D^2} \quad (22)$$

$$\Delta\Delta G_D = m([D]_{50\%} - [D]) - m'([D]_{50\%} - [D]) \pm \quad (23)$$

$$\sqrt{se_m^2 ([D]_{50\%} - [D])^2 + m^2 se_D^2 + se'_m^2 ([D]_{50\%} - [D])^2 + m'^2 se'_D^2}$$

Donde  $se_m$  y  $se_D$  son los errores estándar en  $m$  y  $[D]_{50\%}$  respectivamente.

De la misma manera como se ha descrito anteriormente se calcularon las diferencias de energía libre de estabilidad conformacional entre las proteínas libres y con UDP, con el fin de establecer la influencia del ligando en la estabilidad.

## Resultados y discusiones

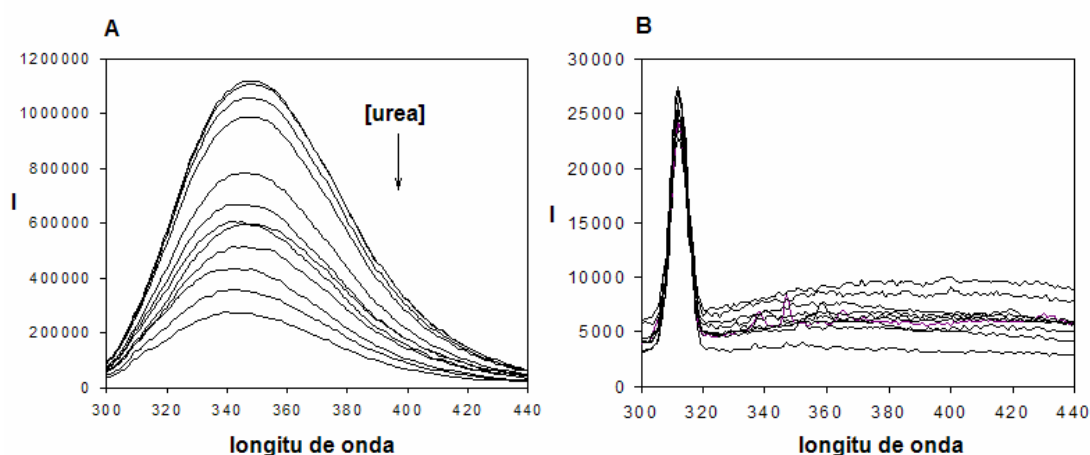
### *Condiciones de desnaturalización*

Los estudios de desnaturalización de la  $\alpha 3$ GT y los mutantes se realizaron siguiendo el protocolo descrito previamente en nuestro laboratorio para la 1,3-1,4- $\beta$ -D-glucan-4-glucanohidrolasa (Pons *et al.* 1997). Después de 12 horas de incubar las reacciones a diferentes concentraciones de urea (0-6M), se realizaron 4 mediciones de emisión de fluorescencia, una cada hora. Los datos así obtenidos fueron similares, demostrándose de esta manera que éste tiempo de incubación es suficiente para alcanzar el equilibrio de desnaturalización. Todas las mediciones de intensidad de fluorescencia se realizaron a pH 7 y a 30°C. Dentro del espectro de emisión de fluorescencia se ha encontrado que el pico máximo se observa a 350nm (figura 6.1), por lo que los valores de intensidad de fluorescencia a ésta longitud de onda fueron utilizados para los cálculos de la estabilidad conformacional para toda la serie de proteínas estudiadas.

**Tabla 6.1.** Condiciones de desnaturalización.

Urea	0 - 6 M
Proteína	20 $\mu$ g/ml
Volumen	1200 $\mu$ l
MnCl <sub>2</sub>	13 mM
UDP-Gal	50 $\mu$ M
Tampón HEPES KCl	(pH) 7
Temperatura	30 °C
Tiempo	12 hrs.





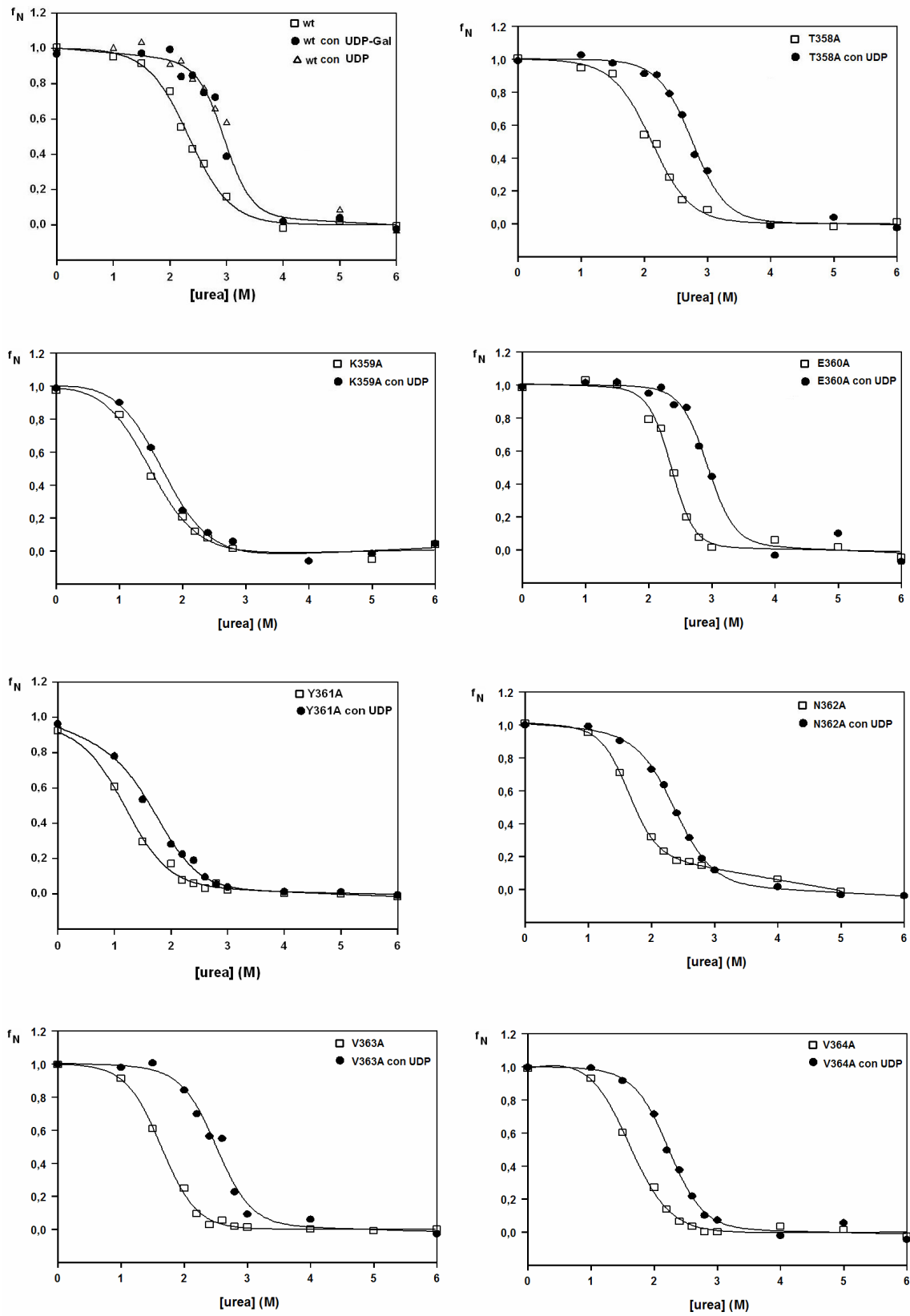
**Figura 6.1.** (A) Variación de la intensidad de fluorescencia emitida por la  $\alpha 3GT$  ( $20\mu g/ml$ ) a diferentes concentraciones de urea, en equilibrio, al excitar a  $\lambda=270nm$ . Nótese que el máximo de emisión corresponde a  $350nm$ . (B) Blanco, emisión en ausencia de proteína a diferentes concentraciones de urea. El pico situado a  $310nm$  corresponde a la señal de Raman del agua. A cada uno de los datos obtenidos para los estudios de desnaturalización se restaron los correspondientes al blanco.

### *Parámetros instrumentales*

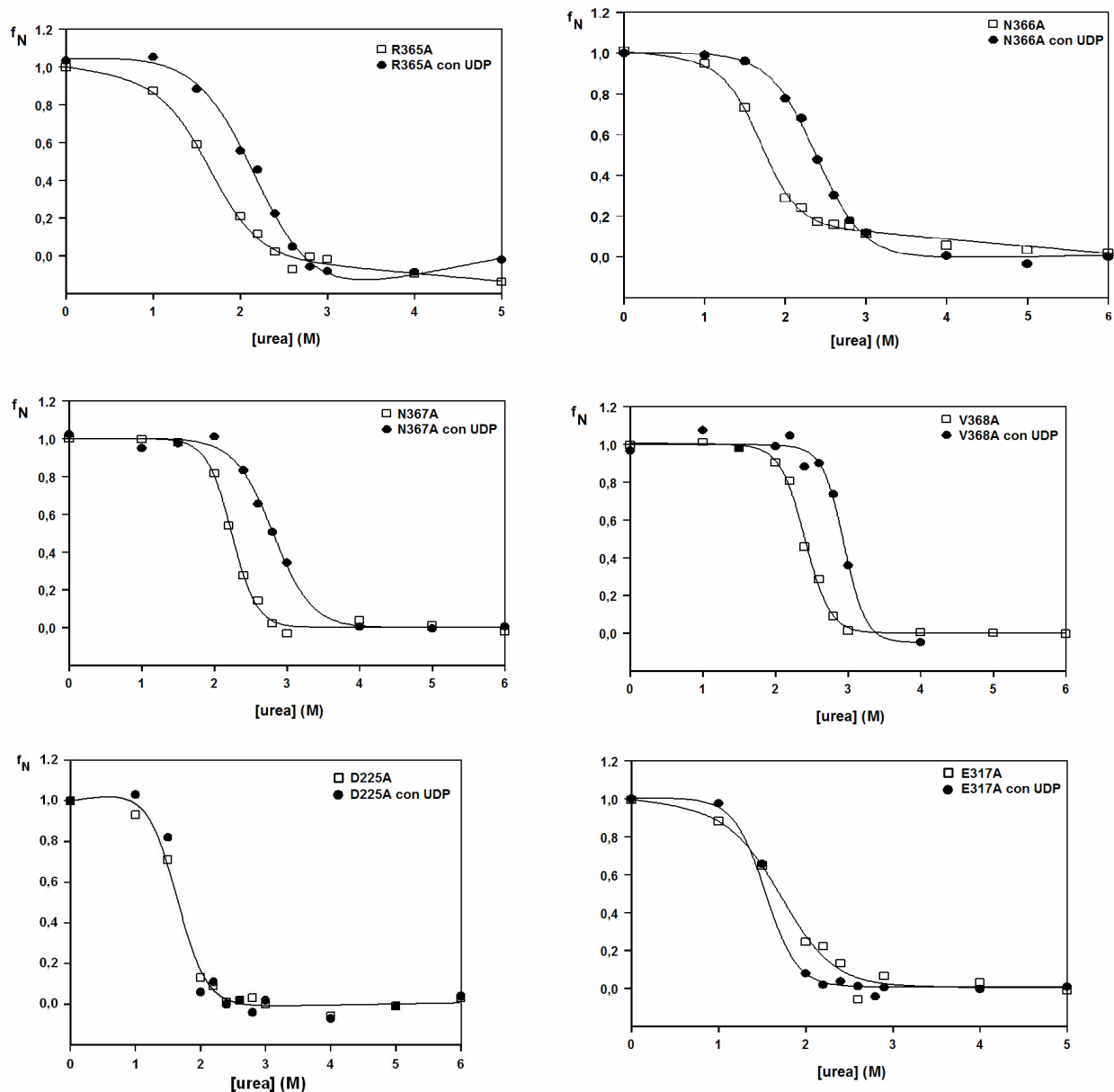
Se estableció una longitud de onda de excitación a  $281nm$ , adecuada para la absorción de los triptófanos, sobretodo considerando aquellos que se encuentra cerca del sitio activo de la  $\alpha 3GT$ , tales como el W249, W250, W250, W314 y W356, entre otros. Por experiencias previas en nuestro laboratorio se ha trabajado con una ventana de excitación ( $slit_{ex}$ ) de  $2nm$  y una ventana de emisión ( $slit_{em}$ ) de  $2nm$ , que da una relación señal ruido adecuada. La señal de emisión se ha registrado en un intervalo de  $300$  a  $450nm$  con un tiempo de integración total de  $1min$ .

### *Estabilidad de mutantes*

En las condiciones de desnaturalización y con los parámetros instrumentales anteriormente descritos fueron analizadas las estabildades de los mutantes del extremo C-terminal de la  $\alpha 3GT$  (T358A, K359A, E360A, Y361A, N362A, V363A, V364A, R365A, N366A, N367A y V368A),



**Figurta 6.2a.** Curvas de equilibrio de desnaturación con urea para la  $\alpha 3GT$  wt y mutantes.



**Figura 6.2b.** (Continuación) Los valores de intensidad de fluorescencia fueron ajustados con la ecuación (27) y normalizados según la ecuación  $f_N = (F - (\alpha_U + \beta_U [D])) / (\alpha_N - \alpha_U + [D](\beta_N - \beta_U))$  donde  $\alpha_U$ ,  $\alpha_N$ ,  $\beta_U$  y  $\beta_N$  son parámetros obtenidos del ajuste a la ecuación (27).

la proteína *wt* y los mutantes del sitio activo D225A y E317A. Para cada una de las proteínas se determinaron los parámetros de estabilidad  $[D]_{50\%}$  y  $m$  ajustando los datos de fluorescencia obtenidos a diferentes concentraciones de urea (de 0 a 6M) a la ecuación (19). La estabilidad de

los mutantes fue comparada con la de *wt*. También se estudio el efecto estabilizador del análogo UDP del sustrato donador en la estabilización de cada mutante.

**Tabla 6.2.** Datos obtenidos del equilibrio de desnaturalización con urea a 30°C para la  $\alpha$ 3GT *wt* y mutantes, en ausencia y presencia del ligando UDP UDP.

Proteína	<i>Sin UDP</i>		<i>Con UDP</i>	
	m (Jmol <sup>-2</sup> )	[D] <sub>50%</sub> (M)	m (Jmol <sup>-2</sup> )	[D] <sub>50%</sub> (M)
<i>wt</i>	6828 ± 883	2,3 ± 0,07	6686 ± 1050	3,1 ± 0,06
T358A	8055 ± 1899	2,1 ± 0,09	9207 ± 1380	2,8 ± 0,05
K359A	7200 ± 1236	1,5 ± 0,07	7876 ± 1068	1,7 ± 0,05
E360A	13052 ± 2592	2,4 ± 0,05	11192 ± 2702	2,9 ± 0,06
Y361A	5618 ± 442	1,2 ± 0,05	5282 ± 329	1,6 ± 0,05
N362A	10447 ± 2329	1,6 ± 0,10	8952 ± 767	2,4 ± 0,03
V363A	9008 ± 1318	1,6 ± 0,08	8600 ± 1420	2,5 ± 0,05
V364A	8489 ± 619	1,7 ± 0,03	8832 ± 1098	2,2 ± 0,04
R365A	9436 ± 716	1,8 ± 0,04	11180 ± 2955	2,3 ± 0,08
N366A	11271 ± 1420	1,7 ± 0,05	8952 ± 767	2,4 ± 0,03
N367A	14739 ± 1872	2,2 ± 0,03	9608 ± 1893	2,8 ± 0,06
V368A	14629 ± 1984	2,4 ± 0,03	17011 ± 6228	2,9 ± 0,07
D225A	13925 ± 1273	1,7 ± 0,03	17812 ± 3836	1,7 ± 0,05
E317A	7503 ± 1118	1,7 ± 0,17	15438 ± 1904	1,6 ± 0,02
promedio	10014		10473	

**Tabla 6.3.** Energías libres de desnaturalización ( $\Delta G_{UN}^{H_2O}$ ) para  $\alpha$ 3GT *wt* y mutantes, determinadas por equilibrio de desnaturalización con urea a 30°C, en presencia y ausencia del ligando UDP.

	<i>Sin UDP</i>	<i>Con UDP</i>	<i>Sin UDP</i>	<i>Con UDP</i>	<i>Con UDP – Sin UDP</i>
	$\Delta G_{UN}^{H_2O}$	$\Delta G_{UN}^{H_2O}$	$\Delta \Delta G$	$\Delta \Delta G$	$\Delta \Delta G$
	(kJ/mol)	(kJ/mol)	(kJ/mol)	(kJ/mol)	(kJ/mol)
<i>wt</i>	23,37	32,02			8,65
T358A	21,19	28,91	2,18	3,11	7,72
K359A	14,85	17,48	8,52	14,54	2,63
E360A	23,61	30,82	-0,24	1,20	7,21
Y361A	11,69	16,59	11,68	15,43	4,90
N362A	16,48	24,94	6,89	7,08	8,46
V363A	16,41	26,27	6,96	5,75	9,87
V364A	16,62	23,38	6,75	8,64	6,76
R365A	17,84	23,98	5,53	8,04	6,14
N366A	16,86	24,94	6,52	7,08	8,08
N367A	22,42	29,41	0,95	2,61	6,99
V368A	24,10	30,67	-0,73	1,35	6,57
D225A	17,12	17,45	6,25	14,57	0,33
E317A	16,93	16,81	6,44	15,21	-0,12

El parámetro que refleja la cooperatividad de transición ( $m$ ) entre el estado plegado y desplegado varía en todas las proteínas estudiadas, con errores estándar muy altos (tabla 6.2, figura 6.2), por lo que se ha considerado el valor promedio  $\langle m \rangle$  para calcular la energía libre de desplegamiento, según la ecuación (20) (tabla 6.3). De esta manera, la estabilidad ha sido determinada únicamente en base al parámetro  $[D]_{50\%}$  que expresa la concentración de urea a la cual el 50% de las moléculas proteicas se encuentran desplegadas, además, éste parámetro es considerado altamente reproducible (Pons *et al.* 1997).

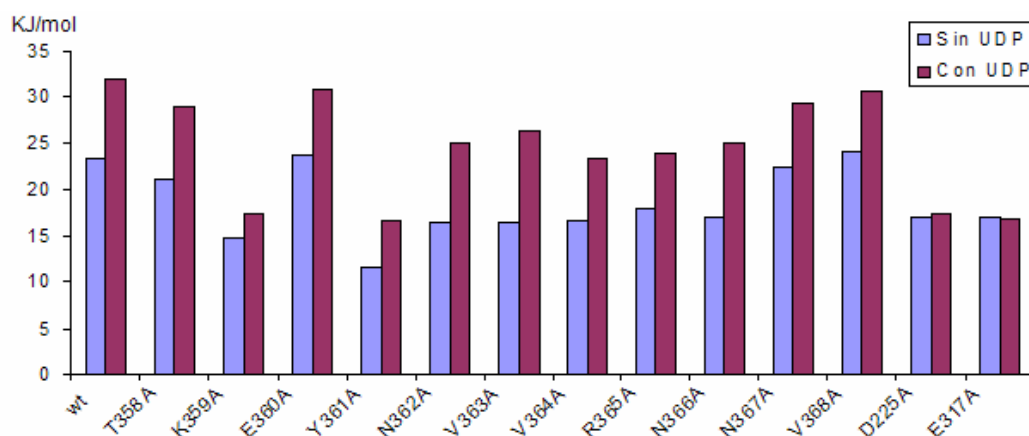
Tomando en cuenta las consideraciones anteriores, se pueden agrupar los mutantes en dos grupos según su estabilidad calculada en términos de energía libre de desplegamiento ( $\Delta G_{UN}^{H_2O}$ ) (tabla 6.4). En el primer grupo están los más estables, incluyendo *wt*, tales son los mutantes T358A, E360A, N367A y V368A con  $\Delta G_{UN}^{H_2O}$  que van de 21 a 24 kJ/mol. Para estos mutantes se puede establecer que la mutación no afecta la estabilidad ya que las energías libres de desplegamiento son similares a *wt*. En el segundo grupo están los mutantes menos estables con  $\Delta G_{UN}^{H_2O}$  que van de 14.85 a 17.84 kJ/mol, tales son: K359A, Y361A, V363A, V364A, R365A, N366A, D225A y E317A. Se destaca que en este segundo grupo están presentes mutantes de los aminoácidos que según las estructuras cristalográficas y modelos existentes para la  $\alpha 3GT$ , interaccionarían directamente con el sustrato donador: K359, Y361 y R365 del extremo C-terminal; D225 del dominio DVD y E317 que por mutagénesis y rescate químico es considerado fundamental en la catálisis (Monegal y Planas, 2006).

#### *Efecto estabilizador del UDP-Gal o UDP*

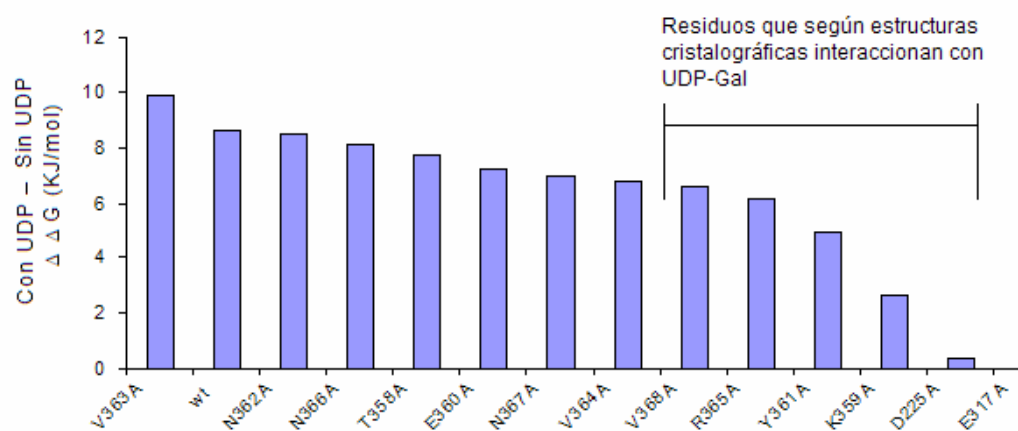
Se determinó el efecto estabilizador de la desnaturalización de la  $\alpha 3GT$  y la serie de mutantes estudiados, añadiendo los ligandos UDP o UDP-Gal en

las mezclas de desnaturalización por urea (tabla 6.1). Para ello, se consideraron dos aspectos. Primero, que la concentración de ligandos no interfiera absorbiendo la luz de excitación, y segundo, que la concentración de ligandos esté por encima del nivel de saturación de sustrato. A concentraciones muy altas de UDP o UDP-Gal (4000 $\mu$ M), se observó que la intensidad de fluorescencia de la disolución de  $\alpha$ 3GT en ausencia de urea, en las condiciones y con los parámetros instrumentales antes descritos (tabla 6.1), disminuye considerablemente, casi hasta el nivel del blanco. El pico máximo de absorción de estos nucleótidos está a 260nm (capítulo 3, figura 3.2) y por tanto no interfieren con el pico de emisión de la proteína a 450nm. Sin embargo, podrían absorber una parte de la luz de excitación (que se da a 270nm), interfiriendo en la excitación de las proteínas. Este problema ha sido solucionado añadiendo concentraciones sustancialmente más bajas de UDP o UDP-Gal. A 50 $\mu$ M, éstos nucleótidos pueden reducir hasta un 20% la intensidad de fluorescencia emitida por la proteínas, lo cual es despreciable, tomando en cuenta que los ajustes a la ecuación (19) se normalizan, tal como se muestra en la figura 6.2b. Por otra parte, 50 $\mu$ M representa más 6 veces la  $K_m$  del donador para *wt*, asegurando una nivel adecuado de saturación del ligando.

Los experimentos realizados revelan que el UDP-Gal o su análogo UDP tienen un efecto estabilizador de la conformación en la  $\alpha$ 3GT *wt* y la mayoría de los mutantes estudiados (figura 6.2a, 6.2b y 6.3), mientras que no para algunos pocos. Los datos obtenidos de los experimentos de fluorescencia fueron ajustados a la ecuación (19) (tabla 6.3) y las energías de desplegamiento fueron calculadas con la ecuación (20) (tabla 6.4). En el caso de la estabilización de *wt* se puede observar que el efecto estabilizante tanto del UDP-Gal como del UDP es prácticamente igual (figura 6.2a), por lo que se ha empleado UDP para analizar la estabilización conformacional de los mutantes.



**Figura 6.3.** Comparación de las energías libres de desplegamiento de los mutantes de la  $\alpha$ 3GT estudiados, en ausencia y presencia del homólogo UDP del sustrato donador. Nótese que los mutantes de residuos que según las estructuras cristalográficas disponibles en el PDB interaccionan con UDP-Gal son los que menos diferencia de energía libre de desplegamiento muestran con y sin UDP (K359A, Y361, D225A, E317A y en menor medida R365A).



**Figura 6.4.** Mutantes de la  $\alpha$ 3GT y wt ordenados según la energía de estabilización en presencia del ligando UDP, de mayor a menor.

Asumiendo que la estabilidad se da por la formación del complejo proteína-UDP, se puede observar que algunos de estos complejos serían más estables que otros (figuras 6.3 y 6.4). Así, el más estable corresponde a *wt*, seguido por V368A, E360A, N367A y T358A con energías que van de 28.9 a 32 kJ/mol. Todos estos mutantes son activos. En un segundo grupo se

pueden agrupar a mutantes con energías de estabilización entre 24.9 y 26.3 KJ/mol: V363A, N362A y N366A, de los cuales, únicamente para V363A no se ha detectado actividad. Lo cual significaría que la mutación permite la interacción con el UDP, pero no proporciona un cambio conformacional favorable para estabilizar el estado de transición. Finalmente, los mutantes V364A, R365A, K359A, Y361A, D225A y E317A presentan energías de estabilización menores a 24 kJ/mol. Como ya se ha explicado antes, de este grupo solamente V364A ha presentado actividad mínima, mientras que para los otros mutantes no se ha detectado actividad. El bajo efecto estabilizador del UDP para los mutantes R365A, y sobre todo para K359A, Y361A, D225A y E317A correlaciona con las estructuras cristalográfica y modelos moleculares, donde los correspondientes aminoácidos interaccionan directamente con el UDP o UDP-Gal.



# CAPÍTULO 7

---

---

**DISCUSIONES ENTORNO A  
LA ESTABILIDAD, ACTIVIDAD  
Y ESTRUCTURA DE MUTANTES  
DEL EXTREMO C-TERMINAL DE LA  
 $\alpha$ -1,3-GALACTOSILTRANSFERASA**

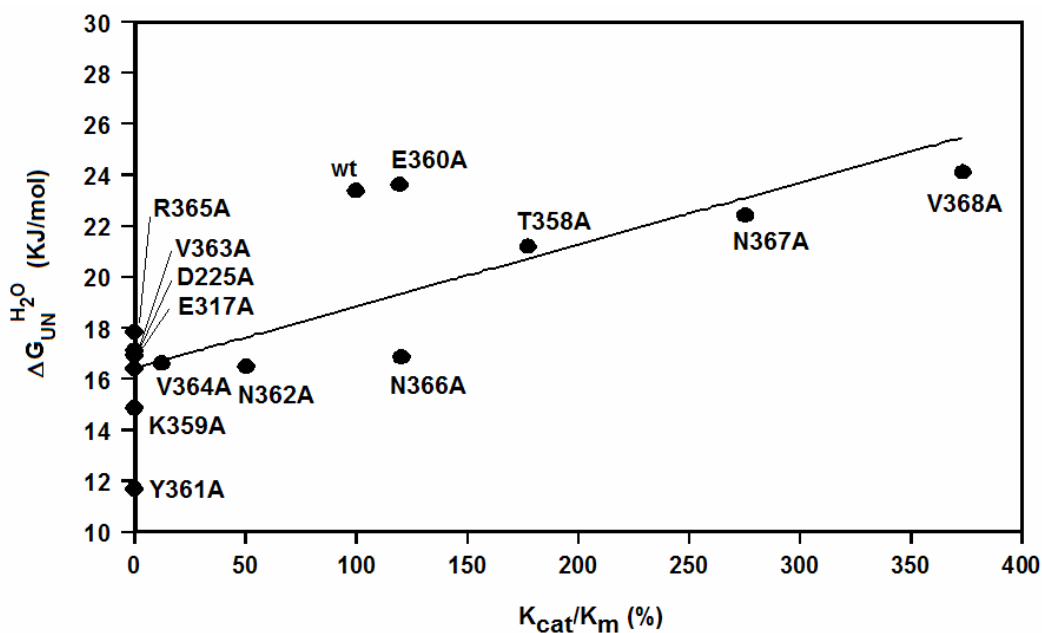
**Capítulo 7.****DISCUSIONES ENTORNO A LA ESTABILIDAD,  
ACTIVIDAD Y ESTRUCTURA DE MUTANTES DEL  
EXTREMO C-TERMINAL DE  
LA  $\alpha$ -1,3-GALACTOSILTRANSFERASA****Introducción**

El extremo C-terminal (aa. 358-368) de la  $\alpha$ -1,3-galactosiltransferasa ( $\alpha$ 3GT) juega un rol clave en la actividad enzimática, sin embargo esta zona ha sido poco estudiada. A pesar de que existen numerosas estructuras cristalográficas (13 a la fecha), ninguna corresponde a un complejo  $\alpha$ 3GT y UDP-Gal, o mejor  $\alpha$ 3GT, UDP-Gal y lactosa. La única estructura cristalográfica que contiene UDP-Gal (Gastinel, et. al. 2001), lastimosamente está truncada en el aminoácido 358. Los otros complejos presentan la zona C-terminal completa (Boix *et al.*, 2001; Boix *et al.*, 2002), pero no tienen al sustrato donador (UDP-Gal), sino al análogo UDP, lo cual no permite establecer claramente las interacciones entre el enzima y los sustratos. Además, los estudios de difracción de rayos X sugieren que esta zona es flexible (Boix *et al.*, 2001; Boix *et al.*, 2002), lo cual podría complicar el estudio cristalográfico de complejos enzimáticos con sustratos.

En la presente tesis doctoral se abordó el estudio del extremo C-terminal desde un enfoque de análisis cinético y de estabilidad de mutantes de alanina de cada uno de los aminoácidos 358-368 (capítulos 5 y 6). De esta manera, la comparación entre eficiencia catalítica y estabilidad enzimática proporcionan un método que permite identificar los aminoácidos que tienen un rol importante en la unión de ligando o en el empaquetamiento estructural (Kellis et al. 1989; Pons et al. 1997). Por otra parte, se construyó un modelo molecular del complejo  $\alpha 3GT/Mn^{+2}/UDP-Gal/Lactosa$  (capítulo 1), que permite predecir posibles interacciones entre la enzima, el cofactor metálico y los dos sustratos. Por tanto, en el presente capítulo, se discuten las posibles correlaciones entre los resultados experimentales y el modelo, de modo que se pueda sugerir la función de cada aminoácido del extremo C-terminal en la actividad y catálisis de la  $\alpha 3GT$ .

### *Eficiencia catalítica y estabilidad*

Una buena correlación entre la eficiencia catalítica ( $k_{cat}^{app}/K_m^{app}$ ) y la estabilidad indica que la actividad enzimática depende de su estabilidad ( $\Delta G_{UN}^{H_2O}$ ). Por tanto, si los mutantes de alanina de un grupo de aminoácidos presentan este comportamiento, significa que estos aminoácidos están involucrados en el empaquetamiento de la proteína. Por otro lado, a los mutantes de alanina de aminoácidos que no muestran una correlación entre  $k_{cat}^{app}/K_m^{app}$  y  $\Delta G_{UN}^{H_2O}$ , se les atribuye funciones diferentes al empaquetamiento, así por ejemplo, si la eficiencia catalítica es muy baja, los aminoácidos estarían interaccionando directamente con los ligandos; pero si la  $k_{cat}^{app}/K_m^{app}$  es muy alta, se interpretaría que los aminoácidos reajustan la conformación de la proteína estabilizando el estado de transición, aun sin tener una interacción directa con los ligandos.



**Figura 7.1.** Eficiencia catalítica ( $k_{cat}^{app}/K_m^{app}$ , del UDP-Gal) versus estabilidad enzimática ( $\Delta G_{UN}^{H_2O}$ ) para  $\alpha 3GT$  *wt* y mutantes. Los valores de  $k_{cat}/K_m$  son presentados en porcentajes relativos a valores de *wt*.

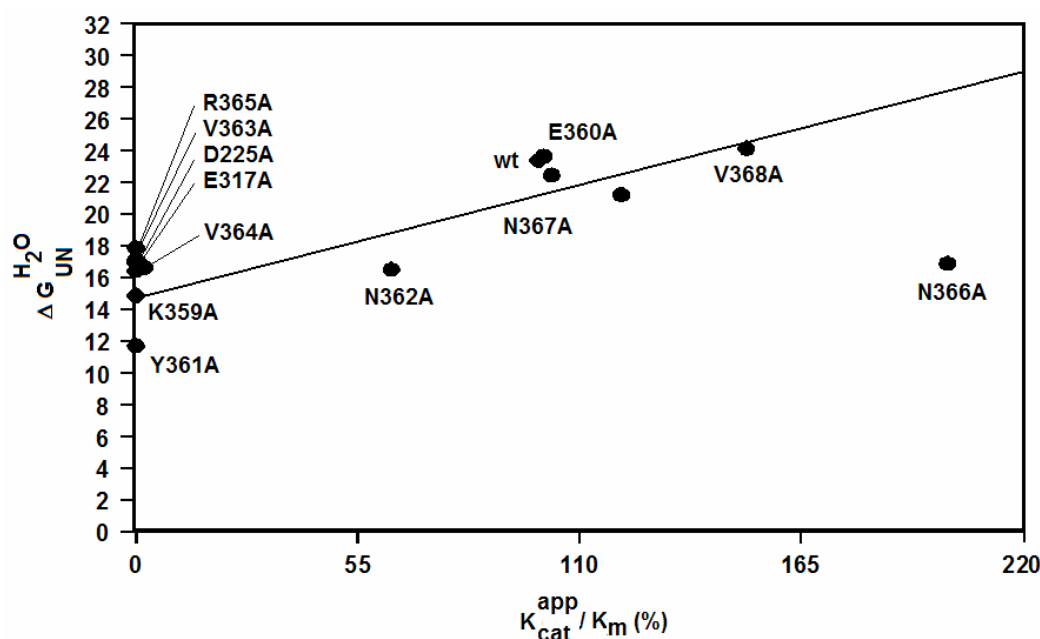
La correlación entre  $k_{cat}^{app}/K_m^{app}$  del UDP-Gal y  $\Delta G_{UN}^{H_2O}$  de los mutantes del extremo C-terminal de la  $\alpha 3GT$  obtenidas en la presente tesis (figura 7.1) permite clasificar a los mutantes en tres grupos. El grupo A (V363A, V364A, N362A, T358A, N367A y V368A) está formado por los enzimas que muestran una buena correlación. Para el mutante V363A no se ha detectado actividad y por tanto es la ordenada en el origen de la recta de correlación (figura 7.1), mientras que los mutantes V364A y N362A son menores al 50% eficientes respecto a *wt*. En estos tres mutantes, la disminución de la  $k_{cat}^{app}/K_m^{app}$  se interpreta como el resultado de un cambio en el empaquetamiento de la estructura inducido por las mutaciones respectivas. En cambio, otros arreglos del empaquetamiento inducidos por las mutaciones T358A, N367A y V368A han inducido una mayor eficiencia catalítica, incluso hasta más de 3 veces la de *wt* en el caso del mutante V368A.

El grupo B de enzimas (*wt*, E360A y N366A) comprende a aquellas que se desvían ligeramente de la correlación  $k_{cat}^{app}/K_m^{app}$  versus  $\Delta G_{UN}^{H_2O}$  (figura 1.7). El mutante E360A muestra una eficiencia muy similar a *wt*, a pesar de ser más estable, la  $k_{cat}^{app}$  es más alta que la de *wt*, especialmente para el sustrato aceptor, pero su afinidad por ambos sustratos es mas baja, especialmente para la lactosa, tal como lo reflejan las  $K_m^{app}$  (capítulo 5). En cambio, el mutante N366A muestra una eficiencia muy similar *wt*, pero una estabilidad menor.

El grupo C (K359A, Y361A y R365A) está compuesto por mutantes, para los cuales no se ha detectado actividad. En orden descendente de estabilidad están R365A, K359A y Y361A (figura 1.7). Otros mutantes, que no pertenecen a la zona C-terminal, pero que están situados en el sitio activo la  $\alpha$ 3GT que tampoco mostraron actividad son el D225A del dominio DVD y el E317A. Los residuos K359, Y361 y R365 interactúan con los fosfatos del UDP en las estructuras cristalográficas. D225 interactúa con el  $Mn^{+2}$ , y éste con el UDP. E317A ha sido propuesto como posible nucleófilo (Gastinel, et. al. 2001), posteriormente se demostró por rescate químico (Monegal y Planas, 2006) que su función catalítica es fundamental. Por tanto los aminoácidos de este grupo están directamente involucrados en interacciones directas con los ligandos.

El mismo análisis anterior, pero tomando en cuenta la eficiencia catalítica para el sustrato aceptor (lactosa) muestra en general, que el efecto de la mayoría de los mutantes es a nivel de empaquetamiento, excluyendo los mutantes sin actividad. Solamente el mutante N366A presenta una desviación clara de la correlación lineal (figura 7.2). Este mutante es más eficiente para la lactosa, sin embargo es menos estable que *wt*. La elevada eficiencia del mutante se debe a la  $k_{cat}^{app}$  que es el doble que de *wt*, a pesar de tener afinidad similar que *wt*, por la lactosa. En las estructuras cristalográficas, el residuo N366 está orientado hacia la superficie de la

proteína y no parece interactuar con ningún otro aminoácido catalítico esencial. Sin embargo, el reemplazamiento de la cadena lateral por un grupo más pequeño (N366A) podría permitir reajustes en la conformación del extremo C-terminal que producen efectos favorables en la estabilización del estado de transición en relación al sustrato aceptor (lactosa).



**Figura 7.2.** Eficiencia catalítica ( $k_{cat}^{app}/K_m^{app}$ , de la lactosa) versus estabilidad enzimática ( $\Delta G_{UN}^{H_2O}$ ) para  $\alpha 3GT$  *wt* y mutantes. Los valores de  $k_{cat}/K_m$  son presentados en porcentajes relativos a valores de *wt*.

Finalmente, se resalta que tanto en las estructuras cristalográficas como en el modelo molecular  $\alpha 3GT/Mn^{2+}/UDP-Gal/Lac$  construido en la presente tesis, los aminoácidos del extremo C-terminal interactúan con el UDP-Gal y en menor medida con la lactosa. El sustrato aceptor se sitúa muy expuesto al disolvente, a diferencia del donador.

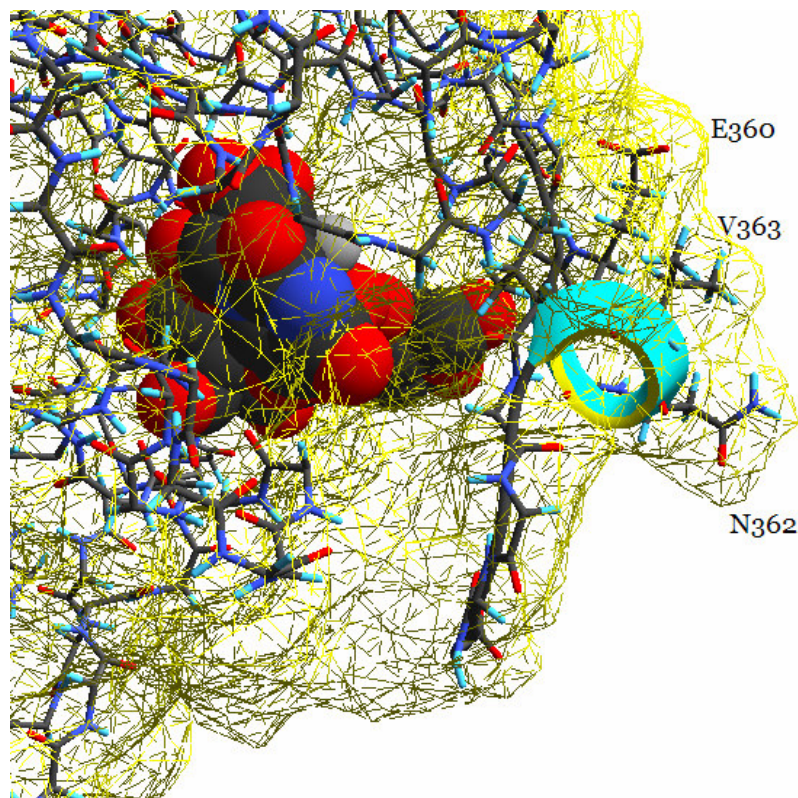
---

*Los mutantes estudiados en contexto del modelo molecular  $\alpha 3GT/Mn^2/UDP-Gal/Lac$ .*

Por las correlaciones entre la  $k_{cat}^{app}/K_m^{app}$  del UDP-Gal y  $\Delta G_{UN}^{H_2O}$ , los mutantes se han clasificado en tres grupos, tal como se ha discutido en el apartado anterior. En el presente apartado, siguiendo el orden de esta misma clasificación, se discuten las funciones de los aminoácidos del extremo C-terminal de la  $\alpha 3GT$  en base al modelo molecular  $\alpha 3GT/Mn^2/UDP-Gal/Lac$  obtenido en la presente tesis (capítulo 1).

*Mutantes del grupo A: V363A, V364A, N362A, T358A, N367A y V368A*

La Val363 es el único aminoácido hidrofóbico de la zona estudiada expuesto a la superficie de la proteína. Tanto en el modelo molecular como en las estructuras cristalográficas está situado justamente en el vértice superior de la única hélice  $\alpha$  y los aminoácidos vecinos más cercanos son el Glu360 y Gln362 de la misma cadena, además de la Arg138 e His142 de la hélice  $\alpha 2$  (figura 7.3). Este mutante no mostró actividad, pero esta carencia de actividad no se puede atribuir a un rol catalítico de la V363, ya que en las estructuras cristalográficas y en el modelo molecular no interacciona con ninguno de los ligandos. Por otra parte, la correlación de la  $k_{cat}^{app}/K_m^{app}$  del UDP-Gal y  $\Delta G_{UN}^{H_2O}$  lo ubican en el grupo de mutantes de aminoácidos que influyen en reordenamientos del empaquetamiento estructural, lo cual es consistente con las estructuras moleculares. Por tanto, el reemplazo de un residuo grande por un grupo más pequeño (V363A) reordenaría el empaquetamiento de la proteína en la zona C-terminal, desfavoreciendo significativamente la estabilidad del estado de transición conduciendo a la pérdida de actividad de la  $\alpha 3GT$  bovina. Además, en  $\alpha 3GT$  de otros organismos, por alineamiento de secuencias (capítulo 1), se puede observar que esta posición está siempre ocupada por un residuo hidrofóbico voluminoso, que en la mayoría de las especies es la leucina.

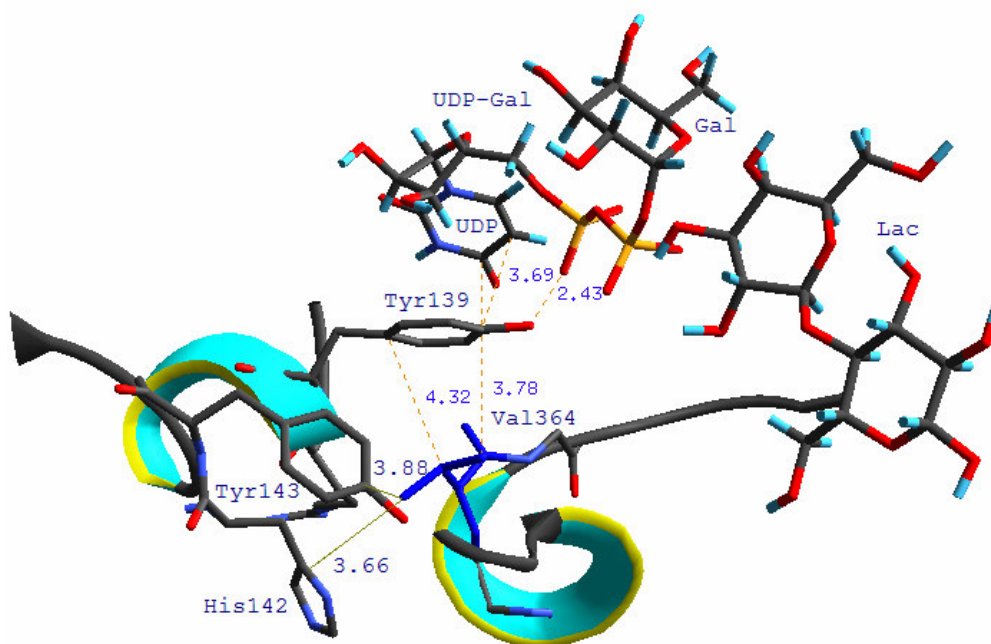


**Figura 7.3.** Extremo C-terminal de la  $\alpha$ 3GT bovina donde se muestra a la valina 363 expuesta a la superficie de la proteína (modelo  $\alpha$ 3GT/Mn<sup>2+</sup>/UDP-Gal/Lac). El UDP-Gal se muestra con volúmenes de Van der Waals.

El mutante V364A muestra la actividad más baja de toda la serie de mutantes (para UDP-Gal 12% respecto a *wt* y 2% para lactosa, aunque la  $K_{mUDP-Gal}^{app}$  es muy similar a la de *wt* (capítulo 5). Sin embargo, la  $K_{mLac}^{app}$  es significativamente superior a *wt*, reflejando una baja afinidad por el sustrato aceptor. La valina 364, a diferencia de la valina 363 está orientada hacia el interior de la proteína e interacciona con las porciones hidrofóbicas de la Arg138, Tyr139, His142 y Tyr143 (figura 7.4). No interacciona directamente con ninguno de los ligandos, sin embargo lo hace con la Tyr139 que a su vez interacciona tanto con el anillo de uridina del UDP como con el fosfato  $\alpha$  del UDP (figura 7.4). Posiblemente, la baja afinidad del mutante V364A por el aceptor se deba a una modificación en

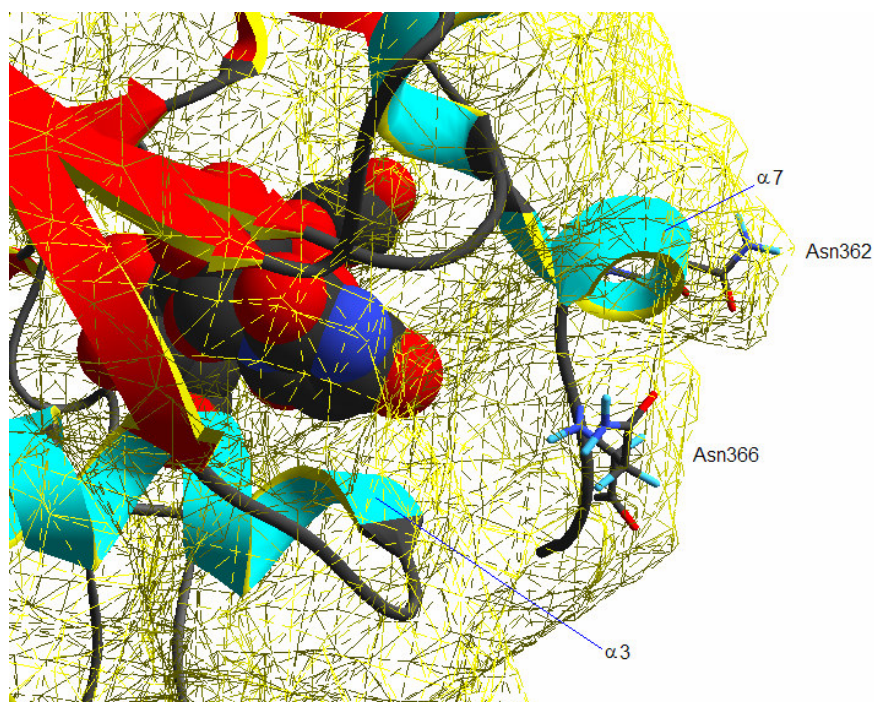


el arreglo de conformación de la zona C-terminal, disminuyendo la capacidad de unión para el aceptor, sin embargo, tal modificación no afectaría la afinidad por el donador, que según los análisis cinéticos, la  $K_{mUDP-Gal}^{app}$  (9.067  $\mu$ M) del mutante es prácticamente similar a *wt* (8.024  $\mu$ M).



**Figura 7.4.** Interacciones de la valina 364 (en azul) con residuos vecinos (modelo  $\alpha$ 3GT/Mn<sup>2+</sup>/UDP-Gal/Lac).

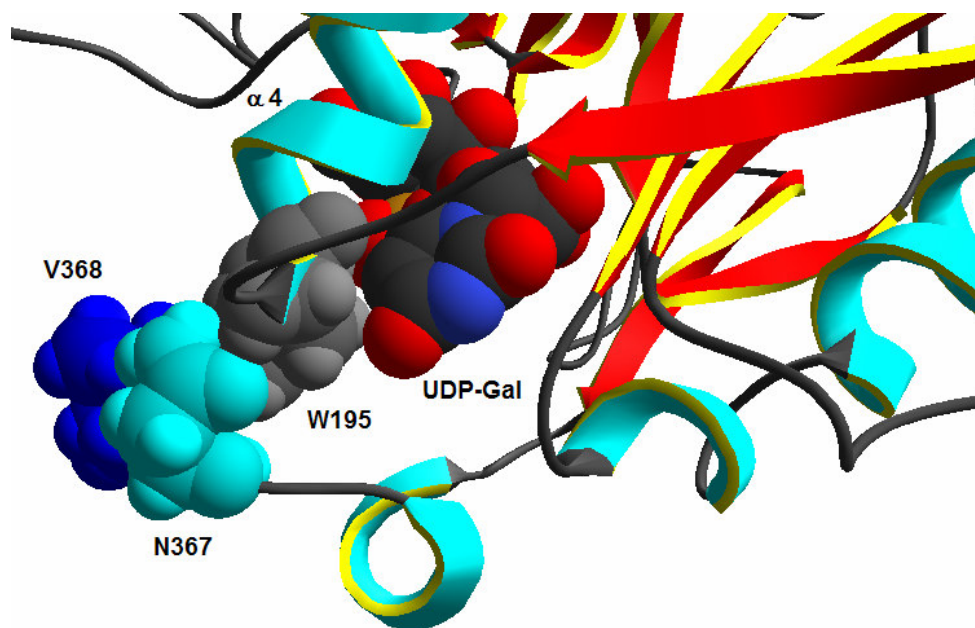
La N362 tiene la cadena lateral expuesta al disolvente, en las estructuras moleculares (figura 7.5). De modo que no interaccionan con ninguno de los ligandos. La disminución de su eficacia catalítica se atribuye a una disminución de su estabilidad, datos que son consistentes con su ubicación de este aminoácido en las estructuras moleculares. Al igual en que en los anteriores mutantes, el reemplazo de la cadena lateral, por un grupo más pequeño (N362A) conduciría a una conformación que desfavorece la estabilización del estado de transición.



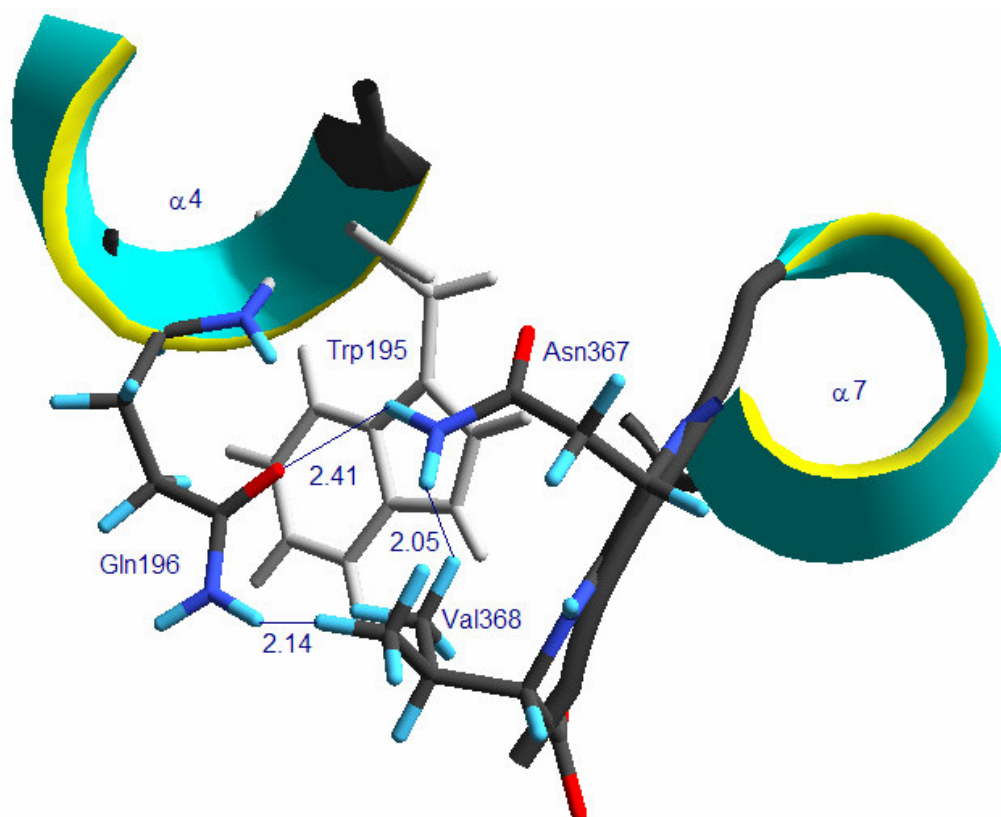
**Figura 7.5.** Situación de los aminoácidos Asn362 y Asn366 de la zona C-terminal en el  $\alpha 3$ GT (modelo  $\alpha 3$ GT/Mn<sup>2+</sup>/UDP-Gal/Lac).

A diferencia de los anteriores mutantes, T358A, N367A y V368A tienen eficiencias catalíticas más altas que *wt*. Estructuralmente, la sustitución de un grupo voluminoso por otro más pequeño, como la alanina, resulta en una mejor estabilización del estado de transición, aumentando la eficiencia catalítica, especialmente en N367A y V368A, hasta 2 y 3 veces respectivamente, en relación a la  $k_{cat}^{app}/K_m^{app}$  de *wt*. Los aminoácidos N367 y V368 son los últimos del extremo C-terminal y sus cadenas laterales están orientadas hacia el interior de la proteína, interaccionando con el W195 de la hélice  $\alpha 4$ , que a su vez interacciona directamente con los fosfatos del UDP-Gal (figura 7.6). La afinidad por el UDP-Gal en los mutantes N367A y V368A es tres veces mayor que la de *wt*, además la  $k_{cat}^{app}$  de V368A es casi el doble que de *wt*.

A



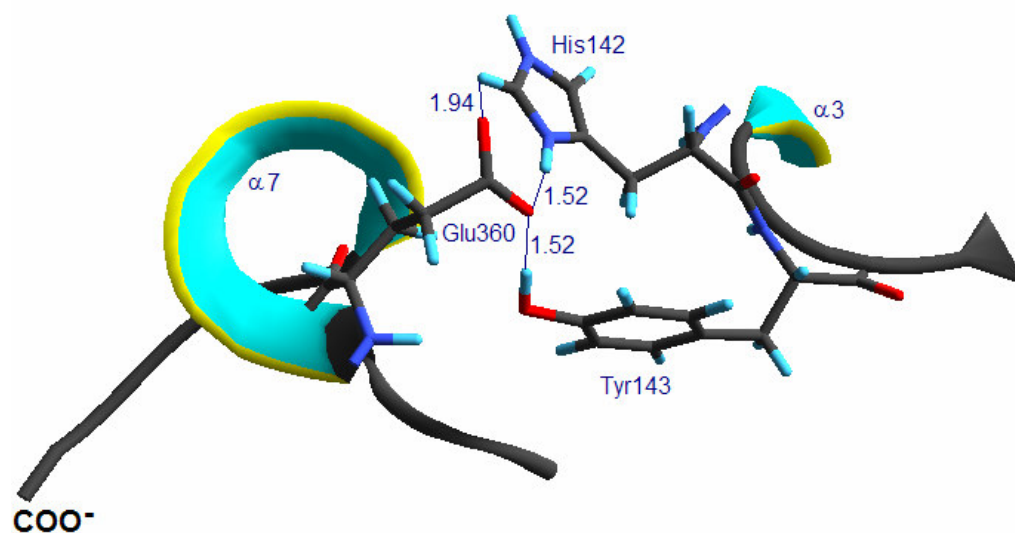
B



**Figura 7.6.** Interacciones de la asparagina 367 y valina 368 con el triptófano 195. (A) Interacción con el UDP-Gal y (B) distancias entre los aminoácidos vecinos (modelo  $\alpha$ 3GT/Mn<sup>2+</sup>/UDP-Gal/Lac).

*Mutantes del grupo B: E360A y N366A*

La relación entre la eficiencia catalítica y estabilidad de estos mutantes se desvía ligeramente de la correlación lineal, lo cual sugiere que los aminoácidos E360 y N366 tienen mayor influencia en el empaquetamiento de la proteína que en la interacción directa con ligandos. Estructuralmente, ninguno de éstos aminoácidos tiene la cadena lateral orientada hacia la cavidad catalítica de la enzima. El glutamato 360 interactúa con la histidina 142 y la tirosina 143 (figura 7.7). El reemplazo del grupo lateral polar y voluminoso por alanina en el mutante E360A no modifica su estabilidad respecto a *wt*. Los estudios cinéticos de este mutante muestran que la afinidad por el UDP-Gal disminuye ligeramente, mientras la  $k_{cat}^{app}$  se incrementa hasta 1.4 veces la de *wt*, por tanto la eficiencia es solo ligeramente superior del *wt*.

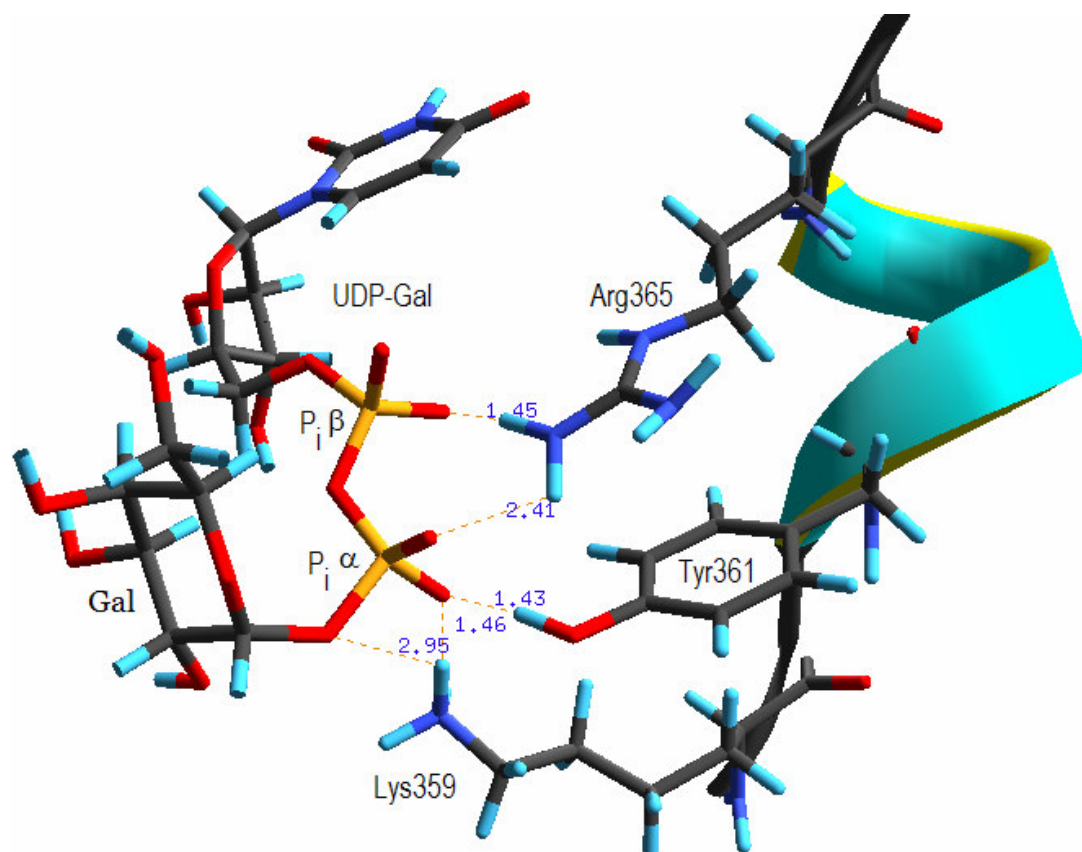


**Figura 7.7.** Interacciones del glutamato 360 con aminoácidos de la hélice  $\alpha 3$  (modelo  $\alpha 3GT/Mn^2/UDP-Gal/Lac$ ).

La asparagina 366 tiene la cadena lateral expuesta al disolvente (figura 7.5). El reemplazo de la cadena lateral por alanina (N366A) disminuye la polaridad y también el volumen del residuo, que se traduce en una disminución de la estabilidad. Sin embargo, su posición alejada del sitio activo no afecta significativamente la eficiencia catalítica.

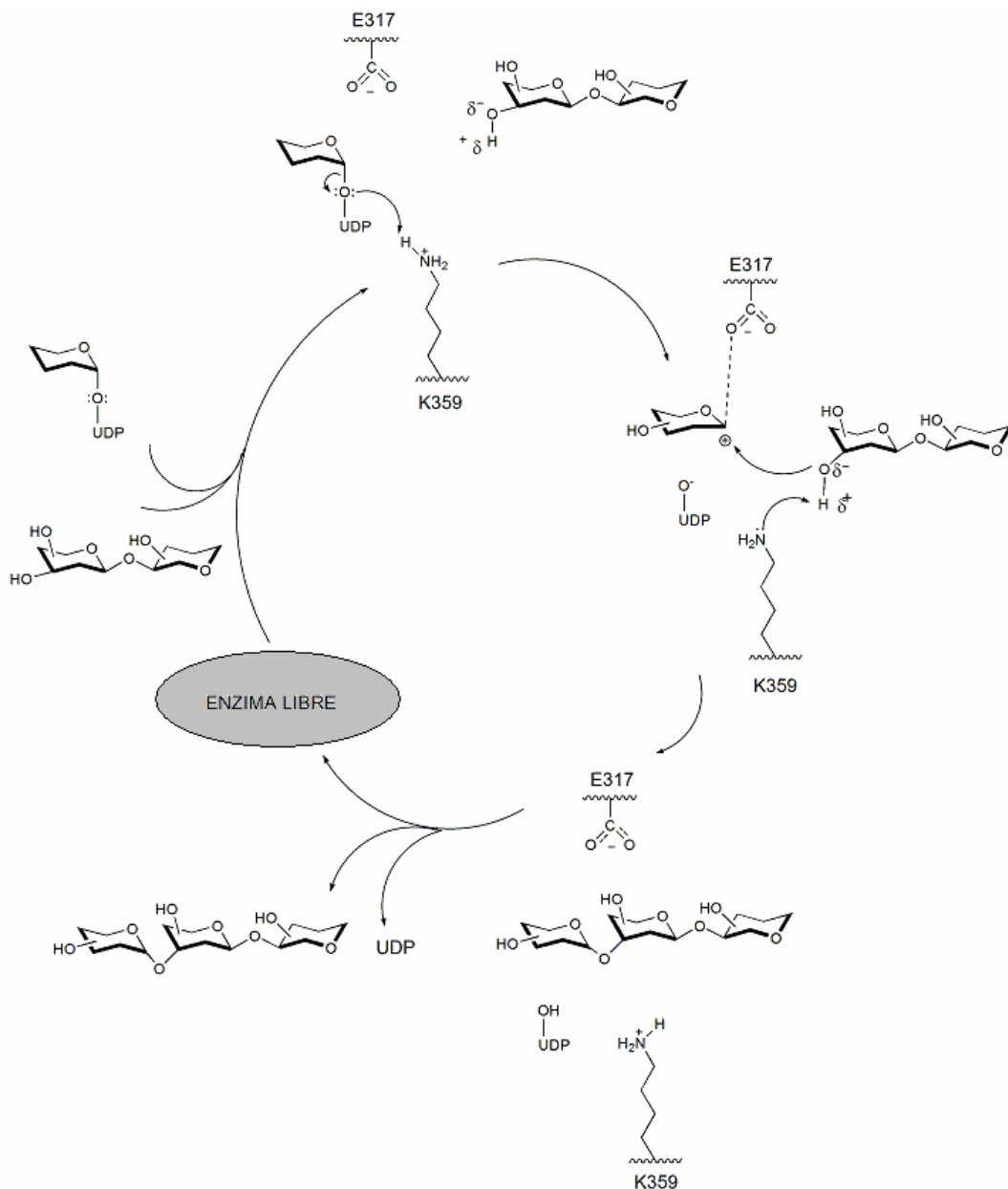
#### *Mutantes del grupo C: K359A, Y361A y R365A*

Los aminoácidos K359, Y361 y R365 interactúan directamente con el sustrato donador (figura 7.8). Consiguientemente, sus respectivos mutantes de alanina no son capaces de interactuar con el ligando, lo cual se ve reflejado por la actividad no detectada de éstos mutantes.



**Figura 7.8.** Interacciones de los residuos Arg365, Tyr361 y Lys359 con los fosfatos del UDP-Gal en el modelo  $\alpha$ 3GT/Mn<sup>2+</sup>/UDP-Gal/Lac.

La Lys359 es de especial interés por ser el aminoácido que se sitúa más cerca de los átomos de ambos sustratos participantes en la reacción, según el modelo  $\alpha 3\text{GT}/\text{Mn}^{+2}/\text{Gal-UDP}/\text{Lactosa}$ . Los resultados experimentales han demostrado que su sustitución por alanina da un mutante cuya actividad no se ha detectado, lo cual sugiere su importancia catalítica y ha llevado a proponer su rol como posible base general en la reacción, catalítica, como se ha explicado en el capítulo 1 (figura 7.9):



**Figura 7.9.** Rol de la lisina 359 como base general en la catálisis de transglucosilación de la  $\alpha 3\text{GT}$ .

La lisina 359, podría actuar como ácido contribuyendo a la hidrólisis del enlace entre la galactosa y el UDP, posteriormente como base activando la nucleofilia de la lactosa o N-acetilactosamina.

En conclusión, los estudios cinéticos y de estabilidad de mutantes de alanina de cada uno de los aminoácidos 358-368 (capítulos 5 y 6) fueron muy consistentes con las estructuras moleculares de los complejos y el modelo obtenido con ambos sustratos, permitiendo establecer las funciones de cada uno de los aminoácidos del extremo C-terminal de la  $\alpha_3$ GT.

# **CONCLUSIONES**

---

---



## CONCLUSIONES

1. A partir de estructuras cristalográficas, se desarrollaron dos modelos moleculares de la  $\alpha$ 3GT, el primero con sustratos UDP-Gal y lactosa, y el segundo con el producto. Ambos complejos moleculares obtenidos han permitido inferir las principales interacciones de los residuos del extremo C-terminal con los ligandos, y se ha propuesto la función de la lisina 359 que actuaría como catalizador ácido base.
2. Se obtuvieron mutantes del extremos C-terminal de la  $\alpha$ 3GT: T358A, K359A, E360A, Y361A, N362A, V363A, V364A, R365A, N366A, N367A y V368A, los cuales se expresaron en *E. coli* BL21(DE3) y se purificaron por cromatografía de afinidad obteniéndose buenos rendimientos, es decir en cantidades suficientes para realizar experimentos de caracterización cinética y de estabilidad, como proteínas con purezas  $\geq 95\%$ . Todas las proteínas recombinantes tienen procesada la metionina inicial en el extremo N-terminal, siendo el primer residuo, glicina.
3. Se ha desarrollado un método para estudios cinéticos de glicosiltransferasas, basado en HPCE sin derivatización de sustratos ni productos, donde se monitoriza la formación del UDP generado como subproducto. Este método rápido y versátil puede aplicarse a otras reacciones enzimáticas donde hay participación de nucleótidos o azúcar nucleótidos.
4. Se validó un ensayo radiométrico suficientemente sensible (límite de cuantificación =  $0.28\mu\text{M}$ ) para detectar bajas concentraciones de

producto de la transglucosidación catalizada por la  $\alpha$ 3GT, necesario para estudiar velocidades iniciales de la enzima.

5. Se caracterizaron cinéticamente los mutantes del extremo C-terminal de la  $\alpha$ 3GT. Para K359A, Y361A, V363A y R365A no se ha detectado actividad, por lo cual, los aminoácidos correspondientes son fundamentales para la actividad  $\alpha$ 3GT. K359, Y361 y R365 interaccionan con los fosfatos del UDP-Gal, además K359A también interacciona con el hidroxilo 3 de la lactosa en el modelo molecular, por lo cual se ha propuesto un nuevo mecanismo de reacción donde K359 jugaría un rol fundamental como ácido/base. Por otra parte, los mutantes N367A y V368A resultaron ser de 2 a 3 veces más activos que *wt*, respectivamente.
6. Los estudios de estabilidad de la  $\alpha$ 3GT y de los mutantes del extremo C-terminal mediante desnaturalización en equilibrio en urea, revelan que *wt* y mutantes de residuos no involucrados directamente en la interacción con los sustratos, presentan mayor estabilidad, que aquellos que según los modelos moleculares y las estructuras cristalográficas, interaccionan directamente con el UDP o UDP-Gal. Por otra parte, se encontró que la presencia de UDP estabiliza al enzima *wt*, mientras que este efecto estabilizador del UDP disminuye en mutantes de residuos directamente implicados en las interacciones con el UDP-Gal, tales como K359A, Y361A y R365A del extremo C-terminal. Al eliminar la cadena lateral que interacciona con el UDP, la presencia del ligando prácticamente no afecta a la estabilización.

# **MATERIALES Y METODOS**

---

---

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Capítulo 1

#### **Modelización molecular de complejos de la $\alpha$ -1,3-galactosiltransferasa con sustratos y producto**

##### *Alineamientos de secuencias*

Los alineamientos dobles de secuencias fueron realizados con el programa SIM utilizando la matriz Blosum62 (servidor ExPasy <http://www.expasy.org>). Los alineamientos múltiples fueron realizados con el programa Multalin versión 5.4.1, con la matriz Blosum62 (<http://www.expasy.org>). Las secuencias empleadas fueron tomadas del GenBanc según los códigos de acceso que se indican las tablas 1.2 y 1.3.

##### *Modelización molecular*

Los modelos estructurales de las proteínas iGb<sub>3</sub> y Forss-S fueron generados a partir de la homología de secuencias con las de  $\alpha$ 3GT, GT-A y GT-B, y utilizando como moldes las estructuras cristalográficas de éstas últimas tres proteínas. El programa empleado fue Swiss-Model, disponible partir del servidor ExPasy. La validación de los modelos se realizó por sobreposición de éstos con estructuras cristalográficas conocidas de la  $\alpha$ GT, GT-A y GT-B.

El modelo del complejo  $\alpha$ 3GT/UDP-Gal/lactosa/Mn<sup>+2</sup> fue construido utilizando como base las coordenadas atómicas de la estructura cristalográfica 1GWV (Boix, et. al. 2001) que contiene UDP y lactosa. El UDP fue removido de 1GWV y en su lugar se ancló la UDP-Gal en la misma conformación en la que está presente UDP-2F-Gal para el complejo cristalizado LgtC/UDP-2F-Gal/Mn. Previamente, el flúor fue sustituido por el grupo correspondiente a la galactosa. Posteriormente se seleccionó una esfera de radio 12Å cuyo centro se hizo coincidir con el centro del sitio

activo de la enzima. Esta zona fue sometida a varios ciclos de optimización geométrica mediante mecánica molecular utilizando el campo de fuerzas CHARM con parametrización para azúcares. El algoritmo empleado fue Steepest Descent, con gradiente de optimización de 0.1 Kcal/(Å mol).

El modelo del complejo  $\alpha$ 3GT/UDP/producto/Mn<sup>+2</sup> fue obtenido a partir del modelo previamente construido  $\alpha$ 3GT/UDP-Gal/lactosa/Mn<sup>+2</sup>. La adecuada orientación y distancia del O3 de la lactosa hacia el C $\alpha$  ha facilitado trazar el enlace entre estos dos átomos, a la vez que se eliminó el enlace del C $\alpha$  con el oxígeno del UDP. A continuación se seleccionó una esfera de radio 12Å cuyo centro se hizo coincidir con el del sitio activo de la enzima. La zona seleccionada se sometió a varios ciclos de optimización molecular de la misma manera que se explicó en el párrafo anterior.

## Capítulo 2

### Mutagénesis dirigida de residuos del extremo C-terminal de la $\alpha$ -1,3-galactosiltransferasa, expresión y purificación

#### *Cepas y vector:*

Cepa de clonación: *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (Life Technologies) (02EcDH5 $\alpha$ 0400II), genotipo: F<sup>-</sup>  $\phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ (lacZYA-argF)U169 *deoR recA1 hsdR17*(r<sub>K</sub>, m<sub>K</sub><sup>+</sup>) *phoA supE44  $\lambda$  thi-1 gyrA96 relA1*.

Cepa de expresión: *Escherichia coli* BL21 DE3 (Novagen) (03EcBL21DE3a0500I), genotipo: F<sup>-</sup> *ompT hsdS<sub>B</sub> gal dcm* (DE3).

Plásmido pET15b- $\alpha$ 3GT/s. Vector pET15b (Novagen) conteniendo el gen del dominio catalítico de la enzima  $\alpha$ -1,3-galactosil transferasa bovina.

#### *Medios de cultivo:*

Medio LB (*Luria Bertani*): En un litro de agua destilada se disuelve 10 g de bacto triptona (*Scharlau*), 5 g de extracto de levadura (*Scharlau*) y 5 g de cloruro de sodio (*Panreac*). Se ajusta el pH a 7.0 con NaOH 5 N. La mezcla se autoclava a 126 °C por 26 minutos.

Medio 2YT: En un litro de agua destilada se disuelve 16 g de bacto triptona (*Scharlau*), 10 g de extracto de levadura (*Scharlau*) y 5 g de cloruro de sodio (*Panreac*). Se ajusta el pH a 7.0 con NaOH 5 N. La mezcla se autoclava a 126 °C por 26 minutos.

### *Preparación de células competentes*

Se utilizó el método químico mediante lavados celulares con  $CaCl_2$  (Sambrook J y Russell DW: 2001). Todo el proceso de preparación de células competentes se realiza de forma estéril y utilizando materiales y reactivos previamente autoclavados. A partir de una colonia única de células se realiza un cultivo en 3 ml de medio líquido 2YT, que se incuba a 37°C y 300 rpm *overnight*. 300 µl de este cultivo se inoculan a 30 ml de medio de cultivo 2YT y se incuba a 37°C y 300 rpm hasta alcanzar una densidad óptica aproximada de 0.3 a 600 nm. El cultivo se mantiene a 0°C durante 20 minutos y se centrifuga a 3000 rpm, a 4°C por 10 min. Se elimina el sobrenadante y el botón celular se resuspende cuidadosamente (por pipeteo) en 15 ml de  $CaCl_2$  50 mM a 4°C. Se mantiene la suspensión en frío a 0°C durante 15 minutos, luego se centrifuga a 3000 rpm, a 4°C por 10 min y nuevamente se elimina el sobrenadante, el botón celular se resuspende en 3 ml de  $CaCl_2$  50 mM frío. Las células así tratadas se conservan a 4°C y pueden ser transformadas en 4 horas, aunque la máxima eficacia de transformación se consigue al cabo de 16 a 24 h. Para utilizar las células competentes en posteriores experimentos se pueden conservar a -20 °C, añadiendo un 15 % de glicerol a la suspensión celular.

### *Transformación*

Se utilizó el método de transformación por shock térmico. En diferentes tubos de *Eppendorf* que contienen 100  $\mu$ l de células competentes se añaden 50 ng del DNA plasmídico en volúmenes inferiores a 5  $\mu$ l y se agita cuidadosamente. Se aconseja transformar con diferentes diluciones de DNA stock para asegurar la obtención de colonias aisladas, y también realizar un control negativo añadiendo 5  $\mu$ l de agua autoclavada y un control positivo con un plásmido de referencia (PUC19), para comprobar la eficacia de las células competentes preparadas. Las células tratadas con el DNA y los respectivos controles, se incuban a 0°C durante 30 min, posteriormente se someten a un shock térmico, llevándolas a 42°C durante 2 min e inmediatamente a 0°C por 5 min. Posteriormente se adicionan 300  $\mu$ l de medio de cultivo 2YT y se incuban 45 min a 37°C para inducir la expresión de  $\beta$ -lactamasa, que proporciona la resistencia a la ampicilina en células transformadas con DNA plasmídico conteniendo el gen correspondiente a la  $\beta$ -lactamasa. Estas células se siembran en placas de LB suplementadas con 100  $\mu$ l de ampicilina (20 mg/ml) y se cultivan a 37°C hasta 12 h, para evitar la formación de colonias satélites.

#### *Obtención de DNA plasmídico.*

Se utilizaron *kits* comerciales de *mini* y *midiprep*, según la cantidad de plásmido que se requería según el tipo de experimento. Para realizar un *screening* de diferentes clones de colonias transformadas para detectar la presencia de una determinada mutación se realizaron *minipreps*. Para obtener stocks de plásmidos mutantes confirmados se realizaron *midipreps*. Los *kits* empleados fueron *midiprep Wizard* de Promega (#A7640), y *miniprep Wizard* de Promega (#A7640).

#### *Electroforesis analítica de DNA en gel de agarosa.*

*Tampones.* Tampón 50x TAE: 242 g Tris-base, 57.1 ml AcOH glacial, 100 ml EDTA 0.5 M (pH 8.0) ó 18.5 g EDTA sólido. Enrasar a 1 lt con agua

destilada. La disolución de trabajo es 40 mM de tris-acetato y 1 mM de EDTA. Tampón de carga 10x: 500 mg glicerina, 200 µl EDTA 0.5 M (pH 8.0), 100 µl SDS 10%, 200 Ml azul de bromofenol (E. Merck, 12.5 mg/ml), 200 µl xilencianol (Eastman Kodak). Añadir agua desionizada hasta 1 ml.

*Marcador de peso molecular. DNA molecular Weight Marker III (Boehringer Mannheim GmbH):*

<i>pb</i>	<i>ng de MIII en 1 µL</i>	<i>ng de MIII en 3 µL</i>
21226	109.4	328
5148	26.5	79
4973	25.6	77
4268	22.0	66
3530	18.2	54
2027	10.5	31
1904	9.8	29
1584	8.2	24
1375	7.1	21
947	4.9	15
831	4.3	13
564	2.9	8.7
125	0.6	2
$\Sigma=48502$	$\Sigma=250$	$\Sigma=750$

*Preparación del gel.* Se disuelve 0.25 g de agarosa en 25 ml de agua *milli Q* y posteriormente se lleva la disolución a ebullición. Se deja enfriar y luego se añaden 500 µl de tampón TAE 50X agitando suavemente y 1.25 µl de bromuro de etidio (10 mg/ml en tampón TAE). Antes de que gelifique la agarosa, se transfiere a un molde y se coloca un peine de plástico para formar los pocillos de carga en el gel. Se deja gelificar durante 30 min.

*Preparación de las muestras.* Se Preparan 10 µl de diluciones de la muestra de DNA en agua *milli Q* autoclavada, de forma que la cantidad total de DNA estimada sea de 10 a 30 ng y se añade 1 µl de tampón de carga.

*Procedimiento:* Cuando el gel está completamente gelificado se introduce en la cámara electroforética y se añaden 250 ml del tampón de



electroforesis TAE 1x, previamente preparado por dilución del estock 50x. Se cargan 10 µl de la muestra en cada pocillo del gel, y en uno de ellos el marcador de peso molecular. Finalmente se conecta la cámara electroforética a la fuente de alimentación, a un potencial de 70 V por 1.5 h. Las bandas de DNA en el gel se visualizan a través de un transiluminador de luz ultravioleta.

### *Cuantificación de DNA*

*Cuantificación por electroforesis.* Se cuantifica por comparación de la intensidad de la banda o bandas de interés de DNA muestra, con bandas patrón de marcador que corresponden a cantidades conocidas de DNA, según la siguiente ecuación:

$$ngDNA = \frac{n^{\circ} pb \text{ banda de intensidad equivalente (muestra)}}{\sum pb \text{ de todas las bandas del marcador}} \times ng_{\text{totales del marcador cargado}}$$

El marcador utilizado es el *DNA Molecular Weight Marker III* (Boehringer Mannheim GmbH), ver apartado 1.3.

*Cuantificación por espectrofotometría.* Se determina la concentración de DNA espectrofotométricamente por el método de las adiciones, leyendo a 260 nm, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$Abs = \varepsilon \cdot b \cdot [DNA] \cdot fd$$

donde: *Abs* = absorbancia,  $\varepsilon$  = coeficiente de extinción molar, *b* = camino óptico (1 cm),  $[DNA]$  = concentración de DNA y *fd* = factor de dilución. Obteniendo la pendiente la curva se calcula la concentración de DNA:

$$[DNA] = \frac{b}{\varepsilon \cdot b}$$

Los coeficientes de extinción molar para diferentes tipos de DNA son:

<i>Tipo de DNA</i>	$\epsilon_{260}$ ( $\mu\text{g}^{-1} \text{ ml cm}^{-1}$ )
oligonucleótidos	0.050
ssDNA	0.025
dsDNA	0.020

*Secuenciación por el método BigDye Terminator v2 (ABI Prism, PE).*

En un tubo de Eppendorf autoclavado se prepara la siguiente mezcla de reacción: 1  $\mu\text{l}$  DMSO 50%, 4  $\mu\text{l}$  ( $\approx 200$  ng) de dsDNA (circular o plasmídico) a secuenciar, 1.5  $\mu\text{l}$  de primer 5 pmol/ $\mu\text{l}$  (T7 promotor o T7 terminador) y 9.5  $\mu\text{l}$  de agua autoclavada. La mezcla de reacción se lleva a termociclador y se ejecuta el siguiente programa:

<i>PASO</i>	<i>TEMPERATURA</i>	<i>TIEMPO</i>
1	98 °C	5 min
2	94 °C	3 min
3	96 °C	30 seg
4	50 °C	15 seg
5	60 °C	4 min
6	29 veces a partir del paso 3	
7	4 °C	Infinito
8	End	

Terminado el paso 1, se pone en pausa el programa para llevar los tubos a hielo por 1 min, luego se añaden 4  $\mu\text{l}$  de *Premix* adjunto en el *Kit* y 15  $\mu\text{l}$  de aceite mineral para evitar la evaporación. Los tubos se llevan nuevamente al termociclador y se pone en marcha el programa de los pasos 2 a 8. Finalizados los ciclos de reacción, se procede con la eliminación de los dNTPs no incorporados, para ello se transfieren 18  $\mu\text{l}$  de la mezcla de reacción a nuevos tubos de *Eppendorf* y se añaden 19  $\mu\text{l}$  de agua autoclavada y 61  $\mu\text{l}$  de etanol. La mezcla se mantiene 10 min en hielo, luego se centrifuga a temperatura ambiente durante 20 min a 13 200 rpm y se elimina el sobrenadante por aspiración. Se añaden 200  $\mu\text{l}$  de disolución de etanol al 70 %, se centrifuga 2 min a 13 200 rpm y se elimina el sobrenadante por aspiración. Se deja secar el pellet en un desecador y se envían *estas* muestras al Servicio Científico Técnico de la Universidad de

Barcelona para la electroforesis capilar de secuenciación. Los cromatogramas y secuencias se leen y analizan con el programa CROMAS2.

### *Mutagénesis dirigida por PCR total*

*Diseño de oligonucleótidos (primers) mutagénicos.* Longitud adecuada, entre 25 y 45 mononucleótidos. La mutación deseada debe estar flanqueada por alrededor de 15 nucleótidos por cada lado. Ambos oligonucleótidos mutagénicos deben contener la mutación deseada alineada en la misma secuencia de la cadena opuesta. El primer nucleótido a adicionarse (extremo 3') en la reacción de polimerización debe corresponder al de adenina para ambas cadenas. La temperatura de fusión ( $T_m$ ) máxima no debe superar a la temperatura de elongación. La temperatura de hibridación (annealing) se sugiere que esté cerca de 2°C por debajo de la  $T_m$  para evitar la formación de repeticiones. Los oligonucleótidos óptimamente tendrían que tener un mínimo de GC de 40%, y tendrían que terminar en una o más nucleótidos de C o G. Los oligonucleótidos se diluyen a una concentración de 100µM.

*Mezcla de reacción para la DNA polimerasa PfuTurbo.* Tampón de reacción (10x para *PfuTurbo*) 5µl (1X). DNA molde (doble cadena) de 5 a 50ng. Oligonucleótido mutagénico #1, 0.25µM. Oligonucleótido mutagénico #2, 0.25µM. Mezcla de dNTPs, 0.2mM. DNA polimerasa *PfuTurbo* 2.5U (se añade al final). Agua milli Q hasta completar un volumen total de 50µl.

*Mezcla de reacción para la EcoZyme.* Tampón de reacción (10x para *EcoZyme*) 5µl (1X). DNA molde (doble cadena) de 5 a 50ng. Oligonucleótido mutagénico #1, 0.25µM. Oligonucleótido mutagénico #2, 0.25µM. Mezcla de dNTPs, 0.2mM.  $MgCl_2$  de 1.5 a 4mM. DNA polimerasa

*EcoZyme* 2.5U (se añade al final). Agua milli Q hasta completar un volumen total de 50µl.

*Ciclos de temperatura.* (Paso 1) Desnaturalización inicial 95°C, 30s. (Paso 2) Desnaturalización 95°C, 30s. (Paso 3) Hibridización. la temperatura de hibridización depende de las características del oligonucleótido, y debe ser unos 2°C menor que la temperatura de fusión ( $T_m$ ), la cual se calcula según el la siguiente ecuación:

$$T_m = 81.5 + 0.41(\%CG) - 675/N - \% \text{bases desapareadas}$$

donde N es la longitud del oligonucleótido mutagénico. (Paso 4) Elongación: para *PfuTurbo*, 2min/Kb a 68°C, para *EcoZyme* 10nmoles de dNTPs/30min a 72°C, el tiempo depende del tamaño del plásmido. (Paso 5) Volver al Paso 2 de 25 a 30 veces. (Paso 6) Conservación a 4°C indefinidamente.

*Digestión con Dpn1.* Añadir 1µl de la enzima Dpn1 al producto crudo de la PCR total. Incubar la reacción por 12 horas a 37°C. Finalmente, se transforma células *E. coli* DH5α con 10 µl del crudo de la reacción.

*Expresión de la α-1,3-galactosiltransferasa.*

*Tampones y reactivos.* IPTG (*Isopropil-β-tiogalactósido*): 100 mM. PMSF (*Fluoruro de fenilmetasulfonyl fosfato*): 100 mM en etanol. Disolución de lisis: 0.25 ml de tampón de lisis BB (4x), 20 µl de lisozima (10 mg/ml), 10 µl de Triton X-100, 2 µl de DNAsa (20 mg/ml), 10 µl PMSF (100 mM) y volumen necesario de agua para aforar a 1 ml. Tampón BB: 2M NaCl, 80mM tris-HCl: 9.69g /L tris-HCl, 116.88g/L, pH 7.9.

*Transformación de vectores de expresión e inducción de la expresión.* Se transforman (como en el apartado 1.1.2) las células competentes BL21(DE3) con el plásmido de interés, y de la placa de transformantes se

selecciona una colonia, que se siembra en una placa LB para obtener colonias únicas. Se prepara un pre-inóculo de 4 ml de medio LB a partir de una colonia única. Se incuba a 37°C y 300 rpm hasta que se aproxime a una DO (600 nm) de 0.8. Posteriormente, se transfiere 1 ml del de pre-inóculo a 1 lt de medio LB, y se incuba o/n a 300 rpm y 37°C. Finalmente, la expresión se induce con 800 µl de IPTG (100 mM) durante 4 h a 30°C y 250 rpm.

*Lisis celular.* La  $\alpha$ -1,3-galactosiltransferasa es una proteína expresada en el medio intracelular, por tanto, se debe llevar a cabo una lisis celular. La lisis puede ser realizada con lizozima o por sonicación, con ésta última técnica se obtuvo mejores resultados cuando la expresión se realizó en volúmenes de cultivo mayores a 200 ml (recomendable para la purificación preparativa de proteína). En ambas técnicas se centrifuga el cultivo durante 10 minutos a 8000 rpm y 4°C para separar el medio de cultivo del sedimento bacteriano. El medio extracelular se descarta.

*Lisis por sonicación.* El botón celular se resuspende en tampón BB 1x de modo que concentre 1/10 el volumen inicial del cultivo. Mantener la muestra en todo momento en un baño de hielo. Se añade PMSF, que es un inhibidor de proteasas, de manera que la concentración final de PMSF sea de 1 mM. El PMSF se hidroliza y se ha de renovar cada 30 minutos. El sonicador se limpia con NaOH (1 M), agua *Milli-Q* y tampón BB 1X. Se sonica la disolución aplicando los siguientes parámetros: *Output control*= 5.5 y *Duty Cycle*= 40 %. Se realizan pulsos de sonicación durante 30 s y se dejan transcurrir 10 min entre pulsos para evitar que la temperatura de la suspensión supere los 10°C. El proceso de sonicación tiene una duración aproximada de 1 hora 30 minutos para cultivos de 200 ml y de 45 minutos para cultivos de 5 ml.

La suspensión resultante de la lisis se centrifuga a 10000 rpm y 4°C durante 15 min para separar la fracción citoplasmática soluble de la insoluble, que contiene los restos de las paredes y membranas celulares,

entre otros. Para analizar el contenido de la fracción intracelular insoluble por electroforesis en gel de acrilamida, se resuspende añadiendo SDS y se agita con vortex y/o se aplica ultrasonido. Tanto las muestras de la fracción soluble como la resuspendida en SDS pueden ser desnaturalizadas y cargadas en el gel. La fracción soluble interesa para purificar la enzima activa, por ello se filtra (0.22  $\mu\text{m}$ ) y se carga a la columna previamente acondicionada como se explica más adelante.

*Análisis de expresión por electroforesis de proteínas SDS-PAGE.*

*Disoluciones.* Disolución A: Acrilamida / bis-acrilamida 30 %, Mix ratio 91:1 (Sigma) filtrada con filtro de 0.2  $\mu\text{m}$ . Disolución B: Tris-HCl 1.5 M; 9.08 g tris-base (Merk), añadir 40 ml de agua milli Q y ajustar el pH a 8.8 con HCl 5 N y enrasar a 50 ml con agua milli Q. Disolución C: Tris-HCl 0.5 M; 3 g tris-base (Merk), añadir 30 ml de agua milli Q, ajustar el pH a 6.8 con HCl 5 N y enrasar a 50 ml con agua milli Q. Disolución D: SDS 10 %; 10 g SDS (Scharlau), 100 ml agua milli Q. Disolución G: Persulfato amónico 20 %; 100 mg  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_7$  (Bio-Rad), 0.5 ml agua milli Q. Preparar cada vez, justo antes de utilizar. Disolución Coomassie: disolver al 1 % la disolución Coomassie Brilliant Blue R (Sigma) en una mezcla AcOH, MeOH y agua (2:9:9). Disolución desteñidora: 50 % agua destilada, 40 % MeOH y 10% AcOH. Marker Low Range de Bio-Rad.

*Tampones.* Tampón de carga: 4 ml agua milli Q, 1 ml Tris-HCl 1.5 mM, 0.8 ml glicerina (Merk), 1.6 ml SDS 10 % (p/V), 0.4 ml  $\beta$ -mercaptoetanol (Bio-Rad), punta de espátula de bromofenol (Bio-Rad). Tampón de electroforesis 5x: 7.5 g de Tris-base (Merk), 36 g glicina (Merk), 2.5 g SDS (Scharlau), añadir 40<sup>o</sup> ml de agua milli Q y ajustar el pH a 8.3 con HCl 5 N. Enrasar a 500 ml de agua.

*Preparación del gel.* Se utilizó una celda electroforética *Mini-PROTEAN*® de Bio-Rad. Primero se prepara el *gel separador* (14 % en acrilamida): en

un vaso de precipitados se mezclan 2.75 ml de Agua Milli Q, 100 µl de disolución D, 2.5 ml de disolución B y 4.6 ml de disolución A; se agita y se añaden 50 µl de disolución G y 5 µl de TEMED. Con esta mezcla se llena el bolsillo de vidrio hasta 2 cm por debajo de la superficie total, luego se vierte cuidadosamente agua *Milli Q*. Se espera a que la mezcla gelifique, aproximadamente 30 min. Luego se prepara el *gel apilador* (4 % en acrilamida): en un vaso de precipitados se mezclan 6.1 ml de agua *Milli Q*, 100 µl de disolución D, 2.5 ml de disolución C y 1.3 ml de disolución A; se agita y se añaden 50 µl de disolución G y 10 µl de TEMED. Se elimina el agua previamente añadida en el bolsillo de vidrio, utilizando papel filtro, posteriormente se completa el llenado del bolsillo de vidrio con esta mezcla que dará lugar al gel apilador. Justo después de verter la mezcla se coloca el peine que definió los pozos de carga entre los dos vidrios que forman el bolsillo. La gelificación tiene una duración de 30 minutos.

*Carga de las muestras y del marcador de pesos moleculares.* El gel polimerizado se coloca en el soporte de electroforesis y se introduce en la celda electroforética. Se prepara el *tampón de electroforesis* (70 ml de tampón 5x más 280 ml de agua *Milli Q*) y se vierte en la cavidad central de la celda electroforética hasta llenarla completamente, el resto se vierte en la cavidad principal de la celda.

*Marker Low Range de Bio-Rad:* en un tubo de *Eppendorf* se vierten 2 µl del marcador de pesos moleculares, 4 µl de *tampón de carga* y 14 µl de agua *Milli Q*, se mezcla por pipeteo.

Cada muestra se prepara en un tubo de *Eppendorf*: se vierten 10 µl de muestra, 4 µl de *tampón de carga* y 6 µl de agua *Milli Q*, se mezcla por pipeteo.

Tanto el marcador de pesos moleculares como las muestras preparadas se centrifugan a 10 000 rpm por 10 s, y se introducen a un baño termostático a 95°C durante 10 minutos. Se dejan enfriar, se centrifugan nuevamente a 10 000 por 10, s y cargan 20 µl en cada pozo del gel con una jeringa *Hamilton* y utilizando un accesorio de guía que viene adjunto con el *kit*. Una vez concluida la carga se retira el accesorio de guía y se pone la tapa de la celda electroforética con la polaridad correcta. La electroforesis se realiza a 160 V y dura aproximadamente 1 h.

*Tinción y revelado.* Se extrae el gel del bolsillo y se lleva a un recipiente conteniendo disolución de *Coomasie* para la tinción. El recipiente se lleva a un agitador orbital por un período de 15 a 30 min. Posteriormente se elimina o recicla la disolución de *Coomasie* y se procede con el revelado, que consiste en decolorar el gel hasta que se distingan las bandas correspondientes a las proteínas, lavándolo con la *disolución desteñidora* en un recipiente y con agitación orbital. El gel revelado se puede conservar a temperatura ambiente dentro de una bolsa plástica sellada conteniendo agua *Milli Q* para evitar su deshidratación.

#### *Purificación de proteínas por cromatografía de afinidad HiTrap Chelating Column*

*Stock de tampones 4x:* Todos los buffers deben prepararse con H<sub>2</sub>O milliQ y filtrarse por 0.45µ. Tampon de carga (*Charge buffer*) 200 mM NiSO<sub>4</sub>: para 250 ml, 13,14g NiSO<sub>4</sub>·6H<sub>2</sub>O (262.85g/mol). Tampón de quitado de Ni (*Strip buffer*, SB) 400mM EDTA, 2M NaCl, 80mM Na<sub>i</sub>PO<sub>4</sub>: para 250 ml, 686,5mg Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O, 2.17g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 29.22g NaCl, 37.23g EDTA (372.24g/mol), pH 7.4. Tampón de unión (*Binding buffer*, BB) 2M NaCl, 80mM tris-HCl: 9.69g /L tris-HCl, 116.88g/L, pH 7.9. Tampón de elución (*Elution buffer*, EB) 2M NaCl, 80mM tris-HCl, 1M imidazol: 4.846g /500ml tris-HCl, 58.44g / 500ml NaCl, 68.08g / 500ml imidazol, pH 7.9.



*Acondicionamiento de la columna.* La columna se lava con 5 volúmenes (25ml) de agua *Milli-Q*, evitando la entrada de aire a la columna. El catión metálico se carga haciendo pasar pasan 7 volúmenes (35ml) de *Charge Buffer*. Finalmente se lava con 3 volúmenes (15ml) de agua *milliQ*.

*Carga de las proteínas.* Se equilibra la columna con 5-10 volúmenes (25-50ml) de *Binding Buffer* a un flujo de 5ml/min. Posteriormente se aplica la muestra resuspendida en *Binding buffer*. El volumen de muestra no es crítico si las proteínas de interés se unen fuertemente a la columna con las condiciones del tampón de carga.

*Lavados.* Inicialmente se lava con 10 volúmenes de *Binding Buffer* (50ml). Posteriormente, se hace pasar el volumen suficiente de *Binding Buffer* como para conseguir el lavado de todas las proteínas que no se retengan en columna.

*Elución.* Se eluye con un gradiente de imidazol de 0 a 0.5M imidazol (100 ml).

*Limpieza columna y preservado.* Concluida la elución de la proteína, se procede con la limpieza de la columna, tal como sigue a continuación: quitar el níquel de la columna con 5 volúmenes de *Strip Buffer*, lavar con 5 volúmenes de H<sub>2</sub>O *milliQ* y finalmente lavar con 5 volúmenes de EtOH al 20% (en H<sub>2</sub>O *milliQ*).

### **Capítulo 3**

#### **Método de electroforesis capilar para análisis de azúcar nucleótidos y ensayos enzimáticos de glicosiltransferasas**

*Reactivos.* UDP-galactosa, UDP-glucosa, UDP-N-acetilgalactosamina, lactosa, UDP y HEPES (*Sigma*). Patrón (2mg/ml) de albúmina sérica bovina (BSA) (*Pierce*). Ácido 8-aminonaftalen-1,3,6-trisulfónico (ANTS) (*Fluka*).

*$\alpha$ -1,3-Galactosiltransferasa bovina recombinante.* Dominio catalítico de la  $\alpha$ -1,3-galactosiltransferasa bovina (aminoácidos 80-368) expresado en *E. coli* BL21(DE3) y purificado por cromatografía de afinidad, tal como se describe en el capítulo 2.

*Condiciones de reacción para la  $\alpha$ -1,3-galactosiltransferasa.* La mezcla de reacción enzimática se preparó con UDP-Gal 1000 $\mu$ M, lactosa 10mM, MnCl<sub>2</sub> 13mM, BSA 0,13mg/ml, KCl 13mM, HEPES, pH 7.0, y la enzima  $\alpha$ -1,3-galactosiltransferasa. Se incubó a 30°C y se fueron tomando alícuotas de 20 $\mu$ l en diferentes intervalos de tiempo. Para cada alícuota se paró la reacción calentando a 98°C por 30s (previamente se estudió la hidrólisis térmica del UDP-Gal con método radiactivo, que se describe en el capítulo 4), se enfrió y se añadió 5 $\mu$ l de patrón interno ANTS (50 $\mu$ M, concentración final). Las muestras así obtenidas se llevaron a electroforesis capilar.

#### *Análisis por electroforesis capilar*

La electroforesis capilar se realizó en un equipo Hewlett-Packard HP<sup>3D</sup> CE G1600 AX equipado con un detector de *diodo array* UV-Vis. El capilar (72cm de longitud, 50 $\mu$ M de diámetro interno, sílica fundida con una burbuja de extensión para el paso de la luz en la ventana de detección) fue tratado o regenerado con 0.1M de NaOH, agua desionizada y tampón (50 $\mu$ M de ácido fosfórico ajustado a pH2.5 con trietil amina) de corrida (por 30, 10 y 10 min, respectivamente).

Las muestras se inyectaron hidrodinámicamente con una presión de 50mbar por 12s. El acondicionamiento entre inyecciones consistió en el equilibrado con tampón de corrida durante 5min. La electroforesis se realizó a 30kV y a temperatura constante de 30°C. Se utilizó el detector de *diodo array* UV/Vis y los electrofoerogramas fueron obtenidos a una longitud de onda de 270nm (20-nm *slit*).

## Capítulo 4

### Validación de ensayo radiométrico para estudios cinéticos de la $\alpha$ -1,3-galactosiltransferasa

*Reactivos y equipos.* Uridine diphosphate galactose [galactose-1-3H(N)] 9.1Ci/mmol (0.1mCi/ml). Líquido de centelleo biodegradable EcoLite™ (NC882475). Resina Dowex 1x8 (intercambio aniónico cloruro) 100g (200-400 mesh) (Fluka 44339). Minivials C Roth Art. 5404.1 2000 Stück OptiPhase 'HiSafe' 3 Perkin Elmer # 1200-437.

#### *Validación del método radiométrico*

Se validaron el margen de linealidad del método, la repetibilidad, los límites de detección y cuantificación mediante la realización de una recta patrón a partir de una disolución *stock* 150 $\mu$ M UDP-Gal\*. El ratio radioactivo:no radioactivo se optimizó en el desarrollo del método como 1/1000 (mol/mol) para un determinado estoc de UDP-Gal radioactivo. Al cambiar la actividad específica entre los diferentes estocs de UDP-Gal radioactivo, lo que se hizo fue mantener el ratio en volúmenes de la disolución radioactiva con la de no radioactivo UDP-Gal 0.5mM (1:21) en todos los experimentos realizados, para obtener el mismo factor de respuesta.

A partir de la disolución 50 $\mu$ M UDP-Gal\* se prepararon una serie de diluciones (25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78, 0.39) y se contó la radioactividad presente en cada una de ellas durante 2 minutos. Se representó la recta patrón y se determinó el margen de linealidad a través del factor de respuesta ( $f \pm 15\%$ ). La repetibilidad se evaluó a dos niveles distintos de concentración (0.78 y 50 $\mu$ M) con 6 repeticiones; y los límites de cuantificación y detección se calcularon a partir de la señal del blanco de agua milli-Q.

#### *Estudio de la reacción catalizada por la $\alpha$ 3GT*

La reacción se sigue en discontinuo tomándose alícuotas de 20µl a determinados tiempos, y adicionándolas sobre un Eppendorf con 100µl de EDTA 0.1M a 4°C que provoca la detención de la reacción. Las muestras se mantienen en hielo durante el tiempo que dura el ensayo, tras el cual se procede a la cromatografía de intercambio aniónico.

Por cada una de las muestras se prepara una mini-columna a partir de una punta de 1ml en cuya parte inferior se ha añadido un poco de fibra de porcelana que ejerce de soporte. Entonces se añaden 400µl de la resina Dowex (1600µl de la disolución preparada), y se pasan 800µl de agua milli-Q. A continuación se añaden los 120µl procedentes del crudo de reacción y se eluyen con 0.2+0.3+0.4ml de agua milli-Q directamente sobre el vial de centelleo. Se adicionan 4ml de líquido de centelleo al vial y se cuenta la radioactividad durante 2 minutos.

- **Reacción en condiciones estándar**

La reacción se hace en 90µl de volumen y se toman 4 muestras de 20µl cada una. Las condiciones estándar para la determinación de actividad son las siguientes: 50µM UDP-Gal\* 1/1000 (ó 1/639), Lac 10mM, MnCl<sub>2</sub> 13mM, BSA 0,13mg/ml, tampón HK 1X, pH 7.0 y T=30 °C. Los enzimas wt y H315A se estudian en dilución 1/10 en BB1x suplementado con Mn<sup>2+</sup> 13mM y BSA 0.13mg/ml; sin embargo el resto de enzimas de actividad muy inferior (E317A, D316A, D225A, A282G) en disolución estoc de BB1x.

## **Capítulo 5**

### **Caracterización cinética de mutantes del extremo C-terminal de la α-1,3-galactosiltransferasa**

Tampón de reacción HK: KCl 13mM, HEPES, pH 7.0,

*Actividades específicas*

Las reacciones enzimáticas fueron monitorizadas mediante el método radiométrico según la metodología descrita en el apartado anterior. Las condiciones de reacción fueron: lactosa 10mM, UDP-(1-<sup>3</sup>H-galactosa) 50uM, MnCl<sub>2</sub> 13mM, BSA 0,13mg/ml, tampón HK pH 7, temperatura 30 °C, volumen total 90ul. Se cuantificó la formación de producto cada 3 minutos.

*Parámetros cinéticos*

La  $K_m^{app}$  y la  $k_{cat}^{app}$  para el UDP-Gal se obtuvieron a partir de la monitorización de diferentes reacciones a concentraciones de UDP-Gal entre 8 y 250µM, para cada uno de los enzimas mutantes. Posteriormente, los datos se ajustaron al modelo de Michaelis Menten. A continuación se describe el procedimiento de preparación de cada una de las mezclas de reacción:

Stocks y condiciones de reacción:

Stocks		Condiciones de reacción	
Lactosa	100 mM	Lactosa	10 mM
UDP-Gal*	500 µM	UDP-Gal*	variable µM
UDP-Gal*	250 µM		
MnCl <sub>2</sub>	130 mM	MnCl <sub>2</sub>	13 mM
BSA	2 mg/ml	BSA	0,13 mg/ml
tampón HK	10 X	tampón HK	1 X
		pH	7
		T°	30 °C
Enzima	0,1327 µM	Enzima	0,0037 µM
		Volumen	90 µl

Preparación de mezclas de reacción:

[UDP-Gal*] (µM)	UDP-Gal* (µl)	Agua (µl)	Lactosa (µl)	MnCl <sub>2</sub> (µl)	BSA (µl)	HK (µl)	Enzima	
8	2,9	51,77	9	9	5,85	9	2,5	Stock UDP-Gal* 250 uM
12	4,3	50,33	9	9	5,85	9	2,5	
20	7,2	47,45	9	9	5,85	9	2,5	
30	10,8	43,85	9	9	5,85	9	2,5	
40	14,4	40,25	9	9	5,85	9	2,5	
50	9,0	45,65	9	9	5,85	9	2,5	Stock UDP-Gal* 500 uM
100	18,0	36,65	9	9	5,85	9	2,5	
250	45,0	9,65	9	9	5,85	9	2,5	

Para cada reacción se monitorizó la cinética tomando alícuotas de 20µl cada 3 minutos. El análisis de las muestras fue mediante detección de radiactividad por contador de centelleo como ya se ha descrito en la sección de materiales y métodos del capítulo 4.

La  $K_m^{app}$  y la  $k_{cat}^{app}$  para la lactosa se obtuvieron a partir de la monitorización de diferentes reacciones a concentraciones de lactosa entre 0.5 y 15mM, para cada uno de los enzimas mutantes. Posteriormente, los datos se ajustaron al modelo de Michaelis Menten. A continuación se describe el procedimiento de preparación de cada una de las mezclas de reacción:

Stocks y condiciones de reacción:

Stocks		Condiciones de reacción	
Lactosa	100 mM	Lactosa	<i>variable</i> mM
UDP-Gal*	500 µM	UDP-Gal*	50 µM
Lactosa	10 µM		
MnCl <sub>2</sub>	130 mM	MnCl <sub>2</sub>	13 mM
BSA	2 mg/ml	BSA	0,13 mg/ml
tampón HK	10 X	tampón HK	1 X
		pH	7
		T°	30 °C
Enzima	0,1327 µM	Enzima	0,0037 µM
		Volumen	90 µl

Preparación de mezclas de reacción:

[lactosa] (mM)	lactosa (µl)	Agua (µl)	UDP-Gal* (µl)	MnCl <sub>2</sub> (µl)	BSA (µl)	HK (µl)	Enzima	
0,5	4,5	50,15	9	9	5,85	9	2,5	Stock Lactosa 10mM
1	9,0	45,65	9	9	5,85	9	2,5	
2	18,0	36,65	9	9	5,85	9	2,5	
3	2,7	51,95	9	9	5,85	9	2,5	Stock Lactosa 100mM
6	5,4	49,25	9	9	5,85	9	2,5	
9	8,1	46,55	9	9	5,85	9	2,5	
12	10,8	43,85	9	9	5,85	9	2,5	
15	13,5	41,15	9	9	5,85	9	2,5	

Para cada reacción se monitorizó la cinética tomando alícuotas de 20µl cada 3 minutos. El análisis de las muestras fue mediante detección de

radiactividad por contador de centelleo como ya se ha descrito en la sección de materiales y métodos del capítulo 4.

## Capítulo 6

### Análisis de estabilidad de mutantes del extremo C-terminal de la $\alpha$ -1,3-galactosiltransferasa

#### Condiciones de desnaturalización

Las condiciones de desnaturalización se muestran en la siguiente tabla:

Urea	0 - 6 M
Proteína	20 $\mu$ g/ml
Volumen	1200 $\mu$ l
MnCl <sub>2</sub>	13 mM
Tampón HEPES KCl	(pH) 7
Temperatura	30 °C
Tiempo	12 hrs.

#### Parámetros instrumentales

Se estableció una longitud de onda de excitación a 281nm. Se ha trabajado con una ventana de excitación (*slit<sub>ex</sub>*) de 2nm y una ventana de emisión (*slit<sub>em</sub>*) de 2nm, que da una relación señal ruido adecuada. La señal de emisión se ha recogido en un intervalo de 300 a 450nm con un tiempo de integración total de 1min.

#### Curvas de desnaturalización

A partir de los siguientes stocks: urea 8M, proteína 200 $\mu$ g/ml y MnCl<sub>2</sub> 260mM, se prepararon 12 mezclas de desnaturalización de 1200 $\mu$ l, para cada mutante, variando la concentración de urea como se indica en la tabla siguiente:

## Preparación de las mezclas de desnaturalización:

Urea [M]	Urea ( $\mu$ l)	HK ( $\mu$ l)	Proteína ( $\mu$ l)	agua ( $\mu$ l)	MnCl <sub>2</sub> ( $\mu$ l)
0,0	0	900	120	120	60
1,0	150	750	120	120	60
1,5	225	675	120	120	60
2,0	300	600	120	120	60
2,2	330	570	120	120	60
2,4	360	540	120	120	60
2,6	390	510	120	120	60
2,8	420	480	120	120	60
3,0	450	450	120	120	60
4,0	600	300	120	120	60
5,0	750	150	120	120	60
6,0	900	0	120	120	60

Los datos obtenidos se ajustaron a al modelo que describe la desnaturalización de proteínas considerando dos estados,: plegado y desplegado (ecuación 19 del capítulo 6, pag. 129).

*Efecto estabilizador del UDP-Gal o UDP*

Las mezclas de desnaturalización se prepararon de manera similar a lo descrito en el apartado anterior, pero añadiendo UDP-Gal a concentración final 50 $\mu$ M, a partir de un stock 40mM, como se detalla en la siguiente tabla:

Urea [M]	Urea ( $\mu$ l)	HK ( $\mu$ l)	Proteína ( $\mu$ l)	UDP-Gal ( $\mu$ l)	MnCl <sub>2</sub> ( $\mu$ l)
0,0	0	900	120	120	60
1,0	150	750	120	120	60
1,5	225	675	120	120	60
2,0	300	600	120	120	60
2,2	330	570	120	120	60
2,4	360	540	120	120	60
2,6	390	510	120	120	60
2,8	420	480	120	120	60
3,0	450	450	120	120	60
4,0	600	300	120	120	60
5,0	750	150	120	120	60
6,0	900	0	120	120	60

Los datos obtenidos se ajustaron a al modelo que describe la desnaturalización de proteínas considerando dos estados,: plegado y desplegado (ecuación 19 del capítulo 6, pag. 129).



# **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

---

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

André, I., Tvaroska, I., Carver, J. P. 2003. On the reaction pathways and determination of transition-state structures for retaining  $\alpha$ -galactosyltransferases. *Carbohydr. Res.* 338: 865-877.

Baisch, G., Öhrlein, R., Kolbinger, F. y streiff, M. 1998. On the preparative use of recombinant pig (1-3)galactosyl-transferase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 8,1575-1578.

Becker, D.J. y Lowe, J.B. 2003 Fucose: biosynthesis and biological function in mammals. *Glycobiology*, 13, 41R-53R.

Benz, I., y Schmidt, M. A., 2002. Never say never again: protein glycosylation in pathogenic bacteria. *Molecular Microbiology* 45, 267-276

Boix, E., Swaminathan, G. J., Zhang, Y., Natesh, R., Brew, K., y Acharya, K. R. 2001. Structure of UDP Complex of UDP-galactose:beta -Galactoside-alpha -1,3- galactosyltransferase at 1.53-Å Resolution Reveals a Conformational Change in the Catalytically Important C Terminus. *J.Biol.Chem.* 276, 48608-48614.

Boix, E., Zhang, Y., Swaminathan, G.J., Brew, K., Acharya, K.R. 2002. Structural basis of ordered binding of donor and acceptor substrates to the retaining glycosyltransferase,  $\beta$ -1,3-galactosyltransferase. *J. Biol. Chem.* 277, 28310-28318.

Bourne, Y. y Henrissat, B. 2001. Glycoside hydrolases and glycosyltransferases: families and functional modules. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11, 593-600.

Breton, C., Najdrová, L. S., Jeanneau, C., Koca, J. and Imberty, A. 2006. Structures and mechanisms of glycosyltransferases. *Glycobiology* 16: 29R–37R

Burkart, M. D., Vincent, S. P., Duffels, A., Murray, B. W., Ley, S. V., y Wong, C. H. 2000. Chemo-enzymatic synthesis of fluorinated sugar nucleotide: useful mechanistic probes for glycosyltransferases. *Bioorg.Med.Chem.* 8, 1937-1946.

Campbell, J. A., Davies, G. J., Bulone, V., Henrissat, B. 1997. A classification of nucleotide-diphosphosugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* 326, 929–939.

CAZY (Carbohydrate Active enZYmes). Base de datos disponible en la web. <http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>

Chen, X., Andrana, P. R. y Wang, P. G. 1999. Carbohydrates in transplantation. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3, 650-658.

Chen, X., Liu, Z., Wang, J., Fang, J., Fan, H., Wang, P. G. 2000. Changing the donor cofactor of bovine alpha 1, 3-galactosyltransferase by fusion with UDP-galactose 4-epimerase. More efficient biocatalysis for synthesis of alpha -gal epitopes. *J.Biol.Chem.* 275, 31594-31600.

Chiesa, A. y O'Neill, R. A. 1994. Capillary electrophoresis of oligosaccharides derivatized with various aminonaphthalene sulfonic acids. *Electrophoresis* 15, 1132-1140.

Chiesa, C. y Horvath, C. 1993. Capillary zone electrophoresis of malto-oligosaccharides erivatized with 8-aminonaphtalene-1,3,6-trisulfonic acid. *J. Chromatogr. A* 645, 337-352.

Chiu, C.P., Watts, A.G., Lairson, L.L., Gilbert, M., Lim, D., Wakarchuk, W.W., Withers, S.G., and Strynadka, N.C.. 2004. Structural analysis of the sialyltransferase CstII from *Campylobacter jejuni* in complex with a substrate analog. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 163–170.

Clarke, J., y Fersht, A. R., 1993. Engineered disulfide bonds as probes of the folding pathway of barnase: increasing the stability of proteins against the rate of denaturation. *Biochemistry.* 32, 4322-4329

Corpet, F. 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl. Acids Res.* 16, 10881 - 10890

Couldrey C. y Green J. E. 2000 Metastases: the glycan connection. *Breast Cancer Res.* 2, 321–323.

Coutinho, P. M., Deleury, E., Davies, G.J., Henrissat, B. 2003. An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases. *J. Mol. Biol.* 328, 307-317.

Coutinho, P.M., Henrissat, B. 1999 Carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach. In "Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering", H.J. Gilbert, G. Davies, B. Henrissat and B. Svensson eds., The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 3-12.

Cunningham, B., C., y Wells, J., A. 1989. High-resolution epitope mapping of hGH-receptor interactions by alanine-scanning mutagenesis. *Science.* 244, 1081–1085.

Dai Y, Vaught TD, Boone J, Chen SH, Phelps CJ, Ball S, Monahan JA, Jobst PM, McCreath KJ, Lamborn AE, Cowell-Lucero JL, Wells KD, Colman A, Polejaeva IA, Ayares DL. 2002. Targeted disruption of the alpha1,3-galactosyltransferase gene in cloned pigs. *Nat Biotechnol.* 20, 251-255.

Davies, G. J. 2001. Sweet secrets of synthesis. *Nature Structural Biology* 8, 98-100.

Davies, G. J., Charnock, S. J., y Henrissat, B. 2001. The enzymatic synthesis of glycosidic bonds: glycosynthases and glycosyltransferases. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* 13, 105-120.

De Angelis, P. L. 2002. Microbial glycosaminoglycan glycosyltransferases. *Glycobiology.* 12, 9R-16R

Dias Filho, B., P., Ueda-Nakamura, U., Lopez, C. H., Tsuneto, T., H., Abreu Filho, B. A. , y Nakamura, C. V., 2005. Cell Surface Glycoproteins in *Crithidia deanei*: Influence of the Endosymbiont. *Acta Protozool.* 44, 13 - 18

El Rassi, A. 2003. Capillary electrophoresis of Carbohydrates. Humana, Totowa, NJ. USA.

Endo, T. y Koizumi, S. 2000. Large - scale production of oligosaccharides using engineered bacteria. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10, 536 - 541

Evangelista, R. A., Liu, M. S. y Chon, F. T. A. 1995. 9-aminopyrene-1,4,6-trisulfonate derivatized sugars by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Anal. Chem.* 67, 2239-2245.

Fang, J., Li, J., Chen, X., Zhang, Y., Wang, J., Guo, Z., Zhang, W., Yu, L., Brew, K., y Wang, P. G. 1998. Highly Efficient Chemoenzymatic Synthesis of  $\alpha$ -Galactosyl Epitopes with a Recombinant  $\alpha(1,3)$ -Galactosyltransferase. *J Am Chem Soc* 120, 6635-6638.

Galili, U. 2001. The  $\alpha$ -gal epitope (Gal  $\alpha(1,3)$ Gal $\beta(1,4)$ GlcNAc-R) in xenotransplantation. *Biochimie* 83, 557-563.

Galili, U., Shohet, S. B., Kobrin, E. Stuls, C. L. y Macher, B. A. 1988. Man, apes and Old World monkeys differ from other mammals in the expression of alpha-galactosyl epitopes in nucleated cells. *J. Biol. Chem.* 263, 17755-17762.

Gastinel, L. N. 2001. Galactosyltransferases: A structural overview of their function and reaction mechanisms. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* 13, 131-145.

Gastinel, L. N., Bignon, C., Misra, A. K., Hindsgaul, O., Shaper, J. H., y Joziase, D. H. 2001. Bovine alpha1,3-galactosyltransferase catalytic domain structure and its relationship with ABO histo-blood group and glycosphingolipid glycosyltransferases. *EMBO J.* 20, 638-649.

Gibson, R. P., Turkenburg, J. P., Charnock, S. J., Lloyd, R., Davies, G. J. 2002. Insights into trehalose synthesis provided by the structure of the retaining glucosyltransferase OtsA. *Chem Biol.* 9, 1337-46.

Goedl, C., Griessler, R., Schwarz, A., y Nidetzky, B. 2006. Structure–function relationships for *Schizophyllum commune* trehalose phosphorylase and their implications for the catalytic mechanism of family GT-4 glycosyltransferases. *Biochem J.* 397:491–500.

Gosselin, S., Alhussaini, M., Streiff, M. B., Takabayashi, K., y Palcic, M. M. 1994. A continuous spectrophotometric assay for glycosyltransferases. *Analytical Biochemistry* 220, 92-97.

Hakomori, 2002. Glycosylation defining cancer malignancy: New wine in an old bottle. *PNAS.* 16, 10231–10233

Heissigerov, H., Breton, C., Moravcov, J., y Imberty, A., 2003. Molecular modeling of glycosyltransferases involved in the biosynthesis of blood

group A, blood group B, Forssman, and iGb3 antigens and their interaction with substrates. *Glycobiology* 13, 377-386.

Henion, T. R., Macher, B. A., Anaraki, F., y Galili, U. 1994. Defining the minimal size of catalytically active primate alpha 1,3 galactosyltransferase: structure-function studies on the recombinant truncated enzyme. *Glycobiology* 4, 193-201.

Hennet, T. 2002. The galactosyltransferase family. *CMLS Cellular and Molecular Life Sciences*. 59, 1081 - 1095

Hoffstetter-Kuhn, S., Aran, P., Gassmann, E. y Widmer, R. 1991. Influence of borate complexation on the electrophoretic behavior of carbohydrates in capillary electrophoresis. *Anal. Chem.* 63, 1541-1547.

Hokke, C. H., Zervosen, A., Elling, L., Joziase, D. H. y van den Eijnden, D. H. 1996. One-pot enzymatic synthesis of the Gal alpha 1->3 Gal beta 1->4GlcNAc sequence with in situ UDP-Gal regeneration. *Glycoconj. J.* 13, 687-692.

Hokke, C.H., Zervosen, A., Elling, L., Joziase, D.H., van den Eijnden, D.H. 1996. One-pot enzymatic synthesis of the Gal?1,3Gal?1,4GlcNAc sequence with in situ UDP-Gal regeneration. *Glycoconjugate Journal* 13, 687-692.

Honda, H. 1996. Separation of neutral carbohydrates by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A.* 720, 337-351.

Horovitz, A., Matthews, J. M., y Fersht, A. R. 1992. Alpha-helix stability in proteins. II. Factors that influence stability at an internal position. *J. Mol. Biol.* 227, 560-568

Hu, Y. y Walker, S. 2002. Remarkable Structural Similarities between Diverse Glycosyltransferases. *Chemistry y Biology* 9, 1287-1296.

Janczuk, A., Li, J., Zhang, W., Chen, X., Chen, Y., Fang, J., Wang, J., y Wang, P. G. 1999. Alpha-Gal oligosaccharides: chemistry and potential biomedical application. *Curr Med Chem* 6 155-164.

Joziase, D. H. and Oriol, R. 1999. Xenotransplantation: the importance of the Gal $\alpha$ 1,3Gal epitope in hyperacute vascular rejection. *Biochim Biophys Acta* 1455, 403-418.

Joziase, D. H., Shaper, J. H., Van den Eijnden, D. H., Van Tunen, A. J., and Shaper, N. L. 1989. Bovine alpha 1----3-galactosyltransferase: isolation and characterization of a cDNA clone. Identification of homologous sequences in human genomic DNA. *J Biol Chem* 264, 14290-14297.

Joziase, D.H., Shaper, J.H., Jabs, E.W., Shaper, N.L. 1991. Characterization of an alpha-1,3-galactosyltransferase homologue on human chromosome 12 that is organized as a processed pseudogene. *J. Biol. Chem.* 266, 6991-6998.

Takehi, K., Funakubo, T., Suzuki, S., Oda, Y. y Kitada, Y. 1999. 3-Aminobenzamide and 3-aminobenzoic acid, tags for capillary electrophoresis of complex carbohydrates with laser-induced fluorescent detection. *J. Chromatogr. A.* 863, 205-218.

Kanie, Y., Kirsch, A., Kanie, O., y Wong, C. H. 1998. Enzymatic assay of galactosyltransferase by capillary electrophoresis. *Anal.Biochem* 263, 240-245.

Keegstra, K y Raikhel, N. 2001. Plant glycosyltransferases. *Current Opinion in Plant Biology.* 4, 219–224.



Keegstra, K., y Raikhel, N. 2001. Plant glycosyltransferases. *Current Opinion in Plant Biology* 4, 219–224

Klockow, A., Amadó, R., Widmer, M., Paulus, A. 1995. Separation of 8-aminonaphthalene-1,3,6-trisulfonic acid-labelled neutral and sialylated N-linked complex oligosaccharides by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 716, 241-257.

Kuwaki K, Tseng Y. L., Dor F., J., et al. 2005. Heart transplantation in baboons using alpha1,3-galactosyltransferase geneknockout pigs as donors: initial experience. *Nat Med.* 11, 29.

Lairson, L. L. y Withers, S.G. 2004. Mechanistic analogies amongst carbohydrate modifying enzymes. *Chem. Commun.*, 2243-2248.

Lairson, L. L., Chiu, C. P. C., Ly, H.D., He, S., Wakarchuk, W. W., Strynadka, N. C. J., Withers, S.G. 2004. Intermediate trapping on a mutant retaining  $\alpha$ -galactosyl transferase identifies an unexpected aspartate residue. *J. Biol. Chem.* 10.1074/jbc.M4004-51200.

Lanteri, M., Giordanengo, V., Vidal, F., Gaudary, P., Lefebvre, J.C. 2002. A complete alpha1,3-galactosyltransferase gene is present in the human genome and partially transcribed. *Glycobiology* 12, 785-92.

Lazarus, B. D., Milland, J., Ramsland, P. A., Mouhtouris, E., y Sandrin, M. 2002. Histidine 271 has a functional role in pig  $\alpha$ -1,3-galactosyltransferase enzyme activity. *Glycobiology.* 12, 793-802.

Le, X.C., Zhang, Y., Dovichi, N.J., Compston, C.A., Palcic, M.M., Beever, R.J., Hindsgaul, O. 1997. Study of the enzymatic transformation of fluorescently labeled oligosaccharides in human epidermoid cells using capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography A* 781, 515-522.

- Lee, K. B., Desai, U. R., Palcic, M. M., Hindsgaul, O., y Linhardt, R. J. 1992. An electrophoresis-based assay for glycosyltransferase activity. *Anal.Biochem.* 205, 108-114.
- Li Y, Baldauf S, Lim EK y Bowles J: 2000. Phylogenetic analysis of the UDP-glycosyltransferase multigen family or *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 276, 4338 - 4343
- Li, J., Ksebati, M.B., Zhang, W., Guo, Z., Wang, J., Yu, L., Fang, J., Wang, P.G. 1999. Conformational analysis of an  $\alpha$ -galactosyl trisaccharide epitope involved in hyperacute rejection upon xenotransplantation. *Carbohydr. Res.* 315, 76-88.
- Li, Y., Baldauf, S., Lim, E. K., y Bowles, J. 2000. Phylogenetic analysis of the UDP-glycosyltransferase multigen family or *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 276, 4338 - 4343
- Ly, H.D., Lougheed, B., Wakarchuk, W.W., Withers, S.G. 2002. Mechanistic studies of retaining  $\beta$ -galactosyltransferase from *Neisseria meningitidis*. *Biochemistry* 41, 5075-5085.
- Malet, C., y Planas, A. 1997. Mechanism of *Bacillus* 1,3-1,4-beta-D-glucan 4-glucanohydrolases: kinetics and pH studies with 4-methylumbelliferyl beta-D-glucan oligosaccharides. *Biochemistry.* 36, 13838-48.
- Markine-Goriaynoff, N., Gillet, L., Van Etten, J. L., Korres, H., Verma, N., y Vanderplassen, A. 2004. Glycosyltransferases encoded by viruses. *Journal of General Virology* 85, 2741-2754
- Milland, J., Russel, S.M., Dodson, H.C., McKenzie, I.F.C., Sandrin, M.S. 2002. The cytoplasmic tail of  $\beta$ -1,3-galactosyltransferase inhibits golgi localization of the full-length enzyme. *J. Biol. Chem.* 277, 10374-10378.

Monegal A., Pinyol R, Planas A. 2005. Capillary electrophoresis method for the enzymatic assay of galactosyltransferases with postreaction derivatization. *Anal Biochem.* 346, 115-123.

Monegal A., y Planas, A. 2006. Chemical Rescue of  $\alpha$ -Galactosyltransferase. Implications in the Mechanism of Retaining Glycosyltransferases. *J. Am. Chem. Soc.*, 128, 16030 -16031

Monegal, A., Bulone, V. y Planas, A. 2005. Caracterización enzimática de la  $\alpha$ -1,3-galactosiltransferasa bovina. Validación de un ensayo radiométrico y mecanismo cinético. *Afinidad* 62, 505-512.

Monegal, A., Bulone, V., y Planas, A. 2005. Caracterización enzimática de la  $\alpha$ -1,3-galactosiltransferasa bovina. validación de un ensayo radiométrico y mecanismo cinético. *Afinidad.* 62, 505-512

Murray, B. W., Wittmann, V., Burkart, M. D., Hung, S. C., y Wong, C. H. 1997. Mechanism of Human  $\alpha$ -1,3-Fucosyltransferase V: Glycosidic Cleavage Occurs Prior to Nucleophilic Attack. *Biochemistry* 36, 823-831. *Nucl. Acids Res.* 16, 10881 – 10890.

Núñez, H.A. and Barker, R. 1976. The metal ion catalyzed decomposition of nucleoside diphosphate sugars. *Biochemistry* 15, 3843-3847.

Núñez de Castro, I. 2001. *Enzimología*. Ed. Pirámide. Madrid, España.

O'Shea, M. G., Samuel, M. S., Konik, C. M. y Mrell, M. K. 1998. Fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis (FACE) of oligosaccharides, efficiency of labelling and high-resolution separation. *Carbohydr. Res.* 307, 1-12.

Oriol, R. 1987. Tissular expression of ABH and Lewis antigens in humans and animals: expected value of different animal models in the study of ABO-incompatible organ transplants. *Transplant. Proc.*, 19, 4416-4420.

Pace, C. N. 1986. Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. *Methods Enzymol.* 131, 266-279

Palcic, M. M. and Sujino, K. 2001. Assays for glycosyltransferases. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* 13, 361-370.

Patenaude, S., Seto, N.O.L., Borisova, S.N., Szpacenko, A., Marcus, S.L., Palcic, M.M., Evans, V.E. 2002. The structural basis for specificity in human ABO(H) blood group biosynthesis. *Nature structural biology* 9, 685-690.

Paulson JC y Colley KJ: 1989. Glycosyltransferases. *J. Biol. Chem.* 264: 17615 - 1761

Paulus, A. y Klockow, A. 1996. Detection of carbohydrates in capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A.* 720, 353-376.

Persson, K., Ly, H. D., Dieckelmann, M., Wakarchuk, W. W., Withers, S. G., y Strynadka, N. C. 2001. Crystal structure of the retaining galactosyltransferase LgtC from *Neisseria meningitidis* in complex with donor and acceptor sugar analogs. *Nature Structural Biology* 8: 166-175.

Phelps, C. J., Koike, C., Vaught, T. D., Boone, J., Wells, K. D., Chen, S. H., Ball, S., Specht, S. M., Polejaeva, I. A., Monahan, J. A., Jobst, P. M., Sharma, S. B, Lamborn, A. E., Garst, A. S., Moore, M., Demetris, A. J., Rudert, W. A., Bottino, R., Bertera, S., Trucco, M., Starzl, T. E., Dai, Y., Ayares, D. L. 2003. Production of alpha 1,3-galactosyltransferase-deficient pigs. *Science* 299: 411-414.

Pons, J., Querol, E., y Planas, A. 1997. Mutational analysis of the major loop of Bacillus 1,3-1,4- $\beta$ -D-glucan-4-glucanohydrolases. *J. Biol. Chem.* 270: 13006-13012.

Qasba, P. K., Ramakrishnan, B., Boeggeman, E. 2005. Substrate induced conformational changes in glycosyltransferases. *Trends Biochem Sci.* 30: 53-62.

Raab, M., Kozmon, S., and Tvaroska, I. (2005). Potential transition-state analogs for glycosyltransferases. Design and DFT calculations of conformational behavior. *Carbohydr. Res.*, 340, 1051-1057.

Rassi, Z. 1996. High Performance Capillary Electrophoresis of Carbohydrates. Beckman Instruments Inc., Fullerton

Rivas-López, M.J., Santos, M.T., y Martínez, I. 2006. Determinación óptima en reacciones enzimáticas con inhibición por exceso de sustrato. XXIX Congreso Nacional de Estadística e Investigación Operativa. Tenerife, España. 16-19 de Mayo.

Rudd, P. M., Elliott, T., Cresswell, P., Wilson, I. A., y Dwek R. A. 2001. Glycosylation and the Immune System. *Science* 291: 2370 - 2376

Sambrook J. and Russell DW. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. Third Edition. Volume 1. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.

Scheible, W. R. y Pauly, M. 2004. Current Opinion in Plant Biology 2004, 7:285-295.

Segel IH: 1993. Enzyme kinetics: behaviour and analysis of rapid equilibrium and steady state enzyme systems. A Wiley - Interscience Publication. United States of America.

Seto, N. O., Compston, C. A., Evans, S. V., Bundle, D. R., Narang, S. A., y Palcic, M. M. 1999. Donor substrate specificity of recombinant human blood group A, B and hybrid A/B glycosyltransferases expressed in *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* 259, 770-775.

Seto, N. O., Palcic, M. M., Compston, C. A., Li, H., Bundle, D. R., y Narang, S. A. 1997. Sequential interchange of four amino acids from blood group B to blood group A glycosyltransferase boosts catalytic activity and progressively modifies substrate recognition in human recombinant enzymes. *J Biol.Chem* 272, 14133-14138.

Shah, P. S., Bizik, F., Dukor, R. K., Qasba, P. K. 2000. Active site studies of bovine  $\beta$ -1,3-galactosyltransferase and its secondary structure prediction. *Biochim Biophys Acta* 1480, 222-234.

Shimma, Y., Saito, F., Oosawa, F., y Jigami, Y. (en prensa) Construction of a library of human glycosyltransferases immobilized in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* *Appl. Environ. Microbiol.*

Sinnott, M.L. 1990. Catalytic mechanisms of enzymatic glycosyl transfer. *Chem. Rev.* 90: 1171-1202.

Snow, D. M., Shaper, J. H., Shaper, N. L., y Hart, G. W. 1999. Determination of  $\beta$ -1,4-Galactosyltransferase Enzymatic Activity by Capillary Electrophoresis and Laser-Induced Fluorescence Detection. *Analytical Biochemistry* 271, 36-42.

Sung, C. K., Singh, A. N., y Raushel, F. M. 1988. Analysis of the Galactosyltransferase Reaction by Positional Isotope Exchange and Secondary Deuterium Isotope Effects. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 267: 54-59.

Suzuki, S. y Honda, S. 1998. A tabulated review of capillary electrophoresis of carbohydrate. *Electrophoresis* 19, 2539-25-60.

Talbot, P., Shur, B. D., y Myles, D. G. 2003. Cell Adhesion and Fertilization: Steps in Oocyte Transport, Sperm-Zona Pellucida Interactions, and Sperm-Egg Fusion. *BIOLOGY OF REPRODUCTION* 68, 1-9

Tarbouriech, N., Charnock, S.J., Davies, G.J. 2001. Three-dimensional structures of the Mn and Mg dTDP complexes of the family GT-2 glycosyltransferase SpsA: a comparison with related NDP-sugar glycosyltransferases. *J. Mol. Biol.* 314 (4): 655-661.

Thomas, V. y Patrik, J. 2000. Glycosyltransferases in plant natural product synthesis: characterization of a supergene family. *Trends in plant science.* 5: 380-386.

Toney, M. D. and Kirsch, J. F. 1989. Direct Bronsted Analysis of the Restoration of Activity to a Mutant Enzyme by Exogenous Amines. *Science* 243, 1485-1488.

Tvaroska I. 2004. Molecular modeling insights into the catalytic mechanism of the retaining galactosyltransferase LgtC. *Carbohydr Res.* 339:1007-1014.

Unligil, U. M. y Rini, J. M. 2000. Glycosyltransferase structure and mechanism [In Process Citation]. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10: 510-517.

Viladot, J., de Ramon, E., Durany, O., y Planas, A. 1998. Probing the mechanism of Bacillus 1,3-1,4- $\beta$ -D-Glucan 4-Glucanohydrolases by chemical rescue of inactive mutants at catalytically essential residues. *Biochemistry* 37: 11332-11342.

Wakarchuk, W. W., y Cunningham, A. 2003. *Methods in Molecular Biology*, Vol. 213: Capillary Electrophoresis of Carbohydrates. P. Thibault and S. Honda. Humana Press Inc.

Watson, K.A., Mc-Cleverty, C., Geremia, S., Cottaz, H., Driguez, H y Johnson, C. 1999. Phosphorylase recognition and phosphorolysis of its oligosaccharide substrate: answers to a long outstanding question. *EMBO Journal* 18, 4619–4632

Yamada K, Yazawa K, Shimizu A et al. 2005. Marked prolongation of porcine renal xenograft survival in baboons through the use of  $\alpha$ 1,3-galactosyltransferase geneknockout donors and the cotransplantation of vascularized thymic tissue. *Nature Med.* 11: 32.

Zhang, S. Y., Malinovskii, V. A., Fiedler, T. J., y Brew, K. 1999. Role of a conserved acidic cluster in bovine  $\beta$ -1,4-galactosyltransferase-1 probed by mutagenesis of a bacterially expressed recombinant enzyme. *Glycobiology* 9: 815-822.

Zhang, Y., Deshpande, A., Xie, Z., Natesh, R., Acharya, K. R., y Brew, K. 2004. *Glycobiology*, 14: 1295-1302

Zhang, Y., Swaminathan, G.J., Deshpande, A., Boix, E., Natesh, R., Xie, Z., Acharya, R., Brew, K. 2003. Roles of Individual Enzyme-Substrate Interactions by  $\beta$ -1,3-Galactosyltransferase in Catalysis and Specificity. *Biochemistry* 42, 13512-13521.

Zhang, Y., Wang, P. G., Brew, K. 2001. Specificity and mechanism of metal ion activation in UDP-galactose: $\beta$ -galactoside- $\alpha$ -1,3-galactosyltransferase. *J.Biol.Chem.* 276, 11567-11574.