



CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DE LA ALFA2,6-SIALILTRANSFERASA DE *An.albimanus*: ALTERNATIVA PARA MEJORAR N-GLICOSILACIÓN EN EL SISTEMA CÉLULAS DE INSECTO-BACULOVIRUS

Germán Plascencia-Villa, Octavio Tonatiuh Ramírez y Sandino Estrada-Mondaca
Instituto de Biotecnología/UNAM, Av. Universidad #2001, Col. Chamilpa, C.P. 62210,
Cuernavaca, Morelos. Tel. (55) 56227617, Fax. (777) 3138811, tonatiuh@ibt.unam.mx

Palabras clave: *sialiltransferasa, D-manosamina, N-glicosilación.*

Introducción. La incapacidad de transferir ácido siálico sobre proteínas recombinantes ha sido una limitación crítica del sistema células de insecto-baculovirus (SCIBV) (1). Esto es debido a la ausencia de actividad sialiltransferasa en las líneas celulares utilizadas. Con la identificación y caracterización de la alfa2,6-sialiltransferasa (ST6) de *Drosophila melanogaster*, y la identificación de la secuencia ortóloga en el genoma de *Anopheles gambiae* se confirmó el potencial de N-glicosilación de los insectos (2). El mosquito *An. albimanus* es capaz de producir sialoglicoproteínas, por ello se emprendió la identificación, clonación y expresión del ADNc de la alfa2,6-sialiltransferasa (AaST6) de este organismo. Así mismo evaluamos la utilización de AaST6 como vía para mejorar la N-glicosilación de proteínas recombinantes en el SCIBV (1,2).

Metodología.

Basados en las secuencias conservadas de los sialilmotifs de la ST6 de *D. melanogaster* y de *An. gambiae*, se diseñaron oligonucleótidos degenerados (GCACGAGATYGTGATGMGRT TCAATCA y AGCTCATCRCTCGTAGTARTGRCA) para amplificar un fragmento del ADNc. Se amplificaron los extremos 5' y 3' mediante RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends, Clontech). La secuencia completa de la AaST6 fue obtenida mediante amplificación por PCR usando oligos específicos (GCTGCAACCGCTCCAGCGATG y ACGGCCGGAC GAAGTAGCATTG). La secuencia de ADN obtenida fue secuenciada y analizada con herramientas bioinformáticas (BLAST, CD-Search, LALIGN, ORFinder). Para comprobar si el ADNc identificado corresponde a una enzima funcional, se construyó un baculovirus recombinante (Bac-N-Blue, Invitrogen) con el que se coinfectaron células de insecto con otro baculovirus recombinante con el que se expresa una glicoproteína cuyo perfil de glicanos ya se ha analizado con anterioridad (1). Los N-glicanos asociados a la glicoproteína recombinante obtenida en los ensayos de coexpresión con AaST6 fueron analizados para conocer la extensión de la N-glicosilación.

Resultados y discusión.

Usando ADNc de *An. albimanus* como templado, oligos degenerados y RACE, se obtuvo el ADNc que codifica para la ST6 de *An. albimanus* (GenBank AY955495).

AaST6 posee un marco abierto de lectura de 440aa (ORFinder)(Fig.1), con dominios funcionales y estructurales característicos de la familia 29 de las glicosiltransferasas: sialiltransferasas (EC 2.4.99).

En AaST6 el dominio citoplasmático N-terminal de 32aa está seguido del dominio transmembranal (17aa) y de un tallo que termina en el dominio catalítico que contiene los *sialylmotifs*

L, S y VS, en los que se identificaron los residuos implicados en el reconocimiento de los sustratos donador y aceptor (100% conservados en esta familia enzimática) (Fig. 1).

```
MRVHGIAYLQGHFPRRQKPTATNRTVVPSASCLWLLFAAIFVAG  
GVAADALGKRNVFVYKLNNTTEKTYKASDEKPTLWSKEQDAPRIRP  
HFSLAKTSHFLFDLNRRCYEVASAGNGTAAVPLVSADCRNRTALF  
RAKIIIGELSRRLKEPVPASGQYQVYRSPFQQRLPLGTGQCRLRQA  
NVRVLSWKEPPFAWNLGTYLPVPLFDPDTATNRSQVIVASAGS  
LKRSLGPPFIDGHDIVMRFNHAPTEGFEADVCAKTTIRVLNSQVV  
TKPEYRLLTAPLFRNVTIAAWDPGKFDQPLSEWLANPDFNLFENF  
KKFRSQYRDANFHIIDPRSIWRAWALQDLTPPIRQNPPTSQFI  
GLGLLLPVCRYIDIVEYIPSTRMNGLCHYYDEELNLGCTFGAWHP  
LAAEKLKLVFQMNAASDYTVFQQGTVRIYSDTLDQC
```

Fig. 1. Secuencia de la alfa2,6-Sialiltransferasa de *An.albimanus*.
Sialylmotifs L, S y VS. Residuos conservados.

La expresión de AaST6 en células de insecto usando un baculovirus recombinante permite complementar el procesamiento de N-glicanos en dicho sistema.

La co-expresión recombinante de AaST6 con una glicoproteína, además del uso de medio de cultivo suplementado con intermediarios de la síntesis de ácido siálico (D-Manosamina) (2), es una alternativa para mejorar la capacidad de N-glicosilación de las células de insecto; en particular la síntesis de glicanos sialilados.

Conclusiones.

Anopheles albimanus posee el potencial genético para sialilación de glicoproteínas, mecanismo que se pensaba ausente en insectos. AaST6 es la segunda sialiltransferasa de insecto en ser clonada, la primera del género *Anopheles*. La co-expresión de AaST6 con una glicoproteína mediante el SCIBV es una alternativa mejorar la ruta de N-glicosilación de las células de insecto superando algunas de sus limitaciones.

Agradecimientos.

DGAPA/UNAM IN220503. CONACyT (171180). Unidad de Síntesis y Secuenciación IBt/UNAM.

Bibliografía.

- Estrada-Mondaca S, Delgado-Bustos LA, Ramírez OT. Mannosamine supplementation extends the N-acetyl glucosaminylation of recombinant human secreted alkaline phosphatase produced in T.ni insect cell cultures (2005). *Biotechnol Appl Biochem*, Vol. 42, 25-34.
- Koles K, Irvine KD, Panin VM: Functional characterization of *Drosophila* sialyltransferase (2004). *J Biol Chem*, Vol. 279, 4346-4357.