



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**La glicosiltransferasa UGT89A2 de *Nicotiana
tabacum* modifica derivados di- y trihidroxilados
del ácido benzoico**

Tesis que presenta
Arianna Duque Ortiz

Para obtener el grado de
Doctora en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:
Dr. Samuel Lara González

San Luis Potosí, S.L.P., noviembre de 2024



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**La glicosiltransferasa UGT89A2 de *Nicotiana tabacum* modifica derivados di- y trihidroxilados del ácido benzoico**” presentada para obtener el Grado de Doctora en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Arianna Duque Ortiz** y aprobada el **15 noviembre del 2024** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Samuel Lara González
Director de la tesis

Dr. Rubén López Revilla
Miembro del Comité Tutoral

Dr. José Alberto Rivera Chávez
Miembro del Comité Tutoral

Dra. María Jazmín Abraham Juárez
Miembro del Comité Tutoral



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biología Estructural de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Samuel Lara González.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología 867402 y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

Este trabajo fue financiado a través del proyecto de Ciencia Básica SEP-CONACYT No CB2011-168710 y por el proyecto CONACYT INFRA-2013-01 No 204373.

Agradecemos al Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LANBAMA) por los servicios otorgados y por el acceso a sus Instalaciones.

Dedicatorias

A mi hijo, Xavier

por ser mi inspiración y mi fuerza en cada paso de este camino.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías
(CONAHCYT)

Al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

Al Dr. Samuel Lara González por la dirección y apoyo en este trabajo.

Al LANBAMA del IPICYT por el apoyo técnico y los servicios otorgados.

A los miembros de mi comité tutorial, Dr. Rubén López Revilla, Dr. José Alberto Rivera Chávez y Dra. María Jazmín Abraham Juárez, por las aportaciones en la tesis.

A la Técnica Rosa Espinosa Luna por el apoyo brindado durante la realización de este trabajo.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Lista de tablas	viii
Lista de figuras	ix
Anexos	x
Resumen	xi
Abstract	xii
Introducción	1
Materiales y métodos	11
Resultados	18
Discusión	43
Conclusión	49
Referencias	50
Anexos	55

Lista de tablas

Tabla 1. Estabilidad térmica de NtUGT89A2 en presencia de posibles sustratos aceptores y UDP-glucosa	28
Tabla 2. Valores de actividad específica y constantes de disociación aparente para sustratos di- y trihidroxilados	34
Tabla 3. Valores de actividad específica y constantes de disociación aparente para sustratos derivados de ácidos benzoicos clorados	39

Lista de figuras

Figura 1. Estructuras químicas de compuestos modificados por Glicosiltransferasas de plantas	8
Figura 2. Mecanismos que usan las glicosiltransferasas para mediar la respuesta al estrés en plantas	9
Figura 3. Análisis bioinformático de la secuencia de aminoácidos NtUGT89A2	20
Figura 4. Análisis filogenético de NtUGT89A2 y 35 glicosiltransferasas de plantas	21
Figura 5. Expresión y purificación por cromatografía de afinidad a níquel de la proteína NtUGT89A2	23
Figura 6: Purificación de la proteína NtUGT89A2 por cromatografía de intercambio iónico y exclusión molecular	25
Figura 7. Análisis de la estabilidad térmica de NtUGT89A2 en presencia de aditivos y ligandos	30
Figura 8. Determinación del tamaño de partícula y del punto de agregación de NtUGT89A2 por dispersión dinámica de luz	31
Figura 9. Actividad de la glicosiltransferasa NtUGT89A2	35
Figura 10. Actividad de glicosiltransferasa de NtUGT89A2 en presencia de ácidos benzoicos clorados	37
Figura 11. Análisis del desplazamiento térmico de NtUGT89A2 frente a derivados de hidroxilados de ácidos benzoicos	41
Figura 12. NtUGT89A cataliza la glicosilación de 2,5-DHBA a 70 °C	42
Figura 13. Alineamiento múltiple del motivo PSPG de NtUGT89A2 con secuencias homólogas de Solanaceae y UGT89A2 de <i>Arabidopsis thaliana</i>	44

Anexos

Anexo 1	55
Tabla S1. Valores del punto medio de desnaturalización térmica (T_m) para NtUGT89A2 en presencia de aditivos y ligandos	55
Figura S1. Análisis TLC de la reacción de glicosilación catalizada por NtUGT89A2	58
Figura S2. Análisis del producto de glicosilación del 2,3-DHBA, 2,4-DHBA y 3,4,5-THBA mediante HPLC en fase reversa	59
Figura S3 Análisis del producto de glicosilación del 2-Cl-3-HBA, 2-Cl-4-HBA y 2-Cl-5-HBA mediante HPLC en fase reversa	60
Figura S4. Identificación estructural del producto de la reacción catalizada por NtUGT89A2 con 2,3-DHBA y UDP-glucosa	61
Figura S5. Identificación estructural del producto de la reacción catalizada por NtUGT89A2 con 2,4-DHBA y UDP-glucosa	62
Figura S6. Identificación estructural del producto de la reacción catalizada por NtUGT89A2 con 2,5-DHBA y UDP-glucosa	63
Figura S7. Identificación estructural del producto de la reacción catalizada por NtUGT89A2 con 3,4,5-THBA y UDP-glucosa	64
Figura S8. Identificación estructural del producto de la reacción catalizada por NtUGT89A2 con 2-Cl-3-HBA y UDP-glucosa	65
Figura S9. Identificación estructural del producto de la reacción catalizada por NtUGT89A2 con 2-Cl-4-HBA y UDP-glucosa	66
Figura S10. Identificación estructural del producto de la reacción catalizada por NtUGT89A2 con 2-Cl-5-HBA y UDP-glucosa	67
Figura S11. Espectro de $^1\text{H-NMR}$ de la reacción enzimática cruda catalizada por NtUGT89A2 utilizando 2,5-DHBA como aceptor y UDP-Glucosa como donador	68
Figura S12. Espectro HMBC de la reacción enzimática cruda que muestra correlaciones cruciales para localizar el grupo glucosa en la estructura de 2,5-DHBA	69
Anexo 2. Artículo publicado	70

Resumen

“La glicosiltransferasa UGT89A2 de *Nicotiana tabacum* modifica derivados di- y trihidroxilados del ácido benzoico”

Las glicosiltransferasas (GTs) desempeñan un papel crucial en la transferencia de grupos glicosilo a varios compuestos aceptores, generando glicoconjugados que participan en múltiples procesos biológicos y farmacológicos. Este estudio se centra en la identificación y caracterización bioquímica de la glicosiltransferasa UGT89A2 de *Nicotiana tabacum* (NtUGT89A2). Se determinó que esta enzima, que actúa como monómero en solución, exhibe una notable preferencia por el ácido 2,5-dihidroxibenzoico (2,5-DHBA). Estos resultados se confirmaron por espectrometría de masas y RMN y corroboraron que NtUGT89A2 cataliza la *O*- β -glucosilación, lo que la convierte en una enzima clave para la modificación de 2,5-DHBA. Los estudios de estabilidad térmica demostraron que NtUGT89A2 mantiene su actividad catalítica completa incluso a 70 °C durante una hora. De hecho, la mayor actividad específica con 2,5-DHBA fue 225 ± 1.7 nkat/mg. Además, se registró un aumento de hasta 10 °C en el punto de desnaturalización térmica (T_m) en presencia de 2,5-DHBA y UDP-glucosa. Este hallazgo sugiere que la unión de estos compuestos no solo favorece la reacción de glicosilación, sino que también mejora la estabilidad estructural de la enzima. Además de 2,5-DHBA, NtUGT89A2 puede utilizar otros sustratos como el ácido 2,3-dihidroxibenzoico y el ácido 2,4-dihidroxibenzoico. También procesa compuestos como el ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico y derivados clorados, como el ácido 2-cloro-5-hidroxibenzoico. Estas características destacan el potencial de NtUGT89A2 para aplicaciones biotecnológicas, especialmente en procesos industriales que involucran la modificación de compuestos bioactivos.

PALABRAS CLAVE: UDP-glicosiltransferasa, ácido 2,3-dihidroxibenzoico, ácido 2,4-dihidroxibenzoico, ácido 2,5-dihidroxibenzoico, ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico.

Abstract

" The glycosyltransferase UGT89A2 from *Nicotiana tabacum* modifies di- and trihydroxylated derivatives of benzoic acid."

Glycosyltransferases (GTs) play a crucial role in transferring glycosyl groups to various acceptor compounds, generating glycoconjugates that participate in multiple biological and pharmacological processes. This study focuses on the identification and biochemical characterization of the glycosyltransferase UGT89A2 from *Nicotiana tabacum* (NtUGT89A2). It was observed that this enzyme, which functions as a monomer in solution, exhibits a remarkable preference for 2,5-dihydroxybenzoic acid (2,5-DHBA), and mass spectrometry and NMR experiments confirmed that NtUGT89A2 catalyzes *O*- β -glucosylation, making it a key enzyme for the modification of 2,5-DHBA. Thermal stability studies demonstrated that NtUGT89A2 retains its full catalytic activity at 70 °C for one hour. The highest specific activity was obtained with 2,5-DHBA, reaching 225 ± 1.7 nkat/mg. Additionally, an increase of up to 10 °C in the thermal denaturation midpoint (T_m) was recorded in the presence of 2,5-DHBA and UDP-glucose. This finding suggests that the binding of these compounds favors the glycosylation reaction and enhances the structural stability of the enzyme. Besides 2,5-DHBA, NtUGT89A2 can utilize other substrates, including 2,3-dihydroxybenzoic acid and 2,4-dihydroxybenzoic acid. It also processes compounds such as 3,4,5-trihydroxybenzoic acid and chlorinated derivatives, such as 2-chloro-5-hydroxybenzoic acid. These characteristics underscore the potential of NtUGT89A2 for biotechnological applications, especially in industrial processes involving the modification of bioactive compounds.

KEYWORDS: UDP-glycosyltransferase, 2,3-dihydroxybenzoic acid, 2,4-dihydroxybenzoic acid, 2,5-dihydroxybenzoic acid, 3,4,5-trihydroxybenzoic acid.

1. Introducción

En la actualidad se han identificado más de 200,000 productos naturales (PN) producidos por las plantas, formando una colección diversa de compuestos con una amplia gama de actividades (Chassagne et al., 2019). Muchos de estos productos están glicosilados, es decir, tienen grupos de azúcares unidos a las agliconas, lo que incrementa la complejidad y variedad de sus estructuras. Los PN glicosilados tienen aplicaciones importantes por ejemplo, para la elaboración de fármacos, edulcorantes, suplementos nutricionales, cosméticos y otros productos de salud, por estas razones, hay un creciente interés en comprender sus procesos de producción y modificación (Shao et al., 2005).

Las glicosiltransferasas (GTs) son cruciales para la biosíntesis de los PN glicosilados y comúnmente realizan el paso final en su ruta biosintética, mediando la formación de enlaces glucosídicos regio- y estereoespecíficos mediante la transferencia de grupos de azúcar activados por nucleótido-difosfato a una variedad de sustratos (Liang et al., 2015). Las GTs involucradas en la biosíntesis de PN glicosilados están clasificadas en la familia GT1 en la base de datos de Enzimas Activas en Carbohidratos (CAZy, <http://www.cazy.org/>). Actualmente, casi 30,000 GTs están incluidas en la familia GT1, y el número de secuencias de GT en diferentes organismos sigue creciendo con el desarrollo de la secuenciación (Zhou et al., 2017). Sin embargo, solo el 1% de las GTs han sido caracterizadas funcionalmente, limitando la clarificación de las rutas biosintéticas de PN glicosilados y la validación de los mecanismos enzimáticos (Lombard et al., 2014).

Mediante catálisis enzimática o métodos de ingeniería metabólica, se pueden producir PN glicosilados a escala industrial, proporcionando una alternativa fiable y escalable a los métodos de producción convencionales basados en la extracción de recursos naturales (Cravens et al., 2019; Wang & Huang, 2009). Sin embargo, las GTs de plantas a menudo presentan propiedades desfavorables para la síntesis de productos objetivo, como bajos niveles de expresión y baja actividad catalítica. Por lo tanto, estos obstáculos persisten como factores limitantes en la biosíntesis de PN glicosilados, los cuales requieren ingeniería de proteínas a través de diseño racional y/o evolución dirigida (Breton et al., 2012; Lairson et al., 2008; McArthur & Chen, 2016).

En los últimos años, el rápido desarrollo de la biología sintética ha acelerado la ingeniería metabólica de rutas sintéticas complejas y ha aumentado la eficiencia durante la producción de recursos naturales limitados (Nemhauser & Torii, 2016). La optimización sistemática de la redirección de flujos metabólicos en hospederos microbianos, para producir productos deseados a través de la expresión heteróloga combinada de rutas y enzimas vegetales hace posible construir nuevas y eficientes rutas biosintéticas de PN glicosilados (Lee et al., 2012) (Keasling, 2012).

1.1 Glicosiltransferasas en plantas

En el complejo proceso de adaptación a diversos ambientes y a las interacciones con factores bióticos, las plantas producen una amplia gama de moléculas especializadas (Bowles et al., 2006). La glicosilación, mediada por las glicosiltransferasas (GT), emerge como un mecanismo clave en la regulación de la abundancia y actividad de fitohormonas y metabolitos secundarios, mejorando la tolerancia al estrés y las características agronómicas de los cultivos, contribuyendo así a una agricultura más sostenible y productiva (Behr et al., 2020). La glicosilación, o adición de grupos glucosilo, desempeña un papel fundamental en la funcionalización y regulación de estas moléculas, asistiendo significativamente a la adaptación y respuesta de las plantas a su entorno (Speeckaert et al., 2022).

Las glicosiltransferasas se clasifican en 135 superfamilias según la secuencia de aminoácidos (Drula et al., 2022). La familia GT1, que incluye las UGT (UDP-glicosiltransferasas), constituye la superfamilia GT más grande en plantas. Estas enzimas glicosilan moléculas de bajo peso molecular y forman un enlace β utilizando UDP como donante de azúcar. (Lairson et al., 2008; Sinnott, 1990).

Las UGT catalizan la formación de O-, N-, S- y C-glucósidos. Estas enzimas presentan un mecanismo de reacción invertido, en el cual participan una histidina cercana a la posición 20 y un residuo de aspartato próximo que estabiliza a la histidina durante la reacción (Louveau & Osbourn, 2019). Por ejemplo, en el caso

de la UGT71G1 de *Medicago truncatula* el residuo próximo que estabiliza a la histidina catalítica (His22) es el Asp121 (Shao et al., 2005).

En cuanto a su estructura, las UGT's adoptan un plegamiento GT-B, que consta de dos dominios de Rossmann separados por una hendidura catalítica (Lairson et al., 2008). Donde, el dominio N-terminal presenta el sitio de unión al sustrato aceptor, el cual está conformado por una cavidad hidrofóbica y residuos poco conservados. Esta característica se ha asociado a la baja especificidad por el sustrato aceptor descrita en algunas UGTs (Osmani et al., 2009; Wang, 2009) (Kannangara et al., 2011).

Por otro lado, el dominio C-terminal contiene el sitio de unión al sustrato donador de azúcar. Los residuos clave en el reconocimiento del sustrato donador (UDP-azúcar) se localizan en un motivo de 44 residuos altamente conservados conocido como PSPG (Putative Secondary Plant Glycosyltransferase) (Shao et al., 2005). Estos residuos han sido descritos con detalle, se ha documentado que la especificidad por el tipo de UDP-azúcar es mediada por los residuos al final del motivo PSPG, en especial la posición 44 y un residuo externo al PSPG localizado en el asa N5 (la quinta asa en el dominio N-terminal, de acuerdo con Osmani et al. 2009 (Osmani et al., 2009) (Louveau & Osbourn, 2019). Por ejemplo, en la enzima UGT89A2 de *Arabidopsis thaliana*, la presencia de un residuo de isoleucina en el asa N5 (Ile153), que se identificó en la variante natural Col-0, es altamente selectiva por UDP-xilosa. Sin embargo, su sustitución por serina, presente en la variante C24, puede utilizar tanto UDP-glucosa como UDP-xilosa observándose preferencia por la UDP-glucosa (Chen & Li, 2017).

La UDP-glucosa es el donante más frecuente para las UGT de la familia 1. Sin embargo, no todas las UGT de esta familia se limitan al uso de UDP-glucosa. Por ejemplo, algunas UGTs usan UDP-ramnosa (UDP-Rha) para agregar ramnosa a los sustratos, lo cual es crucial para la síntesis de glicoconjugados en plantas. Otras UGTs emplean UDP-galactosa (UDP-Gal) para transferir galactosa, modificando moléculas en tejidos animales y vegetales. En un estudio reciente, se identificaron dos UDP-ramnosiltransferasas, MrUGT78R1 y MrUGT78R2, que utilizan UDP-Rha como sustrato, mientras que MrUGT78W1 actúa como UDP-galactosiltransferasa. La investigación reveló residuos clave para la actividad de

transferencia en cada enzima y confirmó su función en la glicosilación de flavonoles en *Nicotiana benthamiana* (Ren et al., 2022). La UDP-xilosa (UDP-Xyl) es empleada por ciertas UGTs para transferir xilosa, como la UGT89A2 de *A. thaliana*, la cual usa tanto UDP-glucosa como UDP-xilosa como sustratos (Chen & Li, 2017). Finalmente, el UDP-ácido glucurónico (UDP-GlcUA) es utilizado por UGTs para añadir ácido glucurónico a sustratos, un proceso vital en la detoxificación y excreción de sustancias en mamíferos. Estos ejemplos demuestran la versatilidad de las UGTs en la utilización de diferentes donantes de azúcar, lo que permite una amplia variedad de modificaciones en los sustratos objetivo (Bowles et al., 2006).

Los métodos bioquímicos clásicos han demostrado ser valiosos para la identificación y caracterización de glicosiltransferasas (GT) en plantas. Estos enfoques implican la purificación de proteínas expresadas heterológamente en *E. coli*, lo que permite investigar sus actividades enzimáticas hacia la glicosilación de sustratos específicos. A pesar de los desafíos que presenta la complejidad de los componentes proteicos en plantas, una vez clonados, estos genes permiten producir las proteínas correspondientes a partir de su secuencia nucleotídica. Por ejemplo, utilizando estos métodos, se ha logrado clonar el gen GT72B1 de *Arabidopsis* y confirmar su capacidad para glicosilar el contaminante 3,4-dicloroanilina *in vitro* (Loutre et al., 2003). De manera similar, se ha clonado un gen que codifica la UDP-glucosiltransferasa de limonoides en *Citrus*, subrayando la efectividad de estos enfoques para caracterizar y entender la función de GT en plantas (Frydman et al., 2004).

Entre otras glicosiltransferasas caracterizadas a la fecha, la UGT72 de planta glicosila principalmente dos clases de fenilpropanoides: monolignoles, componentes básicos de la lignina, y flavonoides, que juegan roles cruciales en la interacción de las plantas con otros organismos y en la respuesta al estrés (Speeckaert et al., 2022). Además, se ha demostrado que la expresión de UGT72B14 de *Rhodiola* en *Escherichia coli*, con codones optimizados, aumenta significativamente la producción de un glucósido fenólico (salidroside), tanto *in vitro* como *in vivo*, demostrando un rendimiento proteico mejorado y una actividad elevada (Xue et al., 2016). En otro estudio se identificaron cinco

glicosiltransferasas (UGTs) de *Arabidopsis* que catalizan la glicosilación de citoquininas. UGT76C1 y UGT76C2 glucosilan todas las citoquininas en las posiciones N7 y N9. UGT85A1, UGT73C5 y UGT73C1 reconocen trans-zeatina y dihidrozeatina, glucosilando el grupo hidroxilo disponible para formar O-glucósidos (Hou et al., 2004).

El análisis del genoma de la planta modelo *A. thaliana* ha revelado la presencia de 122 GT1, registradas en la base de datos CAZy. Sin embargo, algunas UGTs de diferentes especies de plantas muestran una similitud de secuencia muy baja a pesar de tener actividades y sustratos similares. Por ejemplo, se identificaron cinco UGTs responsables de la glicosilación de citoquininas en *Arabidopsis*. Al comparar estas secuencias con las enzimas glicosilantes de citoquininas identificadas en maíz y frijol, se observó una baja similitud de secuencia. Además, las UGTs de maíz y frijol forman una rama única en el árbol filogenético que contiene las UGTs de *Arabidopsis*. Esto sugiere que las UGTs en maíz y frijol evolucionaron a partir de un ancestro común, diferente de los identificados en *Arabidopsis* (Hou et al., 2004).

1.2 Compuestos glicosilados

Las glicosiltransferasas (GT) en las plantas pueden glucosilar las principales clases de metabolitos secundarios, incluyendo fenilpropanoides (flavonoides, cumarinas, lignanos, etc.), alcaloides (alcaloides indólicos, alcaloides esteroidales, citoquininas, etc.), terpenoides (monoterpenoides, diterpenoides, triterpenoides, etc.), y poliquétidos (poliquétidos fenólicos, policétidos aromáticos policíclicos, etc.) (Figura 1) (He et al., 2022).

Las GTs muestran una notable promiscuidad, permitiéndoles catalizar diversas clases de compuestos, este hecho es crucial para la ingeniería de glicosilación y la producción de productos naturales glicosilados. Específicamente, UGT71G1 de *Medicago truncatula* ha demostrado catalizar la glicosilación de una amplia gama de fenilpropanoides, incluyendo cumarinas, cumarones, flavonas e isoflavonas, así como terpenoides como el ácido glicirretínico y el ácido glicirrícico (Achnine et al., 2005; Modolo et al., 2007).

El equilibrio entre un glucósido generalmente inactivo y la correspondiente aglicona activa permite a las plantas responder con precisión a los cambios ambientales (Behr et al., 2020). En este sentido, la glucosilación mediada por UGTs es importante pues permite regular la disponibilidad de compuestos clave como las fitohormonas. Las fitohormonas reguladas por glicosilación incluyen el ácido abscísico (ABA), las auxinas, las citoquininas, los jasmonatos y el ácido salicílico (SA)(Figura 2) (Gachon et al., 2005).

El ácido abscísico (ABA) desempeña un papel crucial en la adaptación al estrés abiótico. Las UGT regulan constantemente la abundancia de ABA libre, ya sea formando el éster glucosílico de ABA, que puede hidrolizarse rápidamente para producir ABA activa, o mediante mecanismos indirectos (Xu et al., 2012). Diversos estudios han demostrado que modificar la expresión de UGT específicas involucradas en la glicosilación del ABA afecta directamente la adaptación de las plantas a condiciones de estrés abiótico. Por ejemplo, al interrumpir la expresión de UGT71C5 en *A. thaliana* se observó un aumento en la concentración de ABA libre y una mayor tolerancia a la sequía, además de un retraso en la germinación de las semillas. Sin embargo, la sobreexpresión de esta UGT tuvo el efecto opuesto en los tres parámetros (Liu et al., 2015). Estos mismos efectos se observaron en *Solanum lycopersicum* (tomate) al silenciar UGT75C1, donde además se observó un retraso en el crecimiento de las raíces y una aceleración en la maduración de los frutos (Sun et al., 2017) (Sun et al., 2017). Por otra parte, la sobreexpresión de UGT71B6 disminuyó la tolerancia a la sequía y la expresión de genes inducibles por estrés osmótico bajo condiciones de estrés.

El ácido salicílico (2-HBA) media la resistencia de las plantas frente a los patógenos biotróficos. Se han descrito numerosas glicosiltransferas que forman glucósidos de los derivados de 2-HBA, los cuales son almacenados en la vacuola para una rápida hidrólisis y liberación de este compuesto activo (Lim et al., 2002). En *A. thaliana*, las enzimas UGT74F1 y UGT74F2 pueden glucosilar la posición 2-OH del anillo de benceno en el ácido salicílico. UGT74F2 también puede glucosilar el grupo carboxilo, mientras que UGT74F1 es específica para formar O-glucósidos. Por otra parte, a diferencia de la selectividad de UGT74F1 y UGT74F2 para la posición 2-OH, muchas enzimas prefieren glucosilar las posiciones 3-OH y

4-OH, y la actividad enzimática se ve fuertemente influenciada por la ubicación de otros grupos hidroxilo alrededor del anillo de benzeno (Lim et al., 2002).

La alteración de la expresión de las UGTs que glicosilan ácido salicílico en las plantas tiene un impacto significativo en su respuesta a las infecciones bacterianas, modulando los niveles de ácido salicílico libre y otros compuestos hormonales, y afectando la resistencia a diversos patógenos. En *A. thaliana*, la sobreexpresión de UGT74F2 reduce los niveles de SA libre y debilita la respuesta inmune contra *Pseudomonas syringae* (Song et al., 2008). De manera similar, la sobreexpresión de UGT76B1 en la misma planta aumenta la susceptibilidad a *Alternaria brassicicola* (von Saint Paul et al., 2011). Estos efectos se atribuyen a la disminución del SA libre y a la alteración del equilibrio hormonal, suprimiendo la respuesta inmune mediada por SA.

Sin embargo, la sobreexpresión de UGTs no siempre tiene un efecto negativo. En algunos casos, puede haber efectos beneficiosos o incluso contradictorios. Por ejemplo, la sobreexpresión de UGT76D1 en *A. thaliana* aumenta la resistencia a *P. syringae* (Huang et al., 2018). Este efecto se debe a la glicosilación del ácido dihidroxibenzoico (DHBA), un precursor del SA, lo que conduce a una acumulación de SA libre y una respuesta inmune más fuerte. Las discrepancias en los resultados de diferentes estudios sobre la sobreexpresión de UGTs pueden deberse a diversos factores, como la especificidad de la enzima, la planta utilizada, el tipo de patógeno y las condiciones ambientales. De manera interesante, otro estudio mostró que la eliminación de UGT76B1 en *A. thaliana* mejoró la resistencia a *P. syringae* pero disminuyó la resistencia hacia el patógeno necrótrofo *Alternaria brassicicola*, mientras que la sobreexpresión tuvo el efecto opuesto (von Saint Paul et al., 2011). La eliminación de UGT76B1 aumentó los niveles de ácido salicílico (SA) y disminuyó los marcadores dependientes de ácido jasmónico (JA), mientras que la sobreexpresión tuvo el efecto contrario. Este fenómeno también se exploró en *Oryza sativa*, donde la eliminación de UGT74J1 condujo a un aumento en los niveles de SA y mayor resistencia al tizón del arroz (*Magnaporthe oryzae*) (Tezuka et al., 2021). Es importante considerar estos factores al interpretar los resultados y comprender la complejidad de la regulación del SA por parte de las UGTs glicosiladoras en la defensa vegetal.

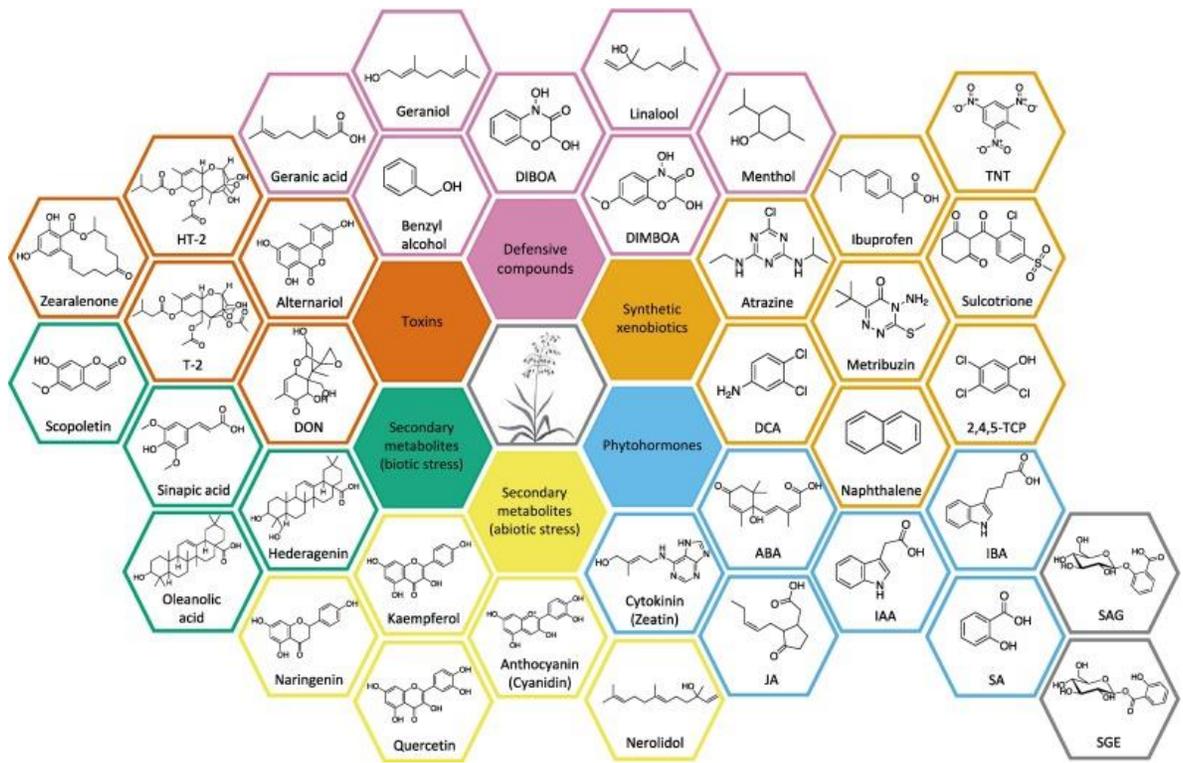


Figura 1. Estructuras químicas de compuestos modificados por glicosiltransferasas de plantas (Gharabli et al., 2023).

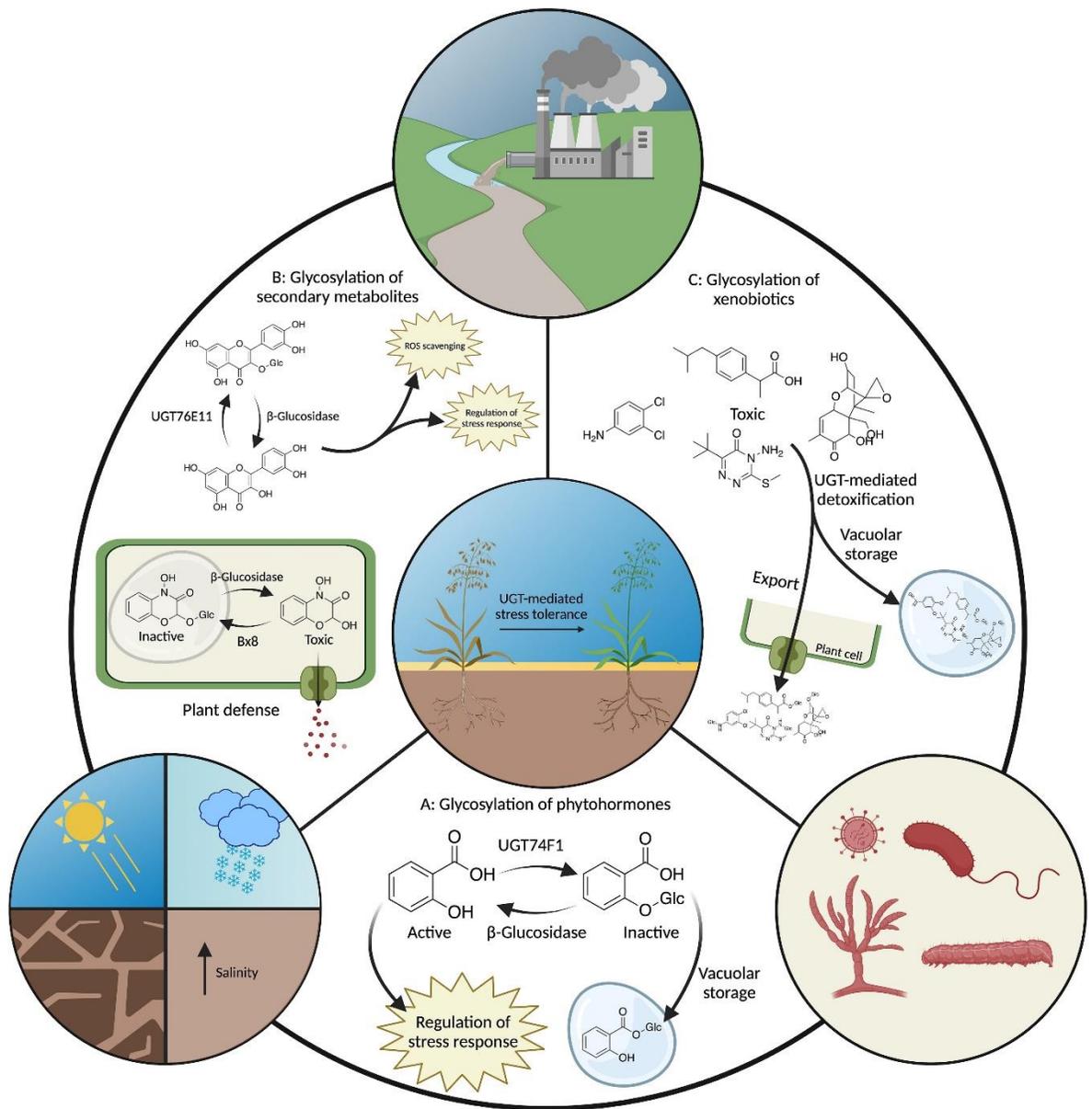


Figura 2. Mecanismos que usan las glicosiltransferasas para mediar la respuesta al estrés en plantas. A. glicosilación de fitohormonas. B. glicosilación de metabolitos secundarios. C. glicosilación de xenobióticos

Por otro lado, los glicósidos de compuestos bioactivos son de suma importancia para la industria de alimentos, cosmética y farmacéutica (Härtl et al., 2018). En este sentido, estas enzimas han sido utilizadas en experimentos de ingeniería metabólica para reducir la toxicidad de la vainillina durante su producción en *Saccharomyces cerevisiae* (Brochado et al., 2010) y para la producción del derivado glucosilado del deoxivivalenol, una micotoxina producida por diferentes especies de *Fusarium* (Michlmayr et al., 2015). Incluso, se han utilizado cultivos celulares de *Nicotiana tabacum* como biocatalizadores para la glicosilación de compuestos con diferentes aplicaciones. Por ejemplo, para reducir la toxicidad de xenobióticos como el 2,4-diclorofeno y del ácido dehidroabiético (Häkkinen et al., 2012; Laurent et al., 2007) y se ha propuesto su uso en el control de contaminantes como compuestos agroquímicos fluoroaromáticos (Shimoda & Hamada, 2009).

En el caso particular de *N. tabacum*, su proteoma contiene más de 300 proteínas anotadas como posibles glicosiltransferasas en la base de datos UniProt (<https://www.uniprot.org/proteomes/UP000084051>). Esta diversidad resalta su uso como biocatalizador y como fuente de GTs con potencial biotecnológico. Sin embargo, la mayoría de estas enzimas carecen de una descripción experimental. En este trabajo se reporta la caracterización bioquímica de la glicosiltransferasa UGT89A2 de tabaco. El gen que codifica para esta proteína se identificó y analizó con herramientas bioinformáticas. La enzima se expresó y purificó como proteína recombinante en bacterias. Se determinó el estado de oligomerización y las condiciones óptimas de actividad. Además, los ensayos de especificidad de sustrato muestran que la enzima NtUGT89A2 glicosila derivados di- y tri-hidroxilados del ácido benzoico y utiliza como sustrato donador a la UDP-glucosa.

2. Materiales y Métodos

2.1 Análisis bioinformático

Las secuencias de glicosiltransferasas de *A. thaliana* depositadas en la base de datos CAZy (Carbohydrate Active Enzyme, www.cazy.org) se utilizaron para identificar posibles UGTs en el genoma de *N. tabacum*. La búsqueda se realizó utilizando la herramienta BLASTP de la base de datos NCBI (Sayers et al., 2022). Se seleccionaron secuencias con un porcentaje de identidad mayor o igual al 45%, un tamaño promedio de 477 residuos, y que tuvieran información sobre posibles sustratos. Las secuencias seleccionadas se sometieron a un análisis *in silico* para predecir su solubilidad (<https://protein-sol.manchester.ac.uk/>) (Hebditch et al., 2017) y su propensión a cristalizar (<https://xtalpred.godziklab.org>) (Jahandideh et al., 2014). La alineación de secuencias se realizó utilizando la herramienta Clustal Omega en el servidor EBI (<https://www.ebi.ac.uk/Tools>) (Madeira et al., 2022). Se llevó a cabo un análisis filogenético con secuencias de proteínas ortólogas de NtUGT89A2 (XP_016497160.1) obtenidas de la base de datos GenBank, incluyendo diferentes especies de la familia *Solanaceae*. Las secuencias se alinearon utilizando la herramienta MUSCLE (Edgar, 2004). El árbol filogenético se construyó con el software MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) versión 6.06 (Tamura et al., 2013) utilizando el algoritmo de máxima verosimilitud. La fiabilidad del árbol filogenético se evaluó mediante un análisis de bootstrap con 1000 réplicas. La búsqueda de proteínas homólogas por superposición de estructuras 3D se realizó con el servidor Foldseek (<https://search.foldseek.com/search>) (van Kempen et al., 2024), utilizando como referencia el modelo predicho para la secuencia XP_016497160.1 (ID: A0A1S4C7P7-TOBAC) de la base de datos AlphaFold (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>) (Varadi et al., 2024).

2.2 Clonación, expresión y purificación

La secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína NtUGT89A2 (XP_016497160.1) fue optimizada para el uso de codones de *E. coli* utilizando herramientas del sitio web de Integrated DNA Technologies (IDT,

<https://www.idtdna.com>). Se añadieron sitios de restricción para las enzimas *NdeI* y *HindIII* para facilitar la clonación en el vector pET28. La secuencia se obtuvo como un *gBlock* de IDT. El *gBlock* fue digerido con las enzimas de restricción *NdeI* y *HindIII* y ligado en los sitios correspondientes de un vector pET28 modificado en el que el sitio de trombina fue reemplazado por la secuencia de la proteasa 3C del virus rinovirus humano (HRV-3C). La reacción de ligación se transformó en la cepa *E. coli* TOP10 y se cultivó en medio sólido Luria-Bertani (LB) suplementado con 50 µg/mL de kanamicina a 37 °C durante 16 horas. Las clonas positivas se seleccionaron mediante PCR utilizando los siguientes primers: 5'-GAATTCCATATATATGAGCAGTAGCAAG y 5'-CGGATCCAAGCTCTTTAGCACTTCA, y se evaluaron adicionalmente mediante ensayos de restricción con las enzimas *NdeI* y *HindIII*. El constructo con el inserto correcto (pET28-NtUGT89A2) se confirmó mediante secuenciación con oligonucleótidos T7 externos.

Las condiciones de expresión utilizadas fueron las siguientes. Células competentes de *E. coli* BL21(DE3) pLysS fueron transformadas con el vector recombinante y cultivadas en medio LB suplementado con kanamicina 50 µg/mL y cloranfenicol 34 µg/mL hasta alcanzar una DO600 de 0.4-0.6 a 28 °C. La expresión de la proteína se indujo mediante la adición de isopropil-β-D-1-tiogalactósido (IPTG) a una concentración final de 0.25 mM durante 4 horas a 28 °C. Las células se recolectaron por centrifugación a 4500 rpm durante 10 minutos a 4 °C. El pellet celular se resuspendió en 30 mL de tampón de lisis (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 300 mM NaCl). La lisis celular se realizó por sonicación en ciclos de 15 s de encendido y 15 s de apagado durante 10 minutos a una amplitud del 50%. El lisado se centrifugó a 12000 rpm durante 10 minutos y se recogió el sobrenadante. La fracción soluble se cargó en una columna de 3 ml de agarosa Ni-NTA al 6 % (Jena Bioscience), previamente equilibrada con tampón de lisis. La columna se lavó con 10 mL de tampón de lisis seguido de 10 mL de tampón de lisis con 10 mM de imidazol. La elución se realizó con un gradiente escalonado de 50, 150, 300 mM de imidazol preparado en tampón de lisis. La proteína recuperada fue desalada con una columna PD-10 (GE Healthcare Life Sciences) en amortiguador A (Tris-HCl 50 mM pH 7.0, 1 mM DTT). La muestra filtrada (0.22

µm), se inyectó a una columna HiTrap Q HP (GE Healthcare Life Sciences) equilibrada con amortiguador A. La elución se realizó con un gradiente lineal de 0-100% de amortiguador B (Tris-HCl 50 mM pH 7.0, 1 mM DTT, NaCl 1 M) con 20 volúmenes de columna (CV) a un flujo de 2 mL/min. Las fracciones en las que eluyó la proteína se colectaron y se concentraron por microfiltración usando con un dispositivo Vivaspin Turbo 15 (Sartorius) con 10 kDa de corte. La proteína concentrada se incubó con 5 unidades/mg de la proteasa HRV-3C a 4 °C toda la noche para eliminar la etiqueta 6XHis. Por último, se realizó una cromatografía de exclusión molecular con una columna Superdex 75 10/300 (GE Healthcare Life Sciences), equilibrada con amortiguador de elución (Tris-HCl 50 mM pH 7.0, NaCl 600 mM), a un flujo de 0.65 mL/min. La elución de la proteína se siguió por absorbancia a 280 nm y se colectaron fracciones de 1 mL. La columna Superdex 75 10/300 se calibró con las proteínas tiroglobulina (670 kDa), γ-globulina (158 kDa), ovoalbúmina (44 kDa), mioglobina (17 kDa) y vitamina B12 (1.3 kDa). Se usó el método de Bradford para estimar la concentración de proteínas; el estándar usado fue seroalbúmina bovina (BSA) (Bradford, 1976). La presencia y grado de pureza de la proteína en cada etapa del proceso de purificación se monitoreó por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE)

2.3 Western Blot

La proteína purificada por afinidad a Níquel fue analizada por Western Blot utilizando un anticuerpo específico para la etiqueta 6XHis. El ensayo de Western Blot se realizó como se describió anteriormente con modificaciones menores (Bocanegra-Jiménez et al., 2021). Las muestras a evaluar se sometieron a SDS-PAGE al 12% usando el método de Laemmli (Laemmli, 1970) y posteriormente se transfirieron a una membrana de PVDF usando un sistema semiseco a 15V por 90min (Thermo Fisher). La membrana se bloqueó con 5% de leche desnatada (nonfat milk) en PBS por 2 horas a temperatura ambiente. Después del lavado, se incubó toda la noche con el anticuerpo primario monoclonal de ratón 6XHis Epitope Tag (Thermo Fisher) diluido 1:3000. La membrana se lavó nuevamente y se incubó con el anticuerpo secundario anti IgG de ratón conjugado con fosfatasa

alcalina (abcam) diluido 1:5000. Finalmente, las muestras se visualizaron usando el kit de Alkaline Phosphatase Conjugate Substrate (Bio-Rad).

2.4 Ensayo de dispersión dinámica de luz

Los ensayos de dispersión dinámica de luz (DLS) se realizaron en un equipo Zetasizer APS2000 (Malvern). La proteína a una concentración final de 0.8 mg/mL se preparó en un amortiguador de Tris-HCl 50 mM pH 8.0, NaCl 300 mM, en un volumen final de 50 μ L. Las soluciones stock y las muestras de proteína se ultrafiltraron con membrana PES de 0.2 μ m de tamaño de poro (Minisart, Sartorius). Las muestras se incubaron 300 s a la temperatura de trabajo antes de realizar la medida. Cada función de correlación se determinó a partir de la adquisición de 14 lecturas en 40 s a 25 °C. Para determinar el punto de agregación, se tomaron lecturas en el rango de 25 a 90 °C con incrementos de 1 °C, la muestra se incubó 120 s a cada temperatura antes de determinar la función de correlación.

2.5 Ensayo de desplazamiento térmico

La temperatura de desnaturalización térmica de la proteína en ausencia o presencia de aditivos o ligandos se determinó usando un ensayo de desplazamiento térmico seguido por fluorescencia como se describió anteriormente (Llamas-García et al., 2022). Las muestras se prepararon en un volumen final de 40 μ l en tampón de elución que contenía Sypro Orange 5X (Invitrogen), 0.1 mg/ml de proteína, con o sin ligando. Se realizaron tres réplicas para cada muestra en placas de PCR de 96 pocillos. La señal de fluorescencia se midió en un termociclador de RT-PCR RT-PCR 7500 Fast kit en tiempo real (Applied Biosystems) en un rango de temperatura de 25 a 95 °C con incrementos de temperatura de 1 °C. La longitud de onda de excitación fue de 455 a 485 nm, mientras que la emisión se registró de 567 a 596 nm. Se utilizó la ecuación de Boltzmann para estimar la T_m según Lee et al, 2019 (Lee et al., 2019).

Para determinar la constante de afinidad de NtUGT89A2 por sus sustratos, se utilizó el análisis isotérmico propuesto por Bai et al. 2019. Para ello se obtuvieron las curvas de desnaturalización térmica de la proteína a

concentraciones crecientes del sustrato aceptor en presencia de una concentración saturante del sustrato donante y viceversa. Se evaluó 2,5-DHBA en un rango de concentración de 0 a 150 μM en presencia de UDP-glucosa 5 mM. Se evaluó la UDP-glucosa de 0 a 200 μM en presencia de 2,5-DHBA 1 mM. Los datos de fluorescencia normalizados de cada transición térmica se expresaron como fracción de proteína desplegada. La fracción de proteína desplegada a 52 °C se graficó en función de la concentración del sustrato. Luego, los datos se ajustaron a un modelo de unión 1:1 (Roy et al., 2023). La constante de disociación aparente (K_d) se calculó utilizando la ecuación (1) (Bai et al., 2019).

$$K_d = (1 - f_{u0}) \left(EC_{50} - \frac{[P]_T}{2} \right) \quad (1)$$

2.6 Ensayos de actividad enzimática

La actividad enzimática se determinó con 1 μg de proteína purificada, en presencia de UDP-glucosa 5 mM como sustrato donador y 1 mM de sustrato aceptor, a pH 8.0, a 37 °C en Tris-HCl 50 mM, en un volumen final de 200 μL , el tiempo de reacción fue de 1 hora. La reacción se desencadenó mediante la adición de la enzima y se detuvo mediante la adición de 200 μL de metanol. Se utilizó cromatografía en capa fina (TLC) como método rápido para analizar el progreso de la reacción; se utilizó acetato de etilo-MeOH (70:30) como fase móvil. El análisis cuantitativo de los productos de reacción se realizó mediante cromatografía líquida de fase inversa (HPLC-PDA-Agilent serie 1200) utilizando una columna LC Synergi™ Polar-RP 80 Å de 4 μm (250 x 4,6 mm, Phenomenex). Se utilizó un gradiente lineal de 0 a 50 % de acetonitrilo en agua a 1 ml/min durante 20 min. La cantidad de micromoles de producto se calculó midiendo la cantidad de sustrato consumido, para ello se determinó el área bajo la curva del pico del sustrato y se extrapolaron a la curva estándar correspondiente. Una unidad de actividad (U) se definió como micromoles de glucósido producido por minuto ($\mu\text{mol}/\text{min}$), mientras que la actividad específica (U/mg) correspondió a micromoles por minuto por miligramo de enzima. Para los ensayos de estabilidad térmica, la enzima en alícuotas se incubó de 20 a 100 °C con intervalos de 5 °C durante 60 minutos, después de lo cual se determinó la actividad a 37 °C. En los ensayos de temperatura óptima, la actividad enzimática se midió directamente a diferentes

temperaturas que oscilaron entre 20 y 100 °C con intervalos de 5 °C durante 1 hora. En ambos casos los productos de reacción se resolvieron mediante TLC y se analizaron mediante densitometría con el software Image J (Schneider et al., 2012). Los experimentos se realizaron por triplicado.

2.7 Análisis de HPLC-ESI-MS y Análisis de Fragmentación LC-MS

El análisis HPLC-ESI-MS en modo negativo se realizó en un sistema Agilent G6530AB HPLC-MS-SQ-TOF, utilizando una columna Gemini-NX C18 (3 µm, 2.0 x 75 mm; Phenomenex, Torrance, CA, EE.UU.) y una mezcla binaria de MeCN-H₂O (0.1% ácido fórmico) como fase móvil. El sistema de elución en gradiente comenzó con una proporción de 15:85 a 100:0 en 8 minutos, y finalmente se mantuvo el sistema isotérmico durante 1.5 minutos. El análisis se realizó a 0.4 mL/min. La muestra se preparó a 2.0 mg/mL en H₂O.

Para el Análisis de Fragmentación LC-MS, el sistema de cromatografía fue un Waters UPLC Clase I acoplado a un espectrómetro de masas Synapt HDMi. La cromatografía se realizó en una columna Acquity BEH (1.7 µm, 2.1 x 50 mm) con temperaturas de columna y muestra de 40 °C y 15 °C, respectivamente. La fase móvil consistió en (A) agua y (B) acetonitrilo, ambos con 0.1% de ácido fórmico (SIGMA). Las condiciones de gradiente de las fases móviles fueron: 0-20 minutos con un gradiente lineal de 1 a 99% B, 20-24 minutos con 99% B isotrático, 24-25 minutos con un gradiente lineal de 90 a 1% B (tiempo total de corrida 30 minutos). La velocidad de flujo fue de 0.3 mL/min y se inyectaron muestras de 5 µL. El análisis espectrométrico se llevó a cabo con una fuente de ionización por electrospray en modo negativo, utilizando voltajes de 3000 V para el capilar, 40 V para el cono de muestreo y 80 V para el voltaje de ajuste de la fuente. La temperatura de la fuente fue de 120 °C y la temperatura de desolvatación fue de 20 °C. La velocidad de flujo de gas de desolvatación fue de 600 L/h y la presión del nebulizador fue de 6.5 bar. La leucina-enkefalina se utilizó como masa de referencia (554.2615, [M-H]⁻). El método de adquisición de masas fue MSe y las condiciones fueron: rango de masa de 50-1200 Da, energía de colisión para la función 1 (MS) fue de 6 V, y para la función 2 (MS²) se utilizó un gradiente de 10 a 30 V. El tiempo de escaneo fue de 0.5 segundos. Los datos se adquirieron y procesaron utilizando el software MassLynx (versión 4.1).

).

2.8 Análisis de RMN

Los experimentos de RMN se registraron en disolvente DMSO- d_6 utilizando un espectrómetro de RMN Bruker Ascend III 700 MHz equipado con una criosonda, operando a 700 MHz para ^1H . Los desplazamientos químicos se reportan en partes por millón en relación con las resonancias del disolvente como estándar interno.

3. Resultados

3.1 Análisis bioinformático

Para seleccionar una glicosiltransferasa del genoma de *N. tabacum* capaz de modificar compuestos aromáticos, se realizó una búsqueda utilizando como referencia 107 secuencias de glicosiltransferasas de *A. thaliana*. Se identificaron 47 secuencias de *N. tabacum*, que fueron analizadas para corroborar la presencia de residuos y características propias de glicosiltransferasas. Además, se realizó una predicción de solubilidad y predisposición a cristalizar. De acuerdo con el análisis realizado, se seleccionó la secuencia XP_016497160.1 de la base de datos del NCBI, la cual conserva características de glicosiltransferasa (Figura 3) y presenta los mejores parámetros de solubilidad y predisposición a cristalizar, con un puntaje de 0.27 en ProteinSol y de 2 en XtalPred-RF, respectivamente.

La secuencia XP_016497160.1 codifica para una proteína de 467 residuos, con un punto isoeléctrico predicho de 6.0 y un peso teórico de 51.4 kDa (Gasteiger et al., 2005). La secuencia posee 48.6% de identidad con la glicosiltransferasa UGT89A2 (CAB83309.1) de *A. thaliana* (AtUGT89A2) (Tabla 1). La predicción de estructura secundaria de la secuencia XP_016497160.1 con JPRED es similar a lo observado en la proteína AtUGT89A2 con 15 hélices alfa y 10 hebras beta, sugiriendo que conserva el mismo plegamiento. La proteína presenta el motivo PSPG de 44 aminoácidos ubicado en el dominio C-terminal. Este motivo, presenta conservados los residuos de reconocimiento del sustrato donador de glucosa (UDP-glucosa) W344, Q347, H362, S367, E370, D386, y Q387. Adicionalmente, presenta los residuos H20 y D119 que han sido implicados en la inversión de la configuración anomérica de la glucosa (Figura 3). Como se esperaba, el análisis filogenético muestra que NtUGT89A2 se agrupa con las glicosiltransferasas de la familia *Solanaceae* con una identidad de 80 al 97% y distante de la proteína AtUGT89A2 tomada inicialmente como referencia (Figura 4). Con base en la identidad de secuencia con AtUGT89A2 y a las características descritas anteriormente, la proteína se identificó como NtUGT89A2. La identidad observada entre NtUGT89A2 y AtUGT89A2 sugiere que NtUGT89A2 puede utilizar como uno

de sus sustratos a derivados de ácido benzoico (Lim et al., 2002), una enzima con esta función no ha sido descrita en *N. tabacum* hasta el momento.

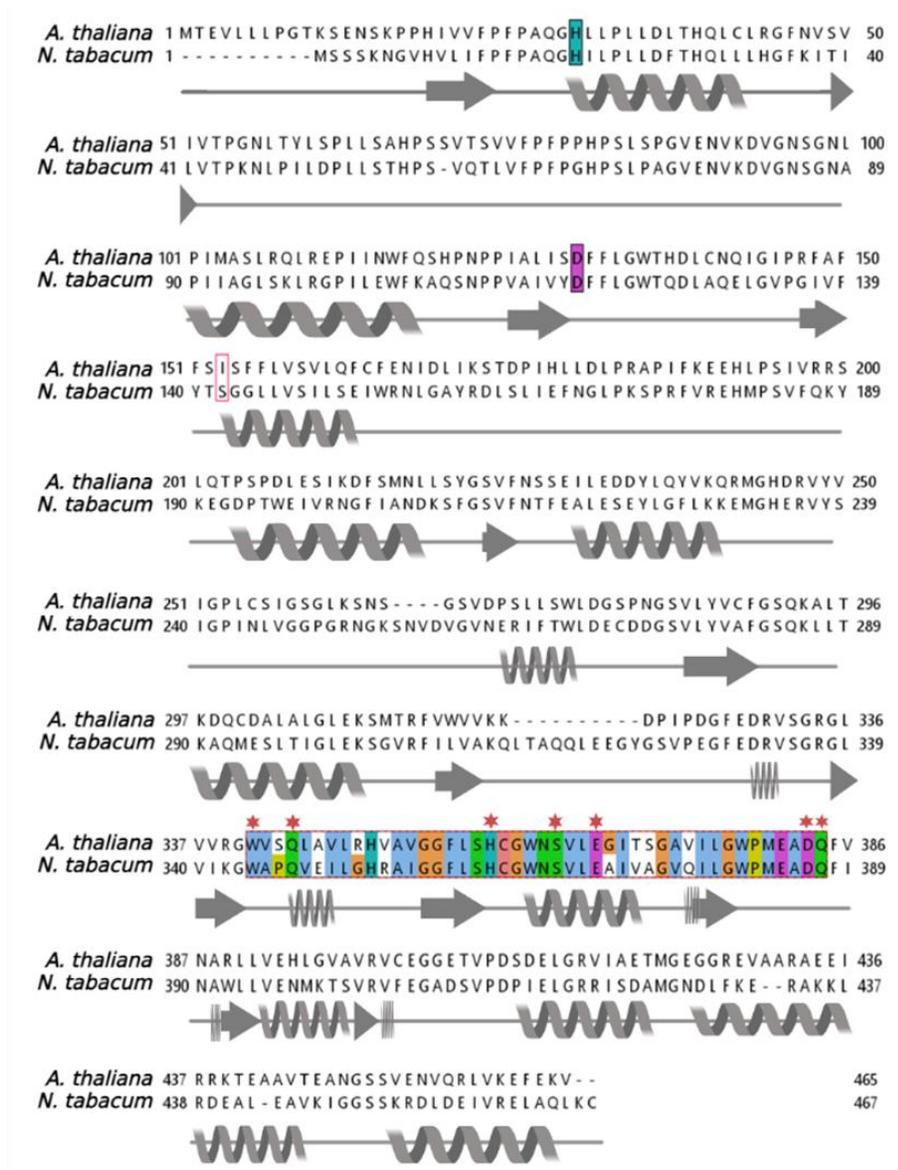


Figura 3. Análisis bioinformático de la secuencia de aminoácidos NtUGT89A2. **A)** Alineación de secuencias de aminoácidos de NtUGT89A2 (XP_016497160.1) y AtUGT89A2 (CAB83309.1). Los 44 residuos pertenecientes al motivo PSPG están sombreados en diferentes colores. Los aminoácidos marcados con un asterisco rojo corresponden a los residuos que interactúan con UDP-glucosa (Shao et al., 2005). Los residuos catalíticos His20 y Asp119 de *N. tabacum* se muestran en verde y magenta, respectivamente. La alineación se realizó en Jalview 2.10.3B1 (se utilizó la versión 11.00 de T-coffee como algoritmo de alineación). La estructura secundaria de NtUGT89A2 predicha por JPred se muestra debajo del alineamiento.

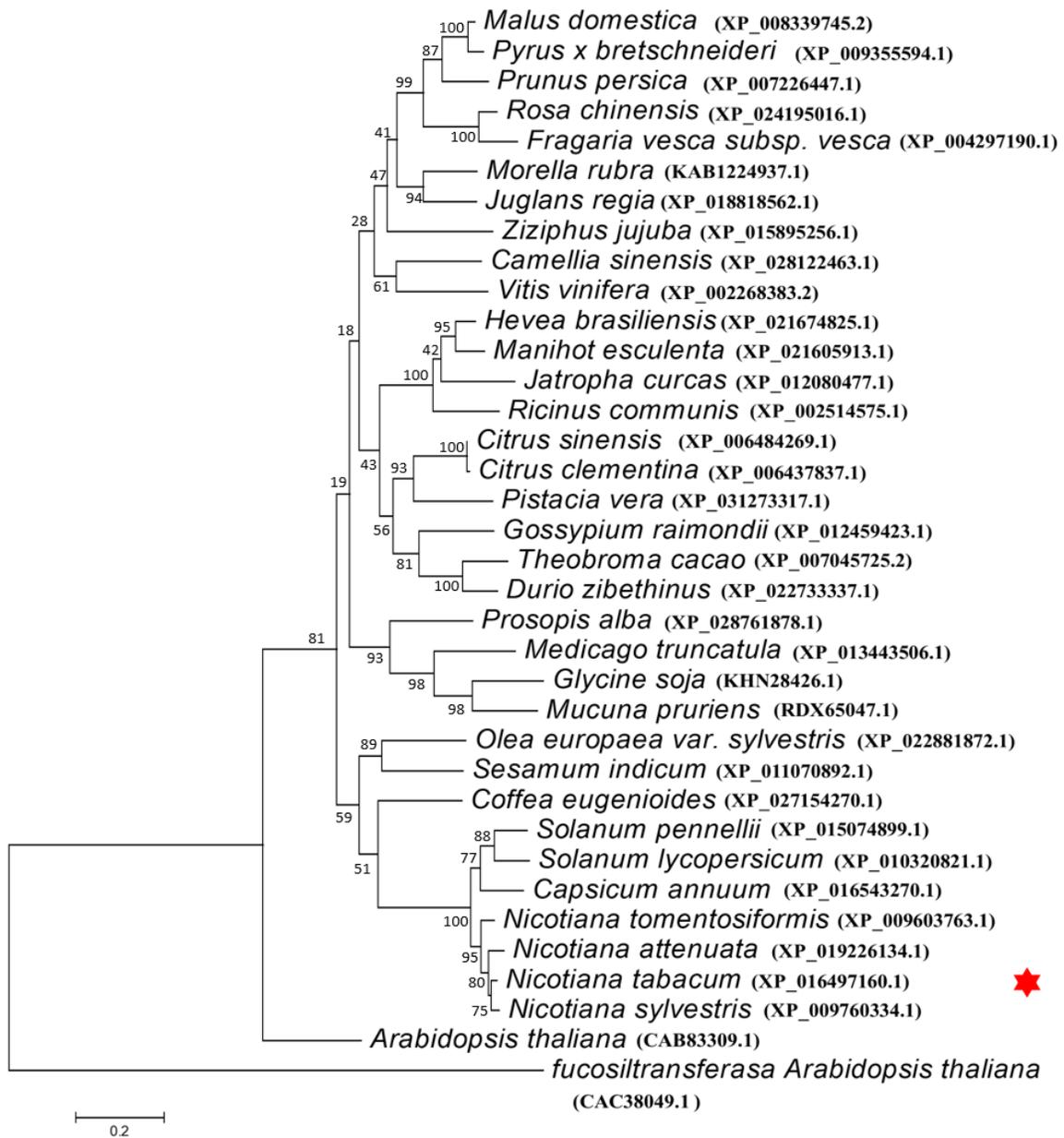


Figura 4. Análisis filogenético de NtUGT89A2 y 35 glicosiltransferasas de plantas. Las especies de plantas se mencionan en el lado derecho de la ubicación de la secuencia. El árbol filogenético fue construido con el software MEGA (Análisis de Genética Evolutiva Molecular) versión 6.06 utilizando el algoritmo de máxima verosimilitud. La fiabilidad del árbol filogenético se evaluó mediante un análisis bootstrap con 1000 réplicas.

3.2 Clonación, expresión y purificación de la proteína NtUGT89A2

La secuencia que codifica los 467 residuos de la proteína NtUGT89A2 fue optimizada para su expresión en bacterias y se clonó en un vector pET28 modificado (pET28-NtUGTA89A2). Para determinar las condiciones óptimas de expresión, se utilizó la cepa *E. coli* BL21(DE3) pLysS, que se transformó con el vector pET28-NtUGT89A2. Se evaluaron diversas condiciones de temperatura, tiempos de inducción y diferentes concentraciones de IPTG. Los mejores resultados se observaron utilizando IPTG 0.25 mM por 4 horas a 28 °C (Figura 5A).

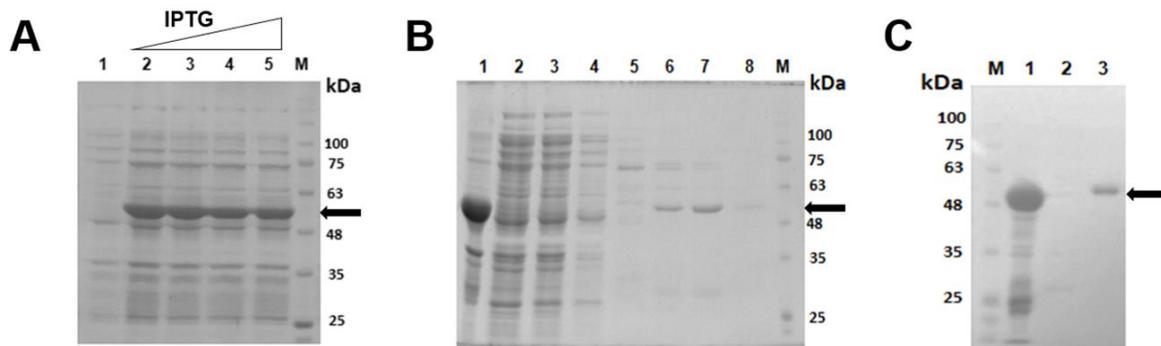


Figura 5. Expresión y purificación por cromatografía de afinidad a níquel de la proteína NtUGT89A2. **A)** Ensayos de expresión de NtUGTA89A2 en la cepa BL21(DE3) pLysS de *E. coli*. La expresión fue inducida con diferentes concentraciones de IPTG a 28 °C por 4 h. Las muestras fueron separadas en gel SDS-PAGE al 12% teñido con Coomassie 250. 1: no inducido, 2: IPTG 0.25 mM, 3: IPTG 0.5 mM, 4: IPTG 0.75 mM, 5: IPTG 1 mM, M: Marcador de peso molecular. **B)** NtUGT89A2 purificada por cromatografía de afinidad a níquel. Las fracciones fueron resueltas en gel SDS-PAGE al 12% teñido con Coomassie 250. 1: Fracción insoluble, 2: fracción soluble, 3: frente de inyección, 4: lavado, 5: imidazol 10 mM, 6: imidazol 50 mM 7: imidazol 150 mM, 8: imidazol 300 mM, M: marcador de peso molecular. **C)** La proteína purificada por afinidad a níquel mostrada en el panel (B) línea 7 fue identificada como NtUGTA89A2 con un anticuerpo anti-6XHis por Western Blot. M: Marcador de peso molecular, 1: fracción insoluble, 2: frente de la cromatografía de níquel, 3: Elución de la cromatografía de afinidad a níquel. El WB fue observado con el kit alkaline Phosphatase Conjugate Substrate (Bio-Rad).

En la purificación por cromatografía de afinidad a níquel, la proteína eluyó principalmente en la fracción de imidazol a 150 mM (Figura 6 A y B). Por su parte, en intercambio iónico la proteína eluyó en un rango de concentración de NaCl de 170 a 300 mM (Figura 6 C y D). Por último, en la cromatografía de exclusión molecular la proteína se recuperó en las fracciones 11 a 13. El pico de la elución se observó en el mililitro 12.3, lo cual corresponde a un peso molecular estimado de 58.3 kDa, un monómero (Figura 6 C). Se purificaron 1.2 mg de proteína por litro de cultivo.

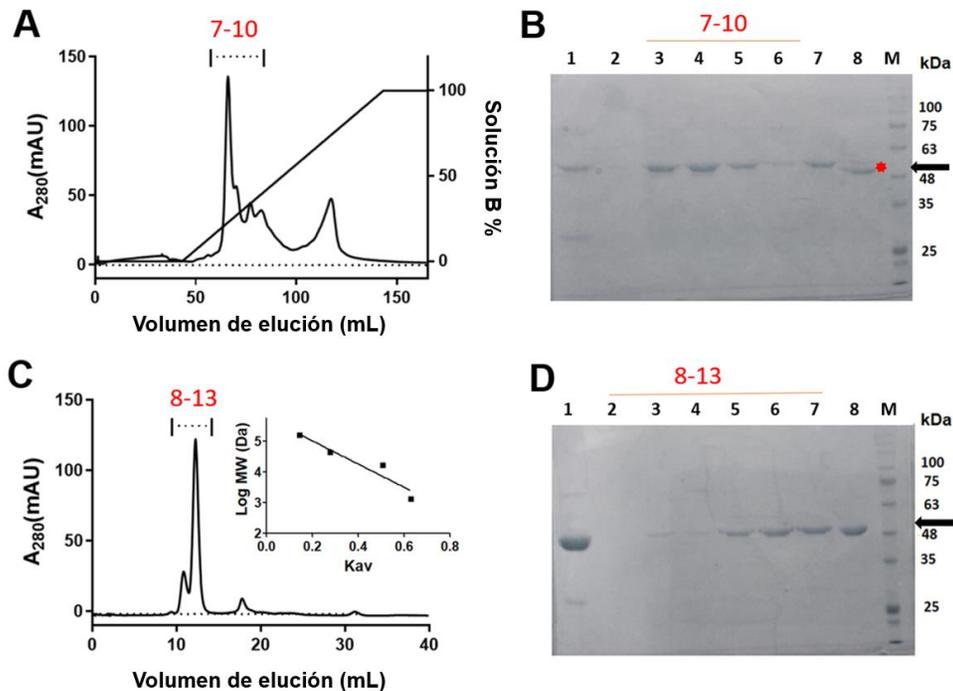


Figura 6. Purificación de la proteína NtUGT89A2 por cromatografía de intercambio iónico y exclusión molecular. **A)** Perfil de elución de la cromatografía de intercambio iónico. El eje derecho representa el porcentaje del amortiguador B, el eje izquierdo representa la absorbancia a 280 nm, el eje de las abscisas representa el volumen de elución. **B)** Las fracciones de la elución de intercambio iónico mostrado en (A) fueron resueltas en SDS-PAGE al 12%. 1: NtUGT89A2 purificada por cromatografía de afinidad de níquel desalada y filtrada. 3 a 6: fracciones 7 a 10 de la elución de intercambio iónico. 7: las fracciones 7-10 juntas. 8: fracciones 7-10 tratadas con la proteasa HRV-3C, se observa (*) el cambio de peso molecular por eliminación de la etiqueta 6XHis. **C)** Perfil de elución de la cromatografía de exclusión molecular. El volumen de elución de NtUGT89A2 fue de 12.3 mL ($y = -3.784x + 5.773$), el cual corresponde a un peso estimado de 58.3 kDa. El eje de las ordenadas representa la absorbancia 280 nm, mientras que el eje de las abscisas representa el volumen de elución. Se muestra la curva de calibración de la columna. **D)** Las fracciones de la cromatografía de exclusión molecular mostradas en (C), fueron resueltas en SDS-PAGE. 1: NtUGT89A2 de intercambio iónico inyectada a la columna Superdex 75. 2-7: fracciones 8 a 13 de la elución. 8: fracciones 11 a 13 juntas. M: Marcador de peso molecular.

3.3 La estabilidad térmica de NtUGT89A2 aumenta en presencia de UDP-glucosa y 2,5-DHBA

Los primeros ensayos de purificación de NtUGT89A2 mostraron que un alto porcentaje de la proteína permanece en la fracción insoluble, lo que resultó en una baja cantidad de proteína obtenida por cromatografía de afinidad a Níquel (datos no mostrados). Para mejorar el rendimiento de la purificación, se realizaron ensayos de desplazamiento térmico monitoreado por fluorescencia para identificar aditivos y ligandos con un efecto positivo en la estabilidad térmica de NtUGT89A2 (Tabla S1).

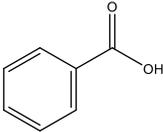
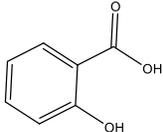
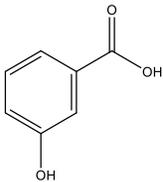
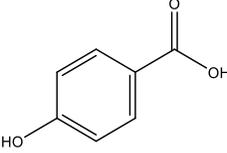
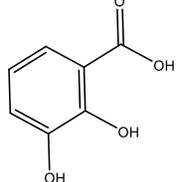
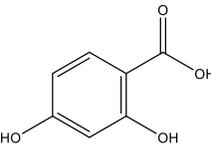
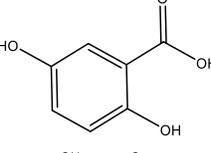
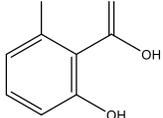
Entre las condiciones evaluadas se incluyeron diferentes valores de pH (5.5 a 8.5), glicerol (5 a 20 %), agente quelante (EDTA 1 a 5 mM), fuerza iónica (NaCl 100 a 1000 mM), y agente reductor (β -mercaptoetanol 2 a 15 mM) (Anexo 1). También se evaluó el efecto de la UDP-glucosa como sustrato donador y derivados mono-, di- y trihidroxilados del ácido benzoico: ácido benzoico, ácido 2-hidroxi-benzóico (2-HBA), ácido 3-hidroxi-benzóico (3-HBA), ácido 4-hidroxi-benzóico (4-HBA), ácido 2,3-dihidroxi-benzóico (2,3-DHBA), ácido 2,4-dihidroxi-benzóico (2,4-DHBA), ácido 2,5-dihidroxi-benzóico (2,5-DHBA), ácido 2,6-dihidroxi-benzóico (2,6-DHBA), ácido 2,3,4-trihidroxi-benzóico (2,3,4-THBA) y ácido 3,4,5-trihidroxi-benzóico (3,4,5-THBA) (Tabla 1).

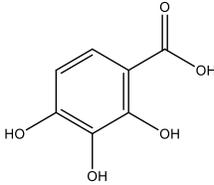
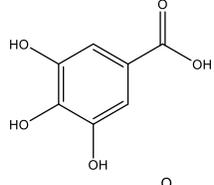
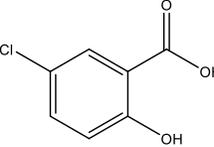
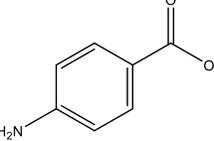
En ausencia de aditivos, NtUGT89A2 presentó un punto medio de desnaturalización térmica (T_m) de 52.4 ± 1.2 °C (Figura 7A). Se observó un efecto positivo cuando se utilizó un pH de 7.0 o en presencia de concentraciones iguales o superiores a 600 mM de NaCl, con un aumento en la T_m de 0.6 y 4.1 °C, respectivamente (Figura 7B y C). No se observó ningún efecto con β -mercaptoetanol, glicerol o EDTA (Tabla S1). Tomando en consideración los resultados anteriores, se modificaron las condiciones de purificación incluyendo NaCl 600 mM y variando el pH a 7.0 después del paso de purificación por afinidad a Níquel. Esto nos permitió aumentar tres veces la cantidad de proteína purificada comparado con las condiciones no optimizadas.

En presencia de los posibles sustratos, no se observaron cambios significativos cuando los sustratos se evaluaron de forma independiente. Por

ejemplo, la T_m en presencia de 5 mM de UDP-glucosa fue de 51.2 ± 0.5 °C, mientras que con 1 mM de 2,5-DHBA el valor fue de 51.3 ± 0.9 °C (Figura 7D) (Tabla S1). Sin embargo, si se observó un cambio significativo cuando se evaluó de forma simultánea el efecto del posible sustrato aceptor en presencia de UDP-glucosa. Como se puede observar en la Figura 7E, la T_m en presencia de ácido benzoico/UDP-glucosa fue 3 °C mayor comparado con la proteína en ausencia de ligandos. Se observaron resultados similares con los derivados 3-HBA/UDP-glucosa y 4-HBA/UDP-glucosa (~ 3 °C). Mientras que con 2-HBA/UDP-glucosa el aumento de la T_m fue de ~ 9 °C. Los mejores resultados se obtuvieron con los derivados di-hidroxilados con un cambio de ~ 10 °C en presencia de 2,5-DHBA/UDP-glucosa (Figura 7E). Por el contrario, en presencia del ácido 4-aminobenzoico/UDP-glucosa, la T_m fue similar a la observada en ausencia de ligandos. Estos resultados sugieren que el ácido benzoico y sus derivados mono y di-hidroxilados se unen con diferente afinidad a NtUGT89A2 siempre y cuando estén en presencia de UDP-glucosa.

Tabla 1. Estabilidad térmica de NtUGT89A2 en presencia de posibles sustratos aceptores y UDP-glucosa. Cada ensayo de desplazamiento térmico se realizó con 4 μ g de proteína, 1 mM de posible sustrato aceptor y 5 mM de UDP-glucosa, por triplicado.

No	Compuesto	T_m ($^{\circ}$ C)	Estructura química
1	Ninguno	52.6 ± 1.3	-
2	Ácido benzoico	55.7 ± 0.4	
3	Ácido 2-hidroxibenzoico (2-HBA)	62.8 ± 1.7	
4	Ácido 3-hidroxibenzoico (3-HBA)	55.8 ± 0.5	
5	Ácido 4-hidroxibenzoico (4-HBA)	56.0 ± 0.4	
6	Ácido 2,3-dihidroxibenzoico (2,3-DHBA)	60.7 ± 0.3	
7	Ácido 2,4-dihidroxibenzoico (2,4-DHBA)	58.8 ± 1.2	
8	Ácido 2,5-dihidroxibenzoico (2,5-DHBA)	62.9 ± 0.7	
9	Ácido 2,6-dihidroxibenzoico (2,6-DHBA)	60.2 ± 1.8	

10	Ácido 2,3,4-trihidroxibenzoico (2,3,4-THBA)	60.9 ± 0.8	
11	Ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico (3,4,5-THBA)	60.6 ± 0.4	
12	Ácido 5-cloro-2-hidroxibenzoico	59.7 ± 0.2	
13	Ácido 4-aminobenzoico	52.3 ± 0.7	

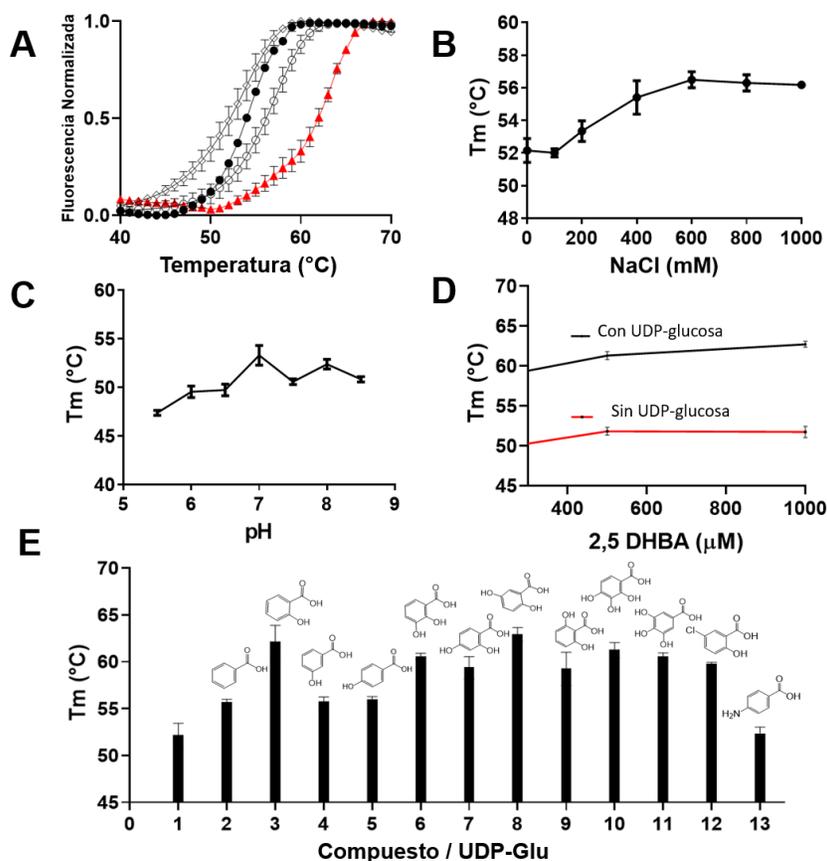


Figura 7. Análisis de la estabilidad térmica de NtUGT89A2 en presencia de aditivos y ligandos. A) Curvas representativas de desnaturalización térmica de NtUGT89A2; sin aditivos (\diamond), UDP-glucosa 5 mM y 2,5 DHBA 1 mM (\blacktriangle), NaCl 600 mM (\circ), y Tris-HCl 50 mM pH 7.0 (\bullet). B) Efecto de la fuerza iónica en la desnaturalización térmica. C) Efecto del pH en la desnaturalización térmica. D) La estabilidad térmica de NtUGT89A2 aumenta solo en presencia tanto del sustrato aceptor como del donador. No se observó un cambio significativo la T_m en presencia de 2,5-DHBA (línea roja); sin embargo, cuando se evaluó el efecto combinado de 2,5-DHBA y UDP-glucosa, el valor de T_m aumentó en ~ 10 °C (línea negra). E) Estabilidad térmica (T_m) de NtUGT89A2 en presencia de derivados del ácido benzoico y 5 mM UDP-glucosa. La ordenada muestra el valor de T_m y las barras corresponden a los derivados del ácido benzoico. 1. NtUGT89A2 en ausencia de ligandos, 2. ácido benzoico, 3. 2-HBA, 4. 3-HBA, 5. 4-HBA, 6: 2,3-DHBA, 7: 2,4-DHBA, 8: 2,5-DHBA, 9: 2,6-DHBA, 10: 2,3,4-THBA, 11: 3,4,5-THBA, 12: 5-cloro-2-HBA y 13: ácido 4-aminobenzoico. Los experimentos se realizaron por triplicado.

3.4 NtUGT89A2 un monómero en solución

El estado oligomérico de NtUGT89A2 fue analizado por dispersión dinámica de luz en condiciones nativas a 25 °C. En estos ensayos, se determinó un tamaño de partícula de 6.7 ± 0.9 nm de diámetro, que corresponde a un peso molecular de 57.8 ± 6.4 kDa, (Figura 8A). Esto sugiere que NtUGT89A2 se encuentra como monómero en solución y confirma los resultados observados por SEC. Además, se monitoreó el cambio en el tamaño de partícula en un rango de temperatura de 25 a 90 °C, lo que permitió determinar una temperatura de agregación de 44 °C (Figura 8B).

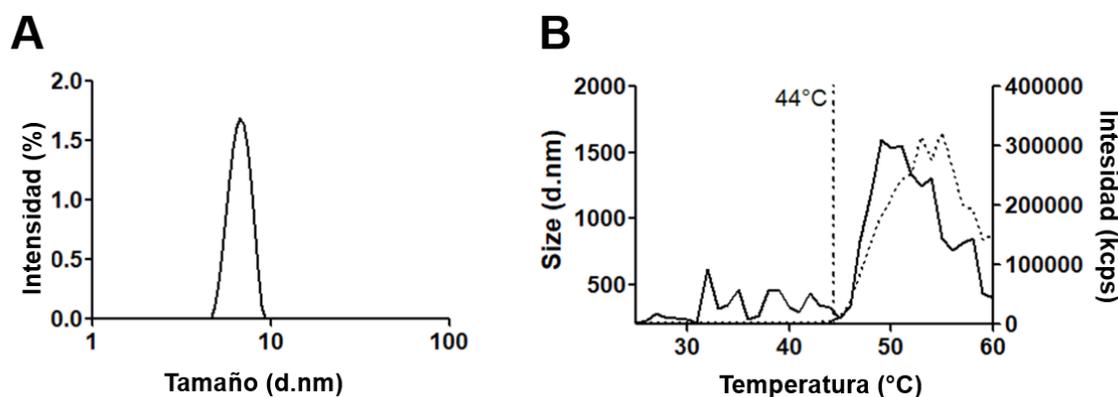


Figura 8. Determinación del tamaño de partícula y del punto de agregación de NtUGT89A2 por dispersión dinámica de luz. **A)** Se muestra la distribución del tamaño de partícula de NtUGT89A2 en solución, el ensayo se realizó a una concentración de proteína de 1 mg/mL en amortiguador Tris 50mM pH 7.0, NaCl 600 mM. Se determinó un tamaño de partícula de 6.7 ± 0.9 nm de diámetro. El eje de las abscisas corresponde al diámetro estimado del tamaño de partícula y el eje de las ordenadas corresponde a la intensidad. **B)** El punto de agregación determinado para NtUGT89A2 fue de 44 °C en Tris 50mM pH 7.0, NaCl 600 mM. El eje derecho de las ordenadas corresponde a la intensidad, el eje izquierdo muestra al tamaño de partícula, el eje de la abscisa corresponde al rango de temperatura evaluada.

3.5 Actividad de glicosiltransferasa de NTUGT89A2

Para determinar si NtUGT89A2 tiene actividad de glicosiltransferasa, se realizaron ensayos de actividad enzimática utilizando UDP-glucosa como sustrato donador y derivados del ácido benzoico como sustratos aceptores. Los ensayos de TLC mostraron que la enzima es capaz de transformar 2,3-DHBA, 2,4-DHBA, 2,5-DHBA y 3,4,5-THBA en un producto. Sin embargo, bajo las condiciones experimentales iniciales, la formación de producto a partir de 2,3-DHBA, 2,4-DHBA y 3,4,5-THBA fue parcial, con una cantidad significativa de sustrato sin convertirse en producto (Figura S1). En contraste, 2,5-DHBA se convirtió completamente en un compuesto con menor factor de retención (Figura 9A).

Las muestras de reacción se analizaron mediante cromatografía en fase reversa en HPLC para determinar el porcentaje de sustrato convertido en producto (Figura 9B). El perfil de elución de la reacción utilizando 2,5-DHBA como sustrato mostró un único pico con un tiempo de retención (R_t) de 9.9 minutos. En contraste, el sustrato no glucosilado tiene un R_t de 13.9 minutos. Por lo tanto, el producto glucosilado se eluye varios minutos antes (Figura 9B). Se observó un comportamiento similar con 2,3-DHBA, 2,4-DHBA y 3,4,5-THBA, donde se detectó un único producto de reacción con un R_t menor que el sustrato correspondiente (Figura S2). Estos resultados sugieren que la reacción de glucosilación produce un único derivado. Como era de esperar, NtUGT89A2 mostró una mayor actividad específica para 2,5-DHBA en comparación con 2,3-DHBA, 2,4-DHBA y 3,4,5-THBA. Sin embargo, cabe mencionar que la actividad específica para 3,4,5-THBA fue mayor que la de 2,3-DHBA y 2,4-DHBA (Tabla 2).

El análisis por HPLC-ESI-MS de la reacción en modo de detección de polaridad negativa confirmó que NtUGT89A2 cataliza la conjugación entre 2,5-DHBA y UDP-glucosa. El principal producto de la reacción fue el monoglucósido de 2,5-DHBA, con el ion $[M - H]^-$ observado a m/z 315.04, congruente con la fórmula molecular $C_{13}H_{15}O_9$ (Figura 9C). Además, se observaron trazas del ion $[M - H]^-$ correspondiente al diglucósido a m/z 477.86, congruente con la fórmula molecular $C_{19}H_{25}O_{14}$. Por otro lado, para el glucósido de 2,3-DHBA y 2,4-DHBA,

se detectó el ion $[M - H]^-$ esperado a m/z 315.07, mientras que para 3,4,5-THBA el ion $[M - H]^-$ correspondiente se detectó a m/z 331.06. Luego se realizó un análisis de fragmentación para determinar si NtUGT89A2 produce un glucósido C u O. En todos los casos, tras la activación por colisiones, se detectó un fragmento correspondiente a la aglicona con m/z 162 Da menor que el ion precursor. Así, el compuesto pierde toda la molécula de azúcar, confirmando la presencia de un enlace O-glucosídico (Zhang et al., 2022). Por ejemplo, la fragmentación del monoglucósido de 2,3-DHBA (ión $[M - H]^-$ a m/z 315.07) produce la aglicona (ión $[M - H]^-$ a m/z 153.01) (Figura S4). Se observaron resultados similares para los productos de reacción de 2,4-DHBA, 2,5-DHBA y 3,4,5-THBA (Figura S5, S6 y S7). Estos resultados indican que NtUGT89A2 cataliza la O-glucosilación de los sustratos.

Para tener una mejor caracterización de la monoglucosilación de 2,5-DHBA, se realizó un análisis de RMN de 1D y 2D de la reacción enzimática cruda en DMSO- d_6 (Figura S11). El examen detallado del espectro de RMN 1H reveló la presencia de al menos cuatro componentes diferentes: UDP-glucosa, UDP, 2,5-DHBA y un derivado monoglucosilado de 2,5-DHBA. Cabe destacar que el valor J de 7.8 Hz para el protón anomérico de la glucosa conjugada con 2,5-DHBA (δ_H 4.61) confirmó una orientación β del enlace glucosídico. En contraste, el valor J para el protón anomérico de la glucosa en UDP-glucosa (δ_H 5.33) fue de 4.9 Hz, indicando una orientación α del enlace glucosídico (Roslund et al., 2008). Estos hallazgos confirmaron colectivamente la inversión de la configuración anomérica de la glucosa.

Para determinar el sitio de glucosilación en 2,5-DHBA, se realizaron experimentos HMBC (Figura S12). El análisis de las correlaciones del protón anomérico en el derivado monoglucosilado de 2,5-DHBA reveló que el grupo glucosa está unido mediante un enlace O- β -glucosídico a la posición C-5 (δ_C 148.8) en lugar de a C-2 (δ_C 157.9). Si la glucosa estuviera unida a C-2 (δ_C 150.9), su desplazamiento químico sería similar al de C-5 (δ_C 152.5), según la plataforma de Cálculo de Desplazamiento Químico con Aprendizaje Profundo (CASCADE) (Guan et al., 2021).

Tabla 2: Valores de actividad específica y constantes de disociación aparente para sustratos di- y trihidroxilados.

Compuesto /UDP-glucosa	Actividad específica (nkat/mg)	Constante de disociación aparente (K_{dapp} (μM))
2,3-DHBA	135 \pm 6.7	286.4 \pm 4.1
2,4-DHBA	38.3 \pm 1.7	603.4 \pm 5.9
2,5-DHBA	225 \pm 1.7	43.0 \pm 2.9
3,4,5-THBA	182.8 \pm 0.3	257 \pm 6.1

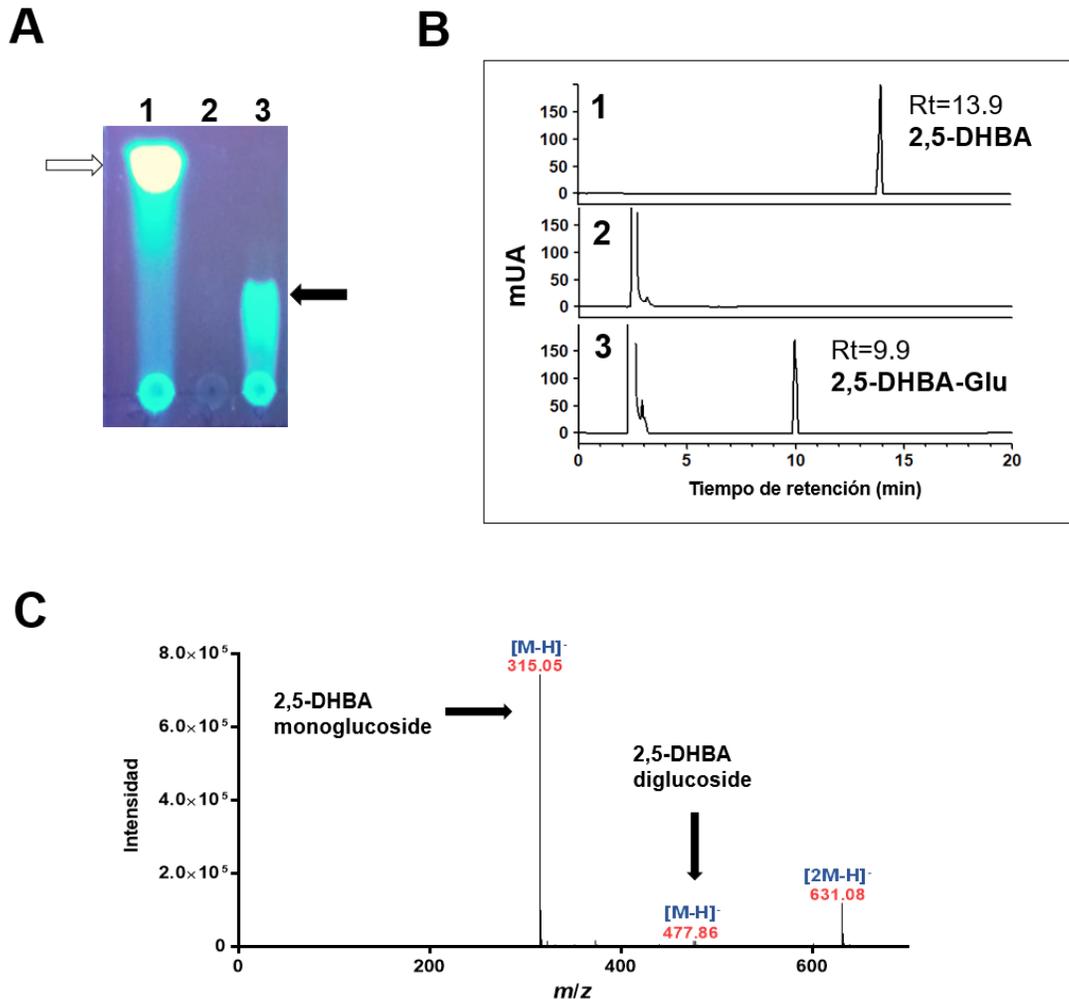


Figura 9. Actividad de la glicosiltransferasa NtUGT89A2. A) Detección del producto de glicosilación de 2,5-DHBA mediante TLC. Se utilizó una placa de sílice como fase estacionaria, mientras que acetato de etilo (7:3) fue usado como fase móvil; los compuestos se visualizaron a (λ) 365 nm. 1. 2,5-DHBA en el buffer de reacción sin enzima (flecha blanca), 2. Mezcla de reacción de glicosilación sin 2,5-DHBA, 3. Producto de glicosilación de 2,5-DHBA (flecha negra). B) Análisis del producto de glicosilación de 2,5-DHBA por HPLC en fase reversa. 1. 2,5-DHBA en la mezcla de reacción sin enzima, 2. Mezcla de reacción sin 2,5-DHBA, 3. Producto de glicosilación de 2,5-DHBA. En los tres casos, se inyectaron 20 μ L de la muestra y se utilizaron las mismas condiciones de elución. C) Análisis HPLC-MS de la mezcla de reacción entre 2,5-DHBA y UDP-glucosa catalizada por NtUGT89A2; el principal producto es el derivado monoglicosilado.

3.6 Actividad O-glycosiltransferasa de NtUGT89A2 frente a derivados clorados de ácidos benzoicos.

La actividad de NtUGT89A2 se analizó adicionalmente utilizando 4 compuestos más en los cuales el grupo OH- fue reemplazado por un átomo de cloro en diferentes posiciones del anillo bencénico: ácido 2-cloro-3-hidroxibenzoico (2-Cl-3-HBA), ácido 2-cloro-4-hidroxibenzoico (2-Cl-4-HBA), ácido 2-cloro-5-hidroxibenzoico (2-Cl-5-HBA) y ácido 2,5-diclorobenzoico (2,5-DCBA). Los resultados descritos anteriormente para 5-Cl-2-HBA también se incluyeron aquí (Figura 10A).

Se observó actividad con los derivados que tienen un Cl- en C-2 y un OH- en C-3, C-4 o C-5. En los tres casos, el producto glucosilado migró con un R_t menor que el del sustrato (Figuras 10C, 10D y 10E) (Figura S3). El análisis de fragmentación inducida por colisiones reveló la presencia del ion $[M - H]^-$ a m/z 170.98 la aglicona, que se liberó por la pérdida de toda la molécula de glucosa. Además, también se detectó el ion $[M - H]^-$ a m/z 333.03 del monoglucósido (Figura S8, S9, S10).

La actividad específica mostró una preferencia por 2-Cl-5-HBA, seguido de 2-Cl-3-HBA y 2-Cl-4-HBA. No se observó actividad con 5-Cl-2-HBA o 2,5-DCBA. Así, los resultados de MS y actividad confirmaron la capacidad de NtUGT89A2 para catalizar la O-glucosilación en las posiciones C-3, C-4 o C-5. Además, el efecto de estos derivados en la estabilidad de la enzima mostró un aumento en T_m muy similar al observado con los derivados dihidroxilados (Tabla 1). Por ejemplo, el cambio más significativo se obtuvo con 2-Cl-5-HBA y 2,5-DCBA, con un T_m de 61.2 y 61.3, respectivamente (Figura 10B). Estos valores fueron muy similares al valor obtenido para 2,5-DHBA (62.9, Tabla 1). Esto sugiere que el Cl⁻ es capaz de rescatar la función del grupo OH⁻ en la posición C-2.

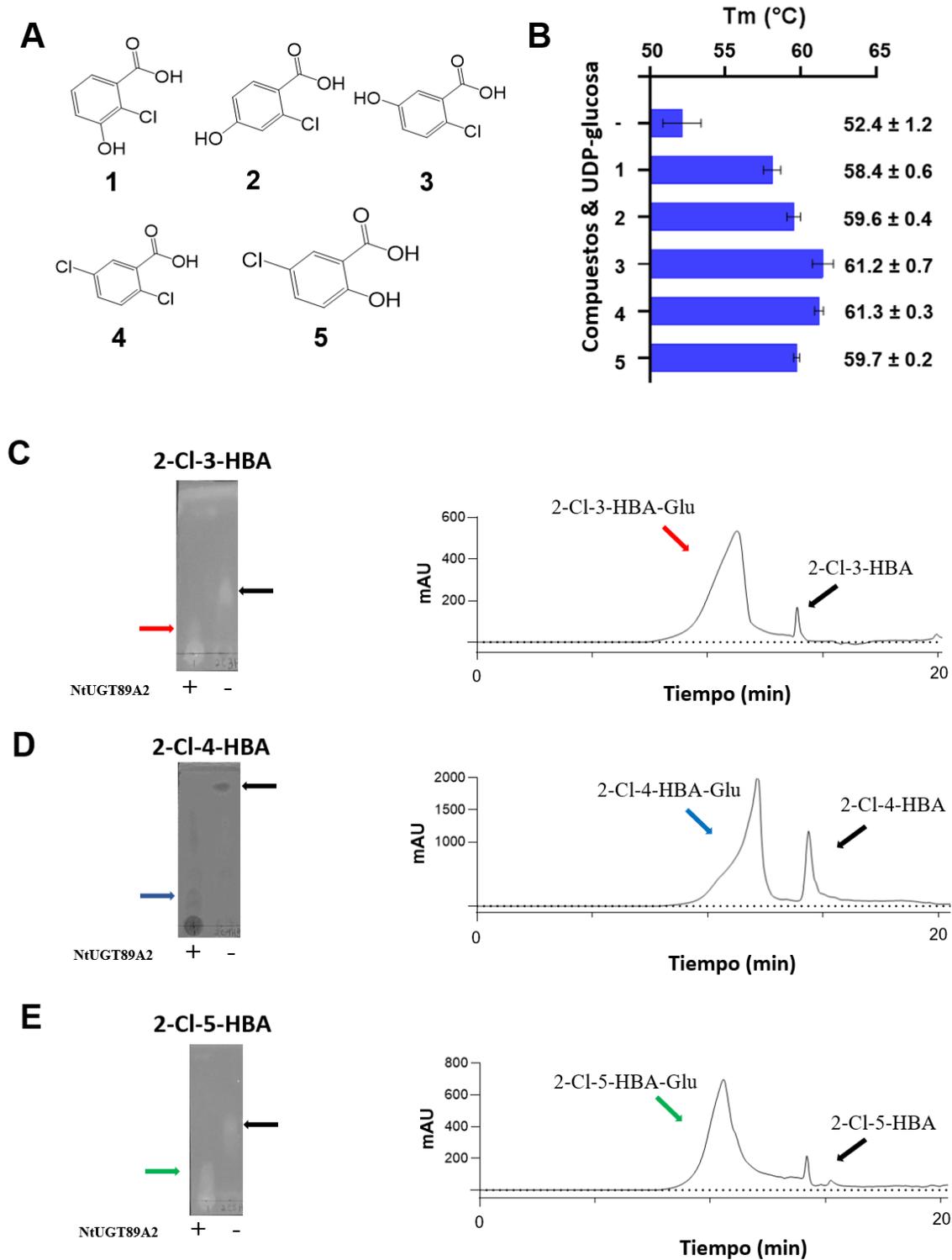


Figura 10. Actividad de glicosiltransferasa de NtUGT89A2 en presencia de ácidos benzoicos clorados. **A)** Estructuras químicas de los compuestos: 1. 2-Cl-3-HBA (2-cloro-3-hidroxibenzoico), 2. 2-Cl-4-HBA (2-cloro-4-hidroxibenzoico), 3. 2-Cl-5-HBA (2-cloro-5-hidroxibenzoico), 4. 2,5-DCBA (2,5-diclorobenzoico) y 5. 5-Cl-2-HBA (5-

cloro-2-hidroxibenzoico). **B)** Los derivados de ácidos benzoicos clorados se evaluaron como posibles ligandos en presencia de 5 mM UDP-glucosa. La ordenada muestra el valor de T_m y las barras corresponden a los derivados de ácido bencílico. 1. NtUGT89A2 en ausencia de ligandos ($T_m = 52.4 \pm 1.2$), 2. 2-Cl-3-HBA/UDP-glucosa ($T_m = 58.4 \pm 0.6$), 3. 2-Cl-4-HBA/UDP-glucosa ($T_m = 59.6 \pm 0.4$), 4. 2-Cl-5-HBA/UDP-glucosa ($T_m = 61.2 \pm 0.7$), 5. 2,5-DCBA/UDP-glucosa ($T_m = 61.3 \pm 0.3$), 6. 5-Cl-2-HBA/UDP-glucosa ($T_m = 59.7 \pm 0.2$). Los experimentos se realizaron por triplicado. **C)** Placa TLC y diagrama HPLC del compuesto 2-Cl-3-HBA. Se utilizó una placa de sílice como fase estacionaria, mientras que el acetato de etilo (7:3) se usó como fase móvil; las manchas se visualizaron a (λ) 254 nm. La flecha roja marca el compuesto glucosilado y la flecha negra indica el compuesto no glucosilado en la placa TLC y en el diagrama HPLC. **D)** Placa TLC y diagrama HPLC del compuesto 2-Cl-4-HBA. Se utilizó una placa de sílice como fase estacionaria, mientras que el acetato de etilo (7:3) se usó como fase móvil; las manchas se visualizaron a (λ) 365 nm. La flecha azul marca el compuesto glucosilado y la flecha negra indica el compuesto no glucosilado en la placa TLC y en el diagrama HPLC. **E)** Placa TLC y diagrama HPLC del compuesto 2-Cl-5-HBA. Se utilizó una placa de sílice como fase estacionaria, mientras que el acetato de etilo (7:3) se usó como fase móvil; las manchas se visualizaron a (λ) 254 nm. La flecha verde marca el compuesto glucosilado y la flecha negra indica el compuesto no glucosilado en la placa TLC y en el diagrama HPLC. En los tres casos, se inyectaron 20 μ l de la muestra y se usaron las mismas condiciones de elución.

Tabla 3. Valores de actividad específica y constantes de disociación aparente para sustratos derivados de ácidos benzoicos clorados.

Compuesto /UDP-glucosa	Actividad específica (nkat/mg)	Constante de disociación aparente (μM) (K_{dapp})
2-Cl-3-HBA	115.1 \pm 5.7	UD
2-Cl-4-HBA	60.4 \pm 2.6	337.7 \pm 10
2-Cl-5-HBA	146.0 \pm 0.2	81.4 \pm 5.6

3.7 NtUGT89A2 tiene una afinidad micromolar por 2,5-DHBA

Para obtener más información sobre la afinidad de NtUGT89A2 por sus sustratos, se realizaron ensayos de desplazamiento térmico monitoreados por fluorescencia a concentraciones crecientes de 2,3-DHBA, 2,4-DHBA, 2,5-DHBA y 3,4,5-THBA en presencia de concentraciones saturantes de UDP-glucosa. Los resultados mostraron que las curvas de desnaturalización térmica se desplazaron a temperaturas más altas con el aumento de la concentración del ligando (Figuras 11A, 11B, 11C y 11E). Esto indica que la unión del ligando aumenta la estabilidad de la proteína, probablemente al incrementar el número de interacciones débiles. Además, se observó que se requería una menor concentración de 2,5-DHBA para promover el cambio en las transiciones térmicas en comparación con 2,3-DHBA, 2,4-DHBA y 3,4,5-THBA.

Para caracterizar mejor la afinidad por los sustratos, los datos fueron analizados utilizando el método isotérmico propuesto por Bai et al. en 2019 (Bai et al., 2019). Este enfoque se ha utilizado anteriormente para determinar constantes de disociación (K_d) a partir de datos de desplazamiento térmico (Burastero et al., 2022; de Azevedo y Nascimento, 2022). Para este propósito, las transiciones térmicas se expresaron como una fracción de proteína desnaturalizada. La fracción de proteína desnaturalizada a una temperatura dada se seleccionó y se graficó contra la concentración del ligando (Figuras 11D y 11F). Los resultados mostraron una mayor afinidad por 2,5-DHBA con un K_d aparente (K_{dapp}) de 43.0 \pm 2.9 μM . La afinidad por 3,4,5-THBA fue 6 veces menor que la de 2,5-DHBA, con

un K_{app} de $257 \pm 6.1 \mu\text{M}$. Mientras que el K_{app} para 2,3-DHBA y 2,4-DHBA fue de $286.4 \pm 4.1 \mu\text{M}$ y $603.4 \pm 5.9 \mu\text{M}$, respectivamente. Estos resultados son consistentes con los valores de T_m mostrados en la Tabla 1 y los valores de actividad específica mostrados en la Tabla 2. En ambos casos, los mejores resultados se obtuvieron con 2,5-DHBA, seguidos de 3,4,5-THBA, 2,3-DHBA y 2,4-DHBA. Por otro lado, el análisis isotérmico con los derivados clorados mostró que NtUGT89A2 tiene una afinidad 2 veces menor por 2-Cl-5-HBA en comparación con 2,5-DHBA (Tabla 3 y Tabla 2). Mientras que la afinidad por 2-Cl-4-HBA es 1.8 veces mayor en comparación con 2,4-DHBA. Así, el papel del grupo OH- en C-2 en la unión se recupera parcialmente por Cl-.

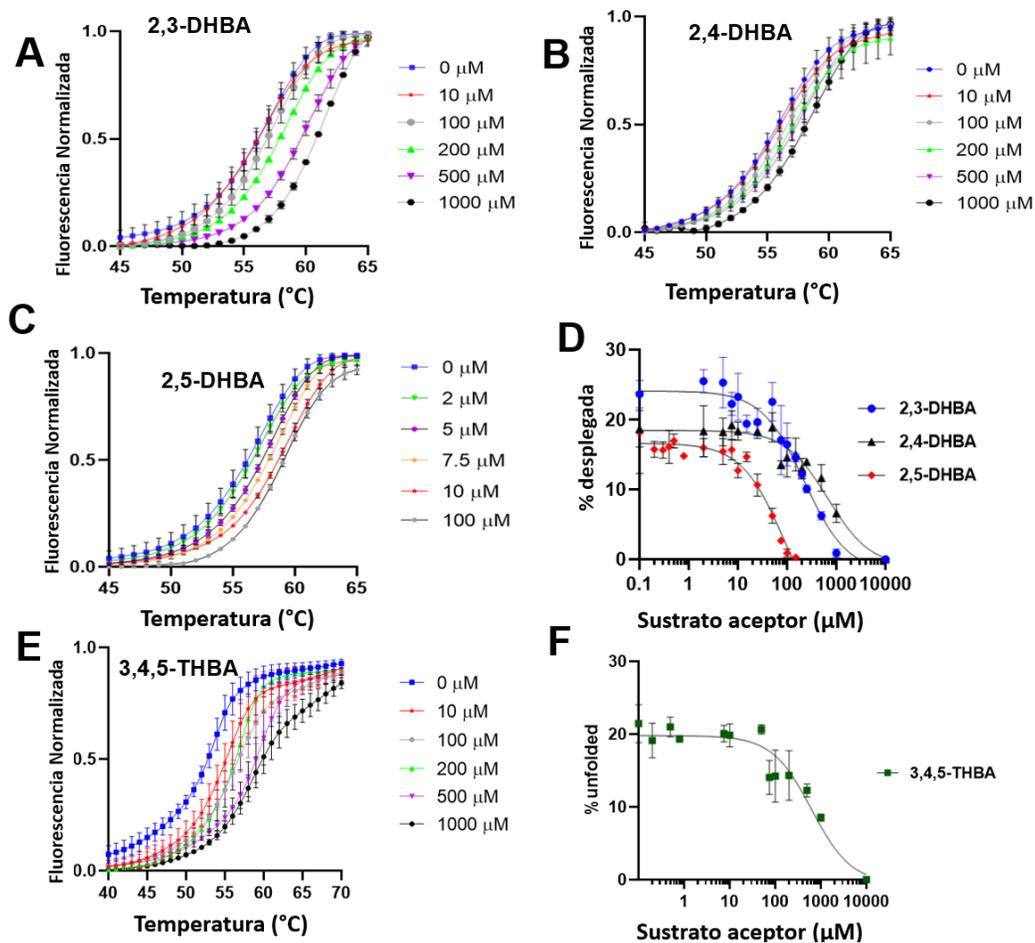


Figura 11. Análisis del desplazamiento térmico de NtUGT89A2 frente a derivados de hidroxilados de ácidos benzoicos. (A) Curvas de desnaturalización térmica de NtUGT89A2 a concentraciones crecientes de 2,3-DHBA (0–1 mM) y concentración saturante de UDP-glucosa (5 mM). Para mayor claridad, se muestran solo seis curvas representativas. De manera similar, en (B) se muestran las transiciones térmicas a concentraciones crecientes de 2,4-DHBA (0–1 mM), en (C) las curvas con 2,5-DHBA (0–0.1 mM) y en (E) las correspondientes a 3,4,5-THBA (0–1 mM). La concentración de UDP-glucosa en (B), (C) y (E) fue de 5 mM. D) Análisis isotérmico de los experimentos de desnaturalización mostrados en A, B y C. De cada transición térmica, se tomó la fracción de proteína desnaturalizada a 52 °C y se graficó en función de la concentración correspondiente de DHBA. F) Análisis isotérmico de los datos mostrados en (E) a 52 °C. Las constantes de afinidad aparente (K_{dapp}) se muestran en la Tabla 2. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

3.8. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de NtUGT89A2

El efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática se evaluó incubando la enzima durante 60 minutos a diferentes temperaturas, desde 20 hasta 100°C en incrementos de 5°C, y luego midiendo la actividad a 37°C. La enzima mostró un 100% de actividad desde 20 hasta 70°C. Sin embargo, la actividad disminuyó en un 50% a 75°C y fue mínima a 95°C (Figura 12A). Estos resultados indican que la enzima mantiene su actividad durante al menos una hora a 70°C. Estos ensayos se realizaron con 2,5-DHBA ya que fue el sustrato que mostró la mayor actividad específica. Por otra parte, se midió la temperatura óptima de actividad de la enzima, observándose una actividad del 100% en el rango de 20 a 70°C (Figura 12B).

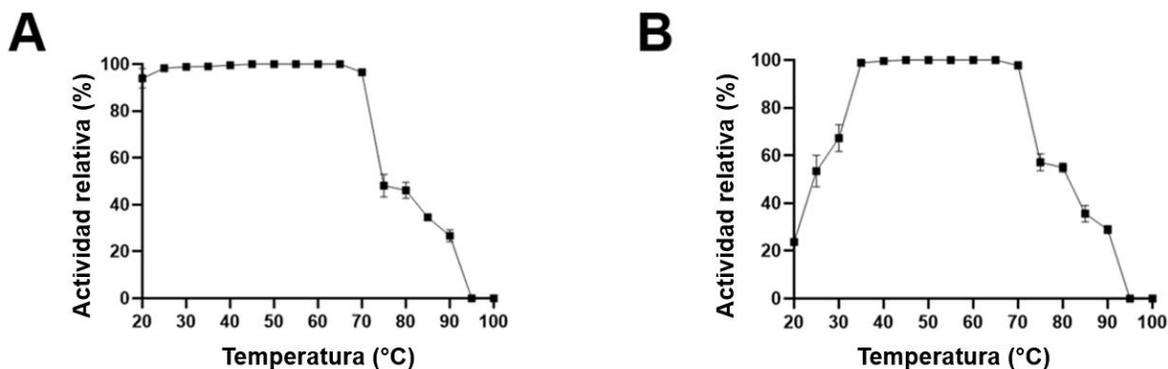


Figura 12. NtUGT89A cataliza la glicosilación de 2,5-DHBA a 70 °C. **A)** Ensayo de estabilidad térmica: alícuotas de la enzima fueron incubadas cada 5 °C desde 20 hasta 100 °C durante 60 minutos, y luego se midió la actividad a 37 °C. **B)** Temperatura óptima de actividad: la actividad enzimática se evaluó cada 5 °C desde 20 hasta 100 °C. Los experimentos se realizaron por triplicado.

Discusión

En este estudio seleccionamos la secuencia XP_016497160.1 que codifica la proteína NtUGT89A2 de *N. tabacum* con el objetivo de expresarla, purificarla y caracterizarla bioquímicamente. La proteína NtUGT89A2 muestra un 48.6% de identidad con la proteína AtUGT89A2 (UniProt Q9LZD8). El análisis de la secuencia de NtUGT89A2 muestra la presencia varios residuos relevantes cuya función ha sido descrita en otras UGTs. Entre estos observamos la presencia de la histidina catalítica (His19) que participa en la desprotonación del sustrato aceptor y del ácido aspártico (Asp119) que estabiliza la carga de la histidina durante la reacción, por lo que NtUGT89A2 es capaz de formar la triada catalítica aceptor-His-Asp (Lairson et al., 2008; Wang, 2009).

Por otro lado, el motivo PSPG característico de las UGTs de plantas (Shao et al., 2005; Wang, 2009), se localiza entre los residuos 344 y 388 en el dominio C-terminal. En este motivo se encuentran conservados varios residuos que han sido descritos como relevantes en la unión del sustrato UDP-glucosa (Lairson et al., 2008). Por ejemplo, se ha propuesto que el triptófano en la posición 1 del PSPG (W344) forma una plataforma hidrofóbica que interacciona con el anillo de uracilo del UDP. La glutamina en la cuarta posición (Q347) y el ácido glutámico en la posición 27 (E370) forman enlaces de hidrógeno con grupos hidroxilos de la ribosa. La histidina en la posición 19 (H362) y la serina en la posición 24 (S367) interactúan con los oxígenos de los dos fosfatos, mientras que en el reconocimiento de la glucosa participan el ácido aspártico en la posición 43 y la glutamina en la 44 (D387 y Q388), que interaccionan con los hidroxilos en C2, C3, y C4. La presencia de estos residuos sugiere que NtUGT89A2 es una glicosiltransferasa que utiliza UDP-glucosa como sustrato (Shao et al., 2005; Wang, 2009). Además, NtUGT89A2 contiene un residuo de serina en la posición 142. Esta posición es relevante puesto que la presencia de una serina en la posición correspondiente en AtUGT89A2 (Ser153) favorece la preferencia por la UDP-glucosa como sustrato (Chen & Li, 2017). Cabe mencionar que la mayoría de las UGTs caracterizadas utilizan preferentemente la UDP-glucosa como sustrato donador.

La comparación del motivo PSPG de NtUGT89A2 con el de AtUGT89A2 permitió identificar diferencias interesantes en los primeros 11 residuos (Figura 13). En las posiciones 3 y 9, AtUGT89A2 tiene residuos de Serina y Arginina, respectivamente. En su lugar NtUGT89A2 tiene Prolina y Glicina, sugiriendo un cambio en la flexibilidad de esta región. Además, en las posiciones 6 y 11 AtUGT89A2 tiene Alanina y Valina, respectivamente; en comparación, NtUGT89A2 tiene Ácido Glutámico y Arginina, lo que sugiere un cambio en la carga electrostática de la región y posiblemente mayor exposición al solvente. Las implicaciones de estos cambios en el reconocimiento y afinidad por el sustrato serán analizadas en trabajos posteriores.

<i>N. tabacum</i>	344	WAPQVEILGHRAIGGFLSHCGWNSVLEAIVAGVQILGWPMEADQ	387
<i>N. sylvestris</i>	344	WAPQVEILGHRAIGGFLSHCGWNSVLEAIVAGVQILGWPMEADQ	387
<i>N. attenuata</i>	345	WAPQVEILGHRAVGGFLSHCGWNSVLEAIVAGVQILGWPMEADQ	388
<i>C. annuum</i>	340	WAPQVEILGHQAVGGFLSHCGWNSVMEGIVAGVLILGWPMEADQ	383
<i>S. lycopersicum</i>	342	WAPQVEILGHRAIGGFLSHCGWNSVMEAIVAGVIILGWPMEADQ	385
<i>S. pennellii</i>	341	WAPQVEILGHRAVGGFLSHCGWNSVLEAIVAGVLILGWPMEADQ	384
<i>N. tomentosiformis</i>	344	WAPQVEILGHRAVGGFLSHCGWNSVLEAIVAGVHILGWPMEADQ	387
<i>A. thaliana</i>	341	WVSQLAVLRHVAVGGFLSHCGWNSVLEGITSGAVILGWPMEADQ	384
		*. *: :* * *.*****:*.*:*. *****	

Figura 13. Alineamiento múltiple del motivo PSPG de NtUGT89A2 con secuencias homólogas de la familia de *Solanaceae* y UGT89A2 de *Arabidopsis thaliana*. Los residuos relevantes conservados en *Solanaceae* que no están conservados en *Arabidopsis* se muestran en azul en las posiciones 3 y 9 (Pro346 y Gly352 en tabaco) y en rojo en las posiciones 6 y 11 (Glu349 y Arg354 en tabaco). Las secuencias incluidas fueron las siguientes: *N. tabacum* (XP_016497160.1), *N. sylvestris* (XP_009760334.1), *N. attenuata* (XP_019226134.1), *C. annuum* (XP_016543279.1), *S. lycopersicum* (XP_010320821.1), *S. pennellii* (XP_015074899.1), *N. tomentosiformis* (XP_009603763.1), *A. thaliana* (CAB83309.1).

Con el objetivo de predecir la probabilidad de que la enzima NtUGT89A2 fuera expresada de forma soluble en bacteria, y favorecer su caracterización bioquímica y biofísica subsecuente, se usaron predictores de cristalización y de

solubilidad. El valor de solubilidad predicho para la proteína fue menor al valor promedio de las proteínas solubles de *E. coli*, con un score de 0.27 (Hebditch et al., 2017). Sin embargo, se ha reportado previamente que otras glicosiltransferasas con un score similar como AtUGT89A2 (Lim et al., 2002), que han sido purificadas en la fracción soluble a partir de cultivos bacterianos. Otros ejemplos de expresión en bacteria incluyen a la UGT73B16 de *Rhodiola rosea* (Mirmazloum et al., 2019).

En los primeros ensayos de purificación de NtUGT89A2, observamos un bajo rendimiento en la proteína total recuperada en el último paso de purificación (SEC), con 0.6 mg/L, mientras que en sistemas de expresión y purificación similares los rendimientos suelen ser mayor a 5 mg/L en condiciones óptimas (Bocanegra-Jiménez et al., 2021). Trabajos previos han reportado que la cantidad de proteína purificada puede mejorar significativamente aumentando su estabilidad, lo que evita su desplegamiento, agregación o degradación. Esto se logra optimizando la composición del amortiguador o identificando ligandos específicos de la proteína (Vedadi et al., 2006). Tomando esto en consideración, optimizamos la composición del amortiguador utilizando el ensayo de desplazamiento térmico. La purificación con el amortiguador optimizado, permitió obtener 3 veces más proteína (1.8 mg/L) comparado con las condiciones no optimizadas.

Como se esperaba, se observó un aumento significativo de estabilidad térmica de la proteína en presencia de posibles sustratos, en particular el 2,5-DHBA y la UDP-glucosa mostraron los mejores resultados. Sin embargo, es importante notar que todos los derivados mono- y di-hidroxilados del DHBA mostraron un aumento significativo de la T_m en presencia de UDP-glucosa. Esto sugiere que la enzima reconoce elementos comunes presentes en los derivados del ácido benzoico, como el grupo COO⁻ y el anillo de benceno; este último probablemente mediado por interacciones π - π con residuos aromáticos. Además, los resultados sugieren que el grupo OH⁻ en la posición 2 del anillo tiene un papel relevante en el reconocimiento probablemente por interacciones iónicas, puesto que los derivados con este grupo favorecieron una mayor estabilidad. En

concordancia, la presencia de un sustituyente con carga positiva en el ácido 4-aminobenzoico, no mostró ningún efecto sobre la T_m .

En condiciones nativas NtUGT89A2 se encontró como monómero en solución, con un peso molecular determinado por SEC de 58.3 kDa, que coincide con el valor determinado por DLS (57.8 ± 6.4 kDa). Estos resultados concuerdan con reportes de glicosiltransferasas de la familia GT1. Por ejemplo, la enzima UGT71G1 de *Medicago truncatula* y VvGT1 de *Vitis vinífera* (Lemmerer et al., 2019; Noguchi et al., 2007; Offen et al., 2006) han sido reportadas como monoméricas.

Con respecto al sustrato aceptor, NtUGT89A2 mostró una preferencia por 2,5-DHBA sobre 3,4,5-THBA, 2,3-DHBA y 2,4-DHBA. Observamos esta preferencia en los ensayos de actividad enzimática, estabilidad térmica y afinidad. Por ejemplo, la actividad con 2,5-DHBA fue 1.2 veces mayor que con 3,4,5-THBA, 1.7 veces mayor que con 2,3-DHBA y 6 veces mayor que con 2,4-DHBA. De manera similar, observamos la mayor estabilidad térmica con 2,5-DHBA en comparación con 3,4,5-THBA, 2,3-DHBA y 2,4-DHBA. Además, la enzima mostró una mayor afinidad por 2,5-DHBA, seguida en orden descendente por 3,4,5-THBA, 2,3-DHBA y 2,4-DHBA. Estos resultados son consistentes con informes previos en los que se demostró que AtUGT89A2 tenía una preferencia por 2,5-DHBA sobre 2,3-DHBA (Chen & Li, 2017). Sin embargo, es importante señalar que NtUGT89A2, a diferencia de su ortólogo en *A. thaliana*, puede aceptar 2,4-DHBA como sustrato. Además, hemos demostrado que la enzima también puede utilizar 3,4,5-THBA y tres derivados clorados del ácido benzoico como sustratos. Adicionalmente, la actividad específica determinada con 2,5-DHBA fue 239 veces mayor que la actividad específica reportada previamente para AtUGT89A2 (Lim et al., 2002). Cabe señalar que, según la identidad de la secuencia de aminoácidos con AtUGT89A2 y los informes previos (Chen y Li, 2017), es probable que NtUGT89A2 también pueda aceptar UDP-xilosa como sustrato donador. Se necesitan más experimentos para investigar esta posibilidad.

En general, los datos de MS y RMN, junto con los resultados de los derivados clorados, demuestran la capacidad de NtUGT89A2 para catalizar el

enlace *O*- β -glucosídico en el C-3, C-4 o C-5 de los derivados dihidroxilados del ácido benzoico en los que el segundo grupo OH está en C-2. Vale la pena señalar que nuestros resultados sugieren un papel importante del OH en C2 en el reconocimiento por la enzima. Esto es evidente a partir de los resultados de estabilidad térmica con ácido benzoico y 2-HBA. En presencia de ácido benzoico y UDP-glucosa, observamos un aumento moderado de 3 °C en la T_m en comparación con la enzima sin ligandos. Por el contrario, cuando un grupo OH está presente en la posición C-2 (2-HBA/UDP-glucosa), el aumento en la T_m fue notable, con una diferencia de 10 °C en comparación con la enzima sin ligandos. Además, no observamos ningún cambio adicional con la presencia de un segundo OH, como se observa en los derivados dihidroxilados (2,3-DHBA, 2,4-DHBA o 2,5-DHBA). Tampoco observamos una disminución significativa cuando el OH en C-2 fue reemplazado por un Cl, como en los derivados clorados. Por lo tanto, los resultados nos permiten proponer que el papel del OH en C-2 es en la unión con la enzima. Se necesitarán más experimentos para verificar esta observación. Por otro lado, los resultados obtenidos con 3,4,5-THBA, donde observamos un comportamiento casi idéntico al de 2,3-DHBA en términos de estabilidad térmica, actividad enzimática y afinidad, sugieren un mecanismo de unión a la enzima diferente al de los sustratos dihidroxilados. Esto puede indicar que NtUGT89A2 tiene baja especificidad para el sustrato aceptor, similar a lo que se ha descrito para otras UGTs (Kannangara et al., 2011; Louveau y Osbourn, 2019; Shao et al., 2005; Wang, 2009; Yan et al., 2022). De hecho, los resultados preliminares muestran que NtUGT89A2 también puede aceptar 4-hidroxibenzaldehído como sustrato (Figura S2).

En las plantas, el 2,3-DHBA y 2,5-DHBA se consideran los principales productos del catabolismo del ácido salicílico (SA), que es una molécula de señalización endógena crítica en los mecanismos de defensa de las plantas (Ding y Ding, 2020). La adición del grupo hidroxilo al SA en las posiciones C3 y C5 del anillo es catalizada por la enzima ácido salicílico 3-hidrolasa (S3H) y la ácido salicílico 5-hidrolasa (S5H), respectivamente (Zhang et al., 2013, 2017). La producción de derivados hidroxilados de SA se considera un mecanismo mediante el cual las plantas regulan la homeostasis de SA. Además, la glucosilación

mediada por UGT76D1 de 2,3-DHBA y 2,5-DHBA se ha implicado recientemente en la respuesta de hipersensibilidad inducida por patógenos en *A. thaliana* (Huang et al., 2018). Este trasfondo sugiere que la función de NtUGT89A2 puede estar relacionada con los mecanismos de defensa de *N. tabacum*. Alternativamente, NtUGT89A2 puede estar involucrada en la prevención de la acumulación de altas concentraciones de 3,4,5-THBA. Similar a lo que se ha descrito en la granada, donde se observó una acumulación de glucósidos de ácido gálico (3,4,5-THBA) en una línea con doble represión que inhibió la producción de β -glucogalina a partir de ácido gálico (Ono et al., 2016).

Finalmente, es interesante señalar que la enzima permanece activa después de una hora de incubación en un amplio rango de temperaturas, incluso a 70 °C. Estos resultados nos permiten proponer que NtUGT89A2 puede utilizarse como una herramienta para el desarrollo de compuestos bioactivos a temperaturas superiores a la ambiental. Sin embargo, aún es necesario demostrar que la enzima puede glucosilar compuestos de diferente naturaleza.

Conclusiones

La exploración del proteoma de tabaco condujo a la identificación de la glicosiltransferasa NtUGT89A2, una proteína de 467 aminoácidos que comparte ~50% de identidad con la UGT89A2 de *A. thaliana* y está conservada en varias especies de la familia *Solanaceae*. La proteína se expresó en bacterias y se obtuvo con alta pureza mediante un protocolo de cromatografía líquida en tres etapas. Se utilizó un ensayo de desplazamiento térmico para identificar ligandos y sustratos que mejoran la estabilidad térmica de NtUGT89A2. La enzima, que es un monómero en solución, cataliza la *O*- β -glucosilación de derivados del ácido benzoico, mostrando preferencia por el 2,5-DHBA frente a 2,3-DHBA y 2,4-DHBA. Otros sustratos de la enzima incluyen el 3,4,5-THBA y derivados clorados como el 2-Cl-3-HBA, 2-Cl-4-HBA y 2-Cl-5-HBA. Además, la enzima muestra actividad en un amplio rango de temperaturas y una afinidad por sus sustratos en el rango micromolar. Estos resultados proporcionan una base para futuros estudios funcionales y estructurales de NtUGT89A2.

Referencias

- Achnine, L., Huhman, D. V., Farag, M. A., Sumner, L. W., Blount, J. W., & Dixon, R. A. (2005). Genomics-based selection and functional characterization of triterpene glycosyltransferases from the model legume *Medicago truncatula*. *The Plant Journal*, *41*(6), 875-887.
- Bai, N., Roder, H., Dickson, A., & Karanicolas, J. (2019). Isothermal analysis of ThermoFluor data can readily provide quantitative binding affinities. *Scientific reports*, *9*(1), 1-15.
- Behr, M., Neutelings, G., El Jaziri, M., & Baucher, M. (2020). You want it sweeter: How glycosylation affects plant response to oxidative stress. *Frontiers in plant science*, *11*, 571399.
- Bocanegra-Jiménez, F. Y., Montero-Morán, G. M., & Lara-González, S. (2021). Purification and characterization of an Fe(II)- and α -ketoglutarate-dependent xanthine hydroxylase from *Aspergillus oryzae*. *Protein Expr Purif*, *183*, 105862. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2021.105862>
- Bowles, D., Lim, E.-K., Poppenberger, B., & Vaistij, F. E. (2006). Glycosyltransferases of lipophilic small molecules. *Annu. Rev. Plant Biol.*, *57*, 567-597.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, *72*(1-2), 248-254.
- Breton, C., Fournel-Gigleux, S., & Palcic, M. M. (2012). Recent structures, evolution and mechanisms of glycosyltransferases. *Current opinion in structural biology*, *22*(5), 540-549.
- Brochado, A. R., Matos, C., Møller, B. L., Hansen, J., Mortensen, U. H., & Patil, K. R. (2010). Improved vanillin production in baker's yeast through in silico design. *Microbial cell factories*, *9*(1), 1-15.
- Chassagne, F., Cabanac, G., Hubert, G., David, B., & Marti, G. (2019). The landscape of natural product diversity and their pharmacological relevance from a focus on the Dictionary of Natural Products®. *Phytochemistry Reviews*, *18*, 601-622.
- Chen, H. Y., & Li, X. (2017). Identification of a residue responsible for UDP-sugar donor selectivity of a dihydroxybenzoic acid glycosyltransferase from *Arabidopsis* natural accessions. *The Plant Journal*, *89*(2), 195-203.
- Cravens, A., Payne, J., & Smolke, C. D. (2019). Synthetic biology strategies for microbial biosynthesis of plant natural products. *Nature communications*, *10*(1), 2142.
- Drula, E., Garron, M.-L., Dogan, S., Lombard, V., Henrissat, B., & Terrapon, N. (2022). The carbohydrate-active enzyme database: functions and literature. *Nucleic acids research*, *50*(D1), D571-D577.
- Frydman, A., Weisshaus, O., Bar-Peled, M., Huhman, D. V., Sumner, L. W., Marin, F. R., Lewinsohn, E., Fluhr, R., Gressel, J., & Eyal, Y. (2004). Citrus fruit bitter flavors: isolation and functional characterization of the gene Cm1, 2RhaT encoding a 1, 2 rhamnosyltransferase, a key enzyme in the biosynthesis of the bitter flavonoids of citrus. *The Plant Journal*, *40*(1), 88-100.
- Gachon, C. M., Langlois-Meurinne, M., & Saindrenan, P. (2005). Plant secondary metabolism glycosyltransferases: the emerging functional analysis. *Trends in Plant Science*, *10*(11), 542-549.

- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Wilkins, M. R., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2005). Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. *The proteomics protocols handbook*, 571-607.
- Gharabli, H., Della Gala, V., & Welner, D. H. (2023). The function of UDP-glycosyltransferases in plants and their possible use in crop protection. *Biotechnology advances*, 67, 108182. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2023.108182>
- Häkkinen, S. T., Lackman, P., Nygrén, H., Oksman-Caldentey, K.-M., Maaheimo, H., & Rischer, H. (2012). Differential patterns of dehydroabiestic acid biotransformation by *Nicotiana tabacum* and *Catharanthus roseus* cells. *Journal of biotechnology*, 157(2), 287-294.
- Härtl, K., McGraphery, K., Rüdiger, J., & Schwab, W. (2018). Tailoring natural products with glycosyltransferases. In *Biotechnology of natural products* (pp. 219-263). Springer.
- He, B., Bai, X., Tan, Y., Xie, W., Feng, Y., & Yang, G.-Y. (2022). Glycosyltransferases: Mining, engineering and applications in biosynthesis of glycosylated plant natural products. *Synth Syst Biotechnol*, 7(1), 602-620.
- Hebditch, M., Carballo-Amador, M. A., Charonis, S., Curtis, R., & Warwicker, J. (2017). Protein-Sol: a web tool for predicting protein solubility from sequence. *Bioinformatics*, 33(19), 3098-3100.
- Hou, B., Lim, E.-K., Higgins, G. S., & Bowles, D. J. (2004). N-glucosylation of cytokinins by glycosyltransferases of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(46), 47822-47832.
- Keasling, J. D. (2012). Synthetic biology and the development of tools for metabolic engineering. *Metab Eng*, 14(3), 189-195. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2012.01.004>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
- Lairson, L., Henrissat, B., Davies, G., & Withers, S. (2008). Glycosyltransferases: structures, functions, and mechanisms. *Annual review of biochemistry*, 77.
- Laurent, F., Canlet, C., Debrauwer, L., & Pascal-Lorber, S. (2007). Metabolic fate of [14C]-2, 4-dichlorophenol in tobacco cell suspension cultures. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 26(11), 2299-2307.
- Lee, J. W., Na, D., Park, J. M., Lee, J., Choi, S., & Lee, S. Y. (2012). Systems metabolic engineering of microorganisms for natural and non-natural chemicals. *Nat Chem Biol*, 8(6), 536-546.
- Lee, P.-H., Huang, X. X., Teh, B. T., & Ng, L.-M. (2019). TSA-CRAFT: a free software for automatic and robust thermal shift assay data analysis. *SLAS Discovery: Advancing Life Sciences R&D*, 24(5), 606-612.
- Lemmerer, M., Mairhofer, J., Lepak, A., Longus, K., Hahn, R., & Nidetzky, B. (2019). Decoupling of recombinant protein production from *Escherichia coli* cell growth enhances functional expression of plant Leloir glycosyltransferases. *Biotechnology and bioengineering*, 116(6), 1259-1268.
- Liang, D.-M., Liu, J.-H., Wu, H., Wang, B.-B., Zhu, H.-J., & Qiao, J.-J. (2015). Glycosyltransferases: mechanisms and applications in natural product development. *Chemical Society Reviews*, 44(22), 8350-8374.
- Lim, E.-K., Doucet, C. J., Li, Y., Elias, L., Worrall, D., Spencer, S. P., Ross, J., & Bowles, D. J. (2002). The activity of *Arabidopsis* glycosyltransferases toward salicylic acid,

- 4-hydroxybenzoic acid, and other benzoates. *Journal of Biological Chemistry*, 277(1), 586-592.
- Liu, Z., Yan, J.-P., Li, D.-K., Luo, Q., Yan, Q., Liu, Z.-B., Ye, L.-M., Wang, J.-M., Li, X.-F., & Yang, Y. (2015). UDP-glucosyltransferase71c5, a major glucosyltransferase, mediates abscisic acid homeostasis in Arabidopsis. *Plant physiology*, 167(4), 1659-1670.
- Llamas-García, M. L., Páez-Pérez, E. D., Benitez-Cardoza, C. G., Montero-Morán, G. M., & Lara-González, S. (2022). Improved Stability of Human CGI-58 Induced by Phosphomimetic S237E Mutation. *ACS omega*, 7(15), 12643-12653.
- Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P. M., & Henrissat, B. (2014). The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic acids research*, 42(D1), D490-D495.
- Loutre, C., Dixon, D. P., Brazier, M., Slater, M., Cole, D. J., & Edwards, R. (2003). Isolation of a glucosyltransferase from Arabidopsis thaliana active in the metabolism of the persistent pollutant 3, 4-dichloroaniline. *The Plant Journal*, 34(4), 485-493.
- McArthur, J. B., & Chen, X. (2016). Glycosyltransferase engineering for carbohydrate synthesis. *Biochemical Society Transactions*, 44(1), 129-142.
- Michlmayr, H., Malachová, A., Varga, E., Kleinová, J., Lemmens, M., Newmister, S., Rayment, I., Berthiller, F., & Adam, G. (2015). Biochemical Characterization of a Recombinant UDP-glucosyltransferase from Rice and Enzymatic Production of Deoxynivalenol-3-O-β-D-glucoside. *Toxins*, 7(7), 2685-2700. <https://www.mdpi.com/2072-6651/7/7/2685>
- Mirmazloum, I., Ladányi, M., Beinrohr, L., Kiss-Bába, E., Kiss, A., & György, Z. (2019). Identification of a novel UDP-glycosyltransferase gene from Rhodiola rosea and its expression during biotransformation of upstream precursors in callus culture. *International journal of biological macromolecules*, 136, 847-858.
- Modolo, L. V., Blount, J. W., Achnine, L., Naoumkina, M. A., Wang, X., & Dixon, R. A. (2007). A functional genomics approach to (iso) flavonoid glycosylation in the model legume Medicago truncatula. *Plant Molecular Biology*, 64, 499-518.
- Nemhauser, J. L., & Torii, K. U. (2016). Plant synthetic biology for molecular engineering of signalling and development. *Nature plants*, 2(3), 1-7.
- Noguchi, A., Saito, A., Homma, Y., Nakao, M., Sasaki, N., Nishino, T., Takahashi, S., & Nakayama, T. (2007). A UDP-glucose: isoflavone 7-O-glucosyltransferase from the roots of soybean (Glycine max) seedlings: purification, gene cloning, phylogenetics, and an implication for an alternative strategy of enzyme catalysis. *Journal of Biological Chemistry*, 282(32), 23581-23590.
- Offen, W., Martinez-Fleites, C., Yang, M., Kiat-Lim, E., Davis, B. G., Tarling, C. A., Ford, C. M., Bowles, D. J., & Davies, G. J. (2006). Structure of a flavonoid glucosyltransferase reveals the basis for plant natural product modification. *The EMBO journal*, 25(6), 1396-1405.
- Ren, C., Guo, Y., Xie, L., Zhao, Z., Xing, M., Cao, Y., Liu, Y., Lin, J., Grierson, D., & Zhang, B. (2022). Identification of UDP-rhamnosyltransferases and UDP-galactosyltransferase involved in flavonol glycosylation in Morella rubra. *Horticulture Research*, 9, uhac138.
- Roy, S., Vega, M. V., Ames, J. R., Britten, N., Kent, A., Evans, K., Isupov, M. N., & Harmer, N. J. (2023). The ROK kinase N-acetylglucosamine kinase uses a

- sequential random enzyme mechanism with successive conformational changes upon each substrate binding. *Journal of Biological Chemistry*, 299(4).
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods*, 9(7), 671-675.
- Shao, H., He, X., Achnine, L., Blount, J. W., Dixon, R. A., & Wang, X. (2005). Crystal structures of a multifunctional triterpene/flavonoid glycosyltransferase from *Medicago truncatula*. *The Plant Cell*, 17(11), 3141-3154.
- Shimoda, K., & Hamada, H. (2009). Bioremediation of Bisphenol A and Benzophenone by Glycosylation with Immobilized Marine Microalga *Pavlova* sp. *Environmental Health Insights*, 3, EHI. S2758.
- Sinnott, M. L. (1990). Catalytic mechanism of enzymic glycosyl transfer. *Chemical reviews*, 90(7), 1171-1202.
- Song, J. T., Koo, Y. J., Seo, H. S., Kim, M. C., Do Choi, Y., & Kim, J. H. (2008). Overexpression of AtSGT1, an Arabidopsis salicylic acid glucosyltransferase, leads to increased susceptibility to *Pseudomonas syringae*. *Phytochemistry*, 69(5), 1128-1134.
- Speeckaert, N., El Jaziri, M., Baucher, M., & Behr, M. (2022). UGT72, a Major Glycosyltransferase Family for Flavonoid and Monolignol Homeostasis in Plants. *Biology*, 11(3).
- Sun, Y., Ji, K., Liang, B., Du, Y., Jiang, L., Wang, J., Kai, W., Zhang, Y., Zhai, X., & Chen, P. (2017). Suppressing ABA uridine diphosphate glucosyltransferase (Sl UGT 75C1) alters fruit ripening and the stress response in tomato. *The Plant Journal*, 91(4), 574-589.
- Vedadi, M., Niesen, F. H., Allali-Hassani, A., Fedorov, O. Y., Finerty Jr, P. J., Wasney, G. A., Yeung, R., Arrowsmith, C., Ball, L. J., & Berglund, H. (2006). Chemical screening methods to identify ligands that promote protein stability, protein crystallization, and structure determination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(43), 15835-15840.
- von Saint Paul, V., Zhang, W., Kanawati, B., Geist, B., Faus-Keßler, T., Schmitt-Kopplin, P., & Schäffner, A. R. (2011). The Arabidopsis glucosyltransferase UGT76B1 conjugates isoleucic acid and modulates plant defense and senescence. *The Plant Cell*, 23(11), 4124-4145.
- Wang, L.-X., & Huang, W. (2009). Enzymatic transglycosylation for glycoconjugate synthesis. *Curr Opin Chem Biol*, 13(5-6), 592-600.
- Wang, X. (2009). Structure, mechanism and engineering of plant natural product glycosyltransferases. *FEBS letters*, 583(20), 3303-3309.
- Xu, Z.-Y., Lee, K. H., Dong, T., Jeong, J. C., Jin, J. B., Kanno, Y., Kim, D. H., Kim, S. Y., Seo, M., & Bressan, R. A. (2012). A vacuolar β -glucosidase homolog that possesses glucose-conjugated abscisic acid hydrolyzing activity plays an important role in osmotic stress responses in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 24(5), 2184-2199.
- Xue, F., Guo, H., Hu, Y., Liu, R., Huang, L., Lv, H., Liu, C., Yang, M., & Ma, L. (2016). Expression of Codon-Optimized Plant Glycosyltransferase UGT72B14 in *Escherichia coli* Enhances Salidroside Production. *BioMed research international*, 2016, 9845927-9845927. <https://doi.org/10.1155/2016/9845927>
- Zhou, K., Hu, L., Li, P., Gong, X., & Ma, F. (2017). Genome-wide identification of glycosyltransferases converting phloretin to phloridzin in *Malus* species. *Plant science*, 265, 131-145.

Anexo 1

Tabla S1. Valores del punto medio de desnaturalización térmica (T_m) para NtUGT89A2 en presencia de aditivos y ligandos. Las curvas de desnaturalización térmica se obtuvieron utilizando el ensayo de desplazamiento térmico con 0.1 mg/mL de proteína y Sypro Orange 5X. Se realizó un ajuste no lineal a la ecuación de Boltzmann. Los experimentos se realizaron por triplicado y se presenta el valor promedio.

Condición	Compuesto	Concentración	pH	T_m (°C)
Proteína sin aditivos	-	-	8	52.4
pH	MES	50mM	5.5	47.2
	MES	50mM	6.0	50.7
	MOPS	50mM	6.5	50.9
	Tris	50mM	7	53.0
	HEPES	50mM	7.5	51.9
	Tris	50mM	8	51.5
	Tris	50mM	8.5	50.3
Crowding	Glycerol	5%	8	-
		10%	8	49.9
		15%	8	51.1
		20%	8	50.7
Chelating agent	EDTA	1mM	8	50.5
		2mM	8	47.2

Condición	Compuesto	Concentración	pH	T_m (°C)
		5mM	8	49.6
		100mM	8	52.4
		200mM	8	52.6
Sal	NaCl	400mM	8	56.1
		600mM	8	56.2
		800mM	8	56.3
		1000mM	8	56.5
Sal/pH	NaCl/Tris	600mM	7	54.2
		2mM	8	48.6
		3mM	8	51.9
Agente reductor	β -mercaptoetanol	5mM	8	49.6
		10mM	8	49.7
		15mM	8	49.8
		250 μ M	8	51.1
	UDP-glucosa	500 μ M	8	52.2
		3000 μ M	8	51.8
		5000 μ M	8	51.2
Ligando		250 μ M	8	49.8
	2,5 DHBA	500 μ M	8	51.5
		1000 μ M	8	51.3
	2HBA	1000 μ M	8	55.4
	3HBA	1000 μ M	8	49.8

Condición	Compuesto	Concentración	pH	T_m (°C)
	4HBA	1000 μ M	8	51.8
	2,3 DHBA	1000 μ M	8	53.2
	Ácido benzoico	1000 μ M	7	55.7
	2-HBA	1000 μ M	7	62.8
	3-HBA	1000 μ M	7	55.8
	4-HBA	1000 μ M	7	56.0
	2,3-DHBA	1000 μ M	7	60.7
	2,4-DHBA	1000 μ M	7	58.8
Ligando +	2,5-DHBA	1000 μ M	7	62.9
5mM UDP-	2,6-DHBA	1000 μ M	7	60.2
glucosa	2,3,4-THBA	1000 μ M	7	60.9
	3,4,5-THBA	1000 μ M	7	60.6
	Ácido 4-aminobenzoico	1000 μ M	7	52.3
	Ácido 5-cloro-2-hidroxibenzoico	1000 μ M	7	59.7

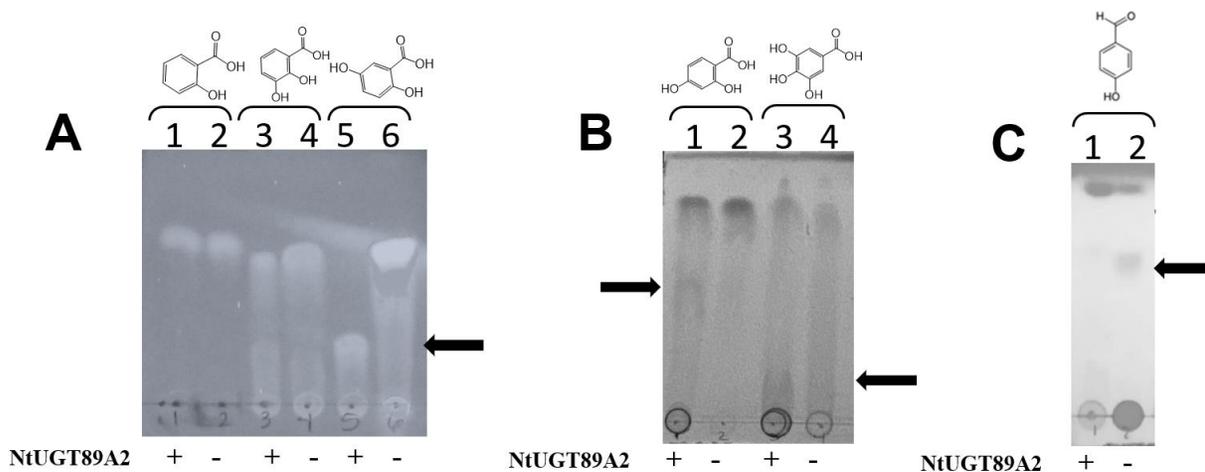


Figura S1: Análisis TLC de la reacción de glicosilación catalizada por NtUGT89A2. A) Resolución TLC del producto de glicosilación de 2-HBA, 2,3-DHBA, 2,5-DHBA. Se utilizó una placa de sílice como fase estacionaria y una fase móvil compuesta por una proporción 7:3 de acetato de etilo a metanol. La placa se reveló exponiéndola a una longitud de onda de 365 nm. 1. Producto de glicosilación de 2-HBA, 2. Compuesto de referencia de 2-HBA, 3. Producto de glicosilación de 2,3-DHBA (indicado por una flecha negra), 4. Compuesto de referencia de 2,3-DHBA, 5. Producto de glicosilación de 2,5-DHBA (indicado por una flecha negra), 6. Compuesto de referencia de 2,5-DHBA. B) Resolución TLC del producto de glicosilación de 2,4-DHBA, 3,4,5-THBA. Se utilizó una placa de sílice como fase estacionaria y una fase móvil compuesta por una proporción 7:3 de acetato de etilo a metanol. La placa se reveló exponiéndola a una longitud de onda de 254 nm. 1. Producto de glicosilación de 2,4-DHBA, 2. Compuesto de referencia de 2,4-DHBA, 3. Producto de glicosilación de 3,4,5-THBA (indicado por una flecha negra), 4. Compuesto de referencia de 3,4,5-THBA. C) Resolución TLC del producto de glicosilación de 4-hidroxi-benzaldehído. Se utilizó una placa de sílice como fase estacionaria y una fase móvil compuesta por una proporción 7:3 de acetato de etilo a metanol. La placa se reveló exponiéndola a una longitud de onda de 254 nm. 1. Compuesto de referencia de 4-hidroxi-benzaldehído, 2. Producto de glicosilación de 4-hidroxi-benzaldehído (indicado por una flecha negra).

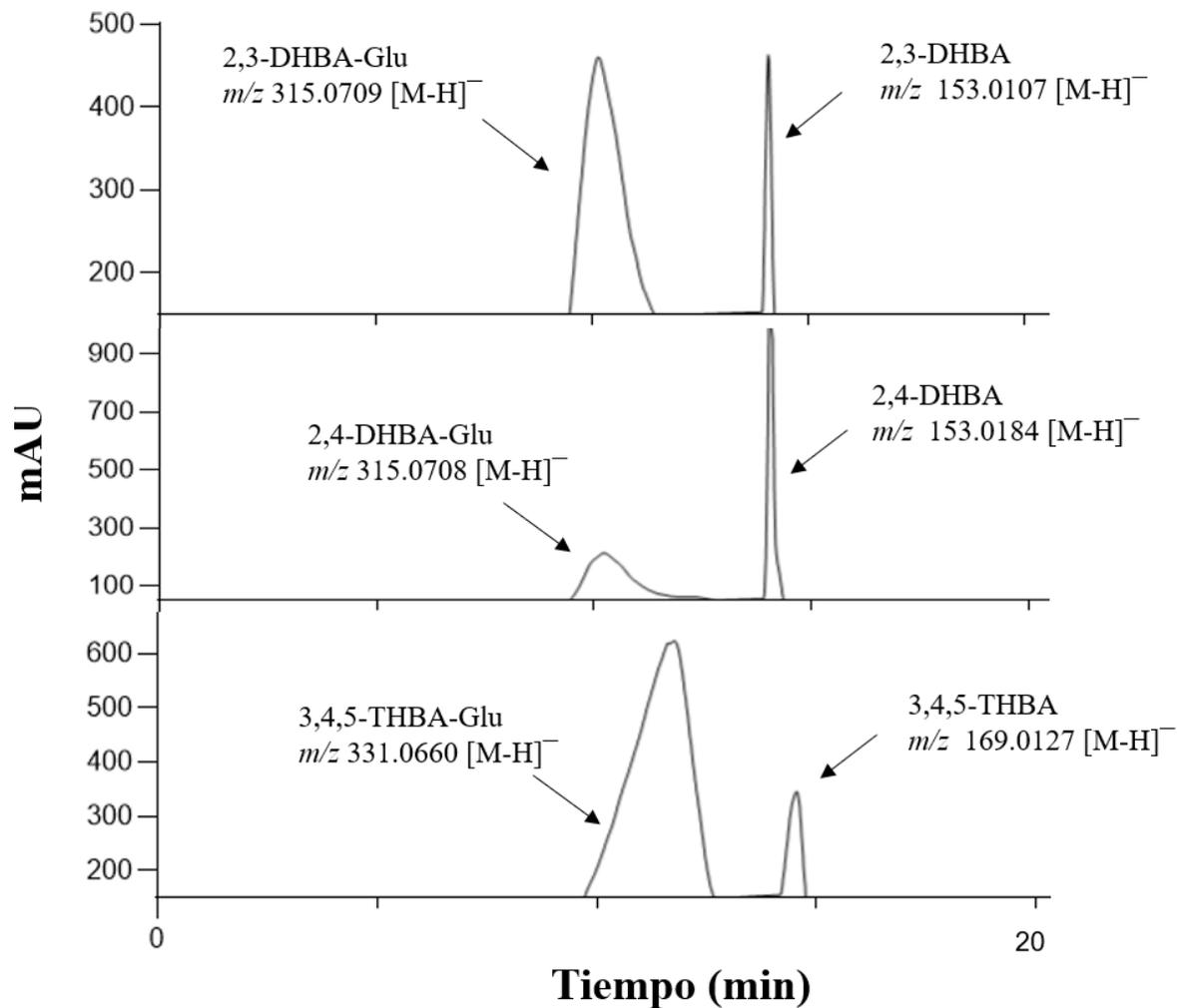


Figura S2: Análisis del producto de glicosilación del 2,3-DHBA, 2,4-DHBA y 3,4,5-THBA mediante HPLC en fase reversa. El perfil de elución de la mezcla de reacción con 2,3-DHBA se muestra en la parte superior, el perfil con 2,4-DHBA está en el medio, y la mezcla de reacción con 3,4,5-DHBA se muestra en la parte inferior. En todos los casos, se inyectaron 20 μ l de la muestra y se utilizaron las mismas condiciones de elución.

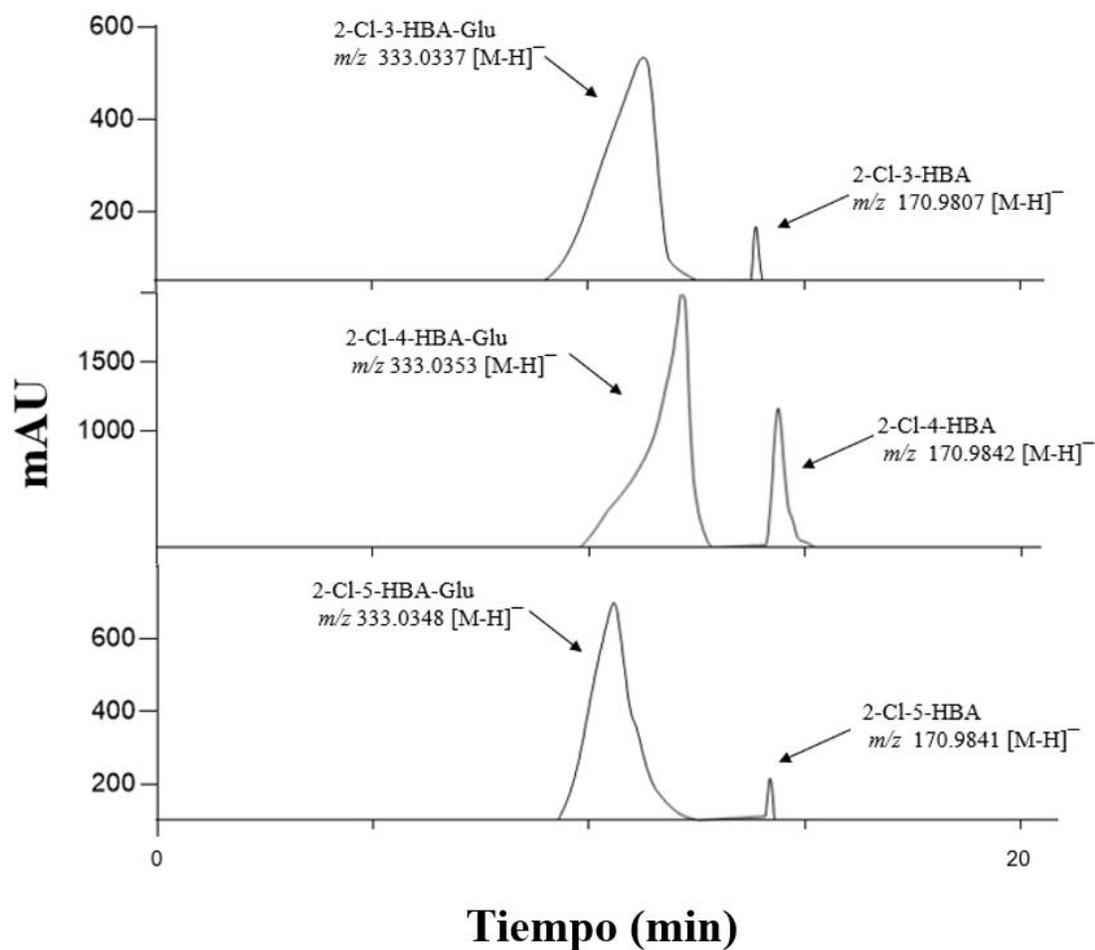


Figura S3. Análisis del producto de glicosilación del 2-Cl-3-HBA, 2-Cl-4-HBA y 2-Cl-5-HBA mediante HPLC en fase reversa. El perfil de elución de la mezcla de reacción con 2-Cl-3-HBA se muestra en la parte superior, el perfil con 2-Cl-4-HBA está en el medio y la mezcla de reacción con 2-Cl-5-HBA se muestra en la parte inferior. En todos los casos, se inyectaron 20 μ l de la muestra y se utilizaron las mismas condiciones de elución.

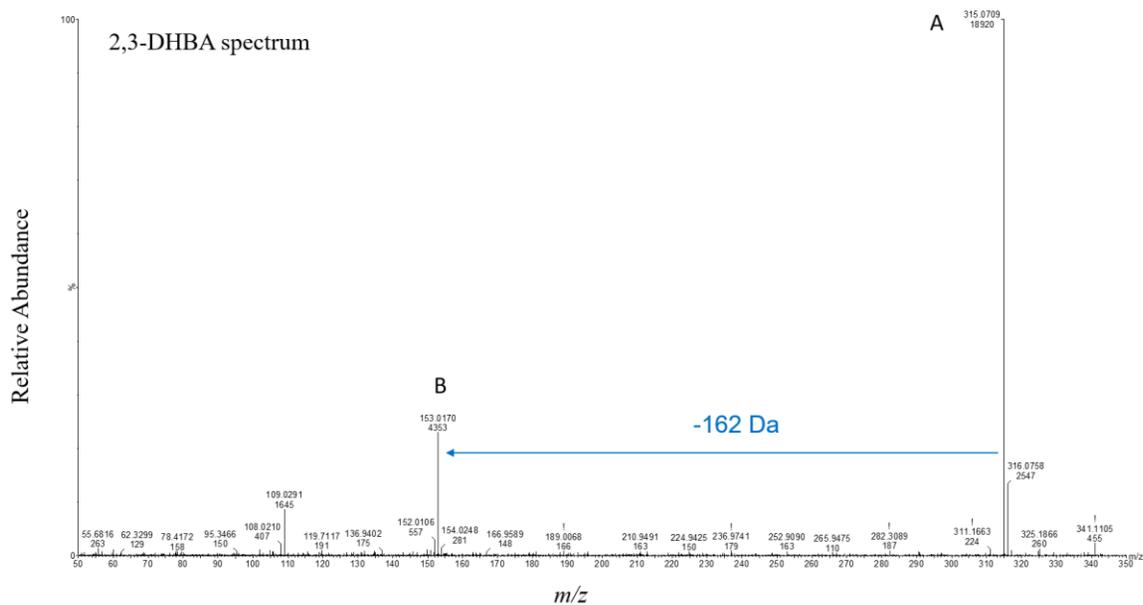


Figura S4. Identificación estructural del producto de la reacción catalizada por NtUGT89A2 con 2,3-DHBA y UDP-glucosa. El espectro MS/MS en modo negativo muestra el ion molecular $[M-H]^-$ a 315.0709 m/z , que corresponde a la masa molecular del monoglucósido de 2,3-DHBA. Se observa una pérdida de 162 Da, correspondiente a la eliminación de una unidad de glucosa, a 153.0170 m/z , indicada por una flecha azul.

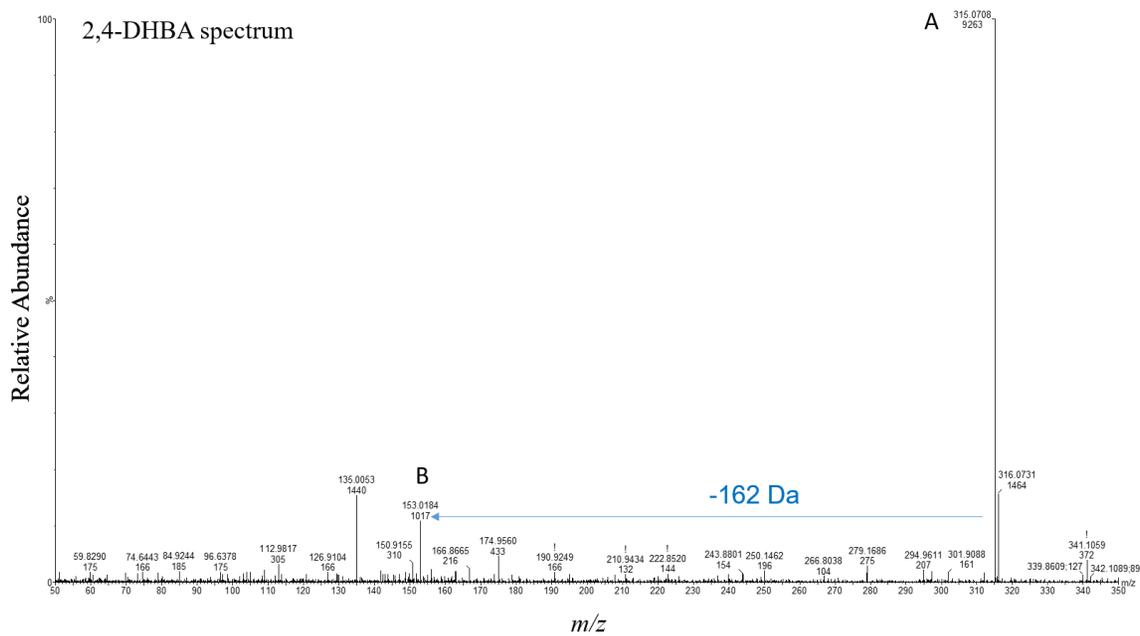


Figura S5. Identificación estructural del producto de la reacción catalizada por NtUGT89A2 con 2,4-DHBA y UDP-glucosa. El espectro MS/MS en modo negativo muestra el ion molecular $[M-H]^-$ a 315.0708 m/z , que corresponde a la masa molecular del monoglucósido de 2,4-DHBA. Se observa una pérdida de 162 Da, correspondiente a la eliminación de una unidad de glucosa, a 153.0184 m/z , indicada por una flecha azul.

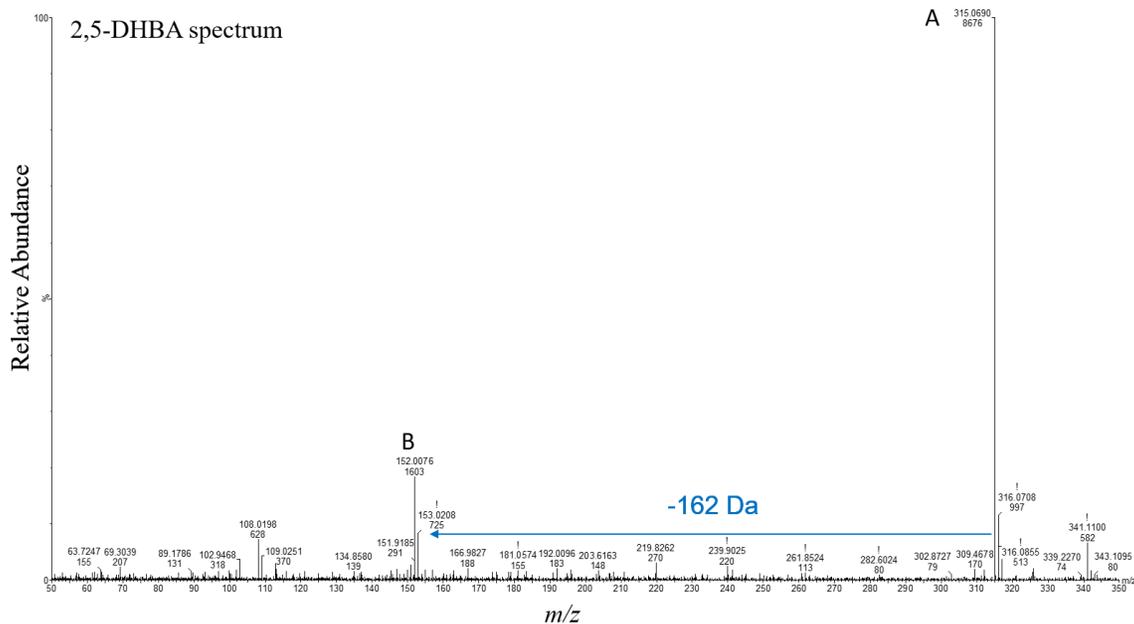


Figura S6. Identificación estructural del producto de la reacción catalizada por NtUGT89A2 con 2,5-DHBA y UDP-glucosa. El espectro MS/MS en modo negativo muestra el ion molecular $[M-H]^-$ a 315.0690 m/z , que corresponde a la masa molecular del monoglucósido de 2,5-DHBA. Se observa una pérdida de 162 Da, correspondiente a la eliminación de una unidad de glucosa, a 153.0208 m/z , indicada por una flecha azul.

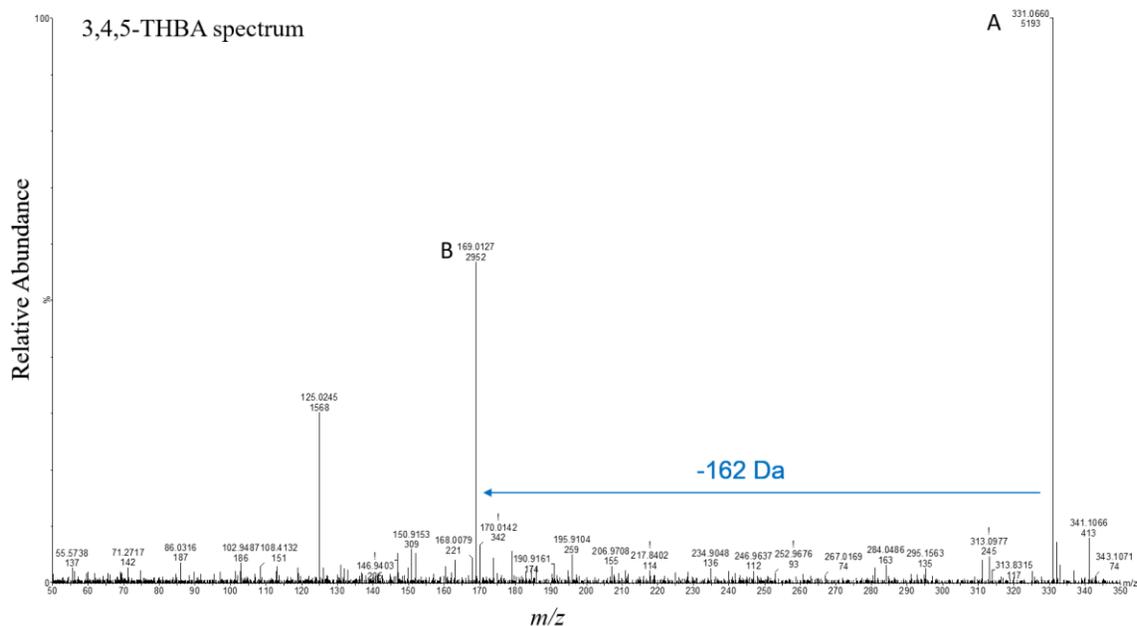


Figura S7. Identificación estructural del producto de la reacción catalizada por NtUGT89A2 con 3,4,5-THBA y UDP-glucosa. El espectro MS/MS en modo negativo muestra el ion molecular $[M-H]^-$ a 331.0660 m/z , que corresponde a la masa molecular del monoglucósido de 3,4,5-THBA. Se observa una pérdida de 162 Da, correspondiente a la eliminación de una unidad de glucosa, a 169.0127 m/z , indicada por una flecha azul.

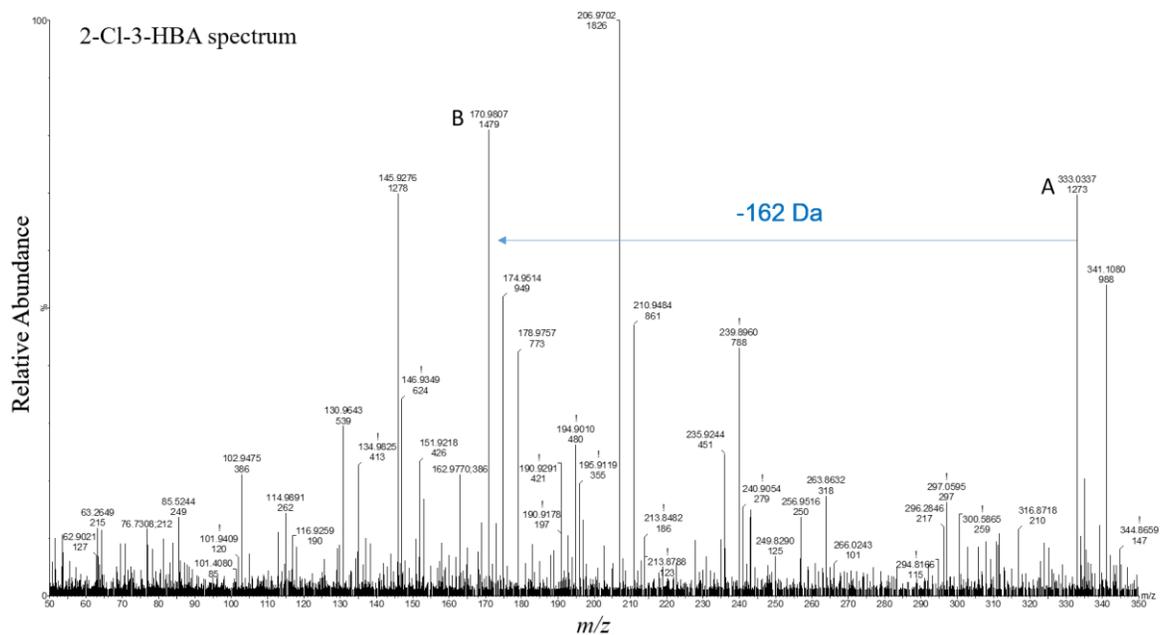


Figura S8. Identificación estructural del producto de la reacción catalizada por NtUGT89A2 con 2-Cl-3-HBA y UDP-glucosa. El espectro MS/MS en modo negativo muestra el ion molecular $[M-H]^-$ a $333.0337\ m/z$, que corresponde a la masa molecular del monoglucósido de 2-Cl-3-HBA. Se observa una pérdida de 162 Da, correspondiente a la eliminación de una unidad de glucosa, a $170.9807\ m/z$, indicada por una flecha azul.

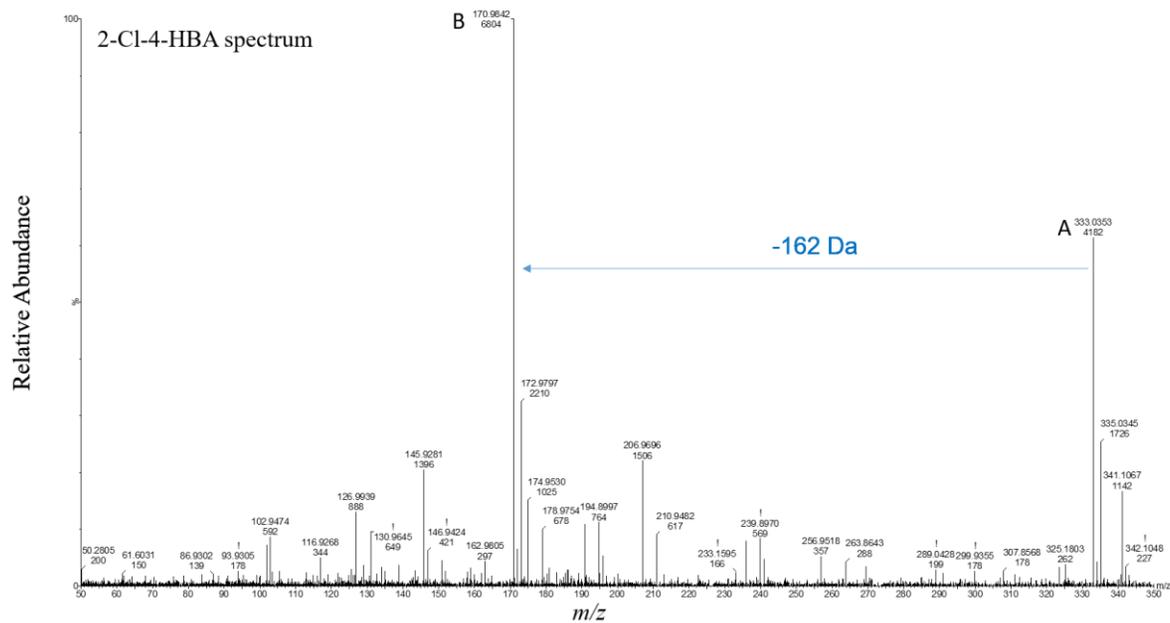


Figura S9. Identificación estructural del producto de la reacción catalizada por NtUGT89A2 con 2-Cl-4-HBA y UDP-glucosa. El espectro MS/MS en modo negativo muestra el ion molecular $[M-H]^-$ a 333.0353 m/z , que corresponde a la masa molecular del monoglucósido de 2-Cl-4-HBA. Se observa una pérdida de 162 Da, correspondiente a la eliminación de una unidad de glucosa, a 170.9842 m/z , indicada por una flecha azul.

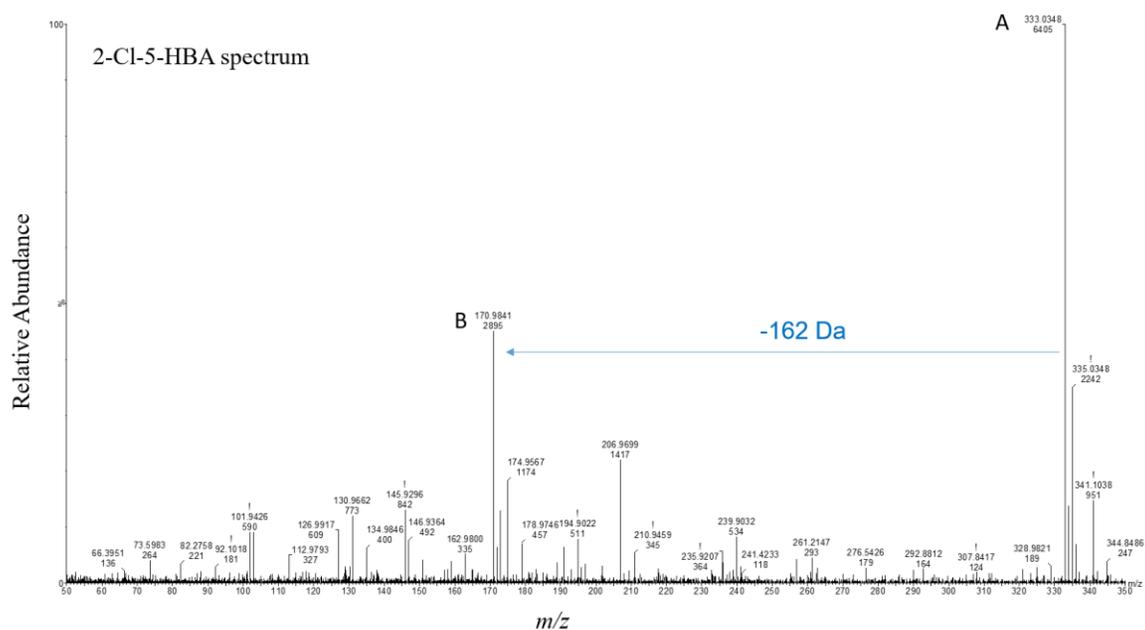


Figura S10. Identificación estructural del producto de la reacción catalizada por NtUGT89A2 con 2-Cl-5-HBA y UDP-glucosa. El espectro MS/MS en modo negativo muestra el ion molecular $[M-H]^-$ a 333.0348 m/z , que corresponde a la masa molecular del monoglucósido de 2-Cl-5-HBA. Se observa una pérdida de 162 Da, correspondiente a la eliminación de una unidad de glucosa, a 170.9841 m/z , indicada por una flecha azul.

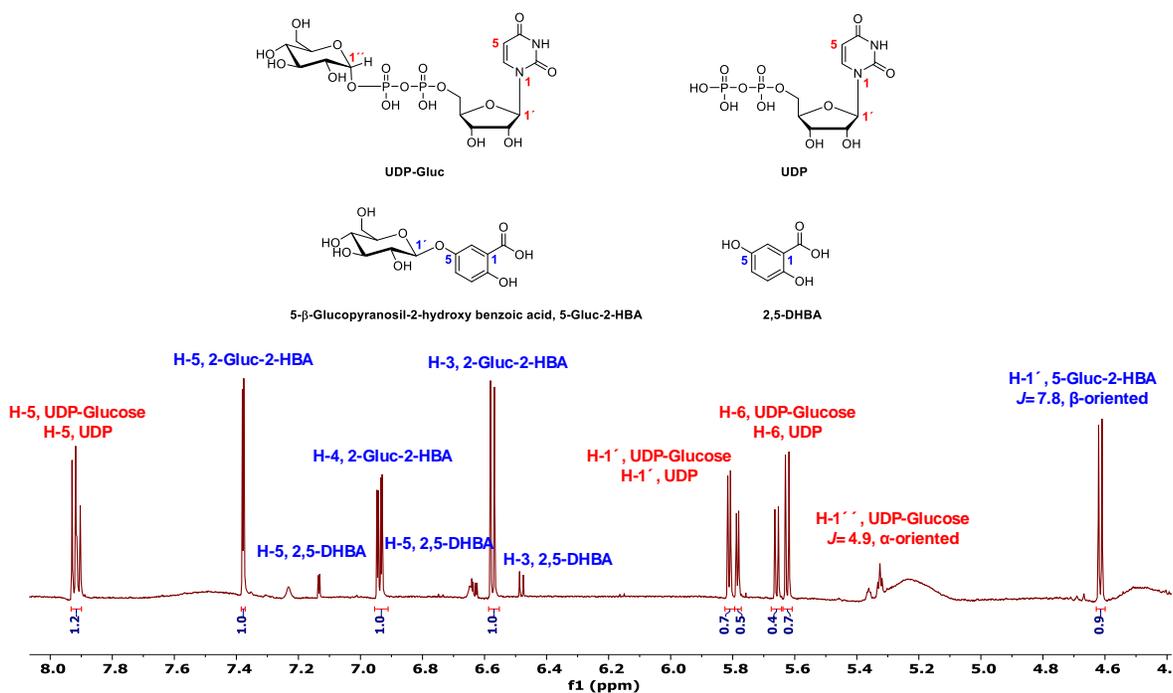


Figura S11. Espectro de ¹H-NMR de la reacción enzimática cruda catalizada por NtUGT89A2 utilizando 2,5-DHBA como aceptor y UDP-Glucosa como donador.

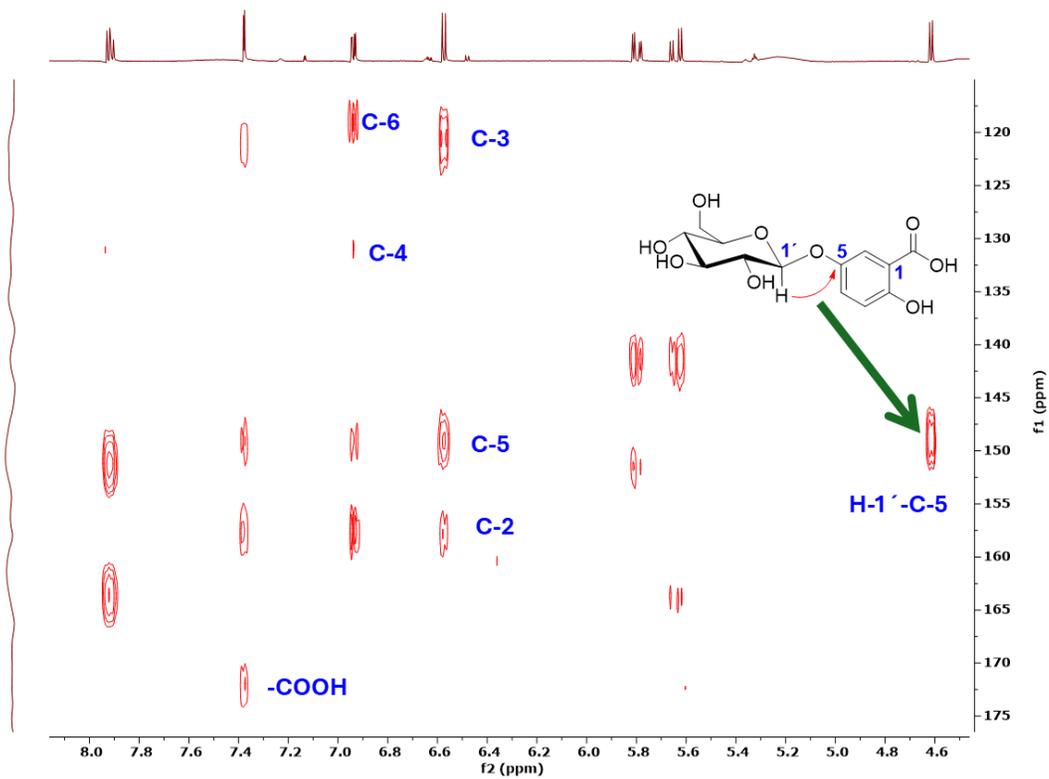


Figura S12. Espectro HMBC de la reacción enzimática cruda que muestra correlaciones cruciales para localizar el grupo glucosa en la estructura de 2,5-DHBA.

Anexo 2

Artículo publicado: The *Nicotiana tabacum* UGT89A2 enzyme catalyzes the glycosylation of di- and trihydroxylated benzoic acid derivatives

<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2024.114203>