



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 267 285**

51 Int. Cl.:  
**C12P 19/24** (2006.01)  
**C12N 9/10** (2006.01)  
**C12N 15/00** (2006.01)  
**C07H 21/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **99941028 .5**  
86 Fecha de presentación : **10.08.1999**  
87 Número de publicación de la solicitud: **1105515**  
87 Fecha de publicación de la solicitud: **13.06.2001**

54 Título:  **$\alpha$ 2,8/2,9-polisialiltransferasa.**

30 Prioridad: **10.08.1998 US 96003 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.03.2007**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.03.2007**

73 Titular/es: **THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE**  
**10550 North Torrey Pines Road**  
**La Jolla, California 92037, US**

72 Inventor/es: **Wong, Chi-Huey;**  
**Shen, Gwo-Jenn y**  
**Datta, Arun**

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 267 285 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

$\alpha$ 2,8/2,9-polisialiltransferasa.

5 **Campo técnico**

La invención se refiere a  $\alpha$ 2,8/2,9-polisialiltransferasa y a métodos para producir y usar  $\alpha$ 2,8/2,9-polisialiltransferasa recombinante.

10 **Antecedentes**

Los ácidos 9-carbono-5-amino-3,5-didesoxi-D-glicero-D-galactononulo-sónicos o ácidos siálicos comprenden una familia de derivados de ácido neuramínico que están ampliamente extendidos en la naturaleza, variando de origen bacteriano a humano. Este resto de azúcar conectado a cadenas de carbohidrato de glicolípidos y glicoproteínas representa un papel clave en muchos episodios biológicos importantes mediados por interacciones carbohidrato-proteína (Schauer, R. y otros (1995) *Biology of the Sialic Acids*, pp 7-67, Plenum Press, Nueva York., Rosenberg, A. ed). Los ácidos siálicos también se encuentran en homopolímeros lineales (poliSia) de ácido *N*-acetilneuramínico (Neu5Ac) y ácido *N*-glicililneuramínico (Neu5Gc) ligados por enlaces  $\alpha$ 2,8-,  $\alpha$ 2,9- o  $\alpha$ 2,8/ $\alpha$ 2,9-cetosídicos (Troy, F. A. (1992) *Glycobiology* **2**, 5-23). El grado de polimerización puede extenderse más allá de 200 residuos de ácido siálico (Rohr, T.E. y otros (1980) *J. Biol. Chem.*, **255**, 2332-2342), constituyendo de ese modo un grupo estructuralmente único de polímeros de carbohidrato que modifican covalentemente glicoconjugados de la superficie celular (Troy, F.A. (1990) *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **2**, 430-449). La polisialilación de las moléculas de adhesión de células neuronales (NCAM) de mamífero, por ejemplo, afecta a interacciones adhesivas célula-célula durante la embriogénesis, incluyendo fasciculación de neuritas e interacciones neuromusculares (Edelman, G.M. (1985) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **50**: 877-889 y Cunningham, B.A. y otros (1987) *Science* **236**: 799-806). Aunque la bacteria neuroinvasiva *Escherichia coli* K1 contiene un homopolímero de (-8-NeuAca2-) (Troy, F.A. y otros (1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 7377-7387), el Grupo C de *Neisseria meningitidis* (Liu, T.Y. y otros (1971) *J. Biol. Chem.* **246**: 4703-4712 y Vann, W.F. y otros (1978) *J. Bacteriol.* **133**, 1300-1306) presenta un homopolímero de enlaces (-9-NeuAca2-). Por otra parte, los antígenos capsulares de poliSia de *E. coli* K92 neuroinvasiva están compuestos por residuos de poli(-8NeuAca2,9NeuAca2-) (Egan, W. y otros (1977) *Biochemistry*, **16**, 3687-3692). Enlaces alternativos de  $\alpha$ 2,8NeuAc- y  $\alpha$ 2,9NeuAc- no podrían encontrarse en sistemas de mamífero y por lo tanto podrían utilizarse para provocar una respuesta inmunológica. De hecho, el heteropolímero procedente de la cepa K92 de *E. coli* se está empleando como una vacuna de carbohidrato en los experimentos clínicos de pacientes que sufren meningitis aguda (Devi, S.J. y otros (1991) *Proc Natl Acad Sci USA*, **88**, 7175-9).

Las sialiltransferasas que catalizan la adición de ácido siálico para formar tales diversas moléculas de reconocimiento de carbohidratos están dentro de al menos dos familias. Mientras que se han obtenido 13 clones de sistemas de mamífero (Tsuji, S. y otros (1996) *Glycobiology* **6**, v-vii), solo se han clonado hasta la fecha 4 de sistemas bacterianos (Vimr, E.R. y otros (1992) *J. Bacteriol* **174**, 5127-5131; Gilbert, M. y otros (1997) *Eur. J. Biochem.* **249**: 187-194 y Yamamoto T. y otros (1998) *J. Biochem* (Tokyo) **123**, 94-100). La clonación reciente de sialiltransferasas tanto de mamífero como bacterianas mostraba que estas dos familias de genes surgían de forma diferente. La polisialiltransferasa (poliST) codificada por *neuS* en *E. coli* usa ácido CMP-siálico como un donante y cataliza una adición secuencial de ácido siálico al extremo no reductor de un aceptor (Kundig, F.D. y otros (1971) *J. Biol Chem.* **246**: 2543-2550 y Steenbergen, S.M. y otros (1990) *Molecular Microbiology* **4**: 603-611). En un estudio detallado que usa la cepa patógena de *E. coli* K1, se ha clonado el gen que codifica para CMP-Neu5Ac:poli- $\alpha$ 2,8-sialosil sialiltransferasa, denominado *neuS*. Se encontró que este gen estaba aglomerado en la región *kps* que está implicada en la iniciación, la polimerización y posiblemente la traslocación de cadenas de poliSia a través de la membrana interna (Weisgerber, C. y otros (1991) *Glycobiology* **1**, 357-365; Weisgerber, C. y otros (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 1578-1587 y Steenbergen, S.M. y otros (1991) *Glycoconjugate J.* **8**, 145). Un gen similar se ha identificado mediante hibridación a la cepa K92 de *E. coli*, cuya cápsula contiene poli (-8NeuAca2,9NeuAca2-) (*ibid*, Egan, W. y otros 1977). La secuencia de nucleótidos completa de este gen *neuS* de K92 mostraba que este producto génico difiere en 70 aminoácidos del producto génico *neuS* de K1 (*ibid*, Vimr, E.R. 1992). Aunque un estudio *in vitro* indicaba que el *neuS* de *E. coli* K1 que codifica para una proteína de 47 kb tiene actividad de polisialiltransferasa, no se había demostrado claramente hasta ahora tal actividad para el producto *neuS* de *E. coli* K92.

55 **Sumario**

Se describe aquí la clonación del gen *neuS* de la cepa K92 de *E. coli* mediante PCR usando los cebadores descritos previamente (*ibid*, Vimr, E.R. y otros 1992), se expresó el gen en *E. coli* y se observó que la enzima procedente de este gen cataliza la síntesis de ácidos polisialílicos con enlaces tanto  $\alpha$ 2,8 como  $\alpha$ 2,9 *in vitro* e *in vivo*.

Un aspecto de la invención se dirige a plásmido de DNA que contiene el gen *neuS* de *escherichia coli* K92 y que codifica  $\alpha$ 2,8/2,9-polisialiltransferasa a partir de *escherichia coli* K92, teniendo la  $\alpha$ 2,8/2,9-polisialiltransferasa una etiqueta de histidina hexámera fusionada a su extremo N-terminal.

Otro aspecto de la invención se dirige a una célula transformada que tiene un gen que codifica  $\alpha$ 2,8/2,9-polisialiltransferasa que tiene una etiqueta de histidina hexámera fusionada a su extremo N-terminal de *escherichia coli* K92, siendo el gen según se indica en el párrafo precedente.

Otro aspecto de la invención se dirige a un procedimiento para obtener  $\alpha 2,8/2,9$ -polisialiltransferasa que tiene una etiqueta de histidina hexámera fusionada a su extremo N-terminal. En la primera etapa del procedimiento, una célula transformada que tiene un gen para  $\alpha 2,8/2,9$ -polisialiltransferasa que tiene una etiqueta de histidina hexámera fusionada a su extremo N-terminal expresa tal gen. La  $\alpha 2,8/2,9$ -polisialiltransferasa expresada que tiene una etiqueta de histidina hexámera fusionada a su extremo N-terminal se libera a continuación de la célula. La  $\alpha 2,8/2,9$ -polisialiltransferasa puede ser de *escherichia coli* K92.

Otro aspecto de la invención se dirige a  $\alpha 2,8/2,9$ -polisialiltransferasa recombinante que no está unida a una membrana celular y que tiene una etiqueta de histidina hexámera fusionada a su extremo N-terminal. En una modalidad preferida, la  $\alpha 2,8/2,9$ -polisialiltransferasa es de *escherichia coli* K92.

Otro aspecto de la invención se dirige a un procedimiento para convertir un sustrato de  $\alpha 2,8/2,9$ -polisialiltransferasa en un producto. En este procedimiento, el sustrato se pone en contacto con  $\alpha 2,8/2,9$ -polisialiltransferasa que tiene una etiqueta de histidina hexámera fusionada a su extremo N-terminal y que no está unida a una membrana celular bajo condiciones que promueven la catálisis enzimática de una conversión del sustrato en el producto. En un modo preferido, la  $\alpha 2,8/2,9$ -polisialiltransferasa es de *escherichia coli* K92.

### Breve descripción de las figuras

La Figura 1 ilustra la construcción del vector de expresión para la expresión de neuS de K92 como una proteína de fusión. El fragmento de PCR de 91,2 kb obtenido para la forma de longitud completa de gen neuS de K92 usando su DNA genómico como plantilla se subclonó en el vector pRSET (Novagen, Madison, WI) usando dos sitios de restricción únicos Bam HI y Eco RI. Esto daba como resultado la expresión de la proteína con una etiqueta de histidina hexámera fusionada en su extremo N-terminal. El vector proporciona el codón de parada seguido por la secuencia para la histidina hexámera. La forma de longitud completa de la proteína permanece principalmente como forma unida a la membrana. Sin embargo, aproximadamente 30-40% de la proteína se “libera” en el Sobr. de 40K durante el tratamiento con un detergente. Esta proteína liberada retiene la actividad catalítica completa y se usó en este estudio.

La Figura 2 ilustra una gráfica de hidrofilia y la estructura secundaria predicha para la  $\alpha 2,8/2,9$ -polisialiltransferasa. La gráfica de hidrofilia de la forma de longitud completa del producto génico neuS de K92 sugiere la presencia de dos señales de retención de la membrana predichas en el medio del polipeptido. La presencia de esta proteína (forma de longitud completa tanto natural como recombinante) como forma unida a la membrana también apoya este modelo. Se describe que aproximadamente 30-40% de la proteína se “libera” en el Sobr. de 40K usando un detergente adecuado. Esta proteína liberada retiene la actividad catalítica completa y se usó en este estudio. La gráfica de hidrofilia se comparó con la de ST6Gal 1 de mamífero (Weinstein y otros, 1987) como un representante. Se predice que esta enzima solo contiene un dominio de traspaso de membrana.

La Figura 3 ilustra un análisis de transferencia Western de la proteína expresada por neuS de K92. Células de *E. coli* de BL21(DE3) transformadas con el gen neuS de K92 en el vector de expresión pRSET se indujeron con IPTG (concentración final 1 mM) y se recogieron después de 4 horas. Las células transformadas con el vector pRSET solamente también se hicieron crecer y se usaron como control negativo. Como un control positivo, BL21(DE3) previamente transformadas con el gen de tioesterasa etiquetado con histidina (40) subclonado en pET20B(+) se hicieron crecer, se indujeron y se recogieron de forma similar. Después de la recogida, las células se sometieron a lisis y los sobrenadantes se recogieron después de la centrifugación a 15.000 rpm (Sobr. de 15K). Las proteínas se desplazaron usando un SDS al 12%-PAGE según se menciona en los “Materiales y Métodos”. Las muestras eran: Sobr. de 15K del control negativo (carril 1), Sobr. de 15K de las células transformadas con gen neuS de K92 (carril 2) y Sobr. de 15 K del control positivo (carril 3). La transferencia se reveló usando anticuerpo anti-(His)<sub>5</sub> (Qiagen) y estuche de sustrato de DAB potenciado con metal (Pierce). La  $\alpha 2,8/2,9$ -polisialiltransferasa expresada por neuS migraba en el gel a aproximadamente 47,5 kd. En el carril 3, el control positivo para la transferencia Western mostraba una banda a ~23 kd para la tioesterasa. Puede apuntarse que el nivel de expresión para el gen neuS era comparativamente inferior que el gen de tioesterasa.

La Figura 4 ilustra un análisis de los productos de reacción enzimática mediante cromatografía en capa fina (TLC). El Sobr. de 40K se usó como una fuente de la enzima en la mezcla de reacción que contenía aceptor 1 mM y CMP<sup>[14]</sup> NeuAc (9 nmol; 1 Ci) como donante en un tampón de reacción que contenía Tris-HCl 25 mM (pH 8,0), MgCl<sub>2</sub> 5 mM, DTT 5 mM y Triton CF-54 al 0,5%. Como un ejemplo, se observó el análisis con la mezcla de reacción que contenía ácido siálico y GM<sub>3</sub> como aceptores y CMP<sup>[14]</sup>NeuAc como sustrato donante. Como un control negativo, la mezcla de reacción contenía ácido siálico como aceptor sin la adición de ninguna enzima. Para A y B, se usaron placas de TLC de gel de sílice 60 para las muestras: mezcla de reacción sin la enzima (carril 1), GM<sub>3</sub> como aceptor (carril 2), ácido siálico como aceptor (carril 3) y mezcla de reacción sin ácido siálico exógeno (carril 4). Los disolventes usados eran: (A) n-propanol:NH<sub>4</sub>OH 1M:agua: 7:1:2; (B) cloroformo:metanol:CaCl<sub>2</sub> al 0,02%: 45:55:10. Las mezclas de reacción también se analizaron mediante TLC en DEAE-celulosa. Después de que la reacción fuera completa, una parte de la muestra se acidificó con ácido acético al 10% y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Para C, se usó placa de TLC de DEAE-celulosa. Las muestras eran: mezcla de reacción con ácido siálico como aceptor (carril 1) y después de la acidificación (carril 2); mezcla de reacción sin enzima (carril 3) y después de la acidificación (carril 4); usando GM<sub>3</sub> como aceptor (carril 5) y después de la acidificación (carril 6); mezcla de reacción sin aceptor exógeno (carril 7) y después de la acidificación (carril 8). Los disolventes en C usados eran: n-propanol:NH<sub>4</sub>OH 14,5 M:agua: 6:1:3. Las placas se secaron después del recorrido y se expusieron a una película XAR-5 de Kodak. La marca de la

## ES 2 267 285 T3

flecha indica la posición del producto o los productos de reacción libres de células potenciales. También se mostraba la posición de CMP-NeuAc y ácido siálico libre. Se encontró que tanto la enzima como sus productos de reacción son inestables y se degradan a lo largo del tiempo.

5 La Figura 5 ilustra una estructura de producto de reacción libre de células. El producto obtenido mediante la reacción libre de células usando proteína de *neuS* de K92 indicaba la estructura de un ácido siálico pentámero con enlaces  $\alpha 2,9/2,8$  alternos (I). También se muestra la forma lactónica principal propuesta (II) obtenida en la reacción enzimática.

### 10 Descripción detallada

Las abreviaturas usadas aquí: NeuAc, ácido neuramínico; PCR, reacción en cadena de la polimerasa; CMP-NeuAc, ácido CMP-neuramínico o ácido CMP-siálico; nt, nucleótido(s); TLC, cromatografía en capa fina.

### 15 Clonación del gen *neuS* de K92

El DNA genómico aislado de la cepa K92 de *Escherichia coli* (ATCC 35860) usando un estuche de extracción de DNA (Qiagen Co., Valencia, CA) se usó para la amplificación del gen *neuS* mediante PCR. Esto se realizó en una mezcla de reacción de 100 ml que contenía 100 mg de DNA genómico como plantilla, 300 nmoles de cebadores, 200 mM de dNTPs, KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), MgCl<sub>2</sub> 2 mM, gelatina al 0,01%, Triton X-100 al 0,1% y una mezcla tanto de DNA polimerasa de *Taq* como de DNA polimerasa de *pfu* (1 unidad de cada una). Dos cebadores, el cebador directo con el sitio *Bam* HI interno (subrayado) [5' ATATTGGATCCATATTTGATGCTAGTT TA 3'; nt. 3-20] y un cebador inverso con el sitio *Eco* R<sup>I</sup>, ((5' GGCGCGAATTCTTACTC CCCCAAGAAAA 3'; nt. 1230-1214), diseñados basándose en la secuencia previamente publicada (*ibid.*, Vimr, E.R. 1992), se usaron para la PCR usando las siguientes condiciones: 94°C, 1 minuto; 50°C, 1 minuto y 72°C, 2 minutos durante 35 ciclos. El análisis en gel de agarosa del producto mostraba la presencia de una banda principal con el tamaño esperado de aproximadamente 1,2 kb. El fragmento obtenido se purificó mediante electroforesis en gel de agarosa, se digirió con *Bam* HI y *Eco* RI y se subclonó en un vector pRSET digerido de forma similar (Invitrogen Co., San Diego, CA) siguiendo técnicas de biología molecular estándar (Sambrook, J. y otros (1989) *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.). La mezcla de ligación se usó a continuación para la transformación de células competentes de la cepa BL21(DE3) de *E. coli* (Novagen, Madison, WI). El clon que contenía el vector de expresión se confirmó mediante secuenciación de ambas hebras usando un secuenciador de DNA automatizado (ABI 377) en las instalaciones de TSRI Core.

### 35 Expresión del gen *neuS* de K92

Puesto que la cepa DH5 $\alpha$  de *E. coli* que carece del aglomerado génico *kps* no tiene actividad de sialiltransferasa (*ibid.*, Steenbergen, S.M. 1990), se usó inicialmente para expresar el gen. Esta cepa tiene un gen formador de vellosidades en su cromosoma y por lo tanto no requiere ninguna presión para la expresión de sus vellosidades sexuales. El fago M13 que contiene el gen de RNA polimerasa de T7 (Invitrogen) se usó para infectar DH5 $\alpha$ F' transformadas con el vector pRSET que contiene el gen de *neuS* clonado. Las células transformadas se hicieron crecer en medio LB (con MgCl<sub>2</sub> 1 mM) que contenía 100  $\mu$ g de carbicilina/ml a 37°C a D.O.<sub>600</sub> ~0,3 y a continuación se añadió IPTG 1 mM. Después de una hora de incubación, el fago M13/T7 se añadió para infectar las células según se describe por el suministrador (Invitrogen) y se recogió después de 5 horas de incubación. Un ensayo de actividad enzimática y SDS-PAGE del lisado celular (sobrenadante de 15K) mostraban la expresión del gen *neuS* en DH5 $\alpha$ F'. Una banda que migra como ~47,5 kd en la SDS al 12%-PAGE aparecía en una hora de incubación después de la infección con gen de RNA polimerasa de T7 que contenía M13 en presencia de IPTG (según se juzgaba por transferencia Western). La intensidad relativa de la banda de 47,5 kd se incrementaba con el tiempo y alcanzaba un máximo después de 4 horas. El ensayo enzimático del extracto libre de células usando ácido siálico como aceptor también indicaba la expresión de la polisialiltransferasa de K92. Sin embargo, las células DHS $\alpha$ F' transformadas con vector pRSET también daban una banda que comigraba con la banda de 47,5 kd en SDS-PAGE. Un intento de separar estas bandas usando agarosa Ni<sup>2+</sup>-NTA resultaba ser difícil. Por lo tanto, se decidió expresar esta proteína en la cepa HMS174(DE3) Lys o BL21(DE3) de *E. coli* (Invitrogen).

55 Las células BL21 transformadas (DE3) que contenían el gen *neuS* de la cepa K92 de *E. coli* se hicieron crecer exponencialmente en medio LB (con MgCl<sub>2</sub> 1 mM) que contenía 100  $\mu$ g de carbicilina/ml a 37°C hasta que se alcanzaba A600 ~0,3. La expresión del gen *neuS* se alcanzaba a 37°C mediante la inducción con IPTG según se describe en el estuche de expresión (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las células se recogieron después de 5 horas de incubación.

60 Un plásmido de DNA denominado BL21/DE3 (8,9-PST) que contenía el gen *neuS* de K92, obtenido anteriormente, se originó de la cepa K92 de *Escherichia coli* mediante PCR para clonar la  $\alpha 2,8/2,9$ -polisialiltransferasa. El DNA se subclonó en el vector pRSET (Invitrogen) y el DNA plasmídico resultante (8,9-PST) se transformó en *Escherichia coli* GL21(DE3).

### 65 Transferencia Western

Este análisis se realizó siguiendo una técnica estándar (Harlow, E. y otros (1988) *Antibodies*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.). Las muestras de proteína se hirvieron durante 8-10 minutos en 1 x tampón de

## ES 2 267 285 T3

muestra de gel de Laemmli en ausencia o presencia de mercaptoetanol al 10%. La electroforesis se realizó usando SDS al 10%-gel de poliacrilamida en tampón de Tris/glicina-SDS. Después de que las proteínas se transfirieran a una membrana de nitrocelulosa, la transferencia se bloqueó con un tampón de bloqueo (transferido en TBS y Tween-20 al 0,1%) y se reveló mediante adsorción con el anticuerpo monoclonal anti-(His)<sub>6</sub> de ratón (Qiagen, Valencia, CA) diluido (1:500) con el tampón de bloqueo. La transferencia se incubó con anticuerpo secundario anti-ratón de oveja conjugado a peroxidasa de rábano picante (1:1000; Amersham Corp.). Las bandas proteínicas se visualizaron mediante quimioluminiscencia según se sugiere mediante el suministrador de los reaccionantes (Amersham Corporation) o tiñendo con el immunoPure Metal Enhanced DAB Substrate Kit (Pierce, Rockford, IL).

### 10 *Ensayo de sialiltransferasa*

El ensayo se llevó a cabo esencialmente como se describe por Vimr y otros (Steenbergen, S.M. y otros (1992) *J. Bacteriol.* 174: 1099-1108) con las siguientes modificaciones: después de recoger, las células se lavaron tres veces con Tris-HCl 25 mM (pH 8,0) y a continuación se resuspendieron en Tris-HCl 25 mM (pH 8,0) que contenía MgCl<sub>2</sub> 5 mM, ditiotreititol (DTT) 5 mM y 1  $\mu$ l/ml de cóctel inhibidor de proteasa (Sigma). Las células se sometieron a lisis tres veces usando una French Press (AMINCO; 1, 35,2 kg/cm<sup>2</sup> (500 psi)). El residuo celular se retiró mediante centrifugación dos veces a 15.000 rpm y el sobrenadante se recogió (denominado Sobr. de 15K). Este sobrenadante se centrifugó de nuevo a 100.000 x g (~40 K rpm) usando una ultracentrífuga Beckman (Modelo L5-50). Tanto el sobrenadante (denominado el Sobr. de 40K) como el nódulo se conservaron. El nódulo se suspendió en un tampón que contenía Tris-HCl 25 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, DTT 5 mM y Triton CF-54 al 0,1%. Los sobrenadantes y el nódulo se almacenaron sobre hielo y se usaron para el ensayo en menos de 2 horas.

Sin la adición de aceptor, se determinó la actividad enzimática endógena. La actividad exógena se detectó a continuación mediante la adición de ácido siálico como aceptor y CMP[<sup>14</sup>C]NeuAc como donante en un tampón de reacción que contenía Tris-HCl 25 mM (pH 8,0), MgCl<sub>2</sub> 5 mM, DTT 5 mM y Triton CF-54 al 0,5%. También se usaron otros sustratos, incluyendo ácido colomínico. Los ensayos de actividad enzimática tanto endógena como exógena miden la transferencia de NeuAc marcado con <sup>14</sup>C al aceptor. Los sustratos radiomarcados sin reaccionar se separaron mediante TLC en DEAE-celulosa (n-propanol/NH<sub>4</sub>OH 14M/H<sub>2</sub>O: 6:1:3) o mediante cromatografía en columna Sephadex G-25. La radiactividad restante en el origen y/o en la parte superior de la placa de TLC o el producto obtenido en el volumen de huecos de la columna Sephadex G-25 se cuantificó mediante espectrometría de centelleo de líquidos. Para el análisis usando cromatografía en columna Sephadex G-25, se preparó una columna (1 cm x 3,5 cm) de Sephadex G-25 (Pharmacia) en agua. La mezcla de reacción libre de células radiomarcada (60  $\mu$ l) se cargó y se lavó con 1,5 ml de agua, que se recogieron y se contaron. En algunos experimentos, la actividad se determinó separando el CMP [<sup>14</sup>]NeuAc no usado mediante cromatografía en columna de Dowex 1X8 (forma fosfatada) (Williams, M.A. y otros (1995) *Glycoconj. J.* 12: 755-761). Las velocidades iniciales se estimaron gráficamente y la actividad se expresó como pmoles de ácido siálico transferidos por hora.

### *Cromatografía en capa fina y fluorografía*

Después de que la reacción libre de células fuera completa, las proteínas se retiraron mediante un filtro Amicon (PMCO 10K) y el sobrenadante que contenía productos de reacción oligómeros se separó mediante cromatografía en capa fina (TLC) en gel de sílice 60 (con soporte de aluminio) y/o DEAE-celulosa (con soporte de plástico) usando los siguientes sistemas disolventes: (a) n-propanol, NH<sub>4</sub>OH 14 M, H<sub>2</sub>O: 6:1:3; (b) cloroformo:metanol:CaCl<sub>2</sub> al 0,02%: 30:55:15. Los cromatogramas de control se calibraron con oligómeros de mono- a hexa-sialosilo (Calbiochem, San Diego, CA) que se detectaron mediante aerosol de orcinol, según se describe por Corfield y Schauer (*Sialic Acids: Chemistry, Metabolism, and Function*, (Schauer, R., ed) *Cell Biology Monograph*, Vol 10, pp. 77-94, Springer-Verlag, Nueva York, 1982). Este método resolvía ácidos siálicos de monómeros a octámeros. Los oligómeros compuestos por nueve o más residuos de sialosilo se retenían en el origen. Los cromatogramas marcados se pulverizaron con En<sup>3</sup>Hance (New England Nuclear) y se sometieron a fluorografía contra una pantalla intensificadora. Después de la fluorografía, los oligómeros de sialosilo se detectaron en placas de TLC de gel de sílice 60 mediante aerosol de orcinol para el alineamiento de señales radiactivas con bandas detectadas colorimétricamente. Para el análisis usando TLC en DEAE-celulosa, la posición del producto o los productos de reacción marcados con <sup>14</sup>C libres de células se marcó después del alineamiento de las señales radiactivas, se cortaron y se contaron.

### 55 *Aislamiento y purificación de oligosacáridos polisialilados*

Cepas de *Escherichia coli* transformadas solamente con vector o con el gen *neuS* de K92 se usaron para la extracción de polisacárido siguiendo el método de Kasper y otros (Kasper, D.L. y otros (1973) *J. Immunol.* 110, 262-268) con las siguientes modificaciones. Para el polisacárido de K92, la cepa K92 de *E. coli* se hizo crecer en 2 l de medio mínimo complementario de Davis (formulación de medio ATCC N° 54) a 37°C durante la noche. La cepa K1 de *E. coli* transformada con el gen *neuS* de K92 se hizo crecer en 2 l de medio mínimo complementario de Davis que contenía 2% de glicerol en lugar de glucosa. Las células se hicieron crecer hasta D.O.<sub>600</sub> ~0,3 y se añadió IPTG 1 mM (concentración final). Después de la incubación a 37°C durante 1 hora, se añadieron fagos M13/T7 (Invitrogen; 10 pfu/célula) y se incubaron a 37°C. Después del crecimiento nocturno los organismos se retiraron mediante centrifugación (48.000 x g durante 30 minutos a 4°C) y el sobrenadante se recogió y se filtró a través de un filtro Millipore de 0,45  $\mu$ . Se añadió bromuro de hexadeciltrimetilamonio (Cetavlon; 0,3%; Sigma) al sobrenadante con agitación y el precipitado formado se recogió mediante centrifugación. El precipitado se solubilizó en CaCl<sub>2</sub> 0,9 M y se reprecipitó con tres volúmenes de etanol absoluto frío (-20°C). La precipitación con etanol de CaCl<sub>2</sub> 0,9 M se repitió tres veces. El

## ES 2 267 285 T3

producto final se dializó contra agua y se liofilizó. La purificación final se realizó usando una columna (2 cm x 25 cm) de Biogel P2 (Pharmacia) eluida con agua siguiendo el procedimiento habitual, y se verificó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida siguiendo el método de Troy y McCloskey (*ibid*, 1979). Después de la hidrólisis mediante ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 N, 80°C), la cuantificación de ácido siálico se determinó mediante el procedimiento de ácido tiobarbitúrico según se describe previamente (Liu, J. y otros (1992) *J. Am. Chem. Soc.* **114**: 3901-3910).

### Ensayo de Proteína

Este se realizó usando reactivo de ácido bicínico (BCA) siguiendo las instrucciones proporcionadas por el suministrador (Pierce Chemical Co.).

### Análisis de espectrometría de masas

Se realizaron experimentos de espectrometría de masas con ionización por electropulverización (ES-MS) en un espectrómetro de masas cuadrupolar triple API III Perkin Elmer SCIEX. Las muestras de electropulverización se introdujeron típicamente en el analizador de masas a una velocidad de 4,0 ml/minuto. Los iones positivos y negativos, generados mediante evaporación de gotículas cargadas, entran en el analizador a través de una placa interfacial y un orificio de 100 mm, mientras que el potencial de desaglomeración se mantiene entre 50-200 V para controlar la energía de colisión de los iones que entran en el analizador de masas. El voltaje del emisor se mantiene típicamente a 5000 V. La *m/z* se determinó para los picos principales.

### Análisis de NRM

Se registraron espectros de resonancia magnética nuclear de <sup>13</sup>C alrededor de 23°C en un espectrómetro AMX-400 o DRX-600 de Bruker que funcionaba en el modo de transformación de Fourier pulsatorio usando desacoplamiento del ruido de protones de banda ancha. Los polisacáridos se trasladaron como soluciones en óxido de deuterio a pH 7,0. El disolvente, D<sub>2</sub>O, servía como una señal de cierre interna. A menudo se usó DMSO como referencia interna. Se encontró que el espectro de <sup>13</sup>C de polisacáridos de K1 y K92 determinado en este estudio era idéntico al presentado por Egan y otros (*ibid*, Egan, W., 1977). La resonancia de NHCO (carbonilo de amida) del polisacárido K1 de los estudios presentes y de Egan se tomó para tener el mismo desplazamiento químico y todas las señales restantes referidas de acuerdo con esto.

## Resultados

### Clonación del gen *neuS* de K92

Previamente, se clonó el gen *neuS* de la cepa K1 de *E. coli* y se encontró que tenía la actividad de  $\alpha$ 2,8-polisialiltransferasa. Usando el gen *neuS* de K1 como una sonda, Vimr y otros clonaron un gen de 1230 pb (*ibid*, Vimr, E.R., 1992) de la cepa K92 de *E. coli* que tenía 87,3% de homología con el gen de K1. La secuencia proteínica deducida de este gen indicaba el mismo número de aminoácidos (total 409 aa) con 83% de homología con la de K1 a nivel proteínico. Estudios estructurales previos sobre el antígeno de polisacárido de esta cepa K92 de *E. coli* (Bos-12) sugería la presencia de ácido polisialílico con enlaces  $\alpha$ -2,8 y  $\alpha$ -2,9 alternos (*ibid*, Egan, W., 1977). Por lo tanto, se supone que el producto génico de la cepa K92 confiere actividad de polisialiltransferasa (14, 13). Sin embargo, la expresión del gen *neuS* de K92 no se demostró claramente, ni tampoco se mostró formar un polímero de ácido siálico *in vitro* con enlaces  $\alpha$ 2,8/2,9 alternos.

Para caracterizar el producto del gen *neuS* de K92, se ha clonado este gen a partir de la cepa K92 de *E. coli* usando un enfoque basado en PCR. Los cebadores se diseñaron basándose en la secuencia previamente publicada (*ibid*, Vimr, E.R., 1992) y se usaron para amplificar el clon de longitud completa del gen *neuS* a partir del DNA genómico de la cepa K92. El fragmento de 1,23 kb obtenido mediante PCR se subclonó en pRSET (Invitrogen) para la expresión del producto del gen *neuS* como una proteína de fusión con la etiqueta de histidina hexámera fusionada en su extremo N-terminal (Fig. 1). El clon se verificó mediante secuenciación de doble hebra de todo el fragmento incluyendo los sitios de restricción.

Una gráfica de la hidrofilia (Hopp, T.P. y otros (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78**, 3824-3828 y Kyte, J. y otros (1982) *J. Mol. Biol.* **157**,105-132) revelaba dos regiones potenciales de cruce de la membrana en esta proteína de 409 residuos de aminoácido. La primera está situada a 177 residuos desde el extremo N. Consiste en 19 aminoácidos hidrófobos bordeados por tres residuos de lisina aguas arriba. De forma interesante, este primer dominio de transmembrana está bordeado en cada extremo por un residuo de prolina. Se sabe que la prolina confiere restricciones de conformación de muchas proteínas biológicamente importantes, según se evidencia por estudios de mutagénesis dirigida al sitio (*ibid*, Datta, A.K. 1998; para una revisión, véase Vanhoop, G. y otros (1995) *FASEB J.* **9**, 736-744). Un motivo KKKP similar, que se encontró que estaba presente en el polipéptido ST6Gal I (para la nomenclatura, véase la Ref. 12), es parte de una secuencia de anclaje de señal propuesta (Weinstein, J. y otros (1987) *J. Biol. Chem.*, **262**, 17735-17743). El segundo dominio de transmembrana está situado a 327 residuos desde el extremo N. Consiste en 17 residuos de aminoácido hidrófobos bordeados por dos residuos de lisina aguas arriba y un residuo de prolina en su extremo C. De forma notable, la lisina y la serina están presentes predominantemente en este dominio. La presencia de estos dos dominios de transmembrana sugiere que esta proteína está unida a la membrana, según se apoya adicionalmente mediante la transferencia Western (véase posteriormente). Esta característica parece ser única entre las

sialiltransferasas bacterianas clonadas, cuya gráfica de hidrofiliía sugiere la presencia de solo una región potencial de cruce de membrana.

#### Expresión del *neuS* de K92

5

Para la expresión, se usó pRSET (Invitrogen), un vector de expresión procariótico diseñado para obtener una etiqueta de histidina hexámera fusionada en la secuencia N-terminal de la proteína deseada. Debido a la falta de cualquier anticuerpo disponible contra el producto del gen *neuS* de K92, la polisialiltransferasa se expresó como una proteína de fusión y se detectó mediante la transferencia Western usando anticuerpo anti-(His)<sub>5</sub> (Qiagen Inc., Valencia, CA).

10

*Electroforesis en SDS-gel de poli(acrilamida) y transferencia Western:* El extracto en bruto libre de células (Sobr. de 15 K y Sobr. de 40 K) y el nódulo celular, suspendidos en Tris-HCl 25 mM (pH 8,0) que contenía MgCl<sub>2</sub> 5 mM y Triton CF-54 al 0,1%, obtenidos mediante ultracentrifugación se analizaron mediante SDS-PAGE. La tinción con azul de Coomassie mostraban la presencia de diversas bandas incluyendo una banda principal a aproximadamente 47,5 kd, el tamaño esperado para el producto del gen *neuS*. Esta banda estaba ausente en el control (células transformadas con vector pRSET solamente). Se usó un gel de réplica para transferir las proteínas a una membrana de nitrocelulosa y se detectó usando anticuerpo monoclonal anti-(His)<sub>5</sub> de ratón (Qiagen, Valencia, CA). La transferencia se reveló finalmente usando sustratos de DAB potenciados siguiendo el protocolo del suministrador (Pierce) o mediante una técnica quimioluminiscente según se describe previamente (Datta, A.K. y otros (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 9608-9614). La transferencia Western mostraba claramente la presencia de una sola banda a aproximadamente 47,5 kd (Fig. 3). También se encontró que la  $\alpha$ 2,8/2,9-polisialiltransferasa estaba presente en el sobrenadante de 40K. El intento inicial de purificar la proteína usando columna de agarosa Ni<sup>2+</sup>NTA fallaba. Aunque la proteína de fusión se une aparentemente a la agarosa Ni<sup>2+</sup>NTA, también se observó unión no específica con otras proteínas celulares. Por lo tanto, el Sobr. de 40K se usó en este estudio para el ensayo enzimático y el análisis de su producto o productos.

25

#### Ensayo de sialiltransferasa

El extracto en bruto libre de células (Sobr. de 15K), el sobrenadante de 40K (Sobr. de 40K) y el nódulo se usaron para el ensayo de diversos sustratos aceptores y CMP [<sup>14</sup>C]NeuAc como sustrato donante. La actividad podía seguirse en todas estas fracciones. Después de que la reacción hubiera terminado, los productos se analizaron mediante TLC o mediante cromatografía en columnas Sephadex G-25. La Figura 4 muestra un análisis representativo. Usando ácido siálico frío como aceptor y CMP [<sup>14</sup>C]NeuAc como donante, se detectó una mancha principal en TLC usando diversos sistemas disolventes. De forma interesante, esta nueva mancha se comportaba como material no polar en TLC de DEAE-celulosa (Fig. 4C). Se encontró que el ácido siálico servía como un buen aceptor, mientras que el ácido colomínico no (Tabla I). El ácido 9-*O*-acetilsíalico no era bien aceptado, indicando que la polimerización probablemente comienza en la posición C9 del aceptor de ácido siálico. De forma notable, los polisialósidos pentámeros y hexámeros con enlaces  $\alpha$ 2,8 no eran aceptados, mientras que el dímero y trímero correspondientes (Calbiochem) servían como aceptores pobres. Entre los glicolípidos probados, GD<sub>3</sub> y GQ<sub>1b</sub> también servían como buenos aceptores. Sin embargo, otros sialilgangliósidos probados eran sustratos pobres (Tabla I).

40

#### Determinación estructural del producto de reacción libre de células

Para la determinación estructural, se llevaron a cabo reacciones libres de células, usando el sobrenadante de 40K como la fuente de enzima, con ácido siálico y CMP-NeuAc no marcado en una relación molar de 1:10 para obtener el producto o los productos de reacción en una cantidad suficiente. Puesto que se sabía que el subproducto CMP inhibe la reacción directa, se añadió fosfatasa alcalina para retirar CMP para incrementar el rendimiento. Según se menciona anteriormente, el producto se movía como un material no polar sobre TLC en DEAE-celulosa, una característica utilizada para la purificación del producto o los productos de reacción libres de células. Después de que la reacción fuera completa, la mezcla de reacción se hizo pasar a través de una columna de Dowex IX8 (forma fosfatada) para retirar CMP-NeuAc y ácido siálico sin reaccionar. El análisis espectral de masas de iones negativos (ES-MS) mostraba un pico principal en *m/z* 1419 para (M-3H<sub>2</sub>O-H) y una *m/z* 1401 para (M-4-H<sub>2</sub>O-H). Este espectro era similar al de ácido  $\alpha$ 2,8-polisíalico obtenido comercialmente (pentámero; Calbiochem). Aunque la muestra auténtica mostraba un patrón de fragmentación que daba cuenta de los fragmentos tetrámero (*m/z* en 1182 para M-3H<sub>2</sub>O-H), trímero (*m/z* en 890 para M-3H<sub>2</sub>O-H), dímero (*m/z* en 599 para M-3H<sub>2</sub>O-H) y monómero (*m/z* en 308 para M-3H<sub>2</sub>O-H), el patrón de fragmentación para el producto de reacción era ligeramente diferente, probablemente debido a la presencia de enlaces  $\alpha$ 2,8 y  $\alpha$ 2,9 en el producto o los productos de reacción libres de células. El grado de polimerización parece estar limitado por la concentración de CMP-NeuAc. La producción de un pentámero como el producto principal en la reacción libre de células se debe probablemente a la limitación de la concentración de CMP-NeuAc junto con el grado limitado de polimerización. Incrementar la cantidad de CMP-NeuAc en la reacción libre de células incrementa en efecto la longitud de cadena del polímero de sialilo según se juzga mediante espectrometría de masas. Aunque la MALDI-MS (Core Facility, The Scripps Research Institute) del pentámero disponible comercialmente (Calbiochem) mostraba un pico para *m/z* a 1473, se obtenía un pico en *m/z* 1474 con CMP-NeuAc 10 mM y una *m/z* 3830 con CMP-NeuAc 20-30 mM.

65

La cepa K1 de *E. coli* que forma el homopolímero de ácidos siálicos conectados por enlaces  $\alpha$ -2,8 en su cápsula se transformó con el gen *neuS* de K92. Esto se realizó para investigar si el producto del gen *neuS* de K92 compete con la  $\alpha$ 2,8-polisialiltransferasa endógena con respecto al mismo aceptor endógeno *in vivo*. El polisacárido capsular de la

## ES 2 267 285 T3

K1 transformada se aisló y purificó mediante cromatografía en columna Biogel P2 según se menciona en “Materiales y Métodos”. La  $^{13}\text{C}$ -NRM de este polisacárido en  $\text{D}_2\text{O}$  mostraba un espectro diferente del de los ácidos polisialílicos derivados de K1 y K92. Los picos principales para  $\text{NCOCH}_3$  y  $\text{NCOCH}_3$  eran similares tanto a los de K1 como K92. Sin embargo, la señal para C-2 a  $\delta$  103,44 era comparativamente más débil. Esto puede deberse a la naturaleza compleja del polisacárido procedente de células transformadas. Por otra parte, los espectros de  $^{13}\text{C}$ -NMR obtenidos para la K1 transformada eran similares a los del polímero obtenido a partir de la cepa K92 de *E. coli*, que también mostraban dos señales estrechamente adyacentes en  $\delta$  23,36 y 23,51. Se observó previamente que esta cepa particular de *E. coli* contiene heteropolisialiloligosacárido con enlaces  $\alpha$ 2,8/2,9 alternos (*ibid*, Egan, W., 1977). Esta complejidad también era evidente en el espectro de  $^1\text{H}$ -NMR que mostraba dos picos a  $\delta$  1,99 y  $\delta$  1,96. Mientras está avanzando un estudio estructural detallado, los datos preliminares indican que el polisacárido aislado de la K1 transformada tiene enlaces tanto  $\alpha$ 2,8 como  $\alpha$ 2,9 presentes en secuencias aleatorias. Esto sugiere que no solo es el gen *neuS* de K92 funcional en la cepa K1 de *E. coli*, sino también que su expresión interrumpía el alargamiento de la cadena de polisialilo normal. Este resultado se debe probablemente a la competición por el mismo aceptor endógeno *in vivo*. Esto también sugiere que el aceptor endógeno no es ni ácido siálico ni ácido colomínico, pero es común para tanto las  $\alpha$ 2,8 como las  $\alpha$ 2,8/2,9-polisialiltransferasas.

De forma interesante, el producto o los productos de reacción enzimática libres de células parecen tender a la formación de lactonas. El producto radiomarcado se traslada como un sialósido no polar en la TLC en DEAE-celulosa y también pasaba a través de una columna de Dowex 1X8 (forma fosfatada). La formación de lactona parece depender de las condiciones de preparación de la muestra y parece ser preferible a pH inferior. Esta lactonización también se observó a pH 8,0, presumiblemente debido a que el pH de la mezcla de reacción disminuía durante la reacción. El análisis de masas por electropulverización también sugería la formación de lactonas en el producto o los productos de reacción libres de células. El pico para  $m/z$  en 1401 está de acuerdo con la pérdida de cuatro  $\text{H}_2\text{O}$  para formar 4 lactonas y el pico principal para  $m/z$  a 1419 está de acuerdo con la formación de 3 lactonas a partir del producto pentámero. La evidencia de apoyo adicional para la presencia de lactonas son los picos de  $^{13}\text{C}$  a  $\sim$ 97 ppm que también se observan en la lactona pentámera auténtica preparada a partir de la hidrólisis parcial del polisacárido de K92.

Estos picos se desplazan hasta  $\sim$ 103,5 ppm cuando se realiza hidrólisis de lactona bajo condiciones básicas. Basándose en la reciente observación de la lactonización regioselectiva de ácido siálico oligómero conectado con enlaces  $\alpha$ -2,8 (Cheng, M.C. y otros (1999) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **38**, 686-689 y Zhang, Y. y otros (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 6183-6189), el grupo carboxilo del ácido siálico del extremo no reductor puede existir como una forma abierta.

Para el análisis espectral de masas del producto de la reacción enzimática, la reacción libre de células se llevó a cabo usando Sobr. de 40 K. La mezcla de reacción contenía ácido siálico 1 mM y CMP-NeuAc 10 mM como donante en un tampón de reacción que contenía Tris-HCl 25 mM (pH 8,0),  $\text{MgCl}_2$  5 mM, DTT 5 mM, Triton CF-54 al 0,5%. Para conducir la reacción directa, el CMP liberado se retiró mediante la adición de fosfatasa alcalina (1 U). Después de que la reacción terminara, el material de reacción se hizo pasar a través de un filtro Amicon (10 MWCO) y el filtrado se usó para el análisis. El producto de reacción enzimática libre de células se comportaba de manera similar al ácido siálico pentámero (Calbiochem), durante la TLC, en varios sistemas disolventes. Los espectros de masas se compararon con el de ácido siálico pentámero disponible comercialmente. Espectro de masas de iones negativos (ES-MS) de: (A) ácido polisialílico pentámero estándar y (B) producto de reacción libre de células. Los picos principales para  $m/z$  estaban marcados por una flecha y se describen en el texto. El ion molecular  $(\text{M}-\text{H}^+)^-$  también se mostraba. También se observaron algunos productos secundarios con masa ( $m/z$ ) superior.

El análisis espectral de masas de los productos de reacción enzimática se realizó con concentración creciente de CMP-NeuAc. Las reacciones enzimáticas libres de células se realizaron como anteriormente con ácido siálico 1 mM y concentración creciente de CMP-NeuAc (10 mM, 15 mM, 20 mM y 30 mM). Después de que la reacción fuera completa, los materiales se filtraron (Amicon; 10 MWCO) y el filtrado de cada tubo de reacción se usó directamente para espectrometría de masas (MALDI-MS). Los espectros eran: A, pentámero estándar (Calbiochem), B, producto de reacción usando CMP-NeuAc 10 mM y C, producto de reacción usando CMP-NeuAc 20 mM. Los picos principales para  $m/z$  se mostraron mediante una flecha y se describieron en el texto. Se observó un espectro similar (a C) usando CMP-NeuAc 30 mM.

El análisis por  $^{13}\text{C}$ -NMR se realizó sobre el polisacárido capsular. Los espectros se registraron en un espectrómetro Bruker DRX-600. La escala es en partes por millón y relativa al DMSO externo. Los espectros de los polisacáridos capsulares purificados eran de K1 (A), K1 transformada con K92*neuS* (B) y K92 (C). La numeración de los átomos de carbono se basa en los resultados previamente publicados (*ibid*, Egan, W. 1977).

El análisis de  $^1\text{H}$ -NMR se realizó sobre el polisacárido capsular de K1 transformada con K92/gen *neuS*. Los espectros se registraron en un Bruker DRX-600 a temperatura ambiente. Solo se ha mostrado la región para los grupos metilo de amida de los enlaces  $\alpha$ 2,8 y  $\alpha$ 2,9 del polisacárido capsular purificado para comparación. El aislamiento y la purificación de los polisacáridos capsulares se mencionaban en *Materiales y Métodos*. Los espectros de los polisacáridos capsulares eran de K1 (A), K92 (B) y K1 transformada con K92/*neuS* (C). Aunque la muestra de K1 mostraba solo un singlete en  $\delta$  1,99, K92 mostraba dos picos en  $\delta$  2,00 y  $\delta$  1,96. El espectro obtenido a partir de la K1 transformada era ancho y complejo, especialmente en  $\sim$  $\delta$  1,99.

## ES 2 267 285 T3

Se realizó el análisis por  $^{13}\text{C}$ -NMR del producto de reacción enzimática. Después de la reacción enzimática, la proteína se retiró mediante filtración (Amicon; 10K). El producto de reacción enzimática se separó de ácido siálico y CMP-NeuAc sin reaccionar haciendo pasar a través de una columna de Dowex 1X8 (forma  $\text{PO}_4^-$ ) eluyendo con tampón de fosfato. El producto se recogió en el volumen de huecos y se desaló haciendo pasar a través de una pequeña columna de Sephadex G-50 eluyendo con agua. El material deseado se recogió en el volumen de huecos, se secó por congelación y se disolvió en  $\text{D}_2\text{O}$  para el análisis de NMR. Los espectros se registraron en un espectrómetro Brucker DRX-600 a temperatura ambiente ( $20^\circ\text{C}$ ). La escala es en partes por millón y relativa a DMSO externo. El espectro A, ácido siálico pentámero conectado por enlaces  $\alpha$ -2,8 disponible comercialmente, resulta de acumulaciones de aproximadamente 25K. El espectro B, producto de reacción libre de células parcialmente purificado, resulta de acumulaciones de aproximadamente 40K.

### Hallazgos

Aunque el ácido siálico es ubicuo en eucariotas, particularmente en mamíferos (*ibid*, Tsuji, S. 1996), no se detecta en procariotas distintos de algunas bacterias patógenas. Estas incluyen algunas cepas de *Escherichia coli*, algunas cepas de *Neisseria meningitidis* y bacterias del serotipo O que incluyen Salmonella (*ibid*, Barry, G.T. 1962 y 1965). Aunque la presencia de actividad de polisialiltransferasa en *E. coli* fue presentada previamente por Roseman y otros (*ibid*, Kundig, F.D. 1971), la naturaleza del gen y su producto no se ha demostrado claramente hasta hace poco. El gen *neuS* clonado de K1 mostraba que su producto tiene tamaño similar pero no homología de secuencia con ninguna de las sialiltransferasas de mamífero. La expresión del gen *neuS* de K1 indica que esta proteína de 47 kd sintetiza ácido polisialílico *in vitro* (*ibid*, Weisgerber, C., 1991). Un gen similar se clonó de la cepa K92 de *E. coli*, cuya cápsula se muestra que contiene ácido heteropolisialílico (-8NeuAca $\alpha$ 2,9NeuAca $\alpha$ 2-) (*ibid*, Egan, W., 1977). Este producto génico difieren en 70 aminoácidos cuando se compara con el producto génico *neuS* de la cepa K1 (*ibid*, Vimr, E.R., 1992). De las sustituciones de aminoácidos observadas, 36 eran conservativas. Sobre la base de tal homología, se postulaba que el gen de K92 procedía de *neuS* de K1 (*ibid*, Vimr, E.R., 1992). Mediante un ensayo de complementación, fue mostrado por este grupo (*ibid*, Steenbergen, S.M., 1992) que el gen *neuS* de K92 expresa actividad de polisialiltransferasa dando un producto que fue reconocido por antisuero C de hombre *in vivo*, sugiriendo que este gen podía producir sialósido con enlaces de  $\alpha$ 2,8/2,9 polisialilo alternos. Sin embargo, debido a que el antisuero C de hombre interactúa tanto con ácido homopolisialílico (-9-NeuAca $\alpha$ 2-) de *Neisseria meningitidis* del Grupo C como con ácido heteropolisialílico (-8NeuAca $\alpha$ 2,9NeuAca $\alpha$ 2-) de la cepa K92 de *E. coli* (Barry, G.T. (1965) *Bull. Soc. Chim. Biol.* **47**, 529-533.34), se garantizaba la identificación estructural del producto o los productos de reacción libres de células. Previamente, la expresión del gen *neuS* de K92 no se había demostrado claramente, ni se había observado que este producto génico catalizara la síntesis de ácido heteropolisialílico (-8NeuAca $\alpha$ 2,9NeuAca $\alpha$ 2-) *in vitro*.

La polisialiltransferasa (poliST) codificada por *neuS* en *E. coli* usa ácido CMP-sialílico como un donante y cataliza la sialilación secuencial del extremo no reductor de aceptores apropiados. Usando *neuS* de K1, la actividad de polimerasa se detectó *in vitro* con sialiloligómeros (denominados ácido colomínico) o con ciertos gangliósidos, tales como  $\text{GD}_3$  (Weisgerber, C., 1991) como substratos. Sin embargo, se observó previamente que este producto génico no podía iniciar la síntesis de ácido polisialílico *de novo* (*ibid*, Steenbergen, S.M., 1992), indicando un requerimiento de un cebador *in vivo* hasta el momento no definido. Este cebador, o iniciador de la polimerización, no parece ser el ácido colomínico, ya que este polímero ni se alargaba eficazmente *in vitro* (18) ni el producto clonado se detectaba *in vivo* (Barry, G.T. y otros, (1962) *J. Gen. Microbiol.* **29**, 335-352). Usando *neuS* de K92, se ha encontrado que el ácido colomínico no es un aceptor. De hecho, entre los aceptores probados, solo el ácido siálico y ciertos gangliósidos resultaban ser buenos aceptores.

En conclusión, se describe aquí que el producto del gen *neuS* de *E. coli* K92 exhibe actividad de  $\alpha$ 2,8/2,9-polisialiltransferasa tanto *in vitro* como *in vivo*. Aparentemente, un solo polipéptido (según se juzgaba por la transferencia Western) para esta polisialiltransferasa cataliza la síntesis de ácido polisialílico transfiriendo secuencialmente ácido siálico con enlaces  $\alpha$ 2,9 y  $\alpha$ 2,8 alternos. Previamente, se observó que KDO-transferasa bacteriana posee tal doble especificidad de enlace (Glode, M.P. y otros, (1977) *J. Infect. Diseases*, **135**, 94-102). Así, enzimas capaces de formar múltiples enlaces diferentes pueden no ser raras en la naturaleza. Aunque la enzima *neuS* de K92 unida a la membrana aceptaba ácido neuramínico exógeno como el mejor sustrato en este estudio, puede preferir otros glicolípidos o glicoproteínas que contienen ácido siálico. El trabajo está avanzando para definir la especificidad de sustrato de esta enzima y para determinar las estructuras detalladas de los productos enzimáticos.

## ES 2 267 285 T3

TABLA I

*Especificidad para el sustrato del producto génico neuS de E. coli K92 expresado en BL21(DE3)*

5 La mezcla de reacción (60  $\mu$ l) contenía 1  $\mu$ M de cada uno de los siguientes aceptores y 9 nmol de CMP[<sup>14</sup>C]NeuAc (actividad específica: 8000 cpm/nmol) como sustrato donante. Las reacciones se llevaron a cabo a 37°C durante 1 h usando 20  $\mu$ g de Sobr. de 40K según se menciona en "Materiales y Métodos". La mezcla de reacción (1  $\mu$ l) se transfirió a manchas sobre una placa de TLC de DEAE-celulosa con soporte de plástico y se hizo avanzar en n-propanol:NH<sub>4</sub>OH 14,5 M:agua: 6:1:3. Después de secar al aire, la placa se expuso a película XAR-5 de Kodak durante la noche a -70°C.  
10 El área correspondiente al producto de reacción se marcó, se cortó y a continuación se contó en fluido de centelleo.

Substratos aceptores potenciales probados	cmp obtenida (por 60 $\mu$ l de reacción)	Ácido siálico total transferido (pmol)
15 Ácido siálico (5AcNeuAC)		
Monómero	3780	470
Dímero	1080	140
20     Trímero	1560	140
Pentámero	0	0
Hexámero	0	0
Ácido 9-O-acetilsíalico	900	110
25     Ácido colomínico	0	0
GD <sub>3</sub>	2880	360
GM <sub>3</sub>	1440	180
GD <sub>2</sub>	900	110
30     GT <sub>1a</sub>	460	40
GT <sub>1b</sub>	1140	130
GQ <sub>1b</sub>	2460	310
Mezclas de gangliósidos	720	90

35

40

45

50

55

60

65

## ES 2 267 285 T3

### REIVINDICACIONES

1. Plásmido de DNA que contiene el gen *neuS* de *escherichia coli* K92 y que codifica  $\alpha 2,8/2,9$ -polisialiltransferasa que tiene una etiqueta de histidina hexámera fusionada a su extremo N-terminal de *escherichia coli* K92.

5

2. Una célula transformada que tiene un gen que codifica  $\alpha 2,8/2,9$ -polisialiltransferasa que tiene una etiqueta de histidina hexámera fusionada a su extremo N-terminal de *escherichia coli* K92, siendo dicho gen como se especifica en la reivindicación 1.

10

3. Un procedimiento para obtener  $\alpha 2,8/2,9$ -polisialiltransferasa, que comprende las siguientes etapas:

Etapa A: expresar un gen que codifica  $\alpha 2,8/2,9$ -polisialiltransferasa que tiene una etiqueta de histidina hexámera fusionada a su extremo N-terminal dentro de una célula transformada que tiene dicho gen para producir dicha  $\alpha 2,8/2,9$ -polisialiltransferasa; y a continuación

15

Etapa B: liberar  $\alpha 2,8/2,9$ -polisialiltransferasa que tiene una etiqueta de histidina hexámera fusionada a su extremo N-terminal y expresada en la Etapa A a partir de la célula.

20

4. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la  $\alpha 2,8/2,9$ -polisialiltransferasa es de *escherichia coli* K92.

5.  $\alpha 2,8/2,9$ -Polisialiltransferasa recombinante que tiene una etiqueta de histidina hexámera fusionada a su extremo N-terminal, no estando dicha  $\alpha 2,8/2,9$ -polisialiltransferasa unida a una membrana celular.

25

6.  $\alpha 2,8/2,9$ -Polisialiltransferasa recombinante que tiene una etiqueta de histidina hexámera fusionada a su extremo N-terminal de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la  $\alpha 2,8/2,9$ -polisialiltransferasa es de *escherichia coli* K92.

30

7. Un método para convertir un sustrato de  $\alpha 2,8/2,9$ -polisialiltransferasa en un producto, comprendiendo dicho método la etapa de poner en contacto el sustrato con  $\alpha 2,8/2,9$ -polisialiltransferasa que tiene una etiqueta de histidina hexámera fusionada a su extremo N-terminal que no está unida a una membrana celular bajo condiciones que promueven la catálisis enzimática de una conversión de un sustrato en el producto.

35

8. Un método de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la  $\alpha 2,8/2,9$ -polisialiltransferasa es de *escherichia coli* K92.

40

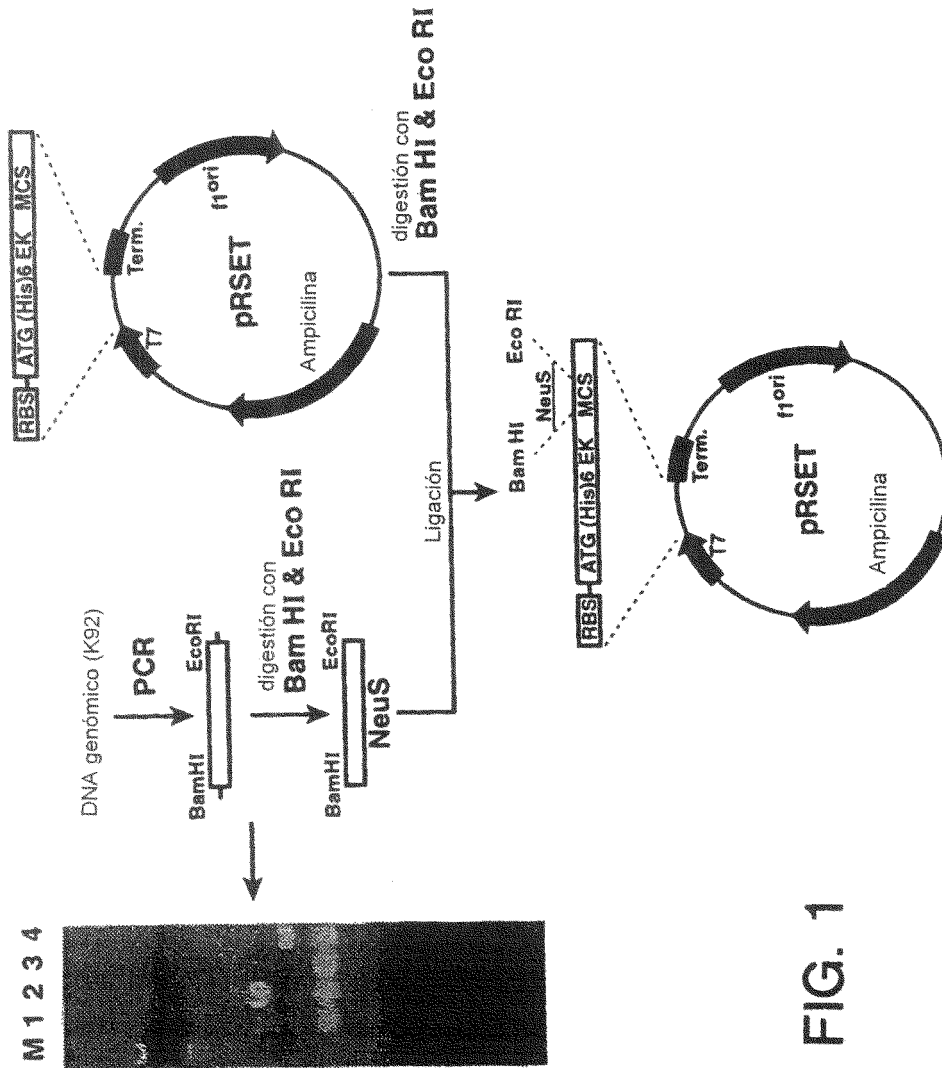
45

50

55

60

65



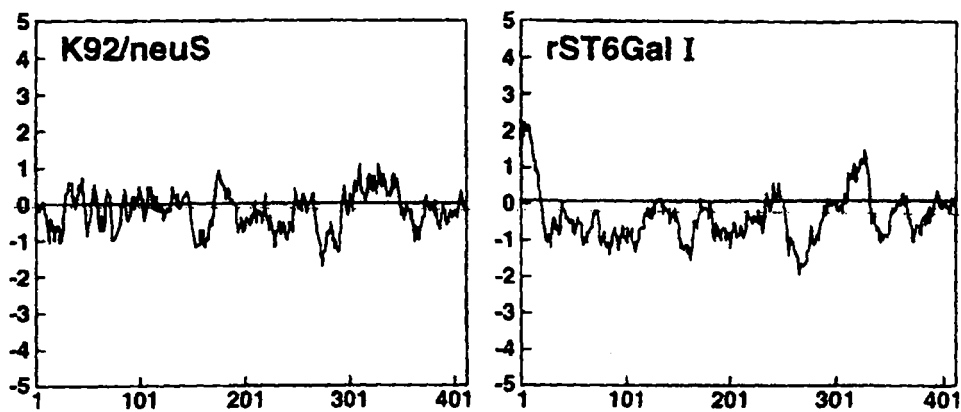
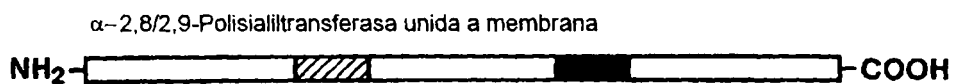
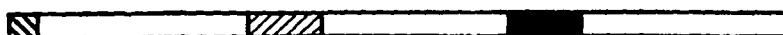


FIG. 2A



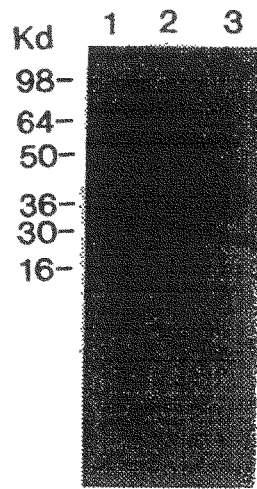
Proteína de membrana



**Key:**

- [ / ] Primer dominio de transmembrana (177-195)
- [ ] Segundo dominio de transmembrana (327-343)
- [ / ] Histidina hexámera

FIG. 2B



**FIG. 3**

FIG. 4A

FIG. 4B

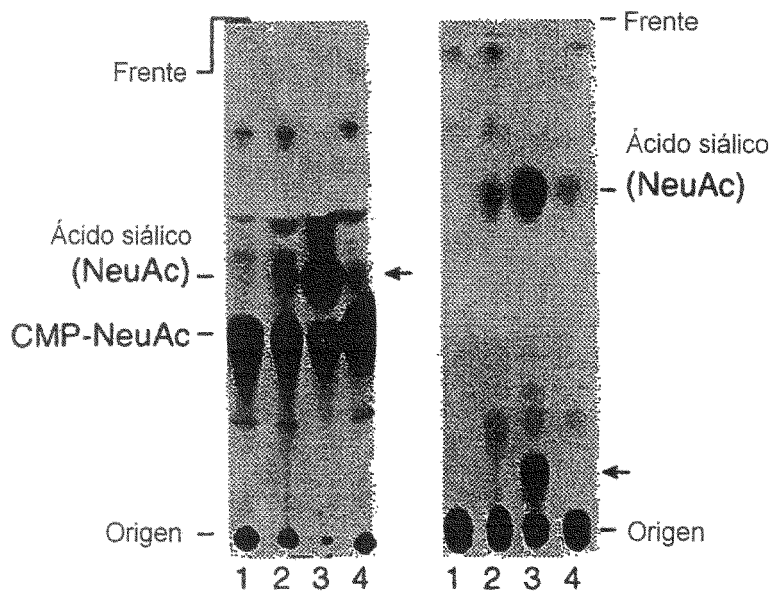
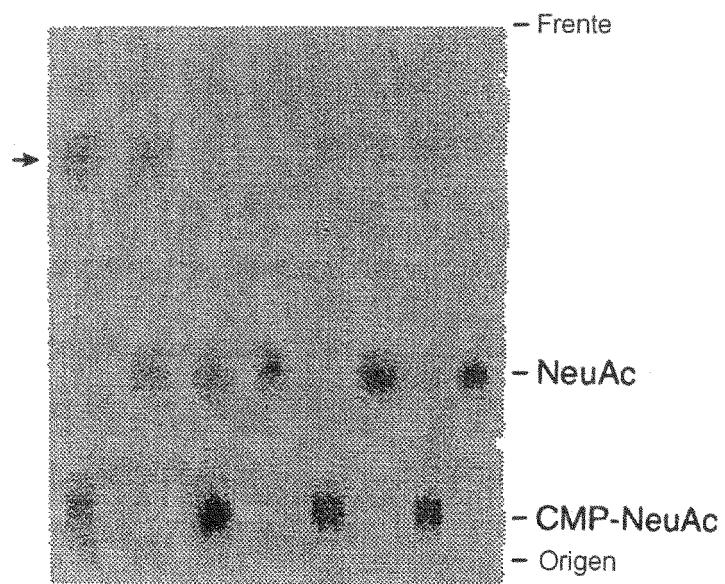


FIG. 4C



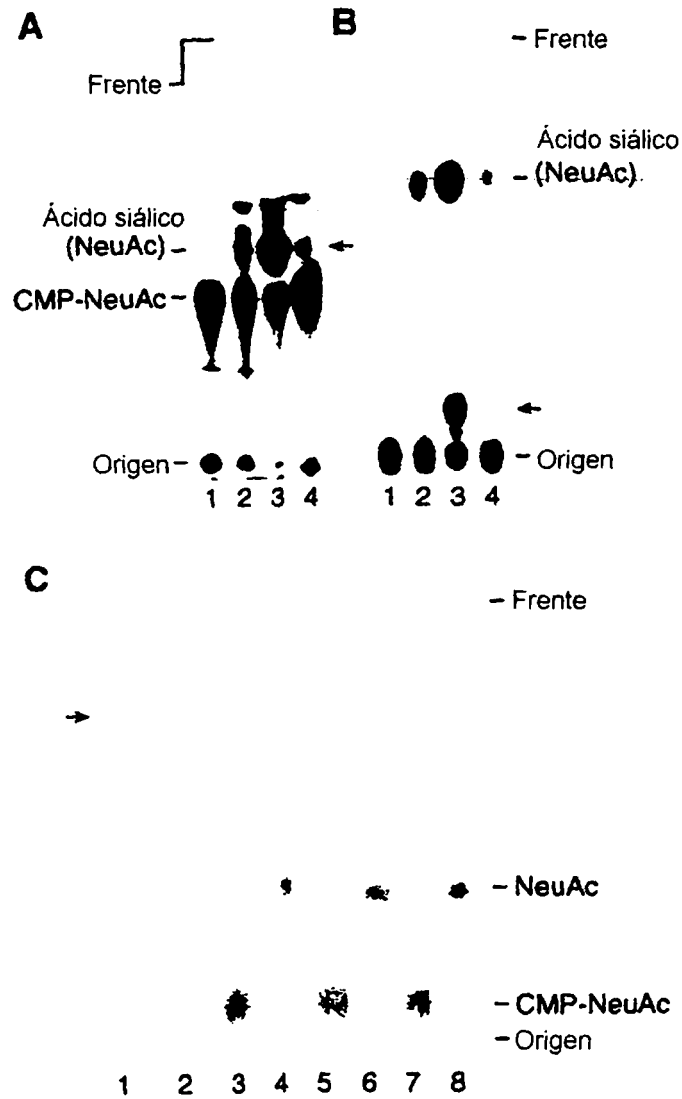
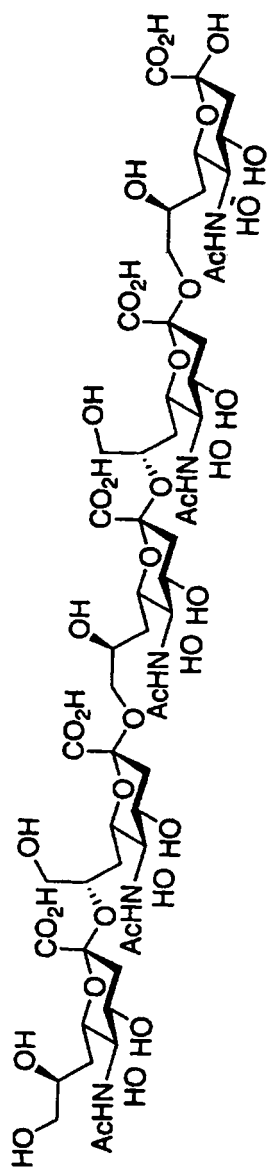
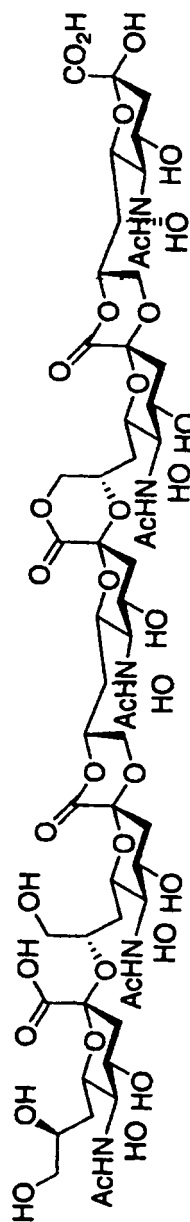


FIG. 4



**I**      C<sub>55</sub>H<sub>167</sub>N<sub>5</sub>O<sub>41</sub>  
Masa Exacta: 1473,49



**II**      C<sub>55</sub>H<sub>161</sub>N<sub>5</sub>O<sub>38</sub>  
Masa Exacta: 1419,46

**FIG. 5**