

Glicosilación de proteínas en bacterias patógenas

Laura Elena Córdova Dávalos*

RESUMEN. La glicosilación de proteínas es una importante modificación postraduccional de las proteínas. En eucariontes los mecanismos de glicosilación han sido bien caracterizados, e inclusive se han descubierto algunas enfermedades en humanos relacionadas con fallas en los mecanismos de glicosilación. Hace algún tiempo se pensaba que las bacterias eran incapaces de glicosilar proteínas, puesto que carecen de los organelos celulares donde se lleva a cabo dicho proceso en eucariontes; sin embargo, en la actualidad ya se ha demostrado la presencia de proteínas glicosiladas en bacterias. Recientemente, el estudio de las proteínas glicosiladas en bacterias patógenas se ha tornado un tópico de investigación muy importante, pues se ha demostrado la participación de las proteínas glicosiladas en la patogénesis bacteriana. Sin duda, el impacto del estudio de las glicoproteínas y sus mecanismos de glicosilación revelará blancos terapéuticos novedosos para combatir las infecciones bacterianas, así como nuevos métodos de diagnóstico.

Palabras clave: Glicoproteínas, glicosiltransferasas, O y N glicosilación.

ABSTRACT. Protein glycosylation is an important modification of proteins. The knowledge about the glycosylation machinery in eucarya is advance; in fact, there are some illness in human being related with failure in the mechanism of protein glycosylation. Some years ago bacteria have been thought incapable of glycosylating proteins. Now, glycoprotein synthesis in bacteria has been firmly established. Currently, the study of protein glycosylation in pathogen bacteria is very important because there are strong relation between glycoproteins and pathogenesis. This new field of investigation is a novel target in the fight against bacteria.

Key words: Glycoprotein, glycosyltransferases, O and N glycosylation.

I. Introducción

Las proteínas de todos los seres vivos pueden ser modificadas postraduccionalmente de diferentes maneras. Una de las modificaciones más estudiadas es la fosforilación de proteínas. La presencia o ausencia de grupos fosfatos regula su actividad, estabilidad, loca-

lización y juega un papel importante en rutas metabólicas y en transducción de señales.¹

Otra modificación postraduccional compleja y muy costosa energéticamente es la glicosilación, que consiste en la adición covalente de azúcares a las proteínas. Actualmente se han definido dos tipos de glicosilación, los cuales están determinados en función del aminoácido al que se une el azúcar: la N-glicosilación, en la cual los azúcares se unen al grupo γ -amido de la asparagina y la O-glicosilación donde los azúcares se unen al grupo hidroxilo de las cadenas laterales de los aminoácidos serina, treonina, hidroxiprolina, hidroxilisina y tirosina. La gran variedad de azúcares, los tipos de enlaces, así como su grado de ramificación incrementan la complejidad de esta modificación postraduccional.¹ Precisamente el campo de la glicobiología está enfocado al entendimiento de la estructura química, biosíntesis y función biológica de los carbohidratos.²

La glicosilación de proteínas en eucariontes ha sido estudiada desde hace tiempo, comenzando por el descubrimiento de los grupos sanguíneos humanos por Landsteiner en 1931, hasta los recientes descubri-

* Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, D.F., México.

Dirección para correspondencia:

Laura Elena Córdova Dávalos

Departamento de Biología Molecular y Biotecnología,
Instituto de Investigaciones Biomédicas,
Universidad Nacional Autónoma de México,
Ciudad Universitaria, D.F., México.

Apartado Postal 70228, Ciudad Universitaria,
D.F., México. C.P. 04510.

Teléfono: (55) 5622-8929.

E-mail: lcdavalos@gmail.com

Recibido: 4 de agosto del 2009

Aceptado con modificaciones: 5 de septiembre del 2009

mientos en niños con defectos congénitos en la biosíntesis de proteínas glicosiladas (CDGs: *Congenital Disorders of Glycosylation*).^{1,2} Según las estimaciones, en los mamíferos el repertorio del glicoma (estudio de los azúcares que componen a un organismo) es mucho mayor y más complejo que el proteoma (estudio de las proteínas que componen a un organismo).²

Los procariontes fueron considerados por mucho tiempo incapaces de glicosilar proteínas, ya que esta actividad, en eucariontes, se lleva a cabo en el retículo endoplásmico y aparato de Golgi, organelos que los procariontes no tienen. Sin embargo, la presencia de proteínas glicosiladas ya ha sido demostrada en los dominios Bacteria y Arquea, por lo que la glicosilación de proteínas es una actividad conservada en los tres dominios de la vida, lo que resalta su gran importancia biológica. Así, la glicosilación de proteínas en procariontes es un tópico de investigación muy reciente.³

Los reportes de proteínas glicosiladas se han ido incrementando, tanto en bacterias patógenas como de vida libre. Por su interés biomédico, la caracterización de proteínas glicosiladas, así como el estudio de sus mecanismos de glicosilación se ha inclinado más hacia las bacterias patógenas.⁴ Algunas de las bacterias donde se ha reportado la presencia de proteínas glicosiladas son *Campylobacter* spp. (agente causal de diarrea), siendo *Campylobacter jejuni* un patógeno que infecta la mucosa del intestino humano y agente causal de gastroenteritis en todo el mundo;^{4,5} *Helicobacter pylori*, patógeno que infecta la mucosa gástrica causando ulceraciones; *Treponema pallidum*, agente causal de la sífilis; *Pseudomonas aeruginosa*, bacteria que infecta individuos inmunocomprometidos y a pacientes con fibrosis quística y *Mycobacterium tuberculosis*, agente causal de la tuberculosis, muy común en pacientes inmunocomprometidos por la infección con VIH, sólo por mencionar algunas.^{3,4}

En general, las proteínas glicosiladas en bacterias se encuentran siempre expuestas en la superficie de las células, por lo que su función biológica podría tener un importante papel en la patogénesis. Recientes estudios han demostrado el papel de la glicosilación en la adhesión, en la protección contra la degradación proteolítica, en el incremento de la solubilidad, en la variación antigenica, en el ensamblaje de proteínas y en la protección contra el sistema inmune.⁵

Por lo tanto, la habilidad de detectar proteínas glicosiladas, entender sus mecanismos de acción, así como las diversas implicaciones biológicas de la variabilidad en los carbohidratos, constituyen una nueva área de diagnóstico y tratamiento de diversas enfermedades; de ahí su importancia en el área biomédica.

II. Glicosilación de proteínas en eucariontes

Antes de abordar los mecanismos de glicosilación de proteínas en bacterias, es importante, revisar brevemente cómo se lleva a cabo la glicosilación de proteínas en eucariontes. Como se mencionó con anterioridad, hay dos tipos de glicosilación de proteínas. La N-glicosilación ha sido ampliamente estudiada respecto a su estructura, biosíntesis y función. La primera parte de este proceso se lleva a cabo en la membrana del retículo endoplasmático rugoso, en donde se transfiere un oligosacárido (llamado *core*) al grupo γ -amido de la asparagina. Este oligosacárido está formado por dos N-acetil-glucosaminas, nueve manosas y tres glucosas, y tiene como base un lípido de la membrana del retículo endoplásmico llamado dolicol-fosfato, el cual está formado por unidades de isopreno (lípido de cinco carbonos). El inicio de la construcción del oligosacárido (*Figura 1*) comienza con la transferencia de una unidad de N-acetil-glucosaminofosfato (la cual está unida al nucleótido uridindifosfato, UDP) al dolicol-fosfato, siendo el producto de esta síntesis N-acetilglucosamina-dolicolpirofosfato. Una vez que se ha unido la N-acetil-glucosaminofosfato al dolicol, sobre ésta se unen otra N-acetil-glucosamina (unida al uridindifosfato, UDP) y cinco manosas (unidas al nucleótido guanosindifosfato, GDP). Hasta

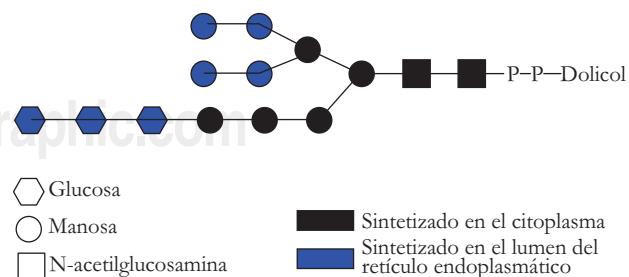


Figura 1. Síntesis del oligosacárido del sistema de N-glicosilación en eucariontes.

este momento las reacciones se llevan a cabo del lado citoplasmático del retículo endoplásmico. Las transferencias del azúcar al oligosacárido son llevadas a cabo por una familia de proteínas llamada ALG (de sus siglas en inglés *Asparagine Linked Glycosylation*). En este punto de la biosíntesis del oligosacárido ocurre una translocación hacia el lumen del retículo endoplásmico, dentro del lumen se agregan otras cuatro manosas, las cuales están unidas al lípido de membrana dolicol-fosfato (la unión de la manosa al dolicol es llevada a cabo por la enzima dolicol-fosfato-manova sintasa) y la transferencia de las tres glucosas unidas también a moléculas de dolicol que se encuentran en la membrana (reacción llevada a cabo por una glicosiltransferasa miembro de la familia ALG).¹

Una vez terminada la biosíntesis del oligosacárido formado por dos N-acetilglucosaminas, nueve manosas y tres glucosas, un complejo enzimático formado por varias proteínas llamado OST (de sus siglas en inglés *Oligo Saccharyl Transferase*), específicamente la subunidad llamada Stt3, se encarga de transferir el oligosacárido al grupo γ -amido de la asparagina en la secuencia consenso Asparagina-X-Serina/Treonina de la proteína (donde X es cualquier aminoácido, excepto prolina). Una vez sintetizado y transferido el oligosacárido a la proteína en el retículo endoplásmico, la proteína glicosilada pasa al aparato de Golgi donde se realizan otras modificaciones.¹

En cuanto a la O-glicosilación, la cual se refiere a la transferencia de un azúcar al radical hidroxilo de las cadenas laterales de los aminoácidos serina o treonina, el caso mejor estudiado es la manosilación de proteínas en *Saccharomyces cerevisiae*; en la O-glicosilación, sólo una manosa se transfiere a la proteína en el lumen del retículo endoplásmico; dicha manosa se activa al unirse al dolicol-fosfato (lípido de membrana); ninguna manosa unida al nucleótido GDP será transferida a la proteína. Posteriormente, la proteína glicosilada con una manosa se transfiere al aparato de Golgi y ahí se termina de glicosilar. A diferencia de la N-glicosilación donde sí hay una secuencia consenso de glicosilación, en la O-glicosilación no hay tal; sin embargo, se ha observado que generalmente las treoninas y serinas que son glicosiladas están rodeadas de prolinas. Además, existe una familia de transferasas encargadas de la manosilación llamadas PMT

(de sus siglas en inglés *Protein O-Mannosyl Transferase*); en el caso de la levadura, algunas manosiltransferasas son esenciales, pues proteínas glicosiladas forman parte estructural de la pared.⁶

III. Glicosilación de proteínas en bacterias

Como se ha mencionado, los hallazgos de proteínas glicosiladas en bacterias son relativamente recientes, por lo que en este momento en la literatura abundan los reportes sobre proteínas glicosiladas en diferentes bacterias; sin embargo, las descripciones a nivel estructural son someras; realmente son muy pocos los reportes que hacen referencia a los mecanismos de glicosilación en bacterias y menos abundantes los que abordan las implicaciones biológicas de dicho proceso. En *Campylobacter jejuni*, agente causal de diarreas en todo el mundo, es donde se han hecho más avances en cuanto a la descripción de los mecanismos de glicosilación y sus implicaciones biológicas.

a. *Campylobacter jejuni*

C. jejuni es una bacteria muy interesante, pues tiene la capacidad de llevar a cabo tanto la N- como la O-glicosilación, convirtiendo a dicha bacteria en un modelo alternativo para el estudio de dichos procesos.

Con base en el uso de lectinas (proteínas que reconocen específicamente a ciertos azúcares) y otras técnicas se ha determinado que la flagelina (proteína que constituye el flagelo) de *Campylobacter* spp está glicosilada en la serina 19, por lo que su glicosilación es de tipo O. Al determinarse la secuencia del genoma de la cepa *C. jejuni* NCTC 11168, se observó que hay un cluster de genes de glicosilación (de aproximadamente 50) donde se encuentran también los genes que codifican para la flagelina. El mecanismo de O-glicosilación en *C. jejuni* ha sido poco estudiado.⁷

Por otro lado, del mecanismo de N-glicosilación se tiene más conocimiento. Inicialmente se pensó que el cluster de genes que codifica al sistema de N-glicosilación de proteínas, era un grupo de genes cuyas proteínas eran similares a las enzimas involucradas a la biosíntesis de lipopolisacáridos y polisacáridos capsulares; sin embargo, al mutar los genes de dicho cluster, se observó que no había ningún efecto en la bio-

síntesis del lipopolisacárido, ni de la cápsula; lo que sí se observó fue una dramática disminución en la inmunorreactividad de varias proteínas de *C. jejuni*, usando suero producido contra las bacterias completas. La explicación fue que esas proteínas que son muy inmunogénicas están glicosiladas y que los genes en cuestión están relacionados con la glicosilación de dichas proteínas; así, al tratar con ácido trifluorometanosulfónico (TMSF, agente desglicosilador) se observó una disminución en la inmunorreactividad, lo que significa que lo que están reconociendo los anticuerpos, es decir, la parte inmunogénica, son los carbohidratos. Así, a dicho cluster de genes se le llamó *pgl* (de sus siglas en inglés *protein glycosylation*).⁸

Trabajos posteriores identificaron algunas de las proteínas glicosiladas por el sistema *pgl* de *C. jejuni*, mediante el uso de lectinas (destacando un mayor reconocimiento de glicoproteínas por parte de la SBA, lectina obtenida de la soya y que reconoce específicamente N-acetilgalactosaminas unidas en enlace α o β), y de técnicas analíticas como la espectrometría de masas y el uso de glicosidasas, tales como β -N-acetyl hexosaminidasa (rompe N-acetilgalactosamina). Así se identificaron a las proteínas PEB3 y CbpA como glicoproteínas⁹ cuyos carbohidratos se unen en la asparagina conservada de la secuencia consenso asparagina-X-serina o treonina, la misma que en las glicoproteínas de *N*-glicosilación en eucariontes. Se sabe que los carbohidratos unidos a la asparagina son la bacilosamina (un trisacárido) y N-acetil-galactosamina;⁷ dichas proteínas están expuestas en la superficie de la bacteria y al mutar algunos genes que forman parte del sistema *pgl* las proteínas se expresan, pero no se glicosilan. La proteína PEB3 es altamente inmunogénica de *C. jejuni*.⁹

El sistema *pgl* (17 Kb) (Figura 2) está formado por cuatro probables glicosiltransferasas: PglH, PglI, PglJ, y PglA; tres proteínas de membrana: PglB, WlaB y PglG y tres enzimas involucradas en la biosíntesis de azúcares: PglD, PglE y PglF.^{7,9} Cabe resaltar que PglB es homóloga a la subunidad Stt3 de la oligosacariltransferasa de eucariontes, la cual se encarga de transferir los azúcares a las proteínas en la *N*-glicosilación.¹⁷ Las posibles funciones biológicas de algunos genes que componen el locus *pgl* han sido asignadas de manera hipotética en base a su homología con otras proteínas ya descritas. En cuanto a la importancia biológica del sistema de *N* glicosilación de *C. jejuni*, hasta el momento se ha demostrado que al interrumpir dicha vía, se reduce la capacidad de las células de unirse e invadir células eucariontes en cultivos *in vitro*, así como su capacidad de colonizar el intestino de pollos y ratones.¹⁰

y PglA; tres proteínas de membrana: PglB, WlaB y PglG y tres enzimas involucradas en la biosíntesis de azúcares: PglD, PglE y PglF.^{7,9} Cabe resaltar que PglB es homóloga a la subunidad Stt3 de la oligosacariltransferasa de eucariontes, la cual se encarga de transferir los azúcares a las proteínas en la *N*-glicosilación.¹⁷ Las posibles funciones biológicas de algunos genes que componen el locus *pgl* han sido asignadas de manera hipotética en base a su homología con otras proteínas ya descritas. En cuanto a la importancia biológica del sistema de *N* glicosilación de *C. jejuni*, hasta el momento se ha demostrado que al interrumpir dicha vía, se reduce la capacidad de las células de unirse e invadir células eucariontes en cultivos *in vitro*, así como su capacidad de colonizar el intestino de pollos y ratones.¹⁰

b. *Mycobacterium tuberculosis*

La tuberculosis es una enfermedad que cobra la vida de dos millones de personas cada año. Su agente causal es *Mycobacterium tuberculosis*, una bacteria presente en aproximadamente un tercio de la población mundial.¹¹ Recientemente, mediante el uso de lectinas se han detectado varias proteínas glicosiladas altamente inmunogénicas en esta bacteria. Dichas proteínas se han encontrado tanto en el sobrenadante de cultivos de *M. tuberculosis* como unidas a la membrana celular. Algunas de las proteínas glicosiladas en *M. tuberculosis* como la de 45/47 kDa y la de 38 kDa son reconocidas por el suero de pacientes infectados con tuberculosis.^{4,12} En el caso de la proteína de 45/47 kDa se ha demostrado por técnicas de espectrometría de masas que está glicosilada con manosas unidas a treoninas localizadas en los extremos amino y carboxilo,¹³ por lo que su glicosilación es de tipo O; además, se sabe que dicha proteína induce la prolifera-

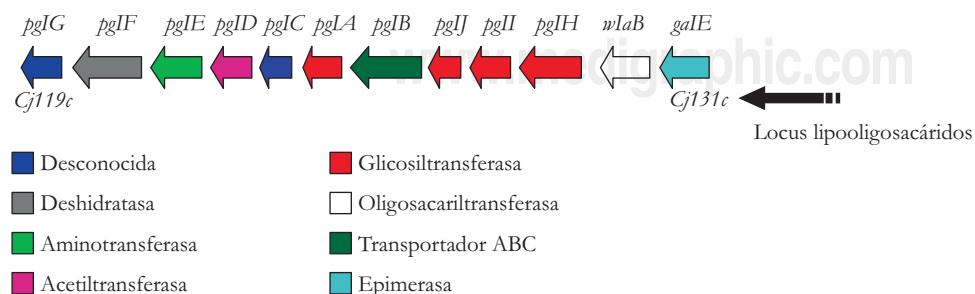


Figura 2. Locus de *N*-glicosilación propuesto para *Camphylobacter jejuni* NCTC 11168 (tomado de Karlyshev A. et al., 2005).

ción de linfocitos T CD4⁺ y que al eliminar sus azúcares se pierde el efecto de inducción de la proliferación de dichas células, lo que indica que su parte inmunogénica son los carbohidratos; la importancia de esta proteína para *M. tuberculosis* es desconocida.¹⁴

La proteína de 38 kDa es una lipoglicoproteína muy abundante en el sobrenadante de los cultivos de *M. tuberculosis*; está codificada por un gen anotado en la base de datos como *pst-1* que pertenece a un operón relacionado con el transporte de fosfato. La reactividad serológica de este antígeno está fuertemente asociada con infecciones latentes y recientes de tuberculosis, por lo que esta proteína está incluida en todos los estudios de diagnóstico de tuberculosis. Además se sabe que confiere inmunidad protectora contra infección por *M. tuberculosis* en modelos animales y humanos, por lo que es candidata a vacuna.¹⁵

Existen otras proteínas glicosiladas en *M. tuberculosis* como la proteína de 19 kDa, la cual está relacionada con la inducción de la respuesta inmune celular y humoral, la adhesina de 28 kDa (HBHA), la cual es necesaria para la diseminación extrapulmonar, y algunas como la de 9 kDa y 20 kDa cuya funcionalidad es desconocida, todas son proteínas secretadas.⁴ Pese al número creciente de reportes de proteínas glicosiladas se sabe poco acerca del mecanismo de glicosilación en *Mycobacterium* sp, en parte debido a las dificultades técnicas para trabajar con dicha bacteria, además del lento crecimiento del microorganismo y

las estrictas condiciones de bioseguridad. En cuanto al sistema de glicosilación de proteínas, recientemente se ha reportado que el gene *Rv1002c* de *M. tuberculosis* H37Rv es homólogo a la familia PMT (*Protein O-Mannosyl Transferase*) de *S. cerevisiae* y tiene actividad de manosiltransferasa, usando a la proteína de 45/47 kDa como blanco de glicosilación; se sabe también que la glicosilación de dicha proteína está asociada al sistema de secreción tipo SEC; así, conforme la proteína se va secretando, la manosiltransferasa la va glicosilando.¹⁶ Como se puede observar, el conocimiento de los mecanismos de glicosilación de proteínas en *M. tuberculosis* es aún muy escaso.

IV. Conclusiones

El estudio de las proteínas glicosiladas en bacterias es un área emergente de las ciencias biomédicas, cuya importancia ha ido creciendo debido a que muchas de las glicoproteínas están relacionadas con la patogénesis de las bacterias. Incrementar el conocimiento para llegar a comprender los mecanismos de glicosilación de proteínas en bacterias patógenas constituye una nueva alternativa para combatir las infecciones bacterianas.

Agradecimientos

Agradezco al Dr. Luis Servín G. y al Dr. Zahed Evangelista M. los comentarios a este manuscrito.

Bibliografía

1. Ludwig L, Strahl S, Tanner W. Protein glycosylation, conserved from yeast to man: a model organism helps elucidate congenital human diseases. *Angew Chem Int* 2006; 45: 6802-6818.
2. Kizuaki O, Marth JD. Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell* 2006; 126: 855-867.
3. Moens S, Vanderleyden J. Glycoproteins in prokaryotes. *Arch Microbiol* 1997; 168: 169-175.
4. Schmidt MA, Riley LW, Benz I. Sweet new world: glycoproteins in bacterial pathogens. *Trends Microbiol* 2003; 11(12): 554-561.
5. Szymanski CM, Wren BW. Protein glycosylation in bacterial mucosal pathogens. *Nature* 2005; 3: 225-237.
6. Strahl S, Gentzsch M, Tanner W. Protein O-mannosylation. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1426(2): 297-307.
7. Szymanski C, Logan S, Linton D, Wren B. *Campylobacter* - a tale of two protein glycosylation systems. *Trends Microbiol* 2003; 11 (5): 233-238.
8. Szymanski C, Yao R, Ewing CP, Trust TJ, Guery P. Evidence for a system of general protein glycosylation in *Campylobacter jejuni*. *Mol Microbiol* 1999; 32(5): 1022-1030.
9. Linton D, Allan E, Karlyshev AV, Cronshaw AD, Wren BW. Identification of N-acetylgalactosamine-containing glycoproteins PEB3 and CgpA in *Campylobacter jejuni*. *Mol Microbiol* 2002; 43(2): 497-508.
10. Andrey V, Karlyshev, Julian M, Brendan W. The *Campylobacter jejuni* glycome. *FEMS Microbiology Reviews* 2005; 29: 377-390.
11. Hoff DF. Tuberculosis vaccine development: goals, immunological design, and evaluation. *Lancet* 2008; 372(9633): 164-75.
12. Espitia C, Mancilla R. Identification, isolation and partial characterization of *Mycobacterium tuberculosis* glycoprotein antigens. *Clin Exp Immunol* 1989; 77: 378-383.
13. Dobos K, Khoo K, Swiderek K, Brennan P, Belisle J. Definition of the full extent of glycosylation of the 45-kilodalton glycoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* 1996; 178(9): 2498-2506.

14. Horn C, Namane A, Pescher P, Riviere M, Romain F, Puzo G, Barzu O, Marchal G. Decreased capacity of recombinant 45/47-kDa molecules (Apa) of *Mycobacterium tuberculosis* to stimulate T lymphocyte responses related to change in their mannosylation pattern. *J Bacteriol* 1999; 274(45): 32023-32030.
15. Jung S, Yang C, Lee J, Shin R, Jung S, Son J, Harding C, Kim H, Park J, Paik T, Song C, Eun-Kyeong. The myco-bacterial 38-kilodalton glycolipoprotein antigen activates the mitogen-activated protein kinase pathway and release of proinflammatory cytokines through toll-like receptors 2 and 4 in human monocytes. *Infection and Immunity* 2006; 74(5): 2686-2696.
16. VanderVen B, Harder J, Crick D, Belisle J. Export-mediated assembly of mycobacterial glycoproteins parallels eukaryotic pathways. *Science* 2005; 309: 941-943.