

Ingeniería enzimática de quitina desacetilasas y glicosintasas como biocatalizadores: diseño racional de la especificidad y evolución dirigida

Hugo Aragunde Pazos

<http://hdl.handle.net/10803/416597>

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

TESIS DOCTORAL

Título Ingeniería enzimática de quitina desacetilasas y glicosintasas como biocatalizadores: diseño racional de la especificidad y evolución dirigida.

Realizada por D. Hugo Aragunde Pazos

en el Centro IQS School of Engineering

y en el Departamento de Bioingeniería

Dirigida por el Dr. Antoni Planas Sauter

“To succeed, planning alone is insufficient.
One must improvise as well.”

Isaac Asimov, Foundation

Agradecimientos

Agradecimientos

Agradezco al Dr. Antoni Planas Sauter el que me haya dado la oportunidad de realizar la tesis doctoral dentro del grupo de Bioquímica. Agradezco que haya confiado en mí para llevar a cabo este trabajo y por permitirme hacerlo mío. Estos años no solo han servido para aprender de enzimología, bioquímica, cromatografía, etc. me han hecho crecer como científico y como persona y eso es algo que me pertenece para siempre.

Agradecer al Dr. Xevi Biarnés el haber sido parte crucial de este trabajo tanto en el planteamiento como en su desarrollo. He de reconocer que es una fuente inagotable de figuras “bonitas”, sin las cuales todas nuestras presentaciones serían poco agradables a la vista. Porque desde el *Bind Scan* siempre me quedó claro que los bioinformáticos son gente especial.

I would like to thank Dr. Bruno M. Moersbacher for allowing me to perform a stay in his group and especially Dr. Stefan Cord-Landwehr for all the help provided in the analysis of my samples.

También me gustaría agradecer a los miembros del tribunal (suplente y titulares) el tiempo dedicado en la evaluación de este trabajo. Si haberla escrito no ha sido una tarea fácil, no menos es leerla y analizarla en detalle.

Este trabajo está dedicado a mis padres por haberme hecho así y no de otra manera, porque gracias ellos estoy aquí y, aunque muchas veces no entiendan lo que hago, me han apoyado para que lo haga en todo momento. Porque estoy seguro de que no existe un experimento tan apasionante y aterrador como ser padres. Tranquilos, creo que los resultados son muy buenos (al menos por Iria). Quiero dedicar este trabajo especialmente a mi hermana. Porque como hermana mayor siempre ha sido un ejemplo a seguir, por su valentía y afán de superación, por saber ser apoyo y confidente. A mis abuelos y abuelas porque son las raíces que me han hecho fuerte, por ser fuente de historias que recordar. A aquellos que ya están para siempre: tierra y mar.

También agradecer a toda “A pandela” por siempre estar. Porque como amigos sois muchas cosas a la vez a pesar de todas las distancias siempre sois la casilla de salida, sois inspiración y conocimiento. A los de siempre y a las “nuevas incorporaciones, porque la mayoría formáis parte de mis más tempranas memorias y todos estaréis cuando esta ya me falle. Porque pocas cosas merecen más la pena que poder estar sentado en la terraza del Rif escuchando, hablando, discutiendo y riendo con vosotros. A Carlos, Denís, Hadrián, Marina, Matías, Miguel, Óscar, Paula, Rocío, Sanni y Vítor (Lúa también). *Cultum in matina, bultum nocturnae*.

Como todas las tesis los resultados aquí reflejados no son solo fruto de mi esfuerzo. Especialmente he de mencionar a dos personas: Sergi Pascual y Estela Castilla. Sin ellos esta tesis no estaría completa. No hay palabras para agradecer las horas que habéis dedicado a lo experimental y a aguantarme, porque en los últimos años hemos aprendido mucho juntos. Es necesario mencionar a las chicas Nano3Bio Cristina Alsina, Laia Grifoll que son capaces iluminar cualquier laboratorio con su alegría. Gracias a todos aquellos que han trabajado durante sus TFX con la VcCDA.

He de agradecer los cientos de horas compartidos con todos aquellos que empezamos esta maratón del doctorado juntos. Parecía que nunca llegaría el día, pero ya hemos llegado. Es necesaria una mención especial a Cristina Val y Javier Romero. “Esto era un gallego, un andaluz y

una maña...” parece un chiste, pero gracias por las risas y los días de odio profundo a los experimentos que no salen.

Me siento en la obligación de agradecer todo lo que he aprendido del Dr. Eduardo Andrés y del Dr. Xavier Pérez. A pesar del poco tiempo compartido fueron muchos los conocimientos que me transmitieron y que han sido útiles desde el minuto 1 de tesis. También a la Dra. Teresa Pellicer, una vecina inmejorable en lo profesional y personal (a pesar de sus inclinaciones futbolísticas).

He de agradecer el soporte proporcionado por todo el grupo de bioquímica. Sin vosotros estos años no hubiesen sido lo mismo y todos habéis contribuido en que este trabajo sea posible. Sé que todavía estáis esperando una tarta de Santiago.

Al swing y a toda la gente que vino con el. Aparecisteis en el mejor momento y habéis llegado para quedaros. La vida nunca deja de sorprendernos.

Seguro que me dejo a mucha gente que me gustaría mencionar. Si te consideras uno de ellos, lo siento pero seguro que me acordé de ti después de haber impreso todo y me sentí fatal.

Y gracias a ti lector por varios motivos: 1) te has molestado en coger este montón de hojas y llegar hasta aquí y 2) porque estoy seguro de que ahora que has acabado de leer los agradecimientos vas a devorar todo el resto de la tesis, bibliografía incluida. No me cabe la menor duda.

The research leading to these results has received funding from the European Union's Seventh Framework Programme for research, technological development and demonstration under grant agreement number 613931

Amb el suport de la Secretaria d'Universitats i Recerca del Departament d'Economia i Coneixement de la Generalitat de Catalunya i els Fons Socials Europeus (2013 FI_B_00268; 2014 FI_B1_00197; 2015_FI_B2_00112).

Índice

1. Índice

1. Índice	13
2. Resumen	19
3. Listado de figuras	25
4. Listado de tablas	31
5. Listado de ecuaciones	35
6. Abreviaturas	39
7. Introducción	45
7.1. Los enzimas.....	45
7.2. Ingeniería enzimática.....	48
7.3. Presentación de los enzimas.....	54
7.4. La Clasificación CAZy.....	54
7.5. Las glicosintasas.....	55
7.5.1. <i>Mecanismo catalítico de las glicosintasas</i>	57
7.5.2. <i>La β-Glucanasa de Bacillus licheniformis</i>	58
7.5.3. <i>Los β-Glucanos naturales y artificiales</i>	59
7.6. Quitina y quitosanos.....	61
7.6.1. <i>Historia de la quitina y el quitosano</i>	61
7.6.2. <i>Quitina y Quitosanos: estructura y propiedades</i>	62
7.6.3. <i>Quitina y quitosanos: Aplicaciones</i>	64
7.6.4. <i>Producción industrial de quitosanos</i>	67
7.6.5. <i>Proyecto Nano3Bio</i>	70
7.6.6. <i>Familia CE4</i>	71
7.6.6.1. <i>Dominio de homología NodB y motivos característicos</i>	72
7.6.6.2. <i>Roles de las desacetilasas de quitina en la naturaleza</i>	72
7.6.7. <i>Quitina desacetilasas</i>	74
7.7. Quitin-oligosacárido desacetilasa de <i>Vibrio cholerae</i>	75
7.7.1. <i>Estructura de VcCDA</i>	76
7.7.2. <i>Mecanismo catalítico de VcCDA</i>	78
7.7.3. <i>Caracterización bioquímica de la VcCDA</i>	79
7.8. <i>Subsite Capping Model: Definición de la preferencia de sustrato</i>	82
7.8.1. <i>Las estructuras de VcCDA en complejo con sustrato</i>	82
7.8.2. <i>El mecanismo del Loop 5: El modelo VcCDA – DP4</i>	84
7.8.3. <i>“Subsite Capping Model” en otras CE4</i>	85

7.8.4.	<i>Definición de la hipótesis del “Subsite Capping Model”</i>	87
8.	Objetivos	91
9.	Presentación de los resultados	95
10.	Capítulo 1. Desacetilasas de quitina	99
10.1.	Un método HPLC-MS para la caracterización cinética de desacetilasas de oligosacáridos de quitina.	101
10.1.1.	<i>Necesidad de un método analítico de oligosacáridos de quitosano</i>	101
10.1.2.	<i>Producción de patrones de-N-acetilados</i>	103
10.1.3.	<i>Desarrollo del método analítico</i>	108
10.1.4.	<i>Validación del sistema analítico global</i>	114
10.1.5.	<i>Aplicaciones del método HPLC-MS</i>	119
10.1.6.	<i>Conclusiones</i>	120
10.2.	Caracterización de VcCDA: Proteína Completa y Dominio Catalítico	123
10.2.1.	<i>Vector de expresión de la VcCDA FL</i>	123
10.2.2.	<i>Expresión y purificación de la VcCDA FL</i>	124
10.2.3.	<i>Caracterización cinética de la VcCDA FL</i>	128
10.2.4.	<i>Dependencia de la actividad de VcCDA con cationes metálicos</i>	131
10.2.5.	<i>Aislamiento del dominio catalítico</i>	134
10.2.6.	<i>Expresión y purificación del dominio catalítico VcCDA CD</i>	142
10.2.7.	<i>Estudio de la estabilidad de la VcCDA CD</i>	149
10.2.8.	<i>Caracterización cinética de la VcCDA CD</i>	151
10.2.9.	<i>Caracterización del patrón de desacetilación de la VcCDA CD</i>	154
10.3.	Demostración del <i>Subsite Capping Model</i> : Primera generación de mutantes	159
10.3.1.	<i>Estrategia 1: Bloqueo del loop 5</i>	160
10.3.1.1.	<i>Expresión y purificación de la VcCDA FL P193C/N273C</i>	162
10.3.1.2.	<i>Comprobación de la formación del puente disulfuro C193-C273</i>	165
10.3.1.3.	<i>Caracterización cinética de la VcCDA FL P193C/N273C</i>	166
10.3.1.4.	<i>Caracterización del patrón de desacetilación de la VcCDA FL P193C/N273C</i>	167
10.3.2.	<i>Estrategia 2: Eliminación del loop 5</i>	169
10.3.2.1.	<i>Expresión y purificación de la VcCDA FL L5-BsPdaA</i>	171
10.3.2.2.	<i>Caracterización cinética de la VcCDA FL L5-BsPda</i>	175
10.3.3.	<i>Conclusiones en la demostración del Subsite Capping Model</i>	177
10.4.	Segunda generación: Ingeniería de la especificidad por sustratos de la VcCDA	178
10.4.1.	<i>Expresión y purificación de los mutantes de segunda generación</i>	182
10.4.2.	<i>Estudio de la estabilidad de los mutantes de segunda generación</i>	188
10.4.3.	<i>Caracterización cinética de los mutantes de segunda generación</i>	190

10.4.4.	<i>Caracterización del patrón de desacetilación de los mutantes de segunda generación ..</i>	194
10.4.5.	<i>Conclusiones en la ingeniería del loop 5</i>	196
10.5.	Discusión global VcCDA.....	199
11.	Capítulo 2. Glicosintasas	203
11.1.	Método HTS para el cribado de librerías de glicosintasas.....	204
11.2.	Mutante transicional de hidrolasa a glicosintasa.....	223
11.3.	Discusión glicosintasas.....	239
12.	Conclusiones	245
12.1.	Conclusiones capítulo 1: quitina desacetilasas	245
12.2.	Conclusiones capítulo 2: glicosintasas	246
13.	Materiales y métodos.....	249
14.	Bibliografía	299
15.	Anexos.....	317
15.1.	Secuenciación del patrón de desacetilación de VcCDA CD	317
15.2.	Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de los constructos desarrollados de VcCDA.....	320
15.3.	Acquisition Method de los métodos HPLC.....	330
15.3.1.	<i>Acquisition Method DP2(N)</i>	<i>330</i>
15.3.2.	<i>Acquisition Method DP3(N)</i>	<i>335</i>
15.3.3.	<i>Acquisition Method DP4(N)</i>	<i>340</i>
15.3.4.	<i>Acquisition Method DP5(N)</i>	<i>345</i>

Resumen

2. Resumen

Los resultados presentados en esta tesis están divididos en dos capítulos en función de los enzimas estudiados: quitina desacetilasas y glicosintasas.

Las de-*N*-acetilasas de quitina (CDAs) son un grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis de los grupos acetamido de los residuos GlcNAc de quitina, quitosano y oligosacáridos de quitina (COS). Las CDAs pertenecen a la familia 4 de las esterasas de carbohidratos (CE4), la cual también incluye esterasas de acetilxilano y desacetilasas de petidoglucano.

Los quitosanos son polisacáridos de *N*-acetil-glucosamina y glucosamina. Los COS y derivados parcialmente desacetilados (paCOS) han demostrado ser moléculas bioactivas en un amplio rango de aplicaciones como pueden ser antimicrobianos, inmunoestimulantes, nano formulaciones para *drug* o *gene delivery*, promotores de crecimiento vegetal, promotores de la cicatrización de heridas, etc. La mayoría de las actividades biológicas asociadas a los paCOS parecen depender no solo del grado de polimerización (DP) y de acetilación (DA), sino también del patrón de acetilación (PA). Esta relación estructura función remarca el rol crucial de las CDAs.

Los objetivos de esta tesis comprenden los estudios de la relación estructura-función dentro del marco del *Subsite Capping Model*. La presencia de varios *loops* rodeando el sitio activo, los cuales varían en tamaño y estructura en función de la CDA, definen los subsitios accesibles en el surco catalítico y, a su vez, también son responsables de definir el patrón de desacetilación. En esta tesis se reporta la validación de una metodología analítica HPLC-MS para la monitorización de la actividad de CDAs, la demostración experimental del *Subsite Capping Model* usando la desacetilasa de quitooligosacáridos de *Vibrio cholerae* y los resultados del diseño racional de los *loops* para la modulación de la especificidad de sustrato. Varias generaciones de mutantes fueron estudiadas obteniéndose como resultado un enzima altamente optimizado.

El otro capítulo incluye el trabajo realizado en el campo de las glicosintasas. Estas enzimas se han convertido en unas eficientes herramientas para la síntesis de oligosacáridos, glicoconjugados y polisacáridos. Se derivan de glicosidasas con retención de conformación anomérica en las que la actividad hidrolítica ha sido abolida por la mutación del nucleófilo catalítico pero que catalizan eficientemente reacciones de transglicosilación cuando se les proporcionan donadores activados con fluoruro con la configuración anomérica opuesta a la del sustrato del enzima hidrolítico parental. Mejorar el rendimiento de las glicosintasas actuales (y futuras) y la ingeniería de la especificidad por sustratos artificiales están siendo afrontados por metodologías de evolución dirigida. Estas aproximaciones dependen en gran medida de métodos de alta eficiencia de cribado.

En este trabajo se presenta un método de cribado independiente de la especificidad del enzima para el cribado de bibliotecas de glicosintasas basado en un quimiosensor fluorescente de fluoruro capaz de transducir la actividad glicosintasa a fluorescencia. Se describe el desarrollo y validación del ensayo así como su aplicación a una biblioteca de saturación del residuo nucleófilo en la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*. Además, se encuentra un nuevo y sorprendente mutante que es posteriormente caracterizado, el mutante E134D. Esta nueva glicosintasa proporciona conocimiento mecanístico sobre el rol de los residuos adyacentes en la reacción catalítica de las glicosintasas.

Summary

The results presented in this thesis are divided in two chapters depending on the enzymes studied: chitin deacetylases and glycosynthases.

Chitin de-*N*-acetylases (CDAs) are a group of enzymes that catalyze the hydrolysis of the acetamido groups of GlcNAc residues of chitin, chitosan, and chitin oligosaccharides (COS). CDAs belong to the family 4 of carbohydrate esterases (CE4), which also includes acetylxylan esterases and peptidoglycan deacetylases.

Chitosans are a family of polysaccharides of *N*-acetyl-glucosamine and glucosamine. COS and their partially deacetylated derivatives (paCOS) have proven to be bioactive molecules in a broad variety of applications such as antimicrobials, immunostimulants, nanoformulations for drug and gene delivery, plant growth promoters, wound healing activity, etc. Most of the biological activities associated with paCOS seem to be largely dependent not only on the degree of polymerization (DP) and degree of acetylation (DA), but also on the specific acetylation pattern (PA). This structure-function relationship highlights the key role of the CDAs.

The objectives of this thesis comprises the studies of structure-function relationships in the frame of the *Subsite Capping Model*. The presence of several loops surrounding the active site, which vary in size and structure depending on the CDA, define the accessible binding subsites of the catalytic cleft and seem to be responsible of defining the deacetylation pattern. In this thesis it is reported the validation of an analytical HPLC-MS methodology for CDA activity monitoring, the experimental demonstration of the *Subsite Capping Model* using the *Vibrio cholerae* chitin oligosaccharide deacetylase as reference and the results of the rational engineering of loops for the modulation of substrate specificity. Several generations of mutants were studied resulting in a greatly optimized enzyme.

The other chapter is the work developed with glycosynthases, these enzymes have become efficient tools for the enzymatic synthesis of oligosaccharides, glycoconjugates and polysaccharides. They derive from retaining glycosidases in which the hydrolase activity has been abolished by mutation of the catalytic nucleophile but efficiently catalyse transglycosylation reactions when using activated glycosyl fluoride donors with the opposite anomeric configuration than the substrate in the parental hydrolase enzyme. Improving the performance of current (and new to come) glycosynthases and engineering specificity for non-natural substrates is being addressed by enzyme directed evolution. These approaches largely depend on efficient high throughput screening methods.

In this work it is presented a general screening assay independent of the enzyme specificity for the screening of glycosynthase libraries based on a fluoride fluorescent chemosensor that transduces glycosynthase activity into fluorescence. This work describes the development and validation of the assay and its application to a nucleophile saturation mutant library of *Bacillus licheniformis* 1,3-1,4- β -glucanase. In addition, a new and surprising mutant was found and furtherly characterized, the E134D mutant. This new glycosynthase provides mechanistic insights on the role of neighbouring residues in the glycosynthase catalytic reaction.

Resumo

Os resultados presentados nesta tese están divididos en dous capítulos en función dos enzimas estudados: quitina desacetilasas e glicosintasas. As de-*N*-acetilasas de quitina (CDAs) son un grupo de enzimas que catalizan a hidrólise dos grupos acetamido dos residuos GlcNAc de quitina, quitosano e oligosacáridos de quitina (COS). As CDAs pertencen á familia 4 das esterases de carbohidratos (CE4), a cal tamén inclúe esterases de acetilxilano e desacetilasas de petidoglucano.

Os quitosanos son unha familia de polisacáridos de *N*-acetil-glucosamina e glucosamina. Os COS e os seus derivados parcialmente acetilados (paCOS) demostraron ser moléculas bioactivas nunha ampla gama de aplicacións como poden ser antimicrobianos, inmunoestimulantes, nano formulacións para a entrega de medicamentos ou xenos, promotores de crecemento vexetal, promotores da cicatrización de feridas, etc. A maioría das actividades biolóxicas asociadas aos paCOS parecen depender non só do grao de polimerización (DP) de do grao de acetilación (DA), senón tamén do patrón de acetilación (PA). Esta relación estrutura función remarca o papel crucial das CDAs.

Os obxectivos desta tese comprenden os estudos da relación estrutura función dentro do marco do *Subsite Capping Model*. A presenza de varios *loops* rodeando o sitio activo, que varían en tamaño e estrutura en función da CDA, definen os subsitios accesibles no suco catalítico e, á súa vez, tamén son responsables de definir o patrón de desacetilación. Nesta tese repórtase a validación dunha metodoloxía analítica HPLC-MS para a monitorización da actividade das CDAs, a demostración experimental do *Subsite Capping Model* empregando a desacetilasa de quitoooligosacáridos de *Vibrio cholerae* e os resultados do deseño racional dos *loops* para a modulación da especificidade de substrato. Varias xeracións de mutantes foron estudadas obtendo como resultado un enzima altamente optimizado.

O outro capítulo inclúe o traballo realizado no campo das glicosintasas. Estas enzimas estanse a converter en eficientes ferramentas para a síntese de oligosacáridos, glicoconjugados e polisacáridos. Derívanse de glicosidasas con retención de conformación anomérica nas que a actividade hidrolítica foi abolida pola mutilación do nucleófilo catalítico pero que catalizan eficientemente a reacción de transglicosilación cando se lles proporcionan doadores activados con fluoruro cunha anomérica configuración oposta á do substrato do enzima hidrolítico parental. Mellorar o rendemento das glicosintasas actuais (e futuras) e a enxeñaría da especificidade por substratos artificiais están sendo enfrontadas por metodoloxías de evolución dirixida. Estas aproximacións dependen en gran medida de métodos de cribado de alta eficiencia.

Neste traballo preséntase un método de cribado independente da especificidade do enzima para o cribado de bibliotecas de glicosintasas baseado nun sensor químico fluorescente de fluoruro capaz de transducir a actividade glicosintasa a fluorescencia. Esta tese describe o desenvolvemento e validación do ensaio, así como a súa aplicación a unha biblioteca de saturación do residuo nucleófilo na 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*. Ademais, atopouse un novo e sorprendente mutante e posteriormente caracterizado, o mutante E134D. Esta nova glicosintasa proporciona coñecementos mecanísticos sobre o rol dos residuos adxacentes na reacción catalítica das glicosintasas.

Resum

Els resultats presentats en aquesta tesi estan dividits en dos capítols en funció dels enzims estudiats: quitina desacetilases i glicosintases.

Les de-*N*-acetilases de quitina (CDAs) són un grup d'enzims que catalitzen la hidròlisi dels grups acetamido dels residus GlcNAc de quitina, quitosà i oligosacàrids de quitina (COS). Les CDAs pertanyen a la família 4 de les esterases de carbohidrats (CE4), la qual també inclou esterases de acetilxilà i desacetilases de petidoglucà.

Els quitosans són una família de polisacàrids de *N*-acetil-glucosamina i glucosamina. Els COS i derivats parcialment desacetilats (paCOS) han demostrat ser molècules bioactives en un ampli rang d'aplicacions com poden ser antimicrobians, immunoestimulants, nano formulacions per *drug o gene delivery*, promotors de creixement vegetal, promotors de la cicatrització de ferides, etc. La majoria de les activitats biològiques associades als paCOS semblen dependre no només del grau de polimerització (DP) i de acetilació (DA), sinó també del patró de acetilació (PA). Aquesta relació estructura funció remarca el paper crucial de les CDAs.

Els objectius d'aquesta tesi comprenen els estudis de la relació estructura funció dins el marc del *Subsite capping Model*. La presència de diversos *loops* envoltant el centre actiu, els quals varien en mida i estructura en funció de la CDA, defineixen els sublocs accessibles en el solc catalític i, a la vegada, també són responsables de definir el patró de desacetilació. En aquesta tesi es reporta la validació d'una metodologia analítica HPLC-MS per a la monitorització de l'activitat de las CDAs, la demostració experimental del *Subsite Capping Model* usant la desacetilasa de quitooligosacàrids de *Vibrio cholerae* i els resultats del disseny racional dels *loops* per a la modulació de l'especificitat de substrat. Diverses generacions de mutants van ser estudiades obtenint com a resultat un enzim altament optimitzat.

L'altre capítol inclou el treball realitzat en el camp de les glicosintases. Aquests enzims s'han convertit en unes eficients eines per a la síntesi d'oligosacàrids, glicoconjugats i polisacàrids. Es deriven de glicosidases amb retenció de conformació anomèrica en què l'activitat hidrolítica ha estat abolida per la mutació del nucleòfil catalític però que catalitzen eficientment reaccions de transglicosilació quan es proporcionen donadors activats amb fluorur amb la configuració anomèrica oposada a la del substrat del enzim hidrolític parental. Millorar el rendiment de les glicosintases actuals (i futures) i l'enginyeria de l'especificitat per substrats artificials estan sent afrontades per metodologies d'evolució dirigida. Aquestes aproximacions depenen en gran mesura en mètodes d'alta eficiència de cribratge.

En aquest treball es presenta un mètode de cribratge independent de l'especificitat del enzim per al cribratge de biblioteques de glicosintases basat en un sensor químic fluorescent de fluorur capaç de traduir l'activitat glicosintasa a fluorescència. Es descriu el desenvolupament i validació de l'assaig així com la seva aplicació a una biblioteca de saturació del residu nucleòfil a la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*. A més, es troba un nou i sorprenent mutant que és posteriorment caracteritzat, el mutant E134D. Aquesta nova glicosintasa proporciona coneixement sobre el paper dels residus adjacents en la reacció catalítica de les glicosintases.

Listado de Figuras

3. Listado de figuras

Figura 7.1- 1 Enzimas y energía de reacción	45
Figura 7.1- 2 Relevancia económica de los enzimas	48
Figura 7.2-3 Esquema de un protocolo de diseño racional de enzimas	50
Figura 7.2-4 Esquema de un protocolo de evolución dirigida.....	51
Figura 7.2- 5 Evolución dirigida vs Desarrollo clásico de enzimas.....	52
Figura 7.5-1 Mecanismos catalíticos de las glicosidasas	56
Figura 7.5-2 Mecanismos glicosidasa WT vs glicosintasa.....	57
Figura 7.5-3 β -Glucanasa	58
Figura 7.5-4 Subsitios β -glucanasa	59
Figura 7.5-5 β -glucano	59
Figura 7.6- 1 Descubridores de la quitina y quitosano.....	61
Figura 7.6-2 Estructura quitina	62
Figura 8.6-3 Estructura quitosano	63
Figura 7.6-4 Esquema de DP, DA y PA	64
Figura 7.6-5 Producción industrial de quitosano	69
Figura 7.6-6 Reacción de desacetilación mediante CDA.....	74
Figura 7.7-1 <i>Vibrio cholerae</i>	76
Figura 7.7-2 Módulos en la secuencia de VcCDA	77
Figura 7.7-3 <i>Fold</i> de VcCDA	77
Figura 7.7-4 <i>Loops</i> de VcCDA	78
Figura 7.7-5 Mecanismo Catalítico de la VcCDA	79
Figura 7.7-6 PA en los productos de reacción de VcCDA	79
Figura 7.7-7 Análisis de las fracciones de GFC en la purificación de VcCDA	80
Figura 7.7-8 Determinación del pH óptimo de VcCDA.....	80
Figura 7.7-9 Caracterización cinética de VcCDA	81
Figura 7.8-1 Estructuras de VcCDA Apo y en complejo con sustratos	83
Figura 7.8-2 Conformaciones del <i>loop</i> 4 en los complejos con DP2 y DP3	84
Figura 7.8-3 Modelo del <i>loop</i> 5 dinámico	85
Figura 7.8-4 Alineamiento de secuencia de CE4s	86
Figura 7.8-5 Estructura de <i>loops</i> y patrón de desacetilación	87
Figura 7.8-6 Esquema del <i>Subsite Capping Model</i>	88
Figura 10.1-1 Sustratos y patrones utilizados en la validación del método HPLC-MS	104
Figura 10.1-2 Protocolo producción de patrones DPX(N).....	105
Figura 10.1-3 Espectro iónico del patrón DP2(N)	106
Figura 10.1-4 Espectro iónico del patrón DP3(N)	107
Figura 10.1-5 Espectro iónico del patrón DP4(N)	107
Figura 10.1-6 Mapa de todo el proceso analítico	108
Figura 10.1-7 Comprobación del tampón de parada	110
Figura 10.1-8 Cromatogramas obtenidos por el método HPLC establecido	112
Figura 10.1-9 Evolución de las reacciones de desacetilación.....	115
Figura 10.1-10 Recta patrón y factores de respuesta para DP2(N).....	117
Figura 10.1-11 Recta patrón y factores de respuesta para DP3(N).....	117
Figura 10.1-12 Recta patrón y factores de respuesta para DP4(N).....	118
Figura 10.1-13 Evolución de los factores de respuesta frente al tiempo	118
Figura 10.1-14 Curvas patrón de enzima para los sustratos DP2 y DP4.....	119

Figura 10.1-15 Monitorización de actividad desacetilasa usando extractos de <i>E. coli</i>	120
Figura 10.2-1 Mapa pET22b VcCDA FL	123
Figura 10.2-2 Proceso purificación afinidad <i>Strep-Tag II</i>	125
Figura 10.2-3 Cromatograma de purificación <i>Strep-Trap</i> de la VcCDA FL	125
Figura 10.2-4 Cromatograma de GFC de la VcCDA FL	126
Figura 10.2-5 SDS-PAGE VcCDA FL	127
Figura 10.2-6 MALDI-TOF VcCDA FL.....	128
Figura 10.2-7 Caracterización cinética de VcCDA FL DP2-DP5	129
Figura 10.2-8 Comparación con los parámetros publicados	130
Figura 10.2-9 Esquema del mecanismo catalítico de VcCDA y la importancia del metal catalítico	131
Figura 10.2-10 Representación de las interacciones del catión metálico en el sitio activo de VcCDA	132
Figura 10.2-11 Ensayo de preferencia de metales de VcCDA.....	133
Figura 10.2-12 Residuos aromáticos en los CBMs de VcCDA	135
Figura 10.2-13 Interacción a través de CBMs en el dímero cristalográfico	137
Figura 10.2-14 Alineamiento VcCDA vs VpCOD.....	138
Figura 10.2-15 Linker entre CBMs y dominio catalítico de VcCDA	139
Figura 10.2-16 Análisis de la superficie expuesta del dominio catalítico	140
Figura 10.2-17 Mapa de pET22b VcCDA FL y pPR IBA2	140
Figura 10.2-18 Mapas de los plásmidos pPR IBA2 VcCDA CD y pPR IBA2 VcCDA FL.....	141
Figura 10.2-19 Prueba de expresión de VcCDA CD	143
Figura 10.2-20 Cromatograma de purificación <i>Strep-Trap</i> de la VcCDA CD	144
Figura 10.2-21 Cromatograma de GFC de la VcCDA CD	145
Figura 10.2-22 SDS-PAGE VcCDA CD	146
Figura 10.2-23 Desacetilación de la AcOMU	146
Figura 10.2-24 Curva patrón MU	147
Figura 10.2-25 Perfil de elución GFC de VcCDA CD vs AcOMU.....	148
Figura 10.2-26 MALDI-TOF VcCDA CD.....	148
Figura 10.2-27 Mecanismo de acción y cálculo de T_m usando <i>Sypro Orange</i> en un ensayo de DSF	150
Figura 10.2-28 Prueba de estabilidad DSF para el cálculo de T_m de VcCDA FL y CD	151
Figura 10.2-29 Comprobación del DA en los productos de VcCDA CD.....	152
Figura 10.2-30 Caracterización cinética de VcCDA CD DP2-DP5	153
Figura 10.2-31 Fragmentación MS^2 de quitoooligosacáridos.....	155
Figura 10.2-32 Ejemplo de un protocolo de secuenciación de PA	156
Figura 10.3-1 Modelo del <i>loop</i> 5 dinámico	159
Figura 10.3-2 Comparación estructura cristalográfica y modelo computacional	160
Figura 10.3-3 Localización del punto de bloqueo del <i>Loop</i> 5 por puente disulfuro.....	161
Figura 10.3-4 Cromatograma de purificación <i>Strep-Trap</i> de la VcCDA FL P193C/N273C	163
Figura 10.3-5 Cromatograma de GFC de la VcCDA FL P193C/N273C	163
Figura 10.3-6 SDS-PAGE VcCDA FL P193C/N273C	164
Figura 10.3-7 Perfil de elución GFC de VcCDA CD vs AcOMU del doble mutante	164
Figura 10.3-8 Mecanismo del reactivo de Ellman: DTNB	165
Figura 10.3-9 Recta patrón obtenida mediante el método de Ellman para la titulación de cisteínas libres	165
Figura 10.3-10 Caracterización cinética de VcCDA FL P193C/N273C comparada con WT FL	166
Figura 10.3-11 Secuencias del <i>loop</i> 5 en diferentes desacetilasas.....	169

Figura 10.3-12 Loops en VcCDA vs BsPdaA.....	170
Figura 10.3-13 Secuencias del <i>loop</i> 5 de VcCDA y BsPdaA.....	170
Figura 10.3-14 Modelo de la VcCDA FL L5-BsPdaA.....	171
Figura 10.3-15 Prueba de expresión de VcCDA L5-BsPdaA con autoinducción	172
Figura 10.3-16 Prueba de expresión de VcCDA L5-BsPdaA con IPTG y Choque Térmico	173
Figura 10.3-17 Cromatograma de purificación <i>Strep-Trap</i> de la VcCDA L5-BsPdaA	174
Figura 10.3-18 Cromatograma de GFC de la VcCDA L5-BsPdaA.....	174
Figura 10.3-19 SDS-PAGE VcCDA L5-BsPdaA	175
Figura 10.3-20 Comparación de velocidades específicas entre VcCDA WT FL y VcCDA L5-BsPdaA	176
Figura 10.4-1 Delimitación del <i>loop</i> 5 para la segunda generación de mutantes	179
Figura 10.4-2 β -factor en la estructura de la VcCDA.....	180
Figura 10.4-3 Eliminación del <i>loop</i> 5: AGA.....	180
Figura 10.4-4 Incremento de flexibilidad P→G.....	181
Figura 10.4-5 Eliminación de motivos estructurales: Δ Hélice1 y Δ Hélice2	181
Figura 10.4-6 Prueba de expresión de los mutantes de segunda generación	183
Figura 10.4-7 Cromatograma de purificación <i>Strep-Trap</i> de los mutantes de segunda generación	184
Figura 10.4-8 Cromatogramas de GFC de los mutantes de segunda generación	185
Figura 10.4-9 SDS-PAGE de los mutantes de segunda generación	186
Figura 10.4-10 Perfil de elución GFC de VcCDA CD vs AcOMU de los mutantes de segunda generación.....	187
Figura 10.4-11 MALDI-TOF de los mutantes de segunda generación	188
Figura 10.4-12 Prueba de estabilidad DSF para el cálculo de T_m de los mutantes de segunda generación.....	189
Figura 10.4-13 Caracterización cinética de los mutantes de segunda generación	191
Figura 10.4-14 Comparación de la fracción monomérica y dimérica del mutante P-G.....	193
Figura 10.4-15 Evolución de actividades en función del DP del sustrato.....	196
Figura 10.4-16 Intentos de cristalización del mutante P-G.....	197
Figure Article 1-1 Fluoride chemosensor assay for monitoring glycosynthase reactions	206
Figure Article 1-2 Set-up of the fluoride chemosensor assay with positive and negative controls	210
Figure Article 1-3 Library screening with the fluoride sensor for screening	212
Figure Article 1-4 Kinetics of the glycosynthase variants.....	213
Figure Article 1-5 Time-course and pH dependence of the reactions catalyzed by the E134D mutant.....	214
Figure Article 1-6 E134S and E134D modeled structures	215
Figure Article 2-1 Enzymatic mechanisms: hydrolase vs glycosynthase	224
Figure Article 2-2 Time-course monitoring of glycosynthase reaction	229
Figure Article 2-3 Glycosynthase activity pH dependence.....	229
Figura Article 2-4 k_{cat}/K_M vs pH	230
Figure Article 2-5 Chemical rescue in E134D, E134A and E134S.....	231
Figure Article 2-6 Size exclusión chromatography of insoluble products of glycosynthase reaction	232
Figure Article 2-7 Modeled enzyme substrate complexes.....	233
Figura 11.3-1 Dualidad hidrolasa/glicosintasas del mutante E134D.....	241
Figura 13.1-1 Esquema protocolo intercambio de <i>loop</i> 5 VcCDA-BsPdaA	253
Figura 13.1-2 Solapamiento cebadores <i>loop</i> 5 VcCDA-BsPdaA.....	254

Figura 13.1-3 Esquema protocolo de introducción de casete para la creación de los mutantes de segunda generación 256

Figura 13.2- 1 Cromatogramas calibración de la columna GFC preparativa Superdex200..... 266

Figura 13.2-2 Recta patrón de calibración de la columna de GFC 267

Figura 13.3-1 Esquema de microplaca para el ensayo actividad específica 269

Figura 13.3-2 Esquema de microplaca para el ensayo de caracterización M&M 271

Figura 13.9-1 *Marker III* ADN 290

Listado de Tablas

4. Listado de tablas

Tabla 7.2-1 Comparación de métodos de ingeniería de proteínas	54
Tabla 7.6-2 Principales aplicaciones de los quitosanos	65
Tabla 7.7-1 Parámetros cinéticos de la caracterización de VcCDA	82
Tabla 10.1-1 Tabla de resultados de la purificación de patrones	106
Tabla 10.1-2 Condiciones optimizadas HPLC	111
Tabla 10.1-3 Condiciones optimizadas detección MS.....	113
Tabla 10.1-4 Validación del método analítico para el di-, tri y tetrasacárido monodesacetilado	114
Tabla 10.1-5 Validación del método analítico global para el di-, tri y tetrasacárido monodesacetilado intercalando muestras reales.....	116
Tabla 10.2-1 Parámetros cinéticos de la caracterización de VcCDA FL.....	129
Tabla 10.2-2 Miembros de la familia CE4 con módulos de unión a carbohidratos	136
Tabla 10.2-3 Parámetros calculados para los constructos de VcCDA	142
Tabla 10.2-4 Parámetros cinéticos de la caracterización de VcCDA CD comparados con VcCDA FL	153
Tabla 10.3-1 Parámetros calculados para la VcCDA FL P193C/N273C	162
Tabla 10.3-2 Resultados de la titulación de cisteínas para la VcCDA FL y P193C/N273C.....	166
Tabla 10.3-3 Parámetros cinéticos de la caracterización de VcCDA FL P193C/N273C comparados con los de la VcCDA WT FL	167
Tabla 10.3-4 Parámetros calculados para la VcCDA L5-BsPdaA.....	171
Tabla 10.3-5 Velocidades específicas para VcCDA WT FL y VcCDA L5-BsPdaA	176
Tabla 10.4-1 Parámetros calculados para los constructos de segunda generación	182
Tabla 10.4-2 Resumen de purificación de los mutates de segunda generación.	187
Tabla 10.4-3 Comparación de T_m en los mutantes de segunda generación.....	189
Tabla 10.4-4 Parámetros cinéticos de la caracterización de los mutantes de segunda generación	192
Tabla 10.4-5 Patrón de desacetilación de los mutantes de segunda generación	195
Table Article 1-1 Positive hits for glycosynthase activity from the saturation library at position 134	213
Table Article 1-2 Kinetic parameter for the glycosynthase mutants.....	214
Table Article 2-1 Kinetic parameters of glycosynthase activity	229
Table Article 2-2 Enzymatic polymerization by E134D an E134S glycosynthase mutants.....	231
Tabla 13.1- 1 Cebadores aislamiento CD de VcCDA.....	251
Tabla 13.1- 2 Programa PCR aislamiento CD de VcCDA.....	251
Tabla 13.1- 3 Cebadores doble mutación P193C/N273C en VcCDA FL.....	252
Tabla 13.1- 4 Programa PCR <i>Quick-Change</i> para la mutación P193C/N273C	252
Tabla 13.1- 5 Cebadores intercambio de <i>loop 5 BsPdaA-VcCDA</i>	254
Tabla 13.1- 6 Programa 1ª PCR eliminación/inserción <i>loop 5 BsPdaA-VcCDA</i>	254
Tabla 13.1- 7 Programa 2ª PCR de ligación <i>loop 5 BsPdaA-VcCDA</i>	255
Tabla 13.1- 8 Cebadores para la creación de los mutantes de segunda generación	257
Tabla 13.1- 9 Programa 1ª PCR eliminación <i>loop 5 VcCDA</i>	257
Tabla 13.1- 10 Programa 2ª PCR adición de casete <i>loop 5</i>	258
Tabla 13.1- 11 Programa 3ª PCR fusión de gen en mutantes de segunda generación	258
Tabla 13.1- 12 Cebadores T7	258
Tabla 13.1- 13 Programa 4ª PCR amplificación de producto de unión de mutantes de segunda generación.....	259

Tabla 13.1- 14 Cebadores mutagénicos D39S para la inactivación de VcCDA.....	259
Tabla 13.1- 15 Programa PCR <i>Quick-Change</i> para la mutación D39S.....	260
Tabla 13.2- 1 Calibración GFC superdex200.....	266
Tabla 13.2- 2 Calibración GFC superdex200 volúmenes de elución	267
Tabla 13.3- 1 Preparación de una reacción enzimática de actividad específica	269
Tabla 13.3- 2 Preparación de una reacción enzimática de caracterización M&M.....	270
Tabla 13.9-1 Solución M medio autoinducción.....	283
Tabla 13.9-2 Solución 5052 medio autoinducción	284
Tabla 13.9-3 Solución MgSO ₄ medio autoinducción	284
Tabla 13.9- 4 Cebadores T7.....	291
Tabla 13.9- 5 Preparación reacción de digestión de ADN	292
Tabla 13.9- 6 Preparación reacción de ligación de ADN con extremos cohesivos.....	293
Tabla 13.10- 1 Preparación gel SDS-PAGE.....	294

Listado de Ecuaciones

5. Listado de ecuaciones

Ecuación 1 Ecuación de Michaelis-Menten	81
Ecuación 2 Ecuación de Hill / alostérica sigmoidal	81
Ecuación 3 Ecuación de la recta de calibración columna GFC preparativa	267
Ecuación 4 Ecuación Sigmoidal de Boltzmann para el cálculo de la T_m	281

Abreviaturas

6. Abreviaturas

Abreviatura	Significado
[X]	Concentración del compuesto X
A	GlcNAc, En la notación de secuencias de oligosacáridos de quitina y quitosano
AcOMU	O-Acetyl Metilumbeliferona
AcN	Acetonitrilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
APCI	<i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i> – Ionización Química a Presión Atmosférica
BCA	<i>Bicinchoninic acid</i> - Ácido bicinchonínico
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> – Albúmina sérica bovina
CBM	<i>Carbohydrate Binding Module</i> – Módulo de unión a Carbohidratos
CD	<i>Catalytic Domain</i> – Dominio Catalítico
CE	<i>Carbohydrate esterases</i> – Esterasas de Carbohidratos
COS	<i>Chitosan Oligosaccharides</i> - Oligosacáridos de quitosano.
CV	Coefficiente de Variación
D	GlcN, En la notación de secuencias de oligosacáridos de quitosano
DA	<i>Degree of Acetylation</i> – Grado de acetilación
DP	<i>Degree of Polymerization</i> – Grado de polimerización
DPX	Quitooligosacárido con un DP con valor X
DPX(N)	Quitooligosacárido con un DP con valor X monodesacetilado
DSF	<i>Differential Scanning Fluorimetry</i> – Flurimetría de Escaneo Diferencial
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico)
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
ELSD	<i>Evaporative Light Scattering Detector</i> – Detector Evaporativo de Dispersión de Luz
ESI	<i>Electro Spray Ionization</i> – Ionización por electroespray
FL	<i>Full Length</i> – Tamaño Completo (aplicado a secuencia de proteínas)
GFC	<i>Gel Filtration Chromatography</i> – Cromatografía de Filtración en Gel
GH	<i>Glycosil Hydrolase</i> – Glicosil Hidrolasa

GlcN	Glucosamina
GlcNAc	N-acetil glucosamina
GT	<i>Glycosil Transferase</i> - Glicosil Transeferasa
HABA	<i>2-Hydroxy-4-aminobenzoic acid</i> – Ácido 2-Hidroxi-4-aminobenzoico
HILIC	<i>Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography</i> – Cromatografía Líquida de interacción Hidrofílica
HPLC	<i>High Performance Liquid chromatography</i> – Cromatografía Líquida de Alta Eficacia
HPSEC	<i>High Performance Size Exclusion Chromatography</i> – Cromatografía de Exclusión por Tamaño de Alto Rendimiento
IMAC	<i>Ionic Metal Affinity Chromatography</i> – Cromatografía de Afinidad por Ión Metálico
LB	Medio de cultivo Luria Bertani
M&M	Michaelis & Menten
MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization - Time Of Flight</i> – Desorción/Ionización por Láser asistido por matriz - Tiempo de vuelo
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i> – Sitio de Clonaje Múltiple
MS	<i>Mass Spectrometry</i> – Espectrometría de Masas
MS ²	<i>MS/MS</i>
MSD	<i>Mass Spectrum Detector</i> – Detector de Espectrometría de Masas
MU	Metilumbeliferona
Mw	<i>Molecular Weight</i> – Peso Molecular
MWCO	<i>Molecular Weight Cut Off</i> – Límite de exclusión por peso molecular
OD ₆₀₀	Densidad óptica a 600nm
ON	<i>Over Night</i> - durante una noche
PA	<i>Pattern of Acetylation</i> – Patrón de acetilación
paCOS	<i>Partially Acetylated Chitin Oligosaccharides</i> - Oligosacáridos de Quitina Parcialmente Acetilados
PB	<i>Phosphate Buffer</i> – Tampón fosfato
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i> – Tampón fosfato salino
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> – Reacción en cadena de la polimerasa
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PMSF	<i>phenylmethylsulfonyl fluoride</i> - fluoruro de fenilmetilsulfonilo

QC-PCR	<i>Quick Change Polymerase Chain Reaction</i>
RPM	Revoluciones Por Minuto
RT	<i>Room Temperature</i> - Temperatura ambiente, $\approx 25^{\circ}\text{C}$
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> – Dodecilsulfato de Sodio
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i> – Gel de electroforesis de Poliacrilamida y dodecilsulfato de sodio
SIM	<i>Single Ion Monitoring</i> – Monitorización de Ion Único
TAE	Tris Acético EDTA
TFA	<i>Trifluoroacetic Acid</i> – Ácido Trifluoroacético
T_m	<i>Melting temperature</i>
TSA	<i>Thermal Shift Assay</i> – Ensayo de Desplazamiento Térmico
UHPLC	<i>Ultra High Performance Liquid Chromatography</i> - Cromatografía Líquida de Muy Alta Eficacia
UPLC	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i> - Cromatografía Líquida de Ultra Eficacia
UV	Ultravioleta
v_0	Velocidad inicial
V_0	Volumen muerto (aplicado en la caracterización de columnas de filtración en gel)
V_e	Volumen de elución
VWD	<i>Variable Wavelength Detector</i> – Detector de Longitud de Onda Variable
WT	<i>Wild Type</i> – Versión Salvaje

Introducción

7. Introducción

7.1. Los enzimas

A pesar del rol básico de los enzimas en la fisiología celular, su manifestación objetiva no llegó hasta el siglo XIX con el nacimiento de la bioquímica como ciencia. Su descubrimiento se inicia en el año 1833, en Francia, Anselme Payen y Jean-François Persoz describieron una sustancia que era capaz de degradar el almidón en los germinados de granos de cebada. Sin embargo, no es hasta el año 1877 que aparece la palabra “Enzima” para definir a estas moléculas, enunciada por Frederick W. Kühne descubridor de la tripsina (Kühne, 1976). En el año 1926 con el aislamiento y la cristalización de la ureasa por James Sumner se aceptó que todos los enzimas eran proteínas al ver que el cristal estaba formado únicamente por sustancia proteica (Sumner, 1926). A pesar de los resultados, esta idea tardó unos años en ser ampliamente aceptada (Nelson, Lehninger, & Cox, 2008).

Los enzimas son los encargados de promover las conversiones que se realizan en el interior (y exterior) celular y además son los responsables del control de su metabolismo, permitiendo que reacciones no espontáneas se produzcan en condiciones biológicamente viables (Alberts et al., 2002). Los enzimas son los responsables de reducir la energía de activación de las reacciones químicas para que estas se puedan producir a temperaturas fisiológicas (Figura 7.1- 1).

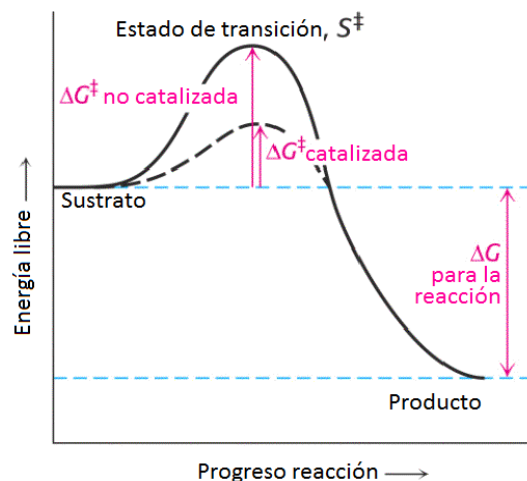


Figura 7.1- 1 Enzimas y energía de reacción

Esquema del papel que llevan a cabo los enzimas en la reducción de la energía de activación (ΔG^\ddagger) en las reacciones de conversión en las que participan. Adaptado de Berg, Tymoczko, & Stryer, 2002.

Los enzimas son las proteínas más remarcables y especializadas. Como catalizadores presentan una capacidad promotora que muchos catalizadores inorgánicos no son capaces de alcanzar (Nelson et al., 2008). Los enzimas aceleran reacciones por factores de un millón o incluso más (Berg et al., 2002).

Una de las características fundamentales para la actividad catalítica de los enzimas, es que estos proporcionan un ambiente determinado en el que se producen las reacciones, este ambiente es el sitio activo. En esta zona del enzima, las cadenas laterales de los aminoácidos permiten inmovilizar momentáneamente el sustrato y, al mismo tiempo, que la reacción catalizada llegue a término liberando al final el producto transformado. De ahí que la estructura tridimensional de

estas proteínas juegue un papel tan importante tanto en la afinidad como en sus propiedades catalíticas. Además de los propios aminoácidos otros elementos como cofactores metálicos y otros tipos de moléculas pueden tener un papel muy relevante en la catálisis.

El hecho de que los enzimas sean tan específicos y tan extraordinarios catalizadores se podría explicar mediante tres principios básicos relacionados con las interacciones enzima-sustrato y la presencia de grupos catalíticos específicos (Nelson et al., 2008):

- a) La reorganización de enlaces covalentes durante la reacción.
- b) La presencia de interacciones con los sustratos.
- c) La presencia de grupos funcionales clave y con un papel catalítico definido en el sitio activo.

El uso por parte del ser humano de los enzimas se remonta a los orígenes de la humanidad. Existen ejemplos de la aplicación histórica de estas biomoléculas como pueden ser la producción de ciertos alimentos y bebidas, o como el curtido de pieles. Por supuesto, este uso era absolutamente inconsciente. Se podría considerar que la primera evidencia de que los enzimas tenían una gran importancia industrial la dieron los hermanos Hans y Eduard Buchner, los cuales describieron en el año 1897 la obtención de etanol a partir de glucosa y extracto de levadura (Buchner, 1897; Polaina & MacCabe, 2007). Este descubrimiento puso punto y final a la teoría vitalista propuesta por Louis Pasteur en 1850, donde se postulaba que la capacidad de producir alcohol por las levaduras era debido a la presencia de “fermentos” que no eran separables de la estructura de levaduras vivas (Nelson et al., 2008).

Existen diferentes aspectos de los enzimas que han atraído la atención de la ingeniería de procesos hacia estos biocatalizadores:

- a) Un alto grado de especificidad por sus sustratos
- b) Una gran capacidad catalizadora
- c) Capacidad de acelerar reacciones en condiciones de temperatura y pH muy suaves, y en medio acuoso.

Al igual que muchos otros aspectos científicos, tecnológicos y sociales, el uso de enzimas sufrió una impresionante evolución a lo largo de la historia. En sus comienzos, el aporte de catalización biológica a transformaciones controladas por el ser humano dependía del crecimiento espontáneo de microorganismos o la adición de preparaciones a partir de cuajos o extractos de origen generalmente animal. Posteriormente, la posibilidad de aislar microorganismos mediante técnicas de cultivo microbiológico, permitió un mayor control sobre la naturaleza de los catalizadores incorporados. Este control alcanzó un nivel superior con la capacidad de purificar los enzimas presentes en estas cepas aisladas y con la aparición de las técnicas de ADN recombinante. Esta capacidad de aislamiento y purificación permitió la búsqueda de aquellos enzimas cuyas propiedades se acercaban más a las necesidades de la transformación o proceso en el que se querían aplicar. Con la clonación de los genes involucrados y el avance en el conocimiento estructural y funcional de los enzimas se dio un paso más en la carrera de estos biocatalizadores como herramientas comunes en la producción de compuestos. El nacimiento de la ingeniería

enzimática se convirtió en un hito de la biotecnología, con la consecución de la capacidad de modificar los enzimas para obtener de ellos propiedades que antes no tenían o mejorar las ya presentes, se empezó a vislumbrar un futuro en los que los enzimas podrían ser adaptados a cualquier situación y objetivo. Este gran avance ha permitido la aplicación de enzimas en procesos que necesitan actividades no presentes en la naturaleza o que estando presentes, no han sido todavía descubiertas.

En la optimización de procesos productivos, generalmente, se busca alcanzar unas condiciones de reacción suaves con temperaturas lo más próximas a la ambiente, este hecho permite una reducción considerable de los costes energéticos globales, sin embargo estas condiciones pueden suponer una baja solubilidad de compuestos u otros inconvenientes. Paralelamente, el estudio de microorganismos extremófilos ha permitido identificar una gran cantidad de nuevas herramientas enzimáticas capaces de actuar en condiciones que serían inviables para enzimas aislados de organismos mesófilos. Así se ha conseguido disponer de biocatalizadores capaces de actuar en un amplio espectro de temperaturas y disolventes, lo cual facilita la disolución de los sustratos y el control de otras propiedades. Por ejemplo, una de los enzimas que supuso un gran salto en las aplicaciones y eficiencia de la PCR fue la *Taq* Polimerasa descubierta en la bacteria *Thermus aquaticus* (Chien, Edgar, & Trela, 1976), que fue aislada en fuentes termales a más de 75°C (Brock & Freeze, 1969). A su vez, se ha encontrado que los enzimas obtenidos de microorganismos termófilos desarrollan una mayor resistencia a sustancias desnaturizantes, como pueden ser los propios disolventes orgánicos (de Miguel Bouzas, Barros-Velázquez, & Villa, 2006). Generalmente las altas temperaturas en procesos químicos favorecen la difusión de los compuestos, se reduce la viscosidad, permiten obtener unas tasas de reacción más elevadas y unos mejores rendimientos (Haki, 2003). Algunos de los enzimas termófilos que son utilizados en la industria son: amilasas, proteasas, lipasas, xilanasas, pululanasa, etc.(de Miguel Bouzas et al., 2006).

La implicación de los enzimas en la industria podría diferenciarse en dos vías, una en la que el enzima ya es el producto final y otra en la que el enzima actúa en algún paso de procesado del producto. A su vez existe otra diferenciación en cuanto a su producción: los de bajo valor añadido y comercializados a granel, *bulk enzymes*, y aquellos que son un producto con un alto valor añadido. Generalmente, estos últimos son aplicados en fines biomédicos, terapéuticos o científicos, como es el caso de las ya comentadas polimerasas. Estas proteínas necesitan cumplir unos requisitos de pureza, actividad y trazabilidad muy elevados. Generalmente, su producción no puede realizarse a gran escala y los rendimientos obtenidos son muy bajos, por lo que su precio en el mercado por kg puede llegar a ser hasta 8 órdenes de magnitud superiores a aquellos producidos a gran escala (Figura 7.1- 2)(Dwyer, 1984).

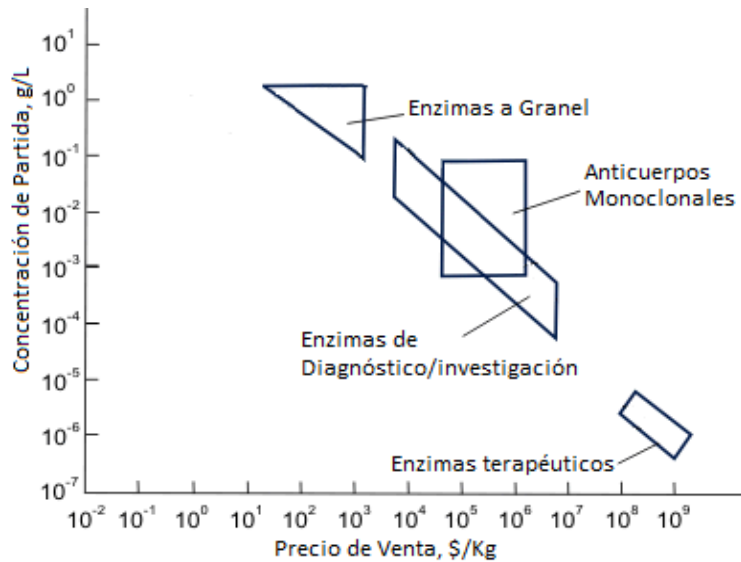


Figura 7.1- 2 Relevancia económica de los enzimas

Gráfico en el que se muestra el precio de los diferentes tipos de enzimas según su mercado final y la concentración en el medio de partida. Adaptado de Dwyer et al. (Dwyer, 1984).

Como ya se ha comentado, los enzimas no son solo el producto final de un proceso industrial, sino que también pueden formar parte de un proceso industrial por sí mismos. Algunas de las industrias que utilizan a los enzimas en alguno de los pasos de fabricación de sus productos son: la energética (obtención de azúcares fermentables para la producción de etanol), la industria textil (tratamientos del algodón, *desizing*, efectos de lavado a la piedra...), la alimentaria (eliminación de ácidos grasos *trans*, eliminación de fosfolípidos de aceites vegetales), la química (aplicación en gran variedad de procesos sintéticos de compuestos orgánicos), etc. (Kirk, Borchert, & Fuglsang, 2002).

Sin embargo, no todos los enzimas son idóneos para su utilización en procesos industriales. Por ejemplo, algunos enzimas además del sustrato sobre el que actuar necesitan la adición de cofactores u otras sustancias (como iones metálicos) al medio de reacción. Este tipo de necesidades especiales de los enzimas encarecen en tal magnitud el proceso que incluso pueden llegar a hacerlo inviable económicamente.

7.2. Ingeniería enzimática

Desde que las teorías creacionistas empezaron a ser sobrepasadas por otras que eliminaban el concepto estático de los organismos invariables, como la teoría Transformista de Jean Baptiste Lamarck (Lamarck, 1809) o la teoría evolucionista de Charles Darwin, plasmada en su obra *El origen de las especies por medio de la selección natural (On the origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life)* en el año 1859 (Darwin, 1859), ya se empezaba a vislumbrar la presencia de una optimización natural de los organismos. Este tipo de ideas culminaron con la aparición de las Teorías Sintéticas Modernas en las que se combinan conceptos Darwinistas como la evolución mediante selección natural con elementos de la genética (los genes, la mutación, teoría de poblaciones...). A partir de los pioneros resultados en el clonaje de genes de los investigadores Herbert Boyer y Stanley Cohen a principios

de los años 70 (Cohen, Chang, Boyer, & Helling, 1973), la era de la modificación y mejora de enzimas vio la luz. Alcanzado el punto en el que se conoce que los enzimas están codificados en elementos básicos, los genes, y que estos pueden ser clonados y modificados mediante mutaciones y su actividad podía ser evaluada, no tardaron en dibujarse teorías y procedimientos para aplicar cambios concretos a los enzimas y optimizar su actividad más allá de lo que la selección natural dictaba.

La aplicación de enzimas en procesos industriales y otros usos, suelen necesitar propiedades que normalmente no se encuentran en organismos aislados de su medio natural. Sin la intervención humana los enzimas ya han sufrido un proceso exhaustivo de optimización: la selección natural. Pero los ingenieros enzimáticos buscan proteínas con alta estabilidad en las condiciones en las que se va a dar el proceso de transformación y una alta actividad catalítica para sustratos no naturales (Schmidt-Dannert & Arnold, 1999).

Por algunos, la ingeniería de proteínas está considerada como una subdisciplina dentro de la ingeniería genética. La característica definitoria de la ingeniería enzimática es que el producto final es una proteína con una secuencia nueva (o modificada) y no un organismo vivo. Dado que las proteínas no pueden reproducirse, muchas de las preocupaciones y prejuicios generados por los microorganismos modificados genéticamente no son aplicables en la ingeniería de proteínas. En este aspecto, las proteínas modificadas mediante ingeniería se parece más a nuevos compuesto químicos de fuentes no biológicas pero que, por su misma naturaleza son fácilmente biodegradables (aunque haya que tener en cuenta otros aspectos de seguridad y toxicidad) (Rubingh & Grayling, 2010).

Para obtener las propiedades deseadas de los enzimas hay dos procedimientos o filosofías de actuación dentro del área de la ingeniería enzimática: el diseño racional y la evolución dirigida. Estas dos alternativas no son incompatibles ya que ambas pueden cooperar en estrategias denominadas combinatorias o semiracionales. En los últimos 40 años se ha llegado al punto en el que es posible desarrollar mediante ingeniería casi cualquier propiedad para la cual exista un método adecuado de análisis o cribado (Rubingh & Grayling, 2010).

El diseño racional es, de los dos protocolos básicos de optimización de enzimas, el primero en aparecer (Chica, Doucet, & Pelletier, 2005), y fue aplicado para la modificación de la especificidad de ciertos enzimas (Craik et al., 1985). Se fundamenta en la realización de mutantes concretos bajo la hipótesis de que esas mutaciones van a determinar una mejora de sus propiedades o una nueva actividad. Sin embargo para realizar este tipo de estrategias se necesita un conocimiento en profundidad de la estructura, del mecanismo catalítico, de su regulación, de las similitudes con otros enzimas emparentados... (Rubingh, 1997). En definitiva cuanto mayor sea el volumen de información sobre la proteína de partida mayores son las probabilidades de éxito. Hoy en día, con el uso de la bioinformática y el incremento de la capacidad de cálculo de las computadoras utilizadas, se ha permitido la generación de hipótesis cada vez más precisas (Pokala & Handel, 2001).

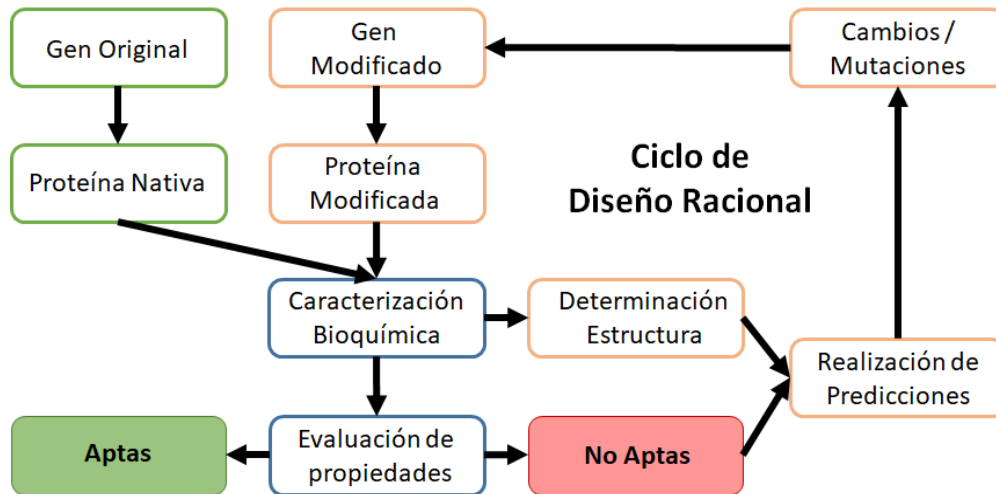


Figura 7.2-3 Esquema de un protocolo de diseño racional de enzimas

Pasos generales de un protocolo de diseño racional de un enzima. Se parte de un gen de interés del que se analizan sus propiedades bioquímicas, si no son aptas se realizan una serie de predicciones en base a la información disponible que conducen a la creación de un mutante bajo esas hipótesis. Esta nueva versión es testada para comprobar si cumple los requerimientos. Inspirado en Rubingh et al (Rubingh & Grayling, 2010).

Por lo general, este tipo de estrategias requieren un esfuerzo en la planificación elevado y los resultados no siempre son los esperados. En los casos en los que la relación entre la estructura y la función indican de manera obvia las modificaciones a realizar, los resultados son excepcionales. Incluso dentro del diseño racional se pueden considerar procedimientos basados en el acoplamiento de módulos enzimáticos sin alterar sus secuencias internas con el fin de combinar sus propiedades y así generar nuevas organizaciones estructurales. Sin embargo cuando la procura de una nueva función no se extrae de manera trivial de la observación de la estructura los resultados no siempre son satisfactorios. Esto se debe a que, a pesar del conocimiento acumulado, hay una gran cantidad de parámetros que todavía no son controlables, como pueden ser el plegamiento de las proteínas, establecimiento de interacciones estabilizantes del sustrato, problemas de expresión.

Más allá de esta problemática los éxitos conseguidos utilizando el diseño racional se han convertido en pasos de gigante a la hora de desenmascarar las posibilidades de la ingeniería enzimática. El poder obtener enzimas que han sido mejorados a partir de una hipótesis de modificación sólida permiten el demostrar muchos principios que, de otro modo, no hubiese sido posible.

La otra opción es la Evolución Dirigida. En este procedimiento no es necesario un conocimiento profundo de la estructura proteína con la que se va a trabajar, sin embargo, aunque no es un requisito sí que puede facilitar el diseño de los experimentos. En la evolución dirigida se trata de reproducir lo que ocurre de modo espontáneo con la selección natural en los organismos vivos en el medio ambiente, pero en este caso en el laboratorio y con una escala temporal mucho más reducida.

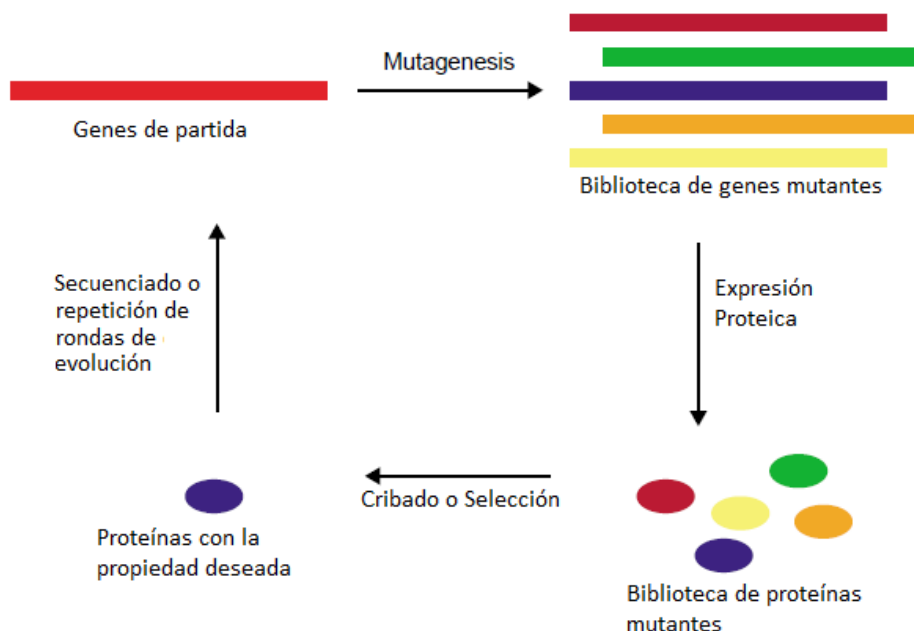


Figura 7.2-4 Esquema de un protocolo de evolución dirigida

Pasos generales de un protocolo de evolución dirigida. Se parte de un gen de interés del que se genera una biblioteca de genes mutantes que son expresados para obtener una biblioteca de proteínas mutantes que son cribadas o seleccionadas en base a alguna propiedad que presenten. Esto se puede continuar con más rondas de evolución o caracterizando el mutante obtenido. Adaptado de Tao et al. (Tao & Cornish, 2002).

La evolución dirigida podría considerarse como una rama dentro de los estudios de genética inversa, concepto enfrentado a los estudios de genética clásica. La genética clásica busca mutantes a partir de observaciones fenotípicas dentro de las poblaciones naturales, para luego determinar el gen que causa esta mutación, de este modo se puede relacionar el gen modificado con una función. En la genética inversa el procedimiento de estudio es exactamente el opuesto, se generan mutaciones en un determinado gen y viendo el fenotipo generado se pueden obtener las relaciones gen-función. Algo similar ocurre en la obtención de enzimas con nuevas características o propiedades a través de la evolución dirigida, como se muestra en la Figura 7.2-5. La aproximación clásica para la obtención de nuevos enzimas se fundamenta en la búsqueda en nuevos organismos aislados, así, la diversidad de estos enzimas es la naturalmente generada por medio de la selección natural como fuerza de cambio. En la evolución dirigida, la diversidad se crea artificialmente por métodos de ingeniería genética y la selección se obtiene mediante la introducción de una presión selectiva también artificial. Este proceso permitirá obtener como resultado mutantes cuyas propiedades son las adecuadas para llevar a cabo una actividad concreta consecuencia de las fuerzas evolutivas introducidas por el investigador.

En todo proceso de evolución dirigida es necesario tener en cuenta cuatro elementos básicos:

- Selección de la proteína o familia de proteínas de partida.
- Selección de un método de generación de variabilidad.
- Disposición de un método de selección o cribado robusto.
- Tamaño de la biblioteca de mutantes

Los parámetros realmente determinantes son los tres primeros, mientras que el tamaño de la biblioteca viene definido por los tres anteriores, aunque eso no le resta importancia.

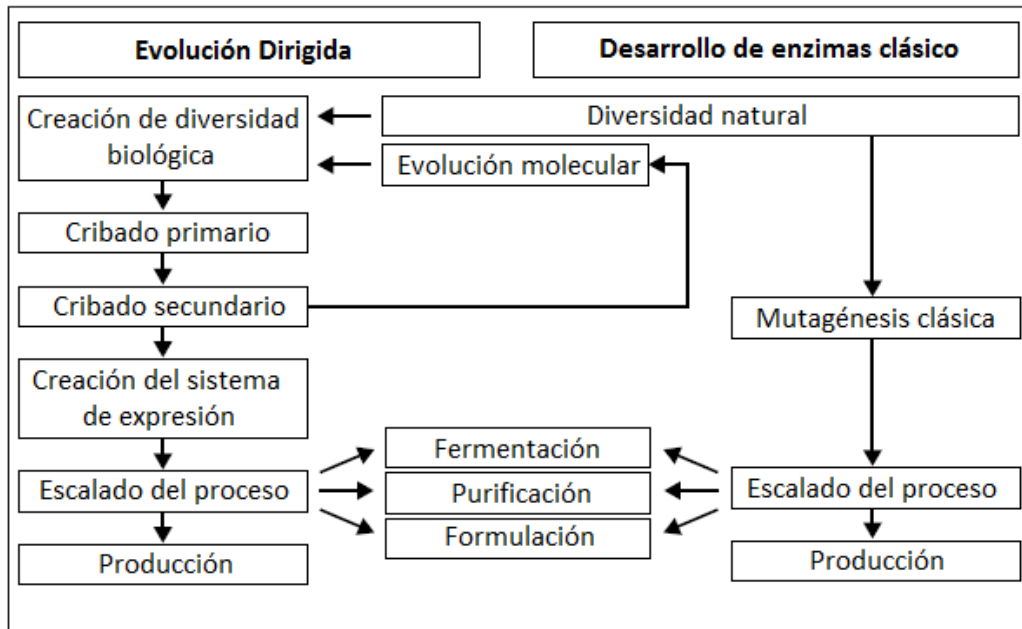


Figura 7.2- 5 Evolución dirigida vs Desarrollo clásico de enzimas

Representación esquemática de los pasos que dan en el desarrollo de enzimas en la actualidad en comparación con el desarrollo clásico de enzimas para producción industrial. Adaptado de Kirk et al. (Kirk et al., 2002).

La selección de la proteína o familia de proteínas de partida es el primer elemento relevante y el que va a condicionar todos los demás. Si solo disponemos de un enzima y queremos mejorar sus propiedades, las técnicas de generación de variabilidad van a ser primordialmente aquellas que introducen mutaciones en el gen. Por el contrario, si disponemos de un conjunto de enzimas emparentados cuyas propiedades queremos combinar, los métodos de generación de variabilidad serán esencialmente aquellos que tienen como base la generación de quimeras por recombinación. Por otro lado, no todas las enzimas presentan el mismo tipo de actividad ni van a ser optimizados hacia las mismas metas, de este modo, el enzima de partida también va a dictaminar cual va a ser el ensayo de medición de actividad que nos permitirá identificar a los mejores mutantes dentro de la población.

El segundo elemento clave es la generación de la variabilidad. En la naturaleza, la variabilidad se genera debido a errores introducidos por las polimerasas en la etapa de replicación del ADN. Debido a que las polimerasas presentan tasas de error ínfimas (p.e 1 base por billón de bases replicadas (Ratray & Strathern, 2003), la aparición de mutantes es esporádica, impedida además por mecanismos de reparación y corrección del ADN, de ahí que la evolución natural necesite una escala temporal tan larga. Como ya se ha explicado, generalmente hay dos formas básicas de generación de la diversidad: por recombinación y por mutación. De cada una de estas dos estrategias han surgido múltiples protocolos para la obtención de los mutantes o quimeras. La selección de un protocolo u otro dentro de las diferentes variedades no es una decisión simple, este paso va a ser el que dicte cual es el tamaño de la biblioteca de mutantes a ser testada. En la mayoría de los casos las bibliotecas se encuentran entre 10^3 - 10^6 mutantes (Reetz, Kahakeaw, & Lohmer, 2008), pero aun así no se cubre el espacio de secuencia de una proteína. El espacio de secuencia es el total de posibles combinaciones de aminoácidos para un determinado tamaño de proteína. Por ejemplo, si se quisiese hacer una mutagénesis al azar cubriendo todo el espacio de secuencia de una proteína de 300 aminoácidos de longitud, el número total de mutantes sería de

20^{300} , siendo este número mayor que el total de átomos del universo (Morley & Kazlauskas, 2005), por lo que es imposible de trabajar. Sin embargo, tampoco interesa cubrir todo el espacio de secuencia, ya que solo aquellas proteínas con un alto grado de similitud con la original podrán presentar una actividad similar a la de partida.

El último elemento determinante en la evolución dirigida es el método que diferencie entre mutantes mejorados y aquellos que no lo son. Hay dos tipos ensayos básicos: los de selección y los de cribado. En la selección, solo aquellos microorganismos que han sido transformados con una proteína de función mejorada son capaces de sobrevivir. Son los ensayos más fáciles de interpretar, pero su aplicación es muy reducida, un ejemplo de esto sería la resistencia a algún tipo de compuesto tóxico. El otro procedimiento es el cribado, *screening* en inglés, en el que se utiliza algún ensayo en el que se puede medir la actividad del enzima y asignarles un valor y así poder seleccionar a los mejores. En este caso no se trata de supervivencia-no supervivencia, se trata de tener una herramienta objetiva de selección de los mutantes que superan un nivel de actividad mayor que el umbral determinado por la proteína WT. Esta etapa también condiciona el tamaño de la biblioteca ya que, por ejemplo, si los sustratos son difíciles de conseguir, el protocolo de medición de la actividad es muy elaborado o no hay posibilidad de la automatización del experimento el hipotético tamaño de la librería se reduce frente las condiciones opuestas (sustrato accesible y barato, ensayo simple y alta capacidad de automatización).

Los protocolos de evolución dirigida se podrían considerar que tienen una meta difusa. El objetivo simple es la mejora de un enzima, pero esta mejora puede alcanzarse en un único paso o no. Si en el primer experimento no se consigue la mejora deseada se puede repetir el proceso sobre la proteína seleccionada como ganadora de la primera ronda de evolución. De este modo se puede entrar en una iteración o combinación de procesos (como se muestra en la Figura 7.2-4) hasta que se alcanza un valor considerado como suficiente por el investigador. Es muy probable que esta no sea la proteína óptima, sobre todo si se recuerda lo mencionado sobre el espacio de secuencia de una proteína, pero si relativizamos el éxito al esfuerzo invertido en el proceso, la consecución del enzima óptimo no tiene por qué ser necesaria (Nov, 2012).

De la mezcla del diseño racional y la evolución dirigida surgen las aproximaciones combinatorias o semiracionales. En este tipo de procesos se buscan zonas concretas del enzima que tengan una gran importancia catalítica o estructural y sobre ellas se realizan, generalmente, procedimientos de mutagénesis de saturación. Un grupo de mutantes de saturación es aquel en que se encuentran los 20 aminoácidos sustituyendo el residuo de una determinada posición. Como en el diseño racional, aquí se necesita un conocimiento pormenorizado de la proteína para la determinación de zonas calientes (*Hot Spots*) pero en el apartado práctico-experimental se observa una gran similitud con la evolución dirigida. Al saturar las posiciones relevantes se genera un número relativamente elevado de mutantes (no tanto como en la mutagénesis al azar) por lo que es necesaria la construcción de bibliotecas y continúan siendo vigentes, por lo tanto, los tres últimos elementos vitales de la evolución dirigida el método de aleatorización, el método de selección y el tamaño de las bibliotecas.

Los tres procesos sufren un desarrollo similar: primero la generación de los genes mutantes candidatos, su inclusión en un vector de expresión, posteriormente se transforman el microorganismo de expresión con la librería de genes mutantes, se obtienen las proteínas mutantes y se realizan los ensayos pertinentes para la selección de los mejores mutantes (Kaur & Sharma,

2006). Pero como ya se ha visto, más allá de este esquema general se presentan otros parámetros que aportan unas ventajas o desventajas como se resumen en la Tabla 7.2-1.

	Diseño racional	Evolución dirigida	Aproximación semiracional
Ventajas	<ul style="list-style-type: none"> · nº reducido de mutantes. · Conocimiento de los efectos concretos del mutante. · Menor esfuerzo experimental. 	<ul style="list-style-type: none"> · Se explora la totalidad del enzima. · Reducida información del enzima. · Aplicación directa de iteraciones. · Diversidad protocolos de generación de diversidad. 	<ul style="list-style-type: none"> · Combinación de evolución dirigida y diseño racional. · nº de mutantes intermedio. · Bibliotecas de tamaño medio · Aplicación directa de iteraciones (generalmente). · Diversidad protocolos de generación de diversidad.
Desventajas	<ul style="list-style-type: none"> · Necesidad de conocimientos previos. · No se exploran posiciones fuera de zonas delimitadas. · No se pueden aplicar iteraciones directamente. 	<ul style="list-style-type: none"> · Elevado nº de mutantes. · Alto esfuerzo experimental · Bibliotecas de gran tamaño. 	<ul style="list-style-type: none"> · No se explora todo el enzima. · Conocimientos previos. · Cierta esfuerzo experimental.

Tabla 7.2-1 Comparación de métodos de ingeniería de proteínas

Cuadro resumen de las ventajas y desventajas de los procedimientos de optimización enzimática presentados: Diseño racional, evolución dirigida y aproximaciones semiracionales.

7.3. Presentación de los enzimas

El objetivo general de esta tesis es la ingeniería enzimática de dos familias de enzimas para aplicaciones de biocatálisis. El trabajo involucra a dos enzimas de origen y actividad muy diferenciadas. Por un lado la *endo*-1,3-1,4- β -Glucanasa, o liquenasa, de *Bacillus licheniformis* (EC 3.2.1.73) y por otro lado la quitin-oligosacárido desacetilasas de *Vibrio cholerae* (también conocida como COD o VcCDA, EC 3.5.1.41). Primero se hará una breve presentación de la β -glucanasa, de la cual los resultados obtenidos serán presentados a modo de artículos ya publicados (Capítulo 2). Por otro lado se presentará la desacetilasa la cual supone un mayor porcentaje del trabajo realizado (Capítulo 1).

En ambos casos se han realizado procedimiento de ingeniería enzimática, sin embargo el enfoque utilizado ha variado de un caso al otro. Por un lado la β -Glucanasa ha sido sometida a un proceso mejora semirracional y la desacetilasa mediante un proceso puramente racional.

7.4. La Clasificación CAZy

La plataforma CAZy (<http://www.cazy.org>) es una base de datos curada, la cual clasifica sistemáticamente información sobre una gran variedad de enzimas que ensamblan, modifican y rompen carbohidratos y glucoconjugados. A este conjunto de enzimas se les ha denominado *CAZymes* haciendo referencia a "*Carbohydrate Active Enzymes*" o enzimas activos sobre carbohidratos. El sistema de clasificación que utiliza esta base de datos se fundamenta en la

similitud de secuencia y la presencia de *fold*s comunes dentro de sus estructuras. Este tipo de clasificación conlleva un mejor reflejo de los mecanismos enzimáticos, *fold*s y características estructurales que aquellas clasificaciones basadas solo en la especificidad por sustratos (Vincent Lombard, Golaconda Ramulu, Drula, Coutinho, & Henrissat, 2014; Nakamura, Nascimento, & Polikarpov, 2017).

Dentro de esta base de datos podemos encontrar enzimas clasificados en cinco grandes clases:

1. Glicosil Hidrolasas (GHs): realizan la rotura o reorganización de los enlaces glicosídicos. Incluye 145 familias.
2. Glicosiltransferasas (GTs): realizan la formación de enlaces glicosídicos. Incluye 103 familias.
3. Polisacárido liasas (PLs): realizan la escisión no hidrolítica de enlaces glicosídicos. Incluye 26 familias.
4. Esterasas de Carbohidratos (CEs): realizan la hidrólisis de ésteres de carbohidratos. Incluye 15 familias.
5. Actividades auxiliares (AAs): enzimas redox que actúan en conjunto con enzimas activos en carbohidratos. Incluye 13 familias.

Adicionalmente, los módulos de unión a carbohidratos (CBMs), que no muestran actividades catalíticas, están clasificados juntos dentro de otro grupo. En la actualidad hay definidas 81 familias de CBMs.

7.5. Las glicosintasas

Las glicosintasas son glicosil-hidrolasas modificadas mediante ingeniería enzimática para que desarrollen una actividad opuesta a su actividad natural. Por lo tanto, estos enzimas no existen naturalmente. Su descubrimiento se produjo simultáneamente en el año 1998 por dos grupos independientes de investigadores: el grupo de Withers trabajando sobre una *exo*-glicosidasa (Mackenzie, Wang, Warren, & Withers, 1998) y el grupo de Planas, Laboratorio de Bioquímica del Institut Químic de Sarrià, trabajando con una *endo*-glicosidasa (Malet & Planas, 1998). Desde su descubrimiento esta tecnología se ha aplicado a múltiples enzimas de diferente naturaleza (Planas, Faijes, & Codera, 2015; Shaikh & Withers, 2008).

Las glicosil-hidrolasas son los enzimas encargados del catabolismo de carbohidratos. Hay dos tipos básicos de estos enzimas en función del mecanismo catalítico: aquellas en las que la configuración del carbono anomérico del producto mantiene su configuración de partida, las denominadas *retaining glycoside hydrolases*; y aquellas en las que se invierte, conocidas como *inverting glycoside hydrolases* (Zechel & Withers, 2000). Estos dos mecanismos se ilustran en la Figura 7.5-1. En las glicosidasas con inversión de configuración hay dos grupos carboxilo catalíticos que actúan como ácido general y base general. La reacción se produce por medio de un único desplazamiento que involucra un estado de transición con la creación de un ion oxocarbenio (Figura 7.5-1a). En las glicosidasas con retención de configuración la reacción se produce mediante

un doble desplazamiento (Koshland, 1953), en el que en una primera fase, denominada glicosilación, se crea un intermediario enzima-sustrato mediante el ataque del carboxilo nucleofílico al sustrato con asistencia protónica del otro residuo carboxílico que actúa de ácido general, y en una segunda etapa, desglicosilación, la base conjugada del ácido general aumenta la nucleofilia de una molécula de agua que ataca el intermediario glicosil-enzima resultando en la liberación del producto de reacción (Figura 7.5-1b). Existe un tercer tipo siendo una variante de este último, consistente en “catálisis asistida por sustrato” que tiene lugar en algunas β -N-acetilhexosaminidasas (Figura 7.5-1c).

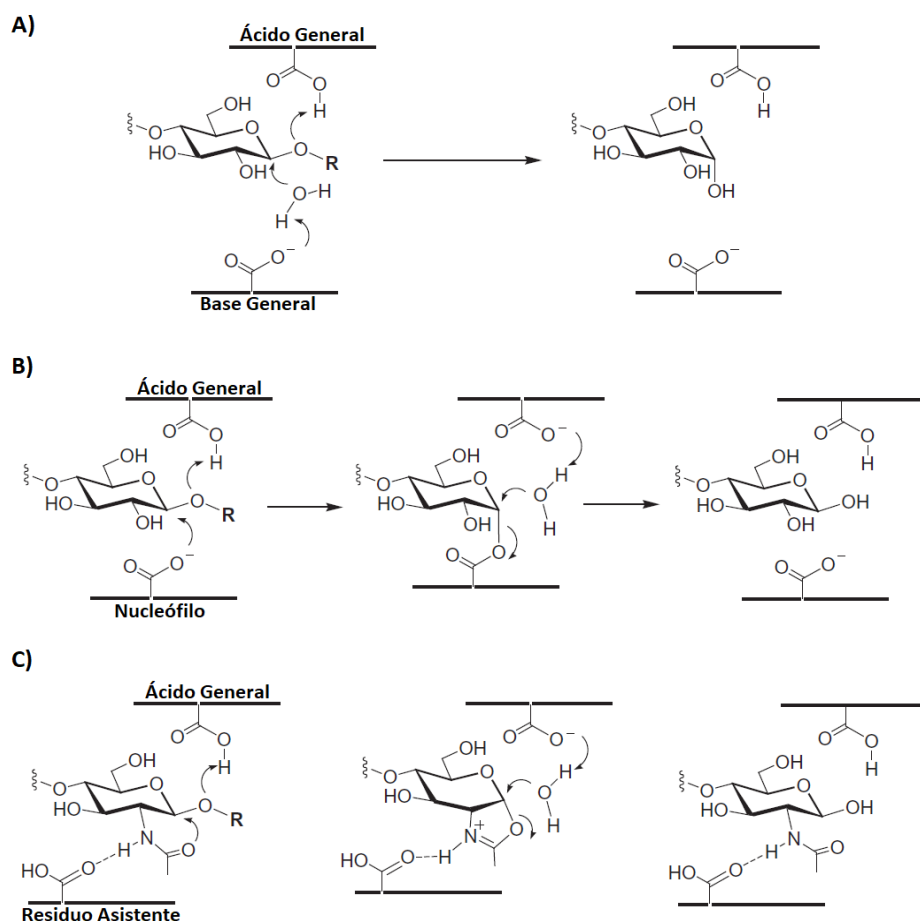


Figura 7.5-1 Mecanismos catalíticos de las glicosidasas

Mecanismos generales para glicosidasas del tipo *inverting* (A) y del tipo *retaining* (B) y una modificación del mecanismo de las *retaining* usado por β -N-Acetilhexosaminidasas (P). Adaptado de Planas et al. (Planas et al., 2015).

Las glicosintasas, propiamente dichas, son glicosil-hidrolasas con retención de configuración en las que el residuo que actúa como nucleófilo ha sido sustituido por uno inerte. Esto imposibilita la reacción hidrolítica, pero son capaces de catalizar significativamente la formación de enlaces glicosídicos a partir de sustratos activados. En la actualidad el término glicosintasa ha sido incorrectamente aplicado a otro tipo de glicosidasas como las *inverting* (Honda & Kitaoka, 2006) o las β -N-Acetilhexosaminidasas (Ohnuma et al., 2012). Estos nuevos enzimas con capacidad de formación de enlaces glicosídicos podrían denominarse “*glycosynthase like*” ya que, generalmente, en estos no se ha eliminado por completo la actividad hidrolítica del enzima original, algo que sí ocurre con las glicosintasas originales (Planas et al., 2015).

7.5.1. Mecanismo catalítico de las glicosintasas

El mecanismo catalítico de las glicosidasas ha sido ampliamente estudiado. Las glicosidasas con retención de configuración además de catalizar la reacción de hidrólisis del enlace glicosídico pueden catalizar la formación de los mismos en su versión salvaje. En función del sustrato utilizados existen dos rutas básicas mediante las cuales el enzima WT puede crear estos enlaces. Uno es el control termodinámico en el cual, sustratos no activados y los productos de transglicosilación se encuentran en equilibrio (Figura 7.5-2). Otra ruta más eficiente se ha denominado transglicosilación por control cinético, esta aproximación se sirve de sustratos activados, como pueden ser fluoruros de glicosilo, arilglicósidos, etc. Al disponer de un mejor grupo saliente se forma el intermediario de una forma más rápida por lo que se produce una acumulación del mismo. De este modo, se busca una captura más rápida del intermediario activado glicosil-enzima por el aceptor glicosídico que por la molécula de agua. Sin embargo estos dos métodos no aportan un gran rendimiento a la reacción, ya que los productos de este último mecanismo también son susceptibles de ser hidrolizados. Combinando estas estrategias con la ingeniería de los medios de reacción se ha llegado hasta rendimientos del 50% (Faijes et al., 2003).

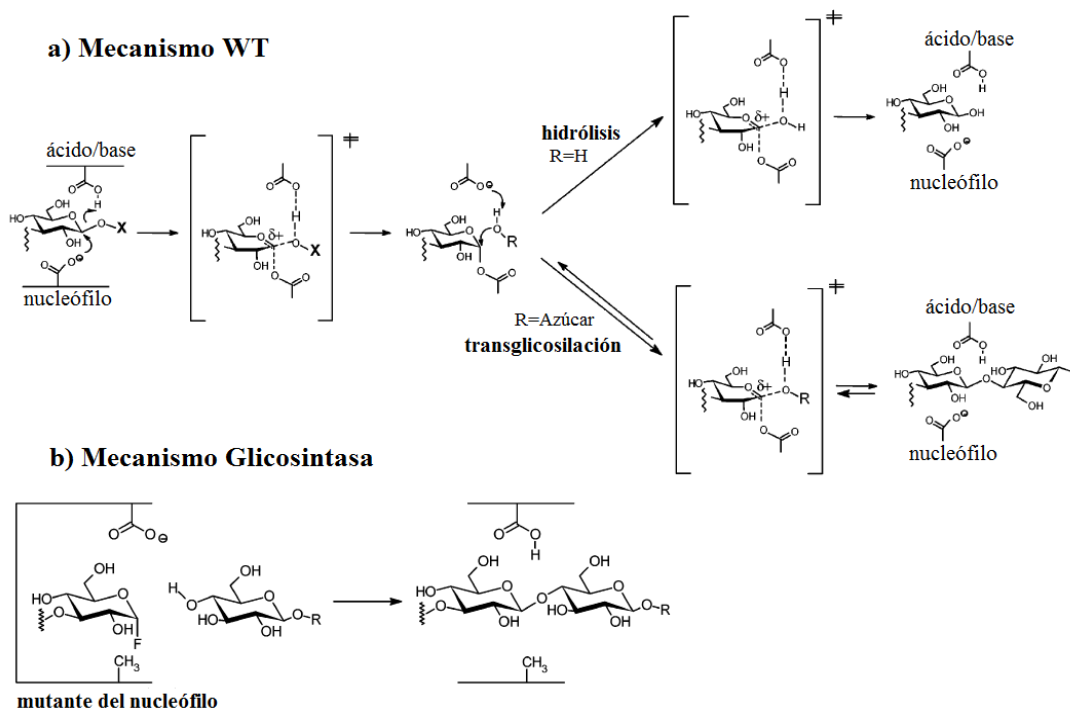


Figura 7.5-2 Mecanismos glicosidasa WT vs glicosintasa

a) Mecanismo de doble desplazamiento de una glicosidasa con retención de configuración, en la rama inferior del esquema se muestra la reacción de transglicosilación con un aceptor glicosídico. b) Mecanismo de transglicosilación de una glicosintasa por mutación del residuo nucleofílico. Adaptado de Faijes et al. (Faijes et al., 2003).

Sin embargo, con la aparición de los mutantes glicosintasa de las glicosidasas se modifica el mecanismo de reacción. En las glicosintasas se ha sustituido el residuo nucleofílico por uno que no tenga esta propiedad, de este modo se previene que la reacción hidrolítica se produzca, no es posible que se forme el intermediario glicosil-enzima. En este caso el sustrato es un fluoruro de glicosilo con una configuración del carbono anómero opuesta a la del sustrato natural (por ejemplo, un fluoruro de glicosilo en α para una β -glucosidasa), que imita la configuración que

adquiere el sustrato al formar el intermediario glicosil-enzima (Figura 7.5-2 a y b). Al eliminar el residuo que actúa como nucleófilo (generalmente glutamato) y sustituirlo con un menos voluminoso (como serina, alanina o glicina por ejemplo) se crea una cavidad de mayor tamaño que permite la entrada del nuevo sustrato sin impedimento en el sitio activo (Fajjes & Planas, 2007).

Los rendimientos de la transglicosilación mediada por glicosintasas son muy elevados puesto que el producto de reacción ya no es hidrolizado por el enzima. En el Laboratorio de Bioquímica del IQS se ha desarrollado esta tecnología en los últimos 20 años. Así, se ha conseguido aplicar a diversos enzimas para su uso como biocatalizadores. Para una revisión reciente ver Planas et al. 2015 (Planas et al., 2015).

7.5.2. La β -Glucanasa de *Bacillus licheniformis*

La *endo*-1,3-1,4- β -Glucanasa, o liquenasa, de *Bacillus licheniformis* (EC 3.2.1.73) es una de las glicosidasas modelo al ser la primera glicosintasa derivada de una *endo*-glicosidasa, y objeto de un amplio estudio en el Laboratorio de Bioquímica del IQS. Según la clasificación de la base de datos CAZy (*Carbohydrate Acting Enzymes*) este enzima pertenece a la familia GH16 de glicosil hidrolasas, caracterizadas por presentar una estructura *jellyroll β -sandwich* y ser glicosidasas con retención de configuración en las que tanto el ácido/base general y el nucleófilo son glutamatos. En este enzima en concreto, se corresponden con E138 (ácido/base) y E134 (nucleófilo) (Juncosa, Pons, Dot, Querol, & Planas, 1994).

La función natural de este enzima es la hidrólisis de beta-glucanos lineales con enlaces β -1,3 y β -1,4 como los presentes en los β -glucanos de cereales o los liquenanos. Presenta una especificidad estricta en el lugar de corte para enlaces glicosídicos β -1,4 en unidades 3-O-sustituidas en el polisacárido sustrato (Planas, 2000).

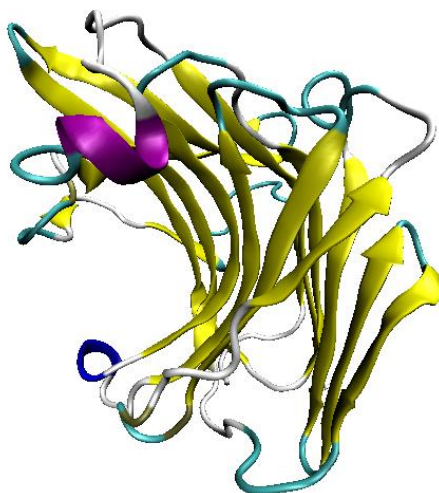


Figura 7.5-3 β -Glucanasa

Estructura cristalográfica de la *endo*-1,3-1,4- β -Glucanasa de *Bacillus licheniformis* (PDB: 1GBG) (Hahn, Pons, Planas, Querol, & Heinemann, 1995).

Esta β -glucanasa de *Bacillus licheniformis* al ser una *endo*-glicosidasa, presenta un sitio activo extendido como se puede observar en la Figura 7.5-3. El sitio activo está dividido en 6 subsitios: 4 hacia el extremo no reductor desde el punto de corte (lado del dador) y 2 hacia el extremo reductor, por lo tanto, en el lado del aceptor como se representa en la Figura 7.5-4 (Fajjes et al., 2003). Esta característica le permite aceptar polisacáridos más largos y complejos (Fajjes & Planas, 2007).

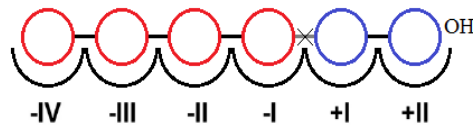


Figura 7.5-4 Subsitios β -glucanasa

Esquema de los subsitios presentes en el sitio activo de la endo-1,3-1,4- β -Glucanasa de *Bacillus licheniformis*.

De este enzima se han obtenido múltiples versiones glicosintasa sustituyendo el residuo nucleofílico por otros aminoácidos: E134A, E134S, E134G, E134C; siendo el más activo hasta la fecha el mutante de serina (Pérez, Fajjes, & Planas, 2011).

7.5.3. Los β -Glucanos naturales y artificiales

Los β -Glucanos naturales son polisacáridos sintetizados por plantas, algas, levaduras, hongos y bacterias. Están compuestos de unidades de D-glucosa unidas por enlaces β -1,3 y β -1,4 (Figura 7.5-5). Su principal función es estructural aunque también actúan como elementos de respuesta a daños. Oligosacáridos derivados de este tipo de compuestos presentan actividades biológicas en otros organismos como inmunomoduladores e incluso antitumorales (Pérez, Fajjes, & Planas, 2011). Su síntesis *in vivo* es realizada por glicosil-transferasas, pero estos enzimas presentan una gran dificultad en su purificación debido a que son generalmente transmembrana, de ahí que la aparición de las glicosintasas fuese un gran avance para obtener β -glucanos de gran pureza.

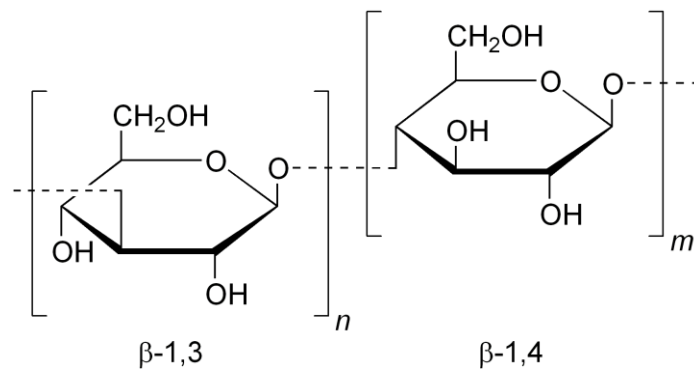


Figura 7.5-5 β -glucano

Estructura del β -1,3-1,4-glucano compuesto de unidades de D-glucosa unidas por enlaces β -1,3 y β -1,4.

La capacidad de este tipo de polímeros para formar hidrogeles los convierten en un biomaterial de gran interés debido a su biocompatibilidad. Sin embargo, los β -glucanos de origen natural no son fácilmente aplicables a procesos biomédicos debido a la heterogeneidad entre lotes y a la posible presencia de contaminantes o patógenos (Shaikh & Withers, 2008). Otra forma de abordar su obtención sería a través de la síntesis química de los mismos, pero el control de la estero y regio-especificidad en la formación del enlace glicosídico necesita unos requerimientos que son

difícilmente escalables (Hanson, Best, Bryan, & Wong, 2004). Con la aparición de la tecnología de las glicosintasas los problemas de los dos métodos de obtención anteriores parecen resueltos. Los glucanos obtenidos mediante síntesis enzimática presentan una gran pureza además de una alta homogeneidad. Por otro lado, controlando el número de unidades de que está compuesto el sustrato y la actividad del enzima se pueden llegar a obtener polímeros de alto peso molecular que muestran una microestructura determinada. Otro aspecto interesante es que este tipo de síntesis presenta rendimientos superiores al 80% (Pérez et al., 2011).

Sin embargo la síntesis enzimática presenta un problema, y es que una vez que el polímero alcanza un determinado peso molecular se hace insoluble y precipita (35-70 kDa), de este modo deja de ser accesible para el enzima y no puede continuar su crecimiento.

En el Laboratorio de Bioquímica del IQS se planteó esta aplicación de las glicosintasas para la síntesis enzimática de polisacáridos (naturales, funcionalizados, y artificiales) con estructuras definidas y homogéneas (Faijes, Imai, Bulone, & Planas 2004). En la actualidad se están desarrollando nuevas aplicaciones (Codera, Gilbert, Faijes, & Planas, 2015). Uno de los objetivos del presente trabajo es el establecimiento de técnicas que permitan la ingeniería de glicosintasas mediante procedimientos de evolución dirigida así como la aplicación de los mismos. El fin último es la obtención de glicosintasas más eficientes las cuales puedan sintetizar polímeros de mayor MW.

7.6. Quitina y quitosanos

7.6.1. Historia de la quitina y el quitosano

La quitina fue aislada por primera vez en el año 1811 por el profesor francés Henri Braconnot a partir de extractos de hongos (Braconnot, 1811), esto sitúa su descubrimiento 30 años antes del aislamiento de la celulosa por el también francés Anselme Payen (Payen, 1838). La observación de Braconnot se basaba en la resistencia de cierta fracción a soluciones alcalinas, él denominó a este compuesto “fungina”. No fue hasta el año 1923 que el polímero de N-acetilglucosamina fue oficialmente bautizado como Quitina. A pesar de no conocer su composición exacta Odier obtuvo quitina pura a partir del caparazón desmineralizado de cangrejos (A. Odier, 1823). El nombre de quitina proviene del griego *χιτών* (*chitón*) que significa “túnica o cobertura” (Campbell, 1823).

Finalmente, en el año 1929, el investigador alemán Albert Hofmann describió la estructura química de la quitina (Karrer & Hofmann, 1929).

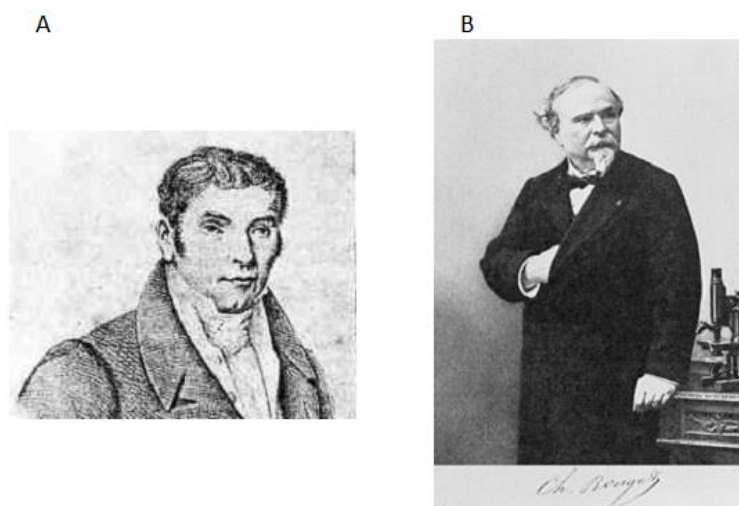


Figura 7.6- 1 Descubridores de la quitina y quitosano

A) Retrato de Henri Braconnot (1780-1855) descubridor de la quitina en el año 1811 B) Fotografía de Charles Marie Benjamin Rouget (1824-1904) descubridor del quitosano en el año 1859.

El quitosano fue descubierto unos años más tarde que la quitina, concretamente fue en el año 1859 por el trabajo del profesor C. Rouget (Rouget, 1859). Se describió a partir del experimento de hervir quitina en hidróxido de potasio concentrado, causando la desacetilación parcial de la misma. Pero, al igual que la quitina, no recibió su nombre formal hasta varios años después de su descubrimiento, en el año 1894 Hoppe-Seyler dieron el nombre oficial de quitosano a este nuevo compuesto (Hoppe-Seyler, 1894). Como se ha mencionado su aislamiento fue a partir de la desacetilación química de la quitina, sin embargo no se describió su obtención desde un productor natural de quitosano hasta el año 1954 por el Dr. Kreger. Se extrajo quitosano natural de las paredes celulares del hongo *Phycomyces blakesleanus* (Kreger, 1954). Hoy en día se conoce que otros hongos como son los zigomicetes, o en algas verdes como *Chlorella* son productores de quitosano. A pesar de estos orígenes naturales identificados, la mayoría del quitosano utilizado industrialmente se obtiene a través de la desacetilación alcalina de quitina extraída de diversas fuentes (Zikakis, 2012).

Transcurridos más de 200 años desde el descubrimiento de la quitina, la atención que han atraído estas dos familias de compuestos ha sido continua, pero es partir de mediados del siglo XX cuando realmente se comienza a acumular información sobre la quitina, el quitosano y sus aplicaciones (Zikakis, 2012).

7.6.2. Quitina y Quitosanos: estructura y propiedades

La quitina es un polisacárido que está ampliamente extendido en varios reinos, de hecho se considera el segundo polímero natural más abundante de la naturaleza justo después de la celulosa. Su función principal es la de actuar como un componente estructural de diferentes tejidos: exoesqueletos de artrópodos (insectos y crustáceos), en los endoesqueletos de moluscos (calamar, sepia, pulpo, etc). paredes celulares de hongos y diatomeas (Kurita, 2001; Varki & Sharon, 2009).

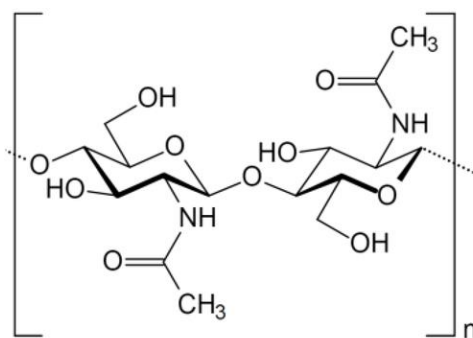


Figura 7.6-2 Estructura quitina

Estructura de la quitina definida como un homopolisacárido lineal compuesto por monómeros de N-acetil-D-glucosamina unidos por enlaces β(1→4).

Químicamente la quitina está definida como un polisacárido lineal compuesto por monómeros de N-acetil-D-glucosamina unidos por enlaces β(1→4). La quitina aparece en la naturaleza a modo de macrofibrillas, en función de la organización de los polímeros dentro de estos haces encontramos 3 tipos de quitina:

- a) α quitina: Está compuesta de cadenas antiparalelas y se encuentra principalmente en crustáceos.
- b) β quitina: Está compuesta por cadenas paralelas y se encuentra principalmente en el esqueleto de calamares.
- c) γ quitina: Está compuesta por una mezcla de cadenas paralelas y antiparalelas. Se encuentra en algunos hongos.

El aspecto de la quitina es el de un sólido no elástico de color blanco (Kumar, 2000) y de las tres isoformas, la α y β son las dos más frecuentes, pero siendo la primera la más abundante (Rinaudo, 2006). La quitina es muy poco soluble en los disolventes comunes. En cuanto a su reactividad química la quitina es considerablemente inerte a pesar del alto contenido de nitrógeno de la misma. Sin embargo, se ha demostrado que la β quitina es ligeramente más reactiva. Este hecho puede ser debido a la organización de las cadenas en las microfibras que además es un aspecto a tener en cuenta en cuanto a su utilización para posteriores transformaciones (Kurita, Tomita, Ishii,

Nishimura, & Shimoda, 1993). El procesado de la quitina principalmente a través de reacciones despolimerización y de-N-acetilación genera una serie de derivados que incluyen el quitosano y los oligosacáridos de quitina y quitosano. Estos polímeros de menor grado de polimerización son de remarcable importancia a nivel de funciones biológicas.

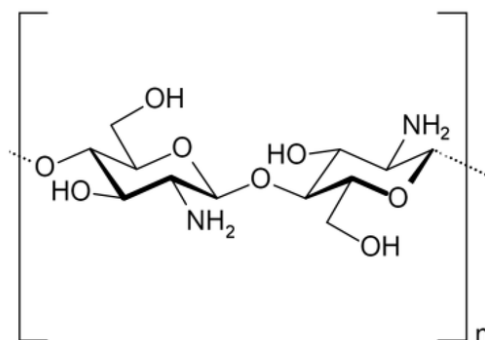


Figura 8.6-3 Estructura quitosano

Estructura del quitosano definido como un heteropolisacárido lineal compuesto por monómeros de N-acetil-D-glucosamina y glucosamina unidos por enlaces β(1→4).

Independientemente del procesado, cuando la quitina es parcialmente desacetilada se le llama quitosano. Esta desacetilación hace que el nuevo polímero sea más soluble y adquiera otras nuevas propiedades que la quitina no tenía originalmente. El proceso natural de desacetilación de la quitina no es muy común, de hecho sólo algunos hongos de los *filum Zygomycota*, *Basidiomycota* y *Ascomycota* han sido descritos como capaces de sintetizar polímeros de quitosano. Las funciones de los quitosanos son muy diversas dependiendo de su grado de polimerización (DP), grado de acetilación (DA) y patrón de acetilación (PA).

- **DP:** es el número de unidades monoméricas que conforman una macromolécula, polímero u oligómero. En el caso de los quitosanos se considera que son oligómeros aquellos que poseen de más de 100 unidades. Además se ha visto que pequeñas variaciones en este parámetro afectan enormemente a sus funciones biológicas.
- **DA:** es la abundancia relativa de monómeros acetilados en un polímero u oligómero. Variaciones en este parámetro afectan tanto a sus propiedades físico-químicas (solubilidad, carga, reactividad) como biológicas.
- **PA:** es la distribución de residuos acetilados en un polímero u oligómero en el que también existe la presencia de residuos no acetilados. En función de su distribución pueden ser de distribución aleatoria (*random*), de bloque o regular. Esta distribución de GlcNAc y GlcN en los oligómeros de quitosano definen sus actividades biológicas.

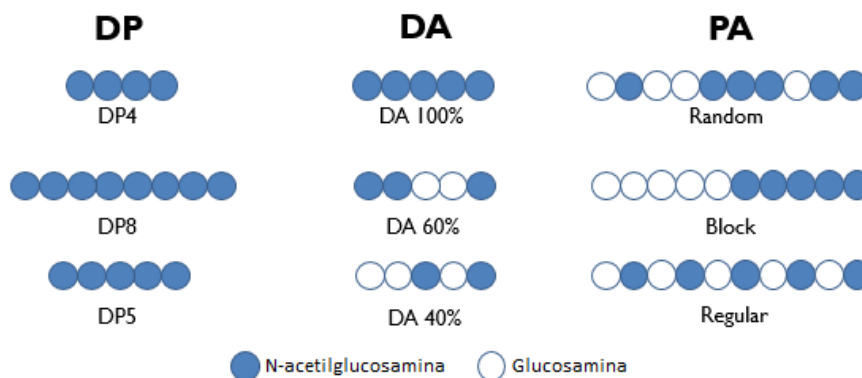


Figura 7.6-4 Esquema de DP, DA y PA

Esquema explicativo de los factores clave que describen los oligómeros de quitosano: grado de polimerización DP, grado de acetilación DA y patrón de acetilación PA.

Como propiedades químicas de los quitosanos destacan: a) son polímeros lineales, b) presencia de grupos amino reactivos, c) presencia de grupos hidroxilo reactivos y d) capacidad de quelar gran cantidad de iones metálicos de transición. Si citamos las propiedades biológicas del quitosano como material en cuanto a su interacción con los organismos podemos encontrar: a) son polímeros naturales biocompatibles, b) son biodegradables y c) son seguros y no tóxicos. Como polímeros tienen la capacidad de interactuar con biomoléculas polianiónicas como pueden ser el ADN, proteínas y los fosfolípidos de las membranas biológicas. Todo este conjunto de características (que los diferencian de otros polímeros naturales como la celulosa, agar, pectinas, etc con un componente más ácido) han atraído la atención de la industria para su aplicación en áreas tan distantes como la medicina y la agricultura. Comparados con los polímeros, los oligómeros de quitosano presentan una mayor solubilidad y una menor viscosidad, este par de propiedades hacen que los oligómeros presenten un abanico de aplicaciones diferentes o adicionales a las de los polímeros.

7.6.3. Quitina y quitosanos: Aplicaciones

Los polímeros de quitosano exhiben una variedad de interesantes propiedades físico-químicas y biológicas que los hacen diferenciarse drásticamente de la quitina. Estos compuestos se consideran unos excelentes productos de partida para un gran número de aplicaciones en áreas tan distantes como la agricultura, cosmética, tratamiento de aguas, medicina y la industria alimentaria entre otros (Azuma, Ifuku, Osaki, Okamoto, & Minami, 2014; Croisier & Jérôme, 2013; Kumar, 2000; Pestov & Bratskaya, 2016; Philibert, Lee, & Fabien, 2016; Rinaudo, 2006).

Área	Aplicaciones
Agricultura	Protección contra patógenos Estimulación del crecimiento vegetal Recubrimiento de semillas Protección contra heladas Liberación controlada de fertilizantes y nutrientes
Tratamiento de Aguas y residuos	Floculante para el clarificado de aguas Eliminación de metales Sustituto de polímeros sintéticos Desodorizante
Industria alimentaria y de bebidas	Fibra no digerible Captura de grasas Conservante Espesante y estabilizador de salsas Film protector para frutas Fungistático Antibacteriano
Industria cosmética	Humectante para piel Tratamiento para el acné Suplementos capilares Reductores de electricidad estática en cabello Bases de maquillaje Tratamientos orales (dentífrico, gomas de mascar)
Medicina y farmacia	Regulador del sistema inmune Antitumoral Hemostático Anticoagulante Promotor de cicatrización Bacteriostático Drug-delivery: terapias químicas y génicas Biomaterial

Tabla 7.6-2 Principales aplicaciones de los quitosanos

Tabla en la que se indican las principales aplicaciones de los polímeros y oligómeros de quitosano dentro de varias áreas de producción. Adatado de Rinaudo et al (Rinaudo, 2006)

A pesar de que los polímeros de quitosano por si mismos ya son interesantes a nivel industrial, los oligómeros (COS, *Chitin Oligosaccharides* y paCOS, *Partially Acetylated Chitosan Oligosaccharides*) también han demostrado ser tanto o más relevantes debido a sus aplicaciones actuales y potenciales dentro de diferentes áreas de producción industrial.

Dentro de sus aplicaciones dentro de la industria médico-farmacéutica destacan por sus aplicaciones:

- **Actividad anti-inflamatoria:** los paCOS han demostrado ser capaces de inhibir la respuesta inflamatoria inducida por lipopolisacáridos siendo de ayuda en el caso de que la respuesta inmune a una infección o condición no patológica sea excesiva. Este tipo de patologías están relacionadas con choques sépticos, enfermedad inflamatoria intestinal, arterioesclerosis, patologías vasculares, etc (Yoon, Moon, Park, Im, & Kim, 2007; Yousef, Pichyangkura, Soodvilai, Chatsudthipong, & Muanprasat, 2012). Además los paCOS también inhiben la activación de basófilos, neutrófilos y linfocitos (M. J. Chung, Park, & Park, 2012).
- **Actividad inmuno-estimulante:** Los paCOS han mostrado prometedores resultados a la hora de promover las funciones del sistema inmune innato y adaptativo, algo de especial

ayuda en situaciones de inmunodepresión o en personas de avanzada edad (Feng, Zhao, & Yu, 2004; Zhang, Liu, Peng, Han, & Yang, 2014).

- **Drug delivery/ tratamiento génico:** Se ha visto que los paCOS son capaces de incrementar la eficiencia de la entrega de ADN/fármaco a las dianas celulares o tisulares debido a su capacidad de promover la permeación a través de diferentes barreras fisiológicas (Ahmed & Aljaeid, 2016; MacLaughlin et al., 1998; Mansouri et al., 2004).
- **Actividad anti-microbiana:** Se ha observado que los paCOS son capaces de desarrollar actividades bactericidas o bacteriostáticas contra bacterias tanto gram positivas como gram negativas. Se ha visto que en función del DP y DA de las moléculas los efectos de las mismas variaban (Y. Chung et al., 2004; Hosseinnejad & Jafari, 2016; Xia, Liu, Zhang, & Chen, 2011).
- **Actividad anti-tumoral:** Varias líneas de investigación han demostrado que los paCOS son capaces de interrumpir la progresión de las células cancerosas en múltiples etapas de desarrollo: crecimiento, invasión y en metástasis. Diferentes estudios han demostrado que estos oligómeros pueden inducir muerte celular en un gran número de tumores de diferente origen: cáncer de hígado (Shen, Chen, Chan, Jeng, & Wang, 2009), leucemia (A. Liu, Song, Cao, Liu, & Jia, 2008), cáncer de próstata (Park, Chung, Choi, & Park, 2011), etc.
- **Actividad de prevención de obesidad y control del colesterol:** Existen evidencias de que tratamientos con quitosanos son efectivos en la reducción de lípidos en plasma conduciendo a una reducción de peso a través de mecanismo de saciado y de promoción de la motilidad intestinal (Barroso, Contreras, Bagchi, & Preuss, 2001; Pokhis, Bitterlich, Cornelli, & Cassano, 2015; Trivedi et al., 2016).
- **Actividad anti-diabética:** Se ha comprobado que la administración de paCOS es capaz de reducir la presencia de glucosa en sangre (Kondo, Nakatani, Hayashi, & Ito, 1996; H.-W. Lee, Park, Choi, Yi, & Shin, 2003)
- **Promoción de cicatrizado y regeneración:** Se ha visto que los paCOS son capaces de promover la regeneración de piel y nervios después de producirse lesiones que los afecten. Los quitosanos son capaces de actuar como análogos de la matriz celular creando un ambiente propicio para esta regeneración. Se han aplicado en vendajes (Ueno et al., 1999) y en otros tipos de aplicaciones relacionadas (Patrulea, Ostafe, Borchard, & Jordan, 2015; Ueno, 2001).
- **Otros efectos:** Control de la presión arterial, efectos antioxidantes, etc.

Además los oligómeros de quitosano también presentan aplicaciones muy interesantes dentro del sector de la agricultura:

- **Actividad anti-microbiana y anti-fúngica y anti-vírica:** diversos estudios utilizando estos tipos de compuestos han demostrado que son capaces de detener el crecimiento fúngico y bacteriano, algo de especial interés a la hora de controlar el efecto de especie fitopatógenas en cultivos de producción (Ben-Shalom, Ardi, Pinto, Aki, & Fallik, 2003; Kendra & Hadwiger, 1984; Kulikov, Chirkov, Il'ina, Lopatin, & Varlamov, 2006).

- **Promoción del sistema inmune de plantas:** además de las actividades específicas contra infecciones típicas de plantas, los paCOS pueden promover la respuesta inmune innata de los organismos vegetales (Hadwiger, 2013; Katiyar, Hemantaranjan, Singh, & Bhanu, 2014).
- **Promotores del crecimiento vegetal:** Se ha demostrado que los oligómeros de quitosano también son capaces de promover el crecimiento en diferentes etapas desde la germinación de semillas hasta en el desarrollo de los frutos (Chamnanmanoontham, Pongprayoon, Pichayangkura, Roytrakul, & Chadchawan, 2014; Mondal et al., 2012; Nge, Nwe, Chandkrachang, & Stevens, 2006).

Algunas propiedades ya mencionadas como su capacidad anti-microbiana también son interesantes para la industria alimentaria y de bebidas. Sin embargo, también existen otras aplicaciones específicas de esta área (Agulló, Rodríguez, Ramos, & Albertengo, 2003; Y.-J. Jeon, Shahidi, & Kim, 2000):

- **Aditivos:** desde estabilizadores de color hasta agentes emulsificantes, los oligómeros de quitosano presenta diferentes acciones como aditivos alimentarios.
- **Acción como fibra dietética y saciantes:** Estas propiedades los sitúan en el campo de la nutraceutica siendo utilizados ampliamente como complementos alimentarios.
- **Astringentes:** esta propiedad permite modular las propiedades organolépticas de los alimentos producidos utilizando quitosanos.

El estudio de estos compuestos están abriendo las puertas a aplicaciones cada vez más variadas en campos muy distantes y otras muchas puertas serán abiertas en aplicaciones que a día de hoy no somos capaces de vislumbrar.

Solo existe una limitación al despegue cuantitativo en producción y aplicaciones de esta familia de moléculas y se debe a que los mecanismos específicos de sus bioactividades no se han podido estudiar con precisión. Este hándicap es debido al método de producción química actual, donde no se consiguen producciones homogéneas de quitosanos químicamente definidos. Es decir, la desacetilación química de oligómeros de quitina resulta en productos que son heterogéneos en DP, DA o PA. Esto impide la realización de estudios precisos que relacionen un compuesto en concreto con su bioactividad (El Gueddari, Schaaf, Kohlhoff, Gorzelanny, & Moerschbacher, 2007; Hosseinnejad & Jafari, 2016; Jung & Park, 2014).

7.6.4. Producción industrial de quitosanos

La quitina, principalmente, es un recurso natural que surge como un subproducto de la actividad de la industria pesquera y de procesado de gambas y cangrejos. También se extrae de otros orígenes como puede ser el endoesqueleto de calamares, pero estos tienen un contenido inferior de quitina (15% vs 23%) (Madhavan & Nair, 1962). Comercialmente la quitina y los quitosanos son dos compuestos de gran relevancia debido a su alto contenido de nitrógeno (entre el 6 y el 8%) comparado con las celulosas sintéticas (Kumar Dutta, Dutta, & Tripathi, 2004).

En el año 2010 se estimó que la capacidad global de producción del mercado de quitosanos se encontraba en torno a las 13,7 mil toneladas métricas y se estimaba que para el año 2015 superaría las 20, a pesar de que no se han encontrado datos que constaten esta evolución en la producción, estudios del tamaño de mercado reflejan un crecimiento considerable de mismo (Global Market Insights, 2016). El precio del kg de quitosano varía mucho en función de las propiedades finales del mismo y, por consiguiente de lo extenso y detallado que sea el proceso de fabricación. Por lo general se estima que su valor oscila desde los 15 USD/kg hasta más de 25000 USD/kg (Roberts, 2008). Hoy en día la producción a gran escala de quitosanos se centra en los siguientes países: India, Japón, Polonia, Noruega y Australia.

El proceso general de extracción implica el uso de condiciones muy exigentes química y térmicamente debido a lo intrincado de las relaciones de la quitina con otros componentes de los tejidos en los que se encuentra. Su extracción desde la materia prima y su transformación a quitosano incluye cuatro etapas básicas: Desproteínización, Desmineralización, Decoloración y Desacetilación (Dhillon, Kaur, Brar, & Verma, 2013; Kumar, 2000).

El proceso de producción comienza por lo general con la acumulación en el exterior de las cáscaras de crustáceos. Esto permite que alcancen un nivel elevado de desecado (sobre todo en países con un alta tasa de exposición solar, p.e. India). La siguiente etapa es la reducción del tamaño de partícula para que todo el procesado químico sea más rápido y eficiente.

La eliminación de proteínas se realiza principalmente con un tratamiento con NaOH, en algunos casos se pueden utilizar enzimas proteolíticas también para este proceso (Skjak-Braek, Anthonsen, & Sandford, 1989).

En la desmineralización se eliminan depósitos de fosfato cálcico o carbonato cálcico mediante el tratamiento con disoluciones de HCl. Tras el lavado y secado del producto se procede con los tratamientos de decoloración. Mediante el uso de permanganato potásico 0,02% y a 60°C, se consigue la eliminación de melaninas y carotenoides. En algunos casos se aplican lejía o peróxido de hidrógeno como tratamientos alternativos o complementarios (Kumar, 2000). Este proceso ya rinde como producto la quitina pura.

Tras el lavado y secado de la quitina se procede con su desacetilación química para la obtención de los polímeros de quitosano. Este proceso se lleva normalmente a cabo mediante la eliminación de los grupos acetamido mediante la aplicación de condiciones alcalinas severas (Horton & Lineback, 1965). Por lo general los parámetros usados en este tratamiento implican altas temperaturas (aproximadamente 90°C a 120°C) y el uso de bases, ya sea NaOH o KOH, en una concentración del 40-50% para conseguir un DA superior al 30%, para DA inferior se suele incrementar la temperatura (más de 100°C) (H.K. No, Lee, & Meyers, 2000; H Kyoon No & Meyers, 1997).

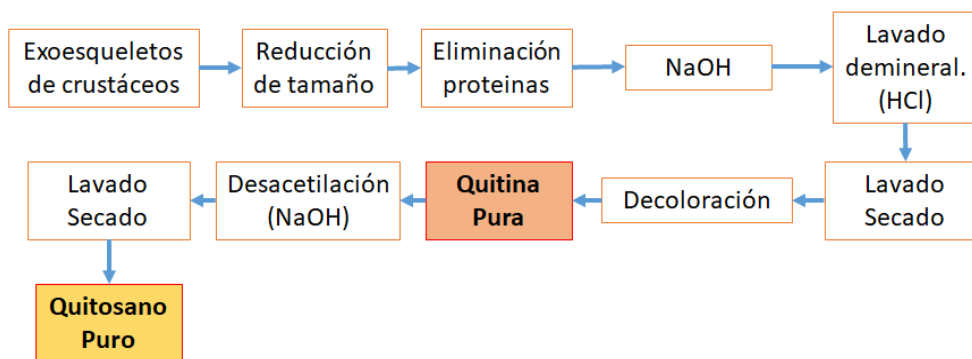


Figura 7.6-5 Producción industrial de quitosano

Esquema general de producción industrial de quitosano a partir de cáscaras de crustáceos a través de la obtención de quitina pura y su posterior desacetilación química (Kumar Dutta et al., 2004).

Para la producción de oligómeros de quitosano el protocolo químico más común es la hidrólisis de polímeros. Esta rotura del enlace glicosídico idealmente puede realizarse por tres procesos: agentes químicos, enzimáticos o por impactos de alta energía (Lodhi et al., 2014). Aunque por normal general a nivel industrial suelen implicar el uso de ácidos (Einbu, Grasdalen, & Varum, 2007) siendo el más frecuente el HCl. La duración del tratamiento, su temperatura y la concentración del ácido puede afectar al tamaño del producto resultante. Las condiciones más frecuentes incluyen 35% de HCl a 80°C durante 1-2 horas (Muanprasat & Chatsudthipong, 2016).

Para la producción de 1 kg de quitosano con un DA del 30% desde cáscaras de crustáceos, son necesarios 6,3 kg de HCl y 1,8 kg de NaOH. Si además tenemos en cuenta las necesidades de agua (0,5 m³ de agua de procesado y 0,9 m³ para el agua de control de temperatura), los requerimientos energéticos para alcanzar las condiciones térmicas para que se den las reacciones químicas necesarias, etc. empezamos a ser conscientes de la magnitud de generación de desechos químicos de este proceso industrial (Kumar, 2000). Como alternativa se han propuesto e investigado propuestas biotecnológicas para la producción de quitosanos, las cuales reducirían el impacto ecológico de todo este proceso.

Sin embargo una de las grandes desventajas de los procesos químicos de generación de polímeros y oligómeros de quitosano es que no se obtiene como resultado final un único producto con un patrón de acetilación definido, ni un grado de polimerización concreto, ni tampoco un grado de acetilación homogéneo. En un porcentaje considerable de aplicaciones esta limitación no es un problema, como puede ser el caso de aplicaciones en la agricultura o el uso de polímeros para la creación de materiales protectores o bioactivos. Por otro lado el poder obtener oligómeros con estos parámetros perfectamente definidos permite explorar las relaciones estructura – biofunción de los diferentes productos. Para obtener este control solo existe un método que se vislumbra como factible, y este es la producción biotecnológica.

Otra gran desventaja de la producción de quitosanos a través de los procesos químicos a escala industrial, es la dependencia de recursos naturales como son las pesquerías de crustáceos y cefalópodos. Por otro lado la reproducibilidad lote a lote utilizando como materia prima materiales de diferentes orígenes, en algunos casos poco controlados en su conservación y transporte, ha demostrado estar considerablemente comprometida.

Existen referencias de síntesis quemo-enzimática de quitosanos (Y. J. Jeon, Park, & Kim, 2001; Pantaleone, Yalpani, & Scollar, 1992), pero en la actualidad se están empezando a implementar la producción de quitosanos a través de microorganismos en los que se han realizado procedimientos de ingeniería metabólica para que pueden transformar una fuente de carbono asequible en un producto final que sea un oligómero o polímero de quitosano con unas características definidas (Naqvi & Moerschbacher, 2015). Sin embargo estas estrategias son todavía un reto debido al número de enzimas involucrados y el objetivo ideal de poder conseguir productos a medida utilizando la combinación de genes necesaria.

7.6.5. Proyecto Nano3Bio

Con el objetivo de crear una alternativa a la producción industrial de quitosanos y cuyos productos sean de alta especificidad y valor añadido nació el proyecto Europeo Nano3Bio.

El objetivo del consorcio de participantes es el conseguir establecer, a través de la ingeniería genética, metabólica y enzimática, métodos biotecnológicos de producción de oligómeros y polímeros de quitosanos parcialmente desacetilados pero completamente definidos.

Las labores de los socios participantes en este proyecto van desde el descubrimiento de enzimas y genes relacionados con la síntesis y transformación de sustrato quitinosos, pasando por el rediseño de los biocatalizadores mediante la ingeniería enzimática para conseguir nuevas actividades o mejoras sobre actividades previas, hasta la ingeniería metabólica por la cual los genes que codifican estas nuevas actividades son incorporadas en el material genético de microorganismos para crear "factorías celulares bacterianas" ("*bacterial cell factories*"). Dentro de los objetivos del proyecto también se incluyen el encontrar nuevas aplicaciones para estos quitosanos producidos biotecnológicamente así como el estudio del impacto ecológico de su producción.

Los principales enzimas estudiados dentro de estos procesos incluyen: quitinsintasas, quitindesacetilasas, quitinasas y quitosanasas.

Los procesos biotecnológicos presentan grandes ventajas sobre los procedimientos de síntesis química, en especial dentro del mundo de los carbohidratos. Las ventajas más claras son:

- Obtención de productos con un PA definido
- Obtención de productos con un DA definido
- Obtención de productos con un DP definido
- Es una producción independiente de recursos naturales
- Condiciones más suaves y menos contaminantes en su producción
- Reproducibilidad lote a lote

Sin embargo a día de hoy aun presentan ciertas desventajas:

- Complejidad a la hora del escalado del proceso
- Limitación en el número de enzimas disponibles

- Los sistemas de producción son más complejos (bioreactores, etc)

7.6.6. Familia CE4

Las esterasas de carbohidratos (CEs) son enzimas que catalizan la de-O- o de-N-acetilación de azúcares con este tipo de sustituciones. Los sustratos usados por estas enzimas son muy diversos, esta heterogeneidad está reflejada en el elevado número de familias de CEs en las bases de datos CAZy. Hasta la fecha (Mayo 2017) se pueden encontrar 16 familias diferentes (V Lombard et al., 2010; Vincent Lombard et al., 2014). Sin embargo, la familia 10 ha sido anulada dado que la mayoría de los miembros eran esterasas activas en sustratos que no eran carbohidratos, de tal modo que solo existen 15 familias de CEs efectivas (Nakamura et al., 2017).

En estos grupos podemos encontrar enzimas ordenados por preferencia de sustrato: quitina desacetilasas, peptidoglucano desacetilasas, acetilxilano esterasas, acetil esterasas, feruloilo esterasas, acetil pectina esterasas, pectina metilesterasas, glucuronoilo esterasas y enzimas que catalizan la N-desacetilación derivados de aminoazúcares de bajo peso molecular (Peter Biely, 2012).

El rango de aplicaciones biológicas y biotecnológicas de las CEs es muy diverso. Mediante su acción catalítica estas esterasas pueden acelerar el proceso de degradación de polímeros facilitando el acceso de hidrolasas (Christov & Prior, 1993) obteniendo de tal modo monosacáridos más fácilmente incorporables a procesos de fermentación. Esta capacidad es cada vez más relevante debido al escenario energético actual en el que el aprovechamiento de la biomasa para la producción de combustibles renovables se ha convertido en una de las prioridades estratégicas a nivel mundial, además de la producción de otro tipo de materiales y productos químicos de manera sostenible (Gupta & Verma, 2015). Por otro lado familias como las CE1, CE4, CE7, CE11 y CE14 contienen enzimas que se han considerado posibles dianas terapéuticas y además de poseer miembros relevantes para otras aplicaciones biomédicas (Nakamura et al., 2017).

La familia CE4 está compuesta principalmente por quitina desacetilasas (EC 3.5.1.41) y quitooligosacárido desacetilasas (EC 3.5.1.-) pero también algunas peptidoglucano desacetilasas (EC 3.1.1.-) y acetil xilano esterasas (EC 3.1.1.72). Todos estos enzimas comparten la región conservada llamada Dominio Desacetilasa, Dominio CE4 o Dominio de Homología NodB. Esto se debe a la gran conservación de este dominio y a que NodB es uno de los primeros enzimas estudiados de esta familia, de ahí que se haya convertido en uno de los referentes (Kafetzopoulos, Thireos, Vournakis, & Bouriotis, 1993). Este tipo de desacetilasas han sido descritos en bacterias, hongos e insectos (Ghormade, Kulkarni, Doiphode, Rajamohanam, & Deshpande, 2010; Zhao, Park, & Muzzarelli, 2010).

Estos enzimas tienen un mecanismo catalítico dependiente de un catión divalente que transcurre a través de un intermediario oxianión tetraédrico creado por una molécula de agua activada por la base general. Este oxianión está estabilizado por el ion metálico y otros residuos del centro activo. Luego el nitrógeno del intermediario se protona debido a la acción del ácido general, de

este modo se genera una amina libre liberado acetato al medio como subproducto (Andrés, Albesa-Jové, et al., 2014).

Como la actividad de estas enzimas se lleva a cabo en polisacáridos u oligosacáridos lineales (con alguna excepción) los patrones de acción enzimática dentro de la cadena (actividad endo-desacetilasa) pueden ser distribuidos en tres tipos (Delmer, 1999; Fraser-Reid, Tatsuta, & Thiem, 2012):

- a) Cadena múltiple: Solo un evento catalítico después del encuentro enzima-sustrato tras lo que se produce la liberación de los dos elementos.
- b) Ataque múltiple: Puede existir más de un encuentro y más de un evento catalítico, siempre hay liberación de los elementos entre cada evento de transformación.
- c) Cadena simple: Procesividad, no hay disociación del enzima por lo que se pueden suceder varios eventos catalíticos antes de que el enzima se disocie.

7.6.6.1. Dominio de homología NodB y motivos característicos

Los miembros de la familia CE4 comparten el dominio NodB que es la estructura primaria que define a estas enzimas. Esta secuencia presenta un tamaño de 150 aminoácidos aproximadamente. Por lo general esta región se define por cinco motivos conservados llamados Motivo 1 hasta el Motivo 5 (Ghormade et al., 2010; Zhao et al., 2010). Cada motivo está definido por una secuencia corta donde se incluyen ciertos aminoácidos de especial relevancia (D. E. Blair, Schüttelkopf, MacRae, & van Aalten, 2005; Imagawa et al., 2008; Zhao et al., 2010).

- a) Motivo 1: TFDD, incluye un Asp que es parte del complejo con el metal catalítico y el otro es la base general.
- b) Motivo 2: H(S/T)XXHP, las dos His forman parte del sistema de unión del metal, mientras que la Ser/Thr son aceptores de puente de hidrógeno para estabilizar la estructura de la región.
- c) Motivo 3: RPPY, forma uno de los laterales del surco donde se sitúa el centro activo, forman interacciones estabilizadoras de esta zona de la estructura.
- d) Motivo 4: DXXD(W/Y), forma el otro lateral del surco del centro activo incluyendo un aminoácido hidrofóbico expuesto al solvente y un Asp enterrado en la estructura.
- e) Motivo 5: I(V/I)LXHD, contiene una Leu que es parte un parche hidrofóbico encargado de acomodar el grupo metilo del acetato y una His que es el ácido general del mecanismo catalítico.

7.6.6.2. Roles de las desacetilasas de quitina en la naturaleza

Dado que la familia CE4 contiene enzimas que actúan en un gran número de sustratos diferentes, es obvio que las funciones que desarrollan en los diferentes organismos que las producen también

son muy diversas. Muchos de los productos resultantes de la desacetilación catalítica realizada por estas enzimas poseen propiedades fisiológicas muy interesantes incluyendo el ser mediadores de la relación huésped-patógeno, evasión de sistema inmune, elementos estructurales, ser moléculas señalizadoras y otras. Además de las desacetilasas de quitina, también otras que actúan sobre otros sustratos como el péptidoglucano, tienen esta función de evadir enzimas hidrolíticos de sus huéspedes, como puede ser el caso de *Bacillus cereus* (Psylinakis et al., 2005)

Dado que la mayoría de los sustratos utilizados por los miembros de la familia CE4 son componentes estructurales de diferentes estructuras y tejidos, sus derivados desacetilados también continúan aportando esta función de soporte.

En algunos casos, además de este rol estructural heredado, la modificación de paredes celulares quitinosas se convierte también en un mecanismo de defensa. Por ejemplo, hongos que actúan como patógenos de organismos vegetales desacetilan la capa externa de quitina de su pared celular para conseguir evadir la batería de enzimas quitinolíticos que expresa la planta como mecanismo inmune inherente para prevenir este tipo de invasiones. Este es el caso de hongos como *Colletotrichum lindemutianum* (Hekmat, Tokuyasu, & Withers, 2003; Tsigos & Bouriotis, 1995) o *Mucor rouxii* (Y Araki & Ito, 1975) entre otros.

Enlazada con la función de evadir los mecanismos de defensa de las plantas, las desacetilasas también albergan otra función de evasión: los oligómeros producidos de la hidrólisis de quitina son moléculas para las cuales las plantas tiene receptores actuando elicitores de respuestas inmunes contra infecciones, algunas desacetilasas son capaces de desacetilar estas cadenas cortas para que dejen de convertirse en moléculas sensibles por la planta. Este puede ser el caso de *Pestalotiopsis sp.* (Eddine, Gueddari, Rauchhaus, Moerschbacher, & Holger, 2002; T. Liu et al., 2012) la cual también posee la capacidad de modificar los polímeros de su pared celular (Sánchez-Vallet, Mesters, & Thomma, 2015).

Otras CDAs están relacionadas con la biosíntesis de moléculas señal como los factores Nod. Estos compuestos son lipooligosacáridos que son secretados por bacterias simbióticas con el fin de modificar el desarrollo de ciertos tejidos de las plantas induciendo la formación de nódulos en las raíces de las mismas. Este es el caso de *Sinorhizobium meliloti* que establece nódulos de fijación de nitrógeno en las raíces de plantas (géneros *Medicago*, *Melilotus* and *Trigonella* (Roche et al., 1996)). En su caso los factores Nod son producidos por los genes que se encuentran dentro del operon *NodABC*, el cual es inducido por flavonoides liberados por las plantas. NodC es una quitinaoligomerosintasa, NodA una aciltransferasa y NodB una quitina desacetilasa (Ardourel, 1994; Atkinson, Palcic, Hindsgaul, & Long, 1994; Roche et al., 1996; Spaink et al., 1994).

Las desacetilasas también están involucradas en la incorporación de C y N al metabolismo. La quitina es un polímero que se produce en cantidades descomunales en el océano debido a estar presente en los tejidos externos del zooplankton. Bacterias del medio marino disponen de complejos sistemas de transducción de señales y rutas de degradación para incluir este tipo de polímeros dentro de sus rutas metabólicas. Estos mecanismos son tan efectivos que a pesar de que las 10¹¹ toneladas de quitina que se producen en la biosfera anualmente, prácticamente no se acumula nada en los sedimentos del medio marino. En este rol tienen especial relevancia las bacterias del género *Vibrio* (Keyhani & Roseman, 1999; Meibom et al., 2004; Zobell & Rittenberg, 1937). También las desacetilasas de xilano son de especial relevancia al promover el acceso de

enzimas hidrolíticas a materiales que de otro modo no sería accesibles facilitando a través de su transformación la incorporación de sustratos a rutas metabólicas. Este es el caso de las desacetilasas de *Streptomyces lividans* (P. Biely et al., 1996; Peter Biely, 1985; Dupont, Daigneault, & Sharek, 1996) o *Clostridium thermocellum* (Fernandes et al., 1999; Lamed & Bayer, 1988).

Algunas desacetilasas tienen la función de promover la infección o promover sucesos que la faciliten. Este es el caso de *Pochonia chlamydiosporia*, es hongo un capaz de infectar huevos del nematodo *Meloidogyne javanica* donde se describió la desacetilación de la quitina presente en la cáscara de sus huevos, por lo que sus desacetilasa parece actuar como un factor de virulencia (Aranda-Martinez et al., 2016; Lopez-Llorca, Olivares-Bernabeu, Salinas, Jansson, & Kolattukudy, 2002; Zare & Gams, 2001).

7.6.7. Quitina desacetilasas

Las desacetilasas de quitina (CDAs) son enzimas que tienen la capacidad de hidrolizar el grupo acetamido de los monómeros de N-acetil-D-glucosamina en polímeros y oligómeros de quitina (Li, Wang, Wang, & Roseman, 2007).

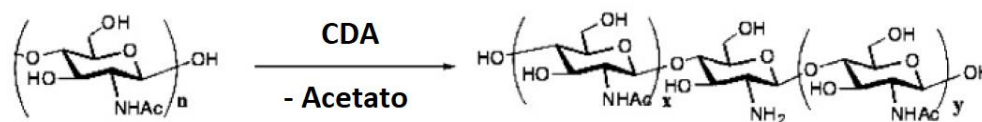


Figura 7.6-6 Reacción de desacetilación mediante CDA

Esquema de reacción en el que se cataliza la desacetilación de quitina mediante la acción de una desacetilasa resultando en la producción de quitosano con la liberación de acetato. Adaptado de Li et al. (Li et al., 2007)

Debido a que la quitina es uno de los polímeros naturales más abundantes, en consecuencia las CDAs están presentes en una gran variedad de organismos realizando múltiples funciones. Están presentes en hongos donde están involucradas tanto en la biosíntesis de la pared celular como en otros procesos como son la esporulación, el catabolismo de oligosacáridos de quitina y otro tipo de funciones clave en la biología de estos organismos (Caufrier, Martinou, Dupont, & Bouriotis, 2003).

Múltiples CDAs han sido caracterizadas a lo largo de los años demostrando que son capaces de cubrir un rango muy extenso de condiciones óptimas para el global de sus actividades. Su peso molecular varía desde apenas 12 kDa hasta los 150 kDa. Muchas de las CDAs de hongos suelen estar glicosiladas. Sus puntos isoeléctricos varían desde los 2,6 hasta los 4,8. El rango de pH óptimo varía desde los 4,5 hasta un valor de 12, otra característica destacable es que existen desacetilasas asombrosamente termoestables encontrándose sus óptimos de actividad desde los 30°C hasta los 60°C, aunque alguna de ellas pueden someterse a 90°C durante ciertos periodos de tiempo conservando un porcentaje considerable de su actividad. Por lo general las CDAs son secretadas al medio extracelular o periplásmico.

La mayoría de las quitinas desacetilasas presentan una alta especificidad para polímeros u oligómeros de quitina y quitosano, sin embargo el DP preferido puede variar según el enzima. En cuanto a su mecanismo de reacción las CDAs presentan tres patrones de acción básicos ya descritos: Cadena múltiple (solo un evento catalítico por encuentro, CDA de *V. cholerae* (Andrés,

Albesa-Jové, et al., 2014)), ataque múltiple (varios encuentros que implican varios eventos, *Pestilotiopsis sp.* (Cord-Landwehr, Melcher, Kolkenbrock, & Moerschbacher, 2016)) o cadena simple (un único encuentro con varios eventos sin disociación, *C. lindemutianum* (Hekmat et al., 2003)). Esto conlleva que se generen productos definidos o no, por ejemplo los enzimas que tienen un mecanismo de cadena múltiple, por lo general producen quitosanos monodesacetilados definidos. Con el fin de producir oligómeros de quitosanos definidos, este tipo de enzimas con este mecanismos son las más interesantes a la hora de estudiar los elementos que dictan cual es el patrón de acetilación del producto de la catálisis.

Las quitina desacetilasas son unos elementos clave en la estrategias de síntesis biotecnológica de paCOS, esto se debe a que son los encargadas de desacetilar las cadenas que las quitina sintasas generan. Además los enzimas con un mecanismo de cadena múltiple o sus combinaciones son los que permitirán generar productos completamente definidos.

7.7. Quitin-oligosacárido desacetilasa de *Vibrio cholerae*

Vibrio cholerae es el agente causante de la enfermedad conocida como cólera. Referencias históricas a patologías, cuya identidad más plausible sea esta misma, se remontan a tiempos de Hipócrates o incluso previos. Sin embargo, su historia moderna se inicia en el año 1887 cuando un brote en la India se extendió rápidamente a través de fronteras y se definió como la primera pandemia de cólera. En el siguiente siglo otras 6 pandemias tuvieron lugar afectando a la mayoría de países del hemisferio sur además de Europa y Norte América (Barua, 1992).

Los agentes etiológicos del cólera y muchas otras enfermedades (Anthrax, tuberculosis, difteria, etc) fueron descubiertos durante el siglo XIX debido a los avances tecnológicos que se produjeron en esa época (Reidl & Klose, 2002). De hecho fue Roberto Koch en el año 1883 quien identificó que el cólera está producido por una bacteria que más tarde fue bautizada como *Vibrio cholerae* (Koch, 1884).

Vibrio cholerae es un bacilo curvo gram negativo de metabolismo anaerobio facultativo. Son unas bacterias con capacidad motil muy elevada debido a la presencia de flagelación polar (Figura 7.7-1). Puede ser aislada de medios acuáticos y de estuario aunque también es un patógeno facultativo del ser humano. En el medio acuático es capaz de unirse a las superficies de plantas, algas verdes filamentosas, copépodos, crustáceos e insectos (Colwell, 1996).

La quitin-oligosacárido desacetilasa de *Vibrio cholera* (también conocida como COD o VcCDA) ha atraído la atención de muchos investigadores debido a sus cascadas de degradación de quitina en el ambiente acuático marino. Se han identificado este tipo de enzimas un considerable número de especies del género *Vibrio*: *V. algynolyticus* (K Ohishi, Murase, Ohta, & Etoh, 2000; Kazuo Ohishi et al., 1997), *V. parahaemolyticus* (K Kadokura et al., 2007; Kazunari Kadokura et al., 2007), *V. cholerae* (Li et al., 2007) y otros.



Figura 7.7-1 *Vibrio cholerae*

Imagen de microscopía electrónica de transmisión de una célula de *Vibrio cholerae*. Autor Tom Kirn, Ron Taylor, Louisa Howard - Dartmouth Electron Microscope Facility.

En presencia de quitina se produce la transducción de una serie de señales que regulan la expresión génica de proteínas relacionadas con la unión celular a este sustrato y su degradación (Keyhani & Roseman, 1999; Li & Roseman, 2004). *Vibrio cholerae* excreta quitinasas las cuales son las encargadas de reducir el tamaño de este sustrato polimérico a dímeros de N-acetil-D-glucosamina, los cuales son rápidamente desacetilados por la VcCDA en la segunda posición desde el extremo no reductor. El producto resultante (GlcNAc-GlcN) tiene dos destinos principales (Hirano et al., 2009; Meibom et al., 2004):

- a) Ser incorporado a rutas metabólicas como fuente de C y N.
- b) Actuar como molécula señal para inducir la expresión de otros enzimas relacionados con la transformación y metabolización de la quitina.

Algunos autores han hipotetizado que el producto generado por este enzima podría ser un precursor de moléculas de señalización similares a los factores Nod del genero *Rhizobium* (Chambon et al., 2015; Li et al., 2007).

7.7.1. Estructura de VcCDA

VcCDA es una proteína extracelular multidominio la cual puede ser encontrada en varias formas oligoméricas. Desde su extremo N terminal presenta el dominio desacetilasa típico de las enzimas CE4 seguido de dos dominios de unión a quitina (Figura 7.7-2). Su secuencia está compuesta de 431 amino ácidos cuyo peso molecular total del monómero es de 47,8 kDa con un punto isoeléctrico de 5,41 según Expasy-Protparam (Gasteiger et al., 2005). En su secuencia original la VcCDA cuenta con un péptido señal de 26 aminoácidos.

La VcCDA fue el primer enzima de la familia CE4 cristalizado en complejo productivo con sus sustratos. Este hito dentro de la investigación en la familia de las desacetilasas de quitina fue llevado a cabo por la colaboración del Laboratorio de Bioquímica del Institut Químic de Sarrià y el grupo del Dr. Marcelo Guerin (Unidad de Biofísica de la Universidad del País Vasco – CSIC, actualmente en el CICBiogune, Derio). Gracias a la resolución de los complejos enzima-sustrato se

consiguió definir su mecanismo catalítico y la generación de hipótesis generales sobre los elementos que dictan la especificidad por sustrato y el patrón de desacetilación de los diferentes enzimas de la familia CE4 (Andrés, Albesa-Jové, et al., 2014).

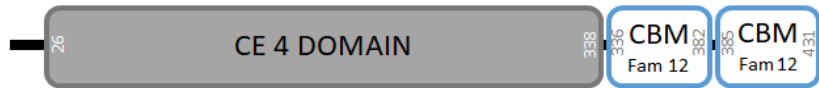


Figura 7.7-2 Módulos en la secuencia de VcCDA

Representación esquemática de los módulos presentes dentro de la secuencia del enzima VcCDA. De extremo N terminal a C terminal se encuentra el dominio CE4 (26-338) y 2 CBMs de la familia 12 (336-382 y 385-431).

El dominio catalítico que abarca desde los residuos 26 al 338 presenta el *fold* típico de las desacetilasas de la familia CE4, es un $(\beta/\alpha)_7$ barrel *fold* (Figura 7.7-3). El núcleo de esta estructura está formado por un cilindro central definido por hojas β rodeado por hélices α , formando una estructura β -barrel distorsionado (Andrés, Albesa-Jové, et al., 2014). Estas estructuras secundarias están conectadas entre sí por una serie de *loops* que acabarán definiendo el surco donde se unirá el sustrato.

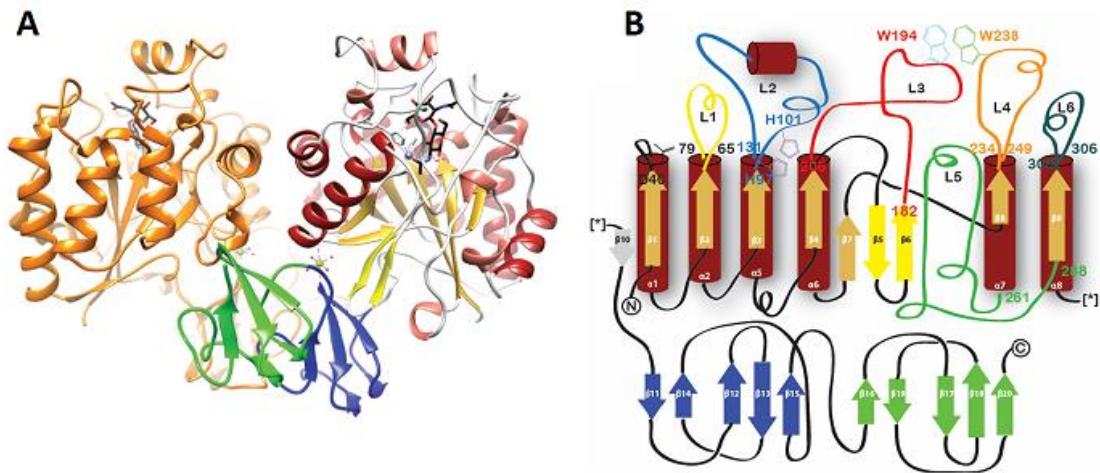


Figura 7.7-3 Fold de VcCDA

A) Representación esquemática mostrando la estructura general cristalizada de VcCDA como un homodímero. Un monómero está representado en naranja mientras que los otros dominios que lo componen están coloreados en el otro monómero: el dominio desacetilasa en rojo y amarillo y los CBMs en azul y verde B) Diagrama topológico del monómero VcCDA. La parte superior muestra el dominio desacetilasa mientras que la parte inferior se corresponde con los dos CBMs.

Dentro del centro activo del enzima se sitúa un catión divalente identificado como Zn^{+2} . Este metal tiene un papel clave en el desarrollo catalítico del enzima. Este metal está retenido debido a sus interacciones complejantes con una serie de residuos del centro activo. Esto se conoce como el motivo HHD de unión a metal, en VcCDA son los residuos His97, His101 y Asp40.

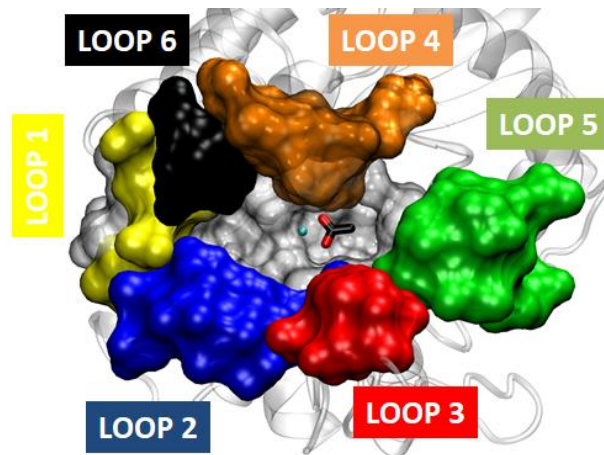


Figura 7.7-4 Loops de VcCDA

Representación de los *loops* que decoran la periferia del surco activo de VcCDA. Identidad de los *loops*: *loop* 1 del 71 a 79, el *loop* 2 de 91 al 131, el *loop* 3 del 182 al 206, el *loop* 4 del 234 al 249, el *loop* 5 del 261 al 288 y el *loop* 6 del 300 al 306

Como se ha descrito, el surco catalítico de VcCDA está definido por una serie de 6 *loops*. Como se explicará en detalle en el apartado en el que se define el *Subsite Capping Model*, estas estructuras son relevantes a diferentes niveles: establece interacciones con el sustrato y pueden definir la especificidad por sustrato. Algunos de estos *loops* se encuentran estabilizados por puentes disulfuros dentro de la propia secuencia del *loop*. Para identificarlos se les ha numerado del 1 al 6 (Figura 7.7-4):

- *Loop* 1: Residuos del Gly71 al Arg79
- *Loop* 2: Residuos del His97 al Asp131
- *Loop* 3: Residuos del Asp182 al Ser206
- *Loop* 4: Residuos del Ala234 al Glu249
- *Loop* 5: Residuos del Leu261 al Asp288
- *Loop* 6: Residuos del Glu300 al Met306

La presencia de estos *loops* decorando el centro activo se mantiene en todos los miembros de la familia CE4 pero su secuencia y propiedades cambiarán de un enzima a otro.

7.7.2. Mecanismo catalítico de VcCDA

La cristalización de este enzima con varios sustratos oligoméricos permitió descifrar el detalle del mecanismo catalítico llevado a cabo por esta desacetilasa. Se trata de un mecanismo de acción ácido/base en el que se producen dos etapas sucesivas.

En una primera etapa una molécula de agua, que estaba siendo coordinada por el metal catalítico Zn^{+2} , es activada por acción de la base general, Asp39. Al activarse el agua se forma un oxianión tetraédrico como intermedio. La carga negativa que se ha generado en el átomo de oxígeno del carbonilo es, a su vez, estabilizada por el átomo de Zn^{+2} y por el N del *backbone* de la Tyr169.

En una segunda etapa el nitrógeno del GlcNAc se protona debido a la acción del ácido general (His295), lo cual conlleva a la rotura del enlace C-N. Este suceso supone la generación de una amina libre en el producto monodesacetilado y la liberación de acetato al medio de reacción.

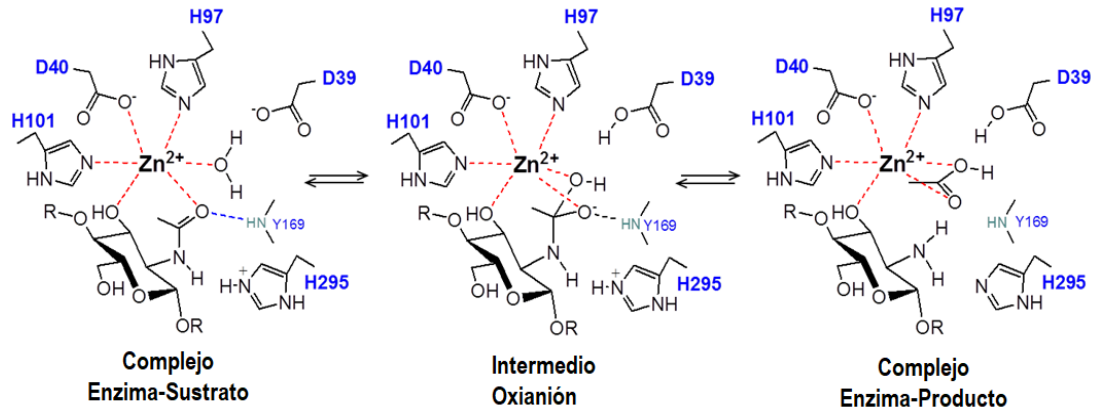


Figura 7.7-5 Mecanismo Catalítico de la VcCDA

Representación del mecanismo ácido/base llevado a cabo por la quitina desacetilasa de *Vibrio cholerae*. Se pueden observar las dos etapas de la reacción: en la primera la activación del agua por la base general (D39) conlleva a la formación de un oxianión tetraédrico intermedio, en la segunda etapa se protona el N del sustrato produciendo la rotura del enlace C-N con la liberación de acetato.

Este enzima es capaz de desacetilar únicamente el segundo residuo desde el extremo no reductor (Figura 7.7-6). Una vez se produce esta reacción el producto no es reconocido como sustrato y no se realiza ninguna desacetilación posterior en ninguna otra posición de la cadena oligomérica. De tal modo que en DP2 (AA), se desacetila el extremo reductor (AD), en DP3 (AAA) el residuo central (ADA), y en DP4 (AAAA) el producto resultante es ADAA. En este tipo de nomenclatura del patrón de acetilación de paCOS A identifica un GlcNAc y D GlcN



Figura 7.7-6 PA en los productos de reacción de VcCDA

Patrón de acetilación de los productos resultantes tras la reacción de desacetilación utilizando VcCDA como catalizador. Se desacetila la segunda unidad desde el extremo no reductor.

7.7.3. Caracterización bioquímica de la VcCDA

Para su caracterización la VcCDA fue expresada heterológicamente en *E. coli* mediante su clonación en un vector pET22b+, el cual es un vector de expresión regulada mediante el sistema PET. En este vector se ha incluido un *Strep-Tag II* en su extremo C-terminal para su purificación mediante cromatografía de afinidad.

En su purificación se observó la presencia de cinco fracciones oligoméricas, siendo el monómero la que desarrollaba una mayor actividad desacetilasa utilizando como sustrato el análogo 4-Acetilmetilumbeliferona (AcOMU). Además se comprobó el peso molecular de cada fracción oligomérica por HPSEC y de la supuesta fracción monomérica mediante MALDI-TOF MS (Figura 7.7-7).

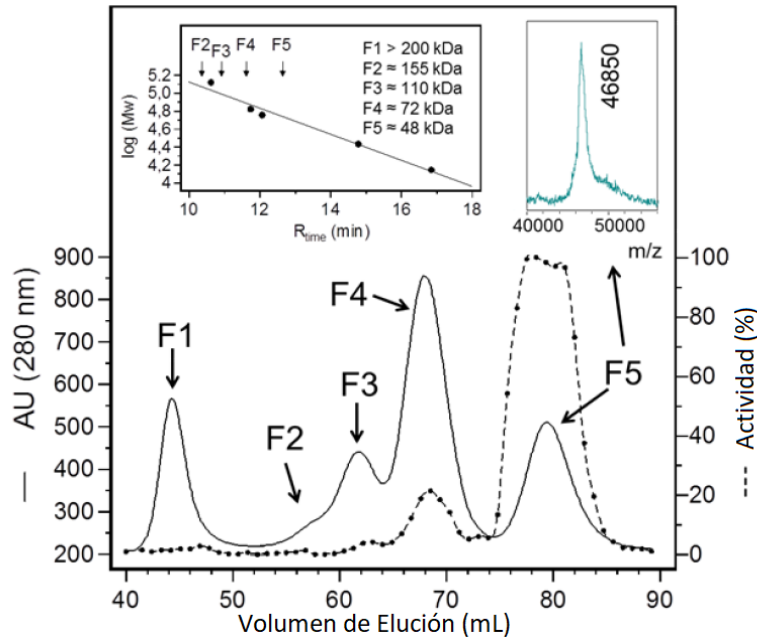


Figura 7.7-7 Análisis de las fracciones de GFC en la purificación de VcCDA

Cromatograma resultante de la GFC preparativa de VcCDA expresada en *E. coli* después de ser purificada mediante la cromatografía de afinidad (*Strep-Trap*). – Absorbancia a 280nm, ... actividad enzimática usando AcOMU como sustrato. Gráfico superior izquierda: peso molecular de cada una de las fracciones estimada por HPSEC; Gráfico superior derecha: Análisis por MALDI-TOF MS de la fracción 5 (monomérica).

Se comprobó el rango de condiciones óptimas para que este enzima desarrollase su actividad desacetilasa. Se realizó un estudio con diferentes tampones para comprobar cuál era el pH óptimo utilizando dos sustrato: AcOMU y el quitooligosacáridos DP2. En ambos casos se observó que el pH óptimo se encuentra entre 8 y 9 independientemente del tampón y sustrato utilizado (Figura 7.7-8).

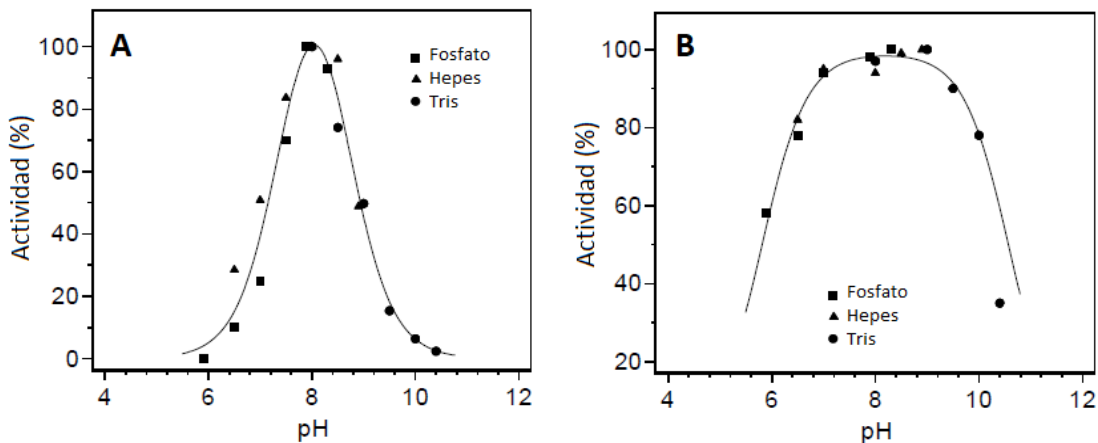


Figura 7.7-8 Determinación del pH óptimo de VcCDA

Dependencia de la actividad enzimática de VcCDA en función del pH usando los sustratos AcOMU (A) y DP2 4 mM (B).

Se caracterizaron los parámetros cinéticos para varios sustratos desde DP2 a DP4, dado que este enzima es inactivo con GlcNAc. Previamente se había descrito que DP2 era el sustrato natural de este enzima (Li et al., 2007).

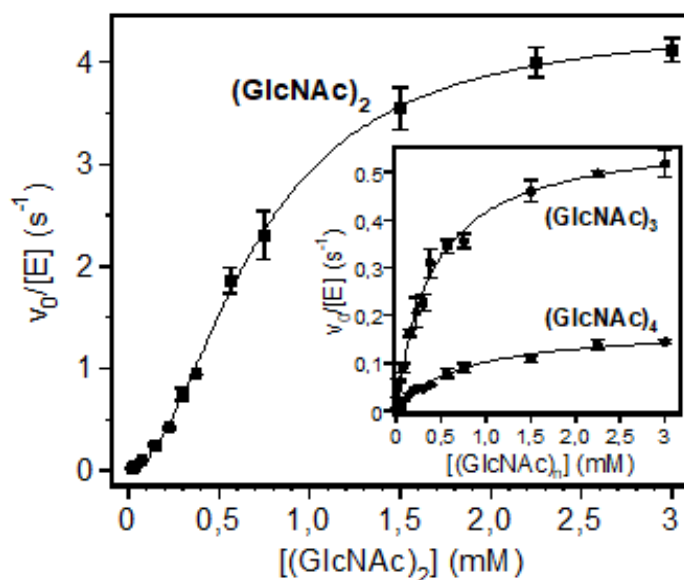


Figura 7.7-9 Caracterización cinética de VcCDA

Caracterización de los parámetros cinéticos utilizando la fracción monomérica de VcCDA y los quitooligosacáridos DP2 a DP4 realizándose los ensayos en tampón fosfato 50 mM pH8,5 NaCl 300 mM y a una temperatura de 37°C.

Una vez obtenidas las cinéticas se observó que no todos los sustratos seguían el mismo tipo de cinética enzimática. Mientras DP3 y DP4 seguían un mecanismo descrito por la ecuación de Michaelis-Menten (Ecuación 1) mientras que DP2 mostraba un comportamiento alostérico el cual se ajustaba a la ecuación de Hill (Ecuación 2).

$$V_0/[E] = \frac{k_{cat} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

Ecuación 1 Ecuación de Michaelis-Menten

$$V_0/[E] = \frac{k_{cat} \cdot [S]^h}{(K_M)^h + [S]^h}$$

Ecuación 2 Ecuación de Hill / alostérica sigmoideal

El valor del coeficiente h de Hill para DP2 muestra un valor próximo a 2 (Tabla 7.7-1), lo que aproximadamente indica que son necesarias dos moléculas de sustrato para que se lleva a cabo la catálisis. Esto se manifiesta en una especie de *fase lag* a concentraciones bajas de sustrato cuando se representa $v_0/[E]$ frente a $[S]$ (Figura 7.7-9).

Sustrato	k_{cat} (s^{-1})	K_M (mM)	Índice de Hill (h)	k_{cat}/K_M ($M^{-1}\cdot s^{-1}$)	% k_{cat}
(GlcNAc) ₂	4,38 ± 0,08	0,69 ± 0,02	1,92	6,3 · 10 ³	100
(GlcNAc) ₃	0,58 ± 0,02	0,40 ± 0,03	-	1,5 · 10 ³	13
(GlcNAc) ₄	0,18 ± 0,01	0,72 ± 0,08	-	2,5 · 10 ²	4

Tabla 7.7-1 Parámetros cinéticos de la caracterización de VcCDA

Parámetros cinéticos k_{cat} y K_M obtenidos en la caracterización de VcCDA. En el caso del sustrato DP2 se observa un comportamiento cooperativo por lo que se utiliza la ecuación de Hill para fenómenos de alosterismo.

En función de los resultados obtenidos en la caracterización del enzima se observa que la actividad del mismo se reduce a medida que se incrementa el DP del sustrato. En función de k_{cat} DP3 es 7,5 veces menos activo mientras que DP4 es 24,3 veces menos activo.

7.8. *Subsite Capping Model: Definición de la preferencia de sustrato*

El *subsite capping model* es una hipótesis propuesta en el grupo de trabajo que permite interpretar porque los miembros de la familia CE4 pueden tener especificidades por sustrato tan diferentes y además ser capaces de generar patrones de desacetilación tan diferentes y definidos en cada una de ellas.

El enunciado de esta hipótesis se fundamenta en varios pilares:

- Los complejos enzima-sustrato cristalizados con VcCDA.
- Modelos bioinformáticos para explicar la actividad de VcCDA en sustrato mayores que DP3.
- Comparación de *loops* con otras CE4 de patrón de desacetilación o estructura conocida.

En los siguientes apartados se introducirá el concepto de “*Subsite Capping Model*” así como los fundamentos científicos los cuales lo gestaron.

7.8.1. Las estructuras de VcCDA en complejo con sustrato

Durante los ensayos de cristalogénesis en los que se resolvió la estructura de VcCDA se realizaron ensayos de *soaking* utilizando como sustratos DP2, DP3 y DP4. De todas las condiciones ensayadas solo se consiguieron cristales de la proteína apo, y en complejo productivo con DP2 y DP3. Por el contrario, no fue posible conseguir un cristal con el tetrámero dentro del sitio activo.

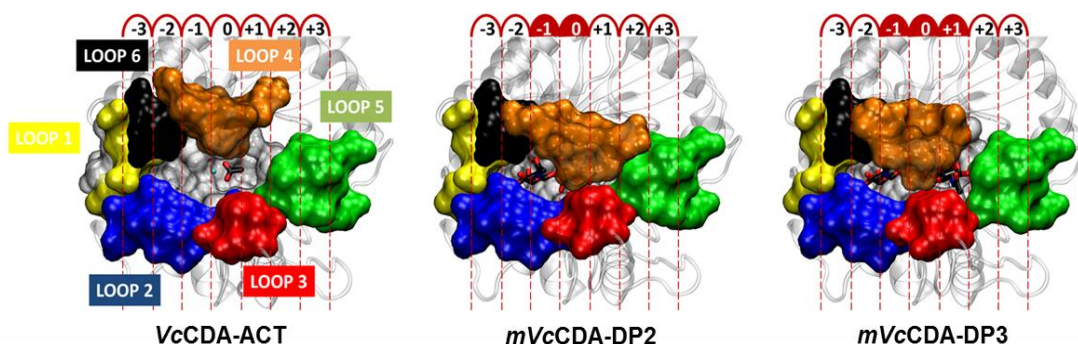


Figura 7.8-1 Estructuras de VcCDA Apo y en complejo con sustratos

Estructuras del enzima VcCDA en su forma apo, en complejo con DP2 y en complejo con DP3 donde se observa el movimiento del *loop* 4 tras la unión del sustrato.

En ausencia de sustrato el enzima muestra un surco activo abierto. Cuando se utilizó el sustrato DP2 este surco abierto se transforma debido al movimiento del *loop* 4 el cual adopta una conformación cerrada sobre el surco. Este mecanismo se conoce como “*induced fit*” cuyo sentido general se traduce en la modulación dinámica de parte de la estructura de un enzima por causa de unión a un sustrato. Esta modificación permite crear el ambiente propicio para que la catálisis se lleve a cabo.

Además esta estructura en complejo con DP2 permite empezar a definir los subsitios del sitio activo de la VcCDA (Figura 7.8-1). La nomenclatura de subsitios es un procedimiento generalmente aceptado para el establecimiento de la situación de monómeros en el caso de enzimas activas sobre polímeros u oligómeros. Esta nomenclatura fue establecida por G.J. Davies et al en 1997 para hidrolasas (Davies, Wilson, & Henrissat, 1997). Dado que esta nomenclatura no era aplicable a enzimas que no producían la hidrólisis del sustrato, fue adaptada por Tokuyasu et al para su aplicación en desacetilasas (Tokuyasu, Mitsutomi, Yamaguchi, Hayashi, & Mori, 2000). El subsitio 0 es aquel en el que se sitúa el residuo que es desacetilado, hacia el extremo no reductor se numeran con signo negativo y hacia el extremo reductor con signo positivo.

En el caso de VcCDA el sustrato se introduce en el sitio activo tal que el segundo monómero desde el extremo no reductor se sitúa en el subsitio 0 en el cual se produce la desacetilación. Aquí ya cabe mencionar que los potenciales subsitios negativos -2 y -3 están físicamente bloqueados por los *loops* 1, 2 y 6.

Cuando se analizó la estructura del enzima en complejo con DP3 destaca que en este caso el *loop* 4 no adopta una conformación completamente cerrada. Para acomodar un sustrato más largo su conformación es semicerrada de tal modo que el trisacárido es capaz de incorporarse a los subsitios -1, 0 y +1.

En la Figura 7.8-2 se observa en detalle las diferentes conformaciones del *loop* 4 en las tres estructuras descritas. Además se destaca la presencia de triptófanos (W238 y W194) los cuales son capaces de establecer interacciones de *stacking* con las piranosas del sustrato. Es de especial relevancia el W238 para la dinámica de cerrado en el mecanismo de *induced fit* tras la unión de sustrato.

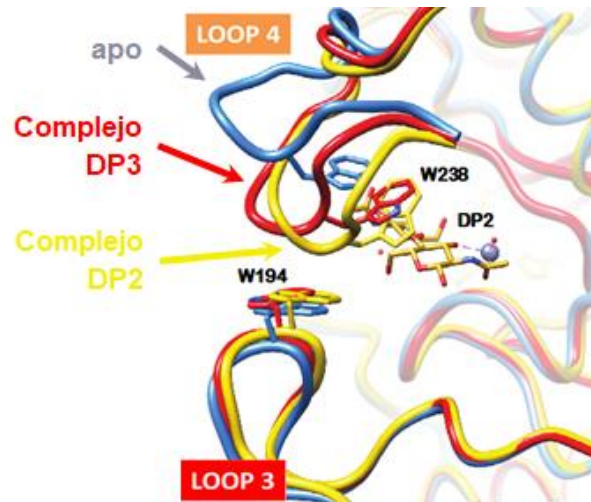


Figura 7.8-2 Conformaciones del loop 4 en los complejos con DP2 y DP3

Imagen de las diferentes conformaciones que adopta el loop 4 cuando se observa la estructura de la proteína apo (azul), en complejo con DP2 (amarillo) y en complejo con DP3 (rojo).

7.8.2. El mecanismo del Loop 5: El modelo VcCDA – DP4

Una de las incógnitas que abrieron los experimentos anteriores es por qué no se consiguió un cristal del complejo con DP4 a pesar de que hay evidencias bioquímicas de que el enzima es activo cuando se utiliza el tetrámero como sustrato.

Analizando los subsitios definidos con la estructura en complejo con DP2 (Figura 7.8-1) se observa que el subsitio +2, necesario para la acomodación de DP4, se encuentra bloqueado por el loop 5 y la conformación semicerrada del loop 4 no es capaz de generar el espacio suficiente para que este compuesto más largo se introduzca en el sitio activo. Estas observaciones llevaron a plantear la hipótesis de que el loop 5, al igual que el 4, es dinámico y sería capaz de modificar su conformación espacial para crear subsitios positivos, permitiendo la catálisis de sustratos más largos.

Es probable que las condiciones restrictivas del ordenamiento cristalográfico de la estructura de la proteína no hayan permitido el movimiento del loop 5, de tal modo que la cristalización en complejo con DP4 resultase infructuosa.

Para aportar soporte a la teoría del loop 5 dinámico se realizó un modelo bioinformático en el que se forzó el desplazamiento de este loop de tal modo que los subsitios positivos estuviesen accesibles para el sustrato. Tras realizar un *docking* con DP4, se observó como este se acomodaba en un modo energéticamente estable dentro del sitio activo (Figura 7.8-3).

En la Figura 7.8-3 se observa como los subsitios negativos siguen estando bloqueados por los loops 1 y 6 principalmente. El sustrato ocupa los subsitios -1, 0, +1 y +2. Este acoplamiento implica que el PA del producto sería el esperado para VcCDA: el segundo residuo desde el extremo no reductor es el único desacetilado.

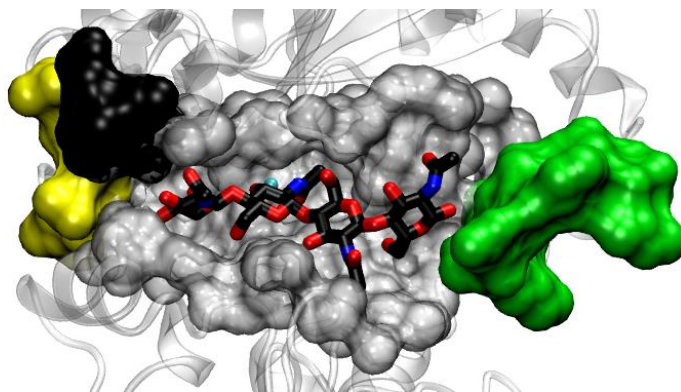


Figura 7.8-3 Modelo del loop 5 dinámico

Modelo bioinformático demostrando el posible comportamiento dinámico de DP5 para permitir la acomodación de sustratos más largos que DP3.

El resultado de esta simulación respalda positivamente la hipótesis de que el *loop 5* es capaz y estaría obligado a moverse para la acomodación de sustratos cuyo DP sea mayor que 3, de tal modo que los subsitios positivos que antes estaban estéricamente ocupados por la conformación que mostraban en el cristal estarían accesibles para los sustratos en cuestión.

Además explica el hecho de que DP2 sea el sustrato de preferencia. Es el único oligómero cuyos subsitios están directamente disponibles permitiendo el cierre completo del *loop 4*. Sustratos como DP3 o DP4 impiden que el *loop 4* se cierre completamente (lo cual podría generar que el ambiente del sitio catalítico no sea el ideal) o exigen que otros *loops* adopten una configuración específica para llegar a acomodar el sustrato.

7.8.3. “Subsite Capping Model” en otras CE4

Una vez identificado la importancia de los *loops* dentro de la estructura de la VcCDA se contempló la posibilidad de que este fenómeno no fuese aislado y que podría ser extrapolable a otras desacetilasas.

Se realizó un alineamiento de secuencias de CE4 cuya estructura cristalográfica había sido obtenida (con la excepción de NodB). Este proceso fue curado utilizando la estructura como referencia para poder situar correctamente la secuencia aminoacídica de los 6 *loops*.

Una vez realizado el alineamiento se destacó que estas proteínas presentaban un núcleo común muy conservado, pero los *loops* eran muy variables tanto en el contenido de su secuencia como en la extensión de la misma (Figura 7.8-4). Es destacable el hecho de que los *loops* presentes en la secuencia de VcCDA son generalmente los más extensos de las proteínas analizadas. Este hecho podría relacionarse con el riguroso control que existe en este enzima en el producto final tras la desacetilación.

7.8 Subsite Capping Model: Definición de la preferencia de sustrato

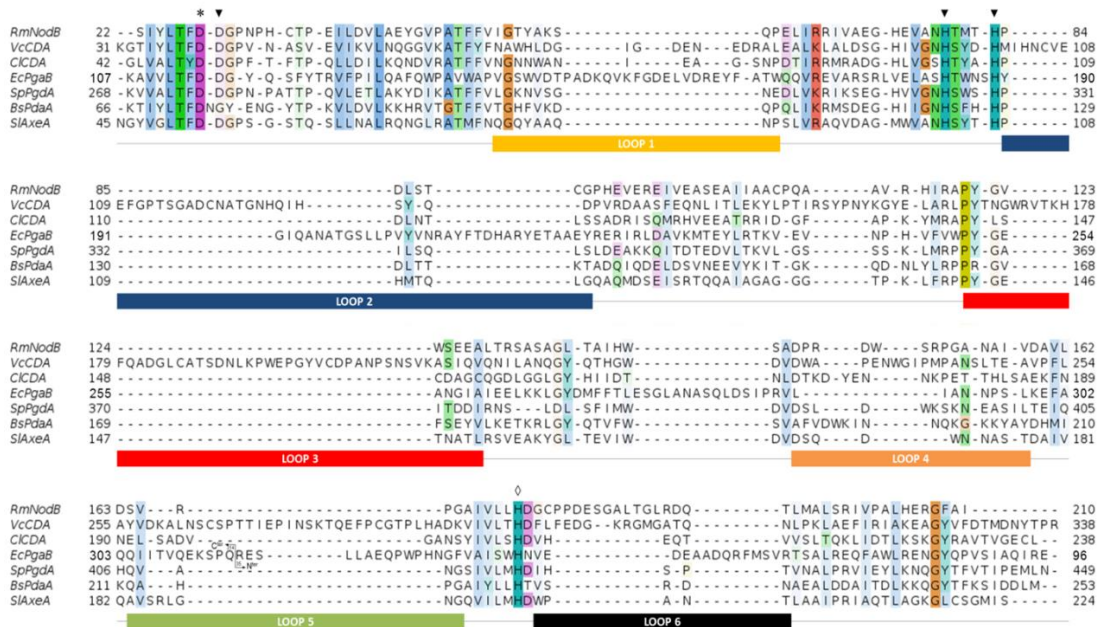


Figura 7.8-4 Alineamiento de secuencia de CE4s

Alineamiento de secuencia de la secuencia polipeptídica de los enzimas CE4 relevantes de los cuales se ha obtenido la estructura 3D (excepto en el caso de NodB). Se destaca la variabilidad en secuencia y extensión de los diferentes *loops*.

Una vez identificadas las diferencias existentes a nivel de secuencia, el siguiente paso fue realizar un análisis de la diversidad estructural de estos elementos en las CDAs de las cuales se había obtenido su patrón de desacetilación y estructura (Figura 7.8-5).

En base a la tabla mostrada en la Figura 7.8-5 se observa que las diferentes CE4s estudiadas presentan *loops* con estructuras tridimensionales muy diferenciadas. Este hecho era de esperar debido a la gran diversidad en secuencias que se habría encontrado. Unificando estos resultados con el hecho de que el resto de la estructura de estas proteínas está muy conservada y que, sin embargo, los PA de sus productos son diferentes, se propone que estos *loops* variables son los posibles determinantes de la preferencia de sustrato y el modo de desacetilación.

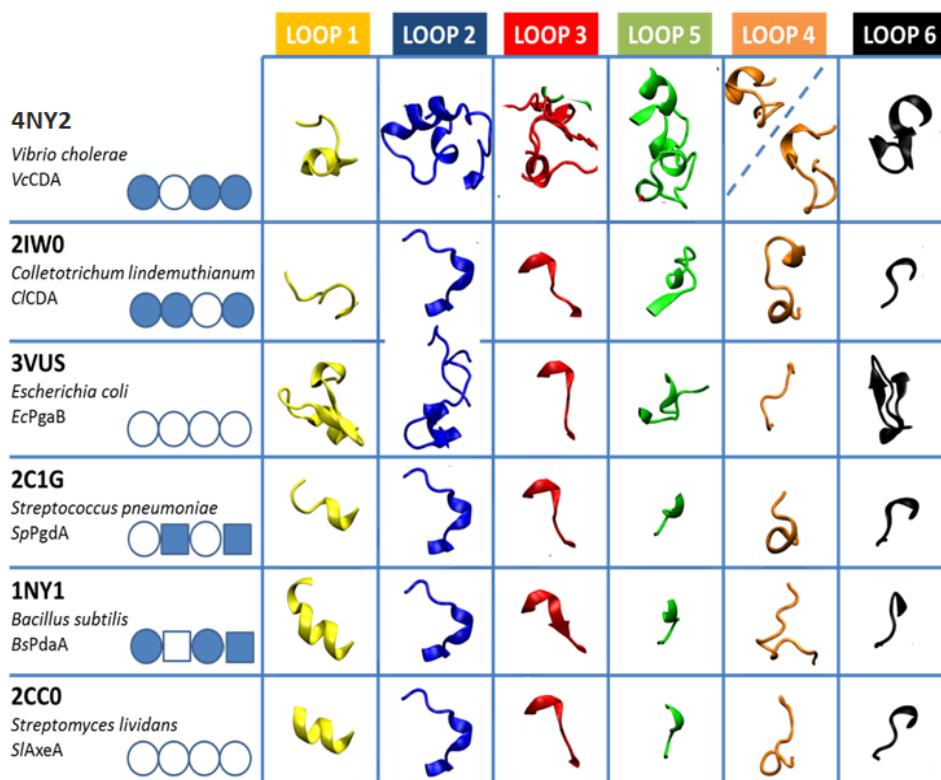


Figura 7.8-5 Estructura de loops y patrón de desacetilación

Estructuras correspondientes a cada uno de los loops 1 a 6 identificados en diferentes desacetilasas de la familia CE4 cuyo patrón de desacetilación ha sido previamente determinado. Círculo Azul: GlcNAc, círculo blanco: GlcN, Cuadrado azul: MurNAc, cuadrado blanco: MurN.

7.8.4. Definición de la hipótesis del “Subsite Capping Model”

El “Subsite Capping Model” es una hipótesis que intenta integrar las conclusiones extraídas de las tres experiencias anteriores de tal modo que permita interpretar la preferencia de sustrato por miembros de la familia CE4 así como el PA de sus productos. Los aspectos clave que integra son:

- La presencia de subsitios potenciales que se encuentran bloqueados por la estructura de los loops que rodean el sitio activo.
- Los loops no son estructuras rígidas e inmóviles, son dinámicos.
- El desplazamiento de los loops permite la exposición de subsitios necesarios para la acomodación de ciertos sustratos.
- Diferentes desacetilasas muestran loops muy diversos en secuencia, tamaño y estructura decorando los sitios activos.

Estos cuatro puntos se convierten en el enunciado del “Subsite Capping Model”:

El patrón de desacetilación y la preferencia de sustrato de los enzimas de la familia CE4 están regidos por las limitaciones impuestas por unos loops específicos y los fenómenos de remodelación dinámica de los mismos.

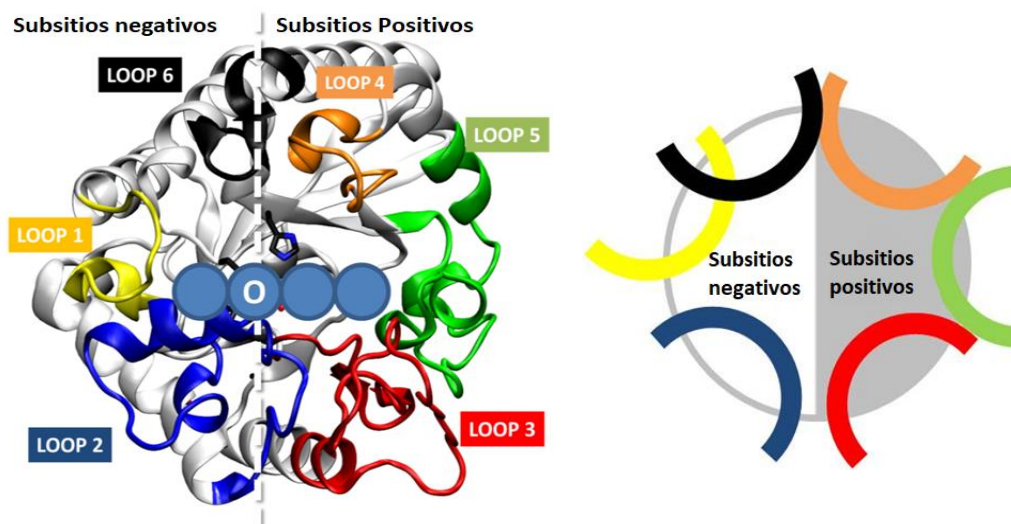


Figura 7.8-6 Esquema del Subsite Capping Model

Representación gráfica de la situación de los *loops* que definen el sitio activo de los miembros de la familia CE4 en base a la hipótesis del *Subsite Capping Model*. Las esferas azules hacen referencia a tetrasacárido

Generalizando el caso de VcCDA, se observa que los subsitios negativos, o del extremo no reductor del sustrato, están definidos por los *loops* 1, 2 y 6, mientras que los subsitios positivos, o del extremo reductor del sustrato, están definidos por los *loops* 3, 4 y 5 (Figura 7.8-6). En la situación particular de VcCDA los *loops* 4 y 5 son móviles permitiendo la acomodación de sustratos largos. Por el otro lado, los *loops* que definen los subsitios negativos presentan una extensa red de interacciones las cuales bloquean muy eficientemente esta región impidiendo que no se obtenga ningún otro PA en los productos de desacetilación.

Situando esta teoría como la piedra angular de la definición de sustrato y productos en CE4s, se podría llegar a generar una base sólida de ingeniería de desacetilasas en las que modular el resultado final de la catálisis fuese tan sencillo como intercambiar *loops* predefinidos. Sin embargo, para llegar a esta situación utópica, es necesario un gran esfuerzo en la demostración de la universalidad y aplicabilidad de esta teoría.

Objetivos

8. Objetivos

A continuación se detallarán los objetivos planteados para esta tesis en función de las dos familias de enzimas estudiadas: las desacetilasas de quitinas y las glicosintasas.

- Objetivos Capítulo 1: quitina desacetilasas

1. Desarrollo y validación de una metodología analítica HPLC-MS específica para la monitorización de la actividad de desacetilasas de oligosacáridos de quitina.
2. Caracterización de la VcCDA: parámetros cinéticos, dependencia de metales.
3. Estudio de los módulos funcionales de la VcCDA: obtención y caracterización del dominio catalítico aislado.
4. Demostración experimental de la hipótesis del *Subsite Capping Model* utilizando como referencia la VcCDA.
5. Diseño racional de mutantes de la VcCDA utilizando como base el marco del *Subsite Capping Model* con el fin de alterar la especificidad por sustrato para que desarrollen una mayor actividad con sustratos mayores que DP3.
6. Caracterización y aplicación de los mutantes obtenidos.

- Objetivos Capítulo 2: glicosintasas

1. Desarrollo y validación de una metodología de cribado HTS para bibliotecas de glicosintasas mutantes en procesos de evolución dirigida.
2. Aplicación del método HTS desarrollado en el cribado de una biblioteca de saturación del residuo nucleófilo en la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*.
3. Caracterización bioquímica de todos los mutantes que surjan de este cribado.
4. Realizar estudios mecanísticos con los nuevos mutantes con el fin de incrementar el conocimiento sobre la reacción glicosintasa.

Presentación de los Resultados

9. Presentación de los resultados

Los resultados correspondientes a los objetivos de la tesis se desarrollan en dos capítulos.

El capítulo 1 presenta los resultados sobre ingeniería de desacetilasas de quitina que se presentan en esta tesis en formato convencional como memoria científica. Estos resultados todavía no se han publicado y se encuentran en proceso de redacción para la publicación de tres artículos (títulos preliminares):

- Revisión bibliográfica: *Substrate recognition and specificity by chitin deacetylases.*
- Artículo: *An HPLC-MS method for kinetic characterization of chitin oligosaccharide deacetylases.*
- Artículo: *Loop topology and dynamics define the specificity and deacetylation pattern of Vibrio cholerae chitin deacetylase.*

El capítulo 2 presenta los resultados sobre glicosintasas. Éstos ya han sido publicados y se presentan en esta tesis en forma de artículos:

- Artículo 1: Eduardo Andrés, Hugo Aragunde, Antoni Planas. 2014. *Screening glycosynthase libraries with a fluoride chemosensor assay independent of enzyme specificity. Identification of a transitional hydrolase to synthase mutant.* Biochemical Journal. 458(2), 355-363.
- Artículo 2: Hugo Aragunde, Estela Castilla, Xevi Biarnés, Magda Faijes, Antoni Planas. 2014. *A transitional hydrolase to glycosynthase mutant by Glu to Asp substitution at the catalytic nucleophile in a retaining glycosynthase.* Carbohydrate Research, 389, 85-92.

En el apartado de conclusiones se resumen los logros realizados en esta tesis. Por último se recogen todos los protocolos utilizados en el desarrollo de los trabajos experimentales que condujeron a obtener los resultados presentados.

Capítulo 1.
Desacetilasas de Quitina

10. Capítulo 1. Desacetilasas de quitina

En los siguientes apartados se detallarán los resultados obtenidos dentro del campo de las desacetilasas de quitina. En concreto se desarrollaran 5 apartados que incluyen:

- El desarrollo de un método analítico HPLC-MS para la caracterización cinética de desacetilasas.
- La caracterización del VcCDA completa y dominio catalítico aislado.
- La demostración experimental del *Subsite Capping Model* y el planteamiento de estrategias para alcanzar este fin.
- Estrategias de diseño racional de los *loops* de la VcCDA con el fin de alterar su especificidad por sustrato y la caracterización de los mutantes obtenidos.
- Discusión global y perspectivas del trabajo realizado.

10.1. Un método HPLC-MS para la caracterización cinética de desacetilasas de oligosacáridos de quitina.

10.1.1. Necesidad de un método analítico de oligosacáridos de quitosano

Las desacetilasas de quitina se han propuesto como una batería de interesantes herramientas para la producción de quitosanos con DP, DA y sobre todo PA definido (Ghormade et al., 2010; Naqvi & Moerschbacher, 2015). Sin embargo, para poder ser capaces de adaptar estas enzimas a las necesidades existentes, u optimizarlas en algún aspecto, necesitamos métodos analíticos que permitan medir inequívocamente su rendimiento catalítico.

El estudio de la actividad desacetilasa no es un área de la bioquímica que hay surgido recientemente y en las décadas pasadas se han publicado múltiples métodos que permiten medir la actividad desacetilasa. Estos métodos se basan en diferentes propiedades físico-químicas de estos heterooligómeros, algunos de estos métodos utilizaban espectroscopía de infrarrojos (Sannan, Kurita, Ogura, & Iwakura, 1978), espectrofotometría-UV (Tan, Khor, Tan, & Wong, 1998), RMN (Hirai, Odani, & Nakajima, 1991), titulación potenciométrica (Jiang, Chen, & Zhong, 2003), etc. Sin embargo estos métodos presentaban una gran problemática: describir únicamente el DA como un parámetro general en una mezcla de moléculas de quitosano las cuales variaban en DP o PA. Este tipo de métodos poseen una baja aplicabilidad cuando se trata de seguir la progresión de la síntesis de quitosanos mediada por CDAs. En la bibliografía también podemos encontrar métodos que son capaces de superar esta limitación y que han sido aplicados en la caracterización de desacetilasas de quitosano, sin embargo estas metodologías tienen en común el límite principal de la solubilidad de los sustratos. La quitina es un polímero insoluble en las condiciones generalmente utilizadas en los ensayos de caracterización enzimática. De tal modo que se generalizó la aplicación de glicol-quitina como sustrato, siendo este un derivado cuya solubilidad se ve generalmente mejorada en medios acuosos (Yoshio Araki & Ito, 1975). Cuando se trata de sustratos oligoméricos, estos son relativamente solubles hasta un DP de 10.

Se pueden identificar dos grupos generales de métodos para la monitorización de la actividad de CDAs que utilizan oligómeros como sustrato:

- a) **Métodos directos:** Aquellos que no necesitan ningún tipo de reacción química o enzimática posterior a la desacetilación mediada por la CDA.
- b) **Métodos indirectos:** Aquellos que necesitan reacciones posteriores con los productos formados para estimar la actividad de la desacetilasa.

Estos dos métodos tienen cada uno una subdivisión posterior, aquellos cuya capacidad de detección se basa en la medición del quitosano producido (generalmente a través de la producción de aminos libres) y aquellos que miden la acumulación de acetato.

Los métodos directos están fundamentados en los cambios de propiedades que se producen en la transformación de quitina a quitosanos. Uno de los métodos más directos es la medición de los cambios de absorbancia a 216 nm, debido a la diferencia en los coeficientes de extinción entre el

grupo funcional carbonilo en los quitoooligosacáridos utilizados como sustrato y el acetato liberado con el producto (Hekmat et al., 2003; Souza, Plumbridge, & Calcagno, 1997). A pesar de la simpleza de este método, se considera que su sensibilidad es muy baja. Los métodos radiométricos también están muy extendidos a la hora de estimar la actividad de CDAs utilizando como sustrato [³H]-acetilglicol-quitina (Yoshio Araki & Ito, 1975; Kauss & Bauch, 1988). Al contrario que el método espectrofotométrico, este método destaca por su sensibilidad pero presenta otros inconvenientes como la necesidad de marcar isotópicamente los sustratos y el hecho de que por lo general cualquier método que implique el uso de radiometría se convierten en tediosos y aparatosos para aplicar rutinariamente y a gran escala.

Siguiendo la evolución lógica de los procesos analíticos, los métodos directos de detección se han extendido con la aplicación de técnicas cromatográficas (u otro tipo de separación de moléculas) para poder segregar diferentes oligómeros en función de su DP cuando se trata de mezclas complejas de reacción. Existen varios modos de detección utilizados para la monitorización de la formación de productos: Métodos HPLC-UV (Tang, Nisole, Dupont, Pelletier, & Waldron, 2011), Índice de refracción (Muraki, Yaku, & Kojima, 1993), MS (Hekmat et al., 2003; Tang et al., 2011). Sin embargo, todos estos métodos no han sido capaces de desempeñar la tarea en cuestión con el rendimiento HTS necesario para evaluar un gran número de muestras, como podría ser necesario para la caracterización enzimática detallada de un número significativo de desacetilasas.

Los métodos indirectos necesitan reacciones posteriores, ya sean químicas o enzimáticas, para poder transformar la presencia de producto en una señal medible. Los métodos indirectos que utilizan el quitosano como sustrato suelen utilizar las aminas libres generadas durante la desacetilación para generar productos medibles por espectrofotometría (ya sea colorimétrica o fluorimétrica). Existen tres reacciones químicas básicas para generar productos cromogénicos: aquellas que usan indol (Dische & Borenfreund, 1950; K Kadokura et al., 2007; Tokuyasu, Ohnishi-Kameyama, & Hayashi, 1996), hidracina de 3-metil-2-benzotiazolona (MBTH) (Kashyap & Garg, 2014; Pacheco, Trombotto, David, & Shirai, 2013), o aquellas que usan ninhidrina (Benson & Hare, 1975; Gohel et al., 2006; Leane, Nankervis, Smith, & Illum, 2004). Los métodos indirectos que generan productos fluorescentes a partir de las reacciones con quitosanos usan normalmente fluorescamina como reactivo de revelado (D. Blair, Hekmat, & Schüttelkopf, 2006).

Además de los métodos indirectos basados en reacciones puramente químicas, también existen métodos que utilizan ensayos enzimáticos acoplados. Estos ensayos enzimáticos por lo general están centrados en la medición de la acumulación de acetato. Estos métodos suelen encontrarse comercialmente disponibles en forma de kits de reactivos. Los enzimas en este tipo de kits varían de una casa comercial a otra pero traducirán la concentración de acetato en la conversión de NAD⁺ en NADH (kit acet, Megazyme; R-Biofarm) (Cord-Landwehr et al., 2016) o NADH en NAD⁺ (kit acetk, Megazyme). Estas conversiones son directamente medibles a través del uso de espectrometría.

Se ha reportado la aplicación de métodos indirectos colorimétricos en los que se ha incorporado una etapa de separación de moléculas, ya bien sea por HPLC o electroforesis. Este es el caso del marcaje de productos para incrementar la sensibilidad del método analítico. Para este marcaje se ha utilizado 1-fenil-3-metil-5-pirazolona (PMP) (Tsigos, Zydowicz, Martinou, Domard, & Bouriotis, 1999) o cristal violeta (Hattori, Anraku, & Kato, 2010).

Las desventajas comunes a los métodos indirectos incluyen, entre otros aspectos, la complejidad a la hora de utilizar múltiples reactivos por cada ensayo y la interacción con otros compuestos presentes en la matriz de reacción (aminas libres, acetato no proveniente de la desacetilación, otros contaminantes, etc).

Por otro lado, también se han desarrollado métodos para estimar la actividad de CDAs utilizando sustratos artificiales como puede ser el acetato de metilumbeliferona (Shao & Wiegel, 1995) o la p-nitroacetanilida (J. Liu et al., 2016). El fundamento de estos ensayos es que tras la hidrólisis del acetato la molécula resultante es capaz de ser excitada por una longitud de onda determinada y emitir fluorescencia eficientemente. Sin embargo a pesar de lo sensible y rapidez de aplicación de estas técnicas, no se está midiendo la eficiencia catalítica de la CDA en cuestión con un sustrato significativo. Esto se debe a que estos sustratos son altamente inespecíficos ya que pueden ser alterados por cualquier esterasa, incluyendo proteasas, lipasas, etc.

Independientemente de las ventajas e inconvenientes mencionadas de todas estas técnicas, ninguna de las descritas hasta este punto es capaz de medir la acumulación directa del producto de desacetilación con el rendimiento y sensibilidad necesaria para la caracterización rápida de un número considerable de desacetilasas naturales o mutantes. Esto pone de manifiesto la necesidad de un método analítico que sea capaz de medir la actividad de desacetilasas en un modo próximo al HTS.

En este apartado se describe la optimización y validación de un método analítico directo para la medida de la formación de oligosacáridos de quitosanos resultantes de la actividad de CDAs utilizando un sistema HPLC-MS integrando una etapa de cromatografía líquida de interacción hidrofílica (HILIC) y detección por espectrometría de masas. HILIC es un modo de separación utilizada en técnicas de HPLC diseñados de tal modo que permite la separación de moléculas polares (Alpert, 1990), como es el caso de los quitosanos y quitinas. En el desarrollo y validación de toda esta metodología se ha utilizado la VcCDA como enzima de referencia.

Los protocolos que se describen en esta sección incluyen una metodología general para la caracterización enzimática que permite el muestreo automático de los ensayos cinéticos permitiendo desacoplar las etapas de muestreo de las de medida. Esta propiedad permite incrementar sensiblemente la capacidad de análisis por operario. El uso de un sistema HPLC-MS presenta la ventaja de acoplar el rendimiento de plataformas robóticas en el muestro, inyectores automáticos en la sección de cromatografía y la selectividad de los detectores MS. Como resultado se obtiene un método rápido, versátil y fidedigno para la cuantificación directa de oligómeros de quitosano.

10.1.2. Producción de patrones de-N-acetilados

Una vez identificada la necesidad de un método analítico adaptado a los requerimientos de los experimentos a realizar una vez se empezase con las etapas de ingeniería enzimática, y una vez establecido el sistema cromatográfico y de detección disponible para su desarrollo, la siguiente etapa es la producción de patrones representativos de la actividad desacetilasa de VcCDA.

Experiencias previas en el análisis de diferentes oligosacáridos de quitosano muestran que los factores de respuesta (relación señal/concentración) en espectrometría de masas con ionización por *electrospray* son muy dependientes del grado de desacetilación y también del patrón de desacetilación.

Los hechos descritos ejemplifican la necesidad de que los patrones utilizados resulten de la actividad desacetilasa del enzima a caracterizar. En este ensayo necesitamos los productos de desacetilación de la VcCDA los cuales estarán desacetilados en la segunda posición desde el extremo no reductor.

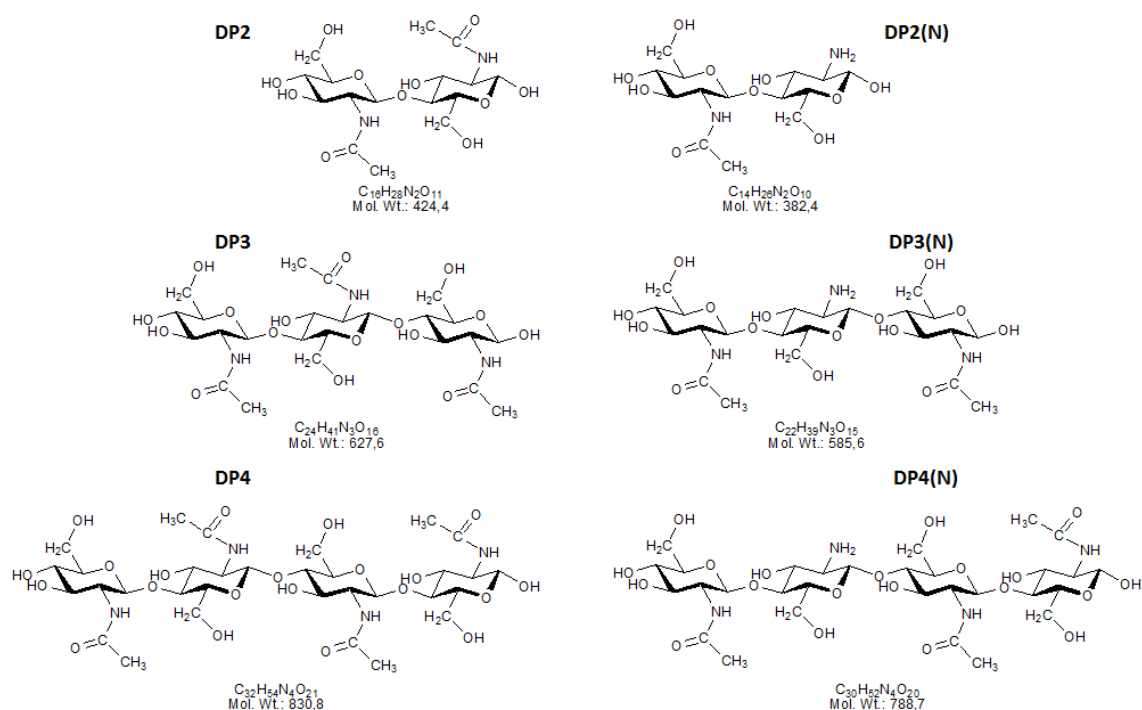


Figura 10.1-1 Sustratos y patrones utilizados en la validación del método HPLC-MS

Estructuras de los oligosacáridos de quitina DP2, DP3 and DP4 y sus respectivos homólogos de quitosano después de haber sido desacetilados por la acción de VcCDA. Este enzima desacetila la segunda posición desde el extremo no reductor. La hidrólisis de un acetato supone una pérdida en masa de 42 Da.

El protocolo general de producción de los patrones se estableció en tres etapas (Figura 10.1-2): a) reacción enzimática de desacetilación; b) desproteínización; c) purificación de productos por cromatografía de intercambio iónico.

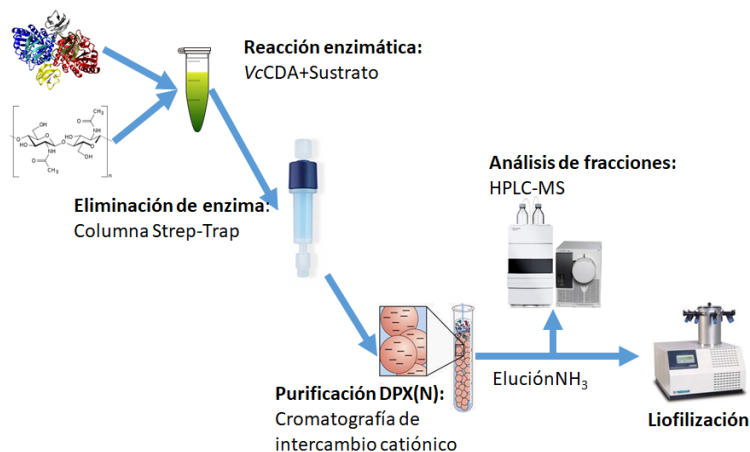


Figura 10.1-2 Protocolo producción de patrones DPX(N)

Esquema general en el que se muestran las diferentes etapas y procedimientos en la producción de patrones monodesacetilados por VcCDA.

Se prepararon tres cócteles de reacción, uno para cada sustrato (DP2, DP3 y DP4) y se mezclaron con una cantidad determinada de enzima VcCDA monomérica purificada. La evolución de la reacción fue monitorizada utilizando un método preliminar de detección mediante MS. Cuando se observó el consumo total del sustrato o la ausencia de evolución de la reacción se continuó con las etapas de purificación de los productos. Este fenómeno se conseguía antes de las 48 horas de reacción

El enzima utilizado se purificó utilizando la cola *Strep-Tag II* introducida en su gen para su expresión heteróloga en *E. coli* y purificación mediante cromatografía de afinidad. Dado que el enzima utilizado en la reacción enzimática dispone de este marcaje se utilizó como oportunidad para eliminar el enzima. El uso de una columna *Strep-Trap* de 1 ml (*GE-Healthcare*) probó ser un método eficiente para eliminar el enzima de la mezcla de reacción.

La siguiente etapa de purificación conduce a la obtención de los productos monodesacetilados puros a través de un protocolo de cromatografía de intercambio catiónico. Para este proceso se utilizó la resina Dowex 50wx8. Esta resina consiste en una matriz de estireno-divinilbenzeno con ácidos sulfónicos como grupos funcionales para la inmovilización de cationes. Una vez desproteinizada la mezcla de reacción, esta se incubó con la resina previamente acondicionada.

Tras el lavado y elución progresiva de los productos unidos mediante el uso de un gradiente de NH_3 , las diferentes fracciones fueron analizadas por el método preliminar de detección mediante MS. Como norma general, el compuesto monodesacetilado eluye a partir del 3% (v/v) de contenido en NH_3 , mientras que las fracciones previas mostraban trazas del producto de partida.

Aquellas fracciones que fueron identificadas como puras, se unieron en un único volumen y liofilizadas para su conservación. Tras este procedimiento se estimó la eficiencia del protocolo completo, cuyo rendimiento se acercaba al 50% de la masa teórica esperada en función de la cantidad de sustrato utilizada (Tabla 10.1-1).

Sustrato	MW	mg en reacción	DPX(N) MW	mg teóricos DPX(n)	mg purificados	Rendimiento (%)
DP2	424,4	10,34	382,4	9,32	4,25	45,6
DP3	627,6	6,11	585,6	5,70	3,85	67,5
DP4	830,8	10,32	788,7	9,80	4,69	47,9

Tabla 10.1-1 Tabla de resultados de la purificación de patrones

Tabla con las cantidades de quitooligosacáridos de partida así como las masas teóricas y reales del producto de desacetilación y su rendimiento.

Una pequeña fracción ya purificada fue disuelta en n-propanol:H₂O 1:1 y se analizó por espectrometría de masas con ionización por *electrospray* en modo positivo. La elección de este modo se debe a que los quitosanos monodesacetilados presentan aminas primarias que son fácilmente protonables utilizando ácido fórmico como aditivo en los eluyentes empleados. Esta protonación aumenta la sensibilidad a la hora de detectar iones en la etapa de MS.

Al analizar el espectro del producto purificado de la desacetilación de DP2, se observa que solo están presentes los iones correspondiente a [DP2(N)+H]⁺ a 383,3 Da, y los iones (minoritarios) correspondientes a los aductos de sales o a iones moleculares (Figura 10.1-3).

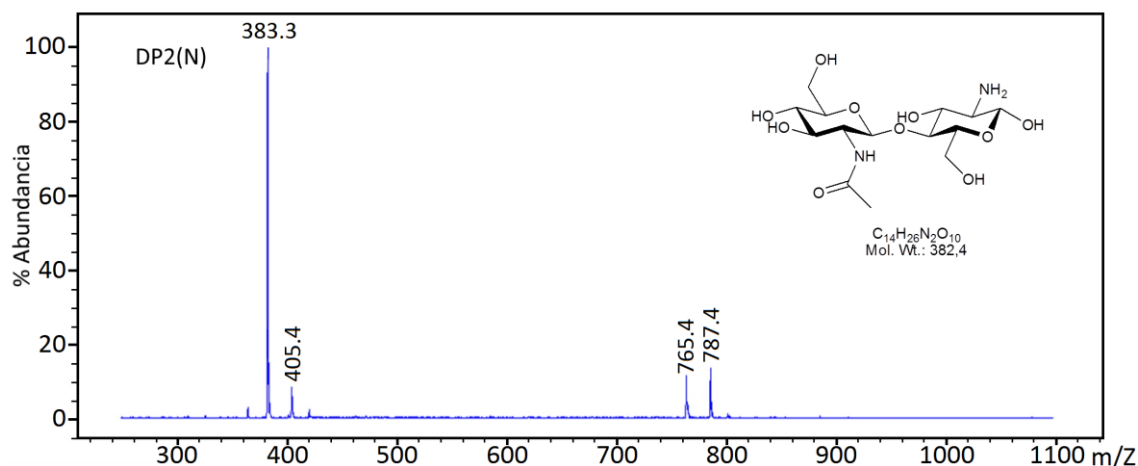


Figura 10.1-3 Espectro iónico del patrón DP2(N)

Espectro del escaneo de iones para el producto DP2(N) después de la desacetilación por VcCDA y su purificación. m/z = 383,3 [DP2(N)+H]⁺; m/z = 405,3 [DP2(N)+Na]⁺; m/z = 765,4 [2·DP2(N)+H]⁺; m/z = 787,4 [2·DP2(N)+Na]⁺.

En el caso del producto de la transformación de DP3 por la VcCDA solo aparecen los iones esperables: m/z= 586,4 que se corresponde con la masa protonada del producto monodesacetilado; m/z=293,8 representa el ion doblemente cargado y m/z=608,3 es el resultado del aducto del producto monodesacetilado con un ion de Na⁺ (Figura 10.1-4).

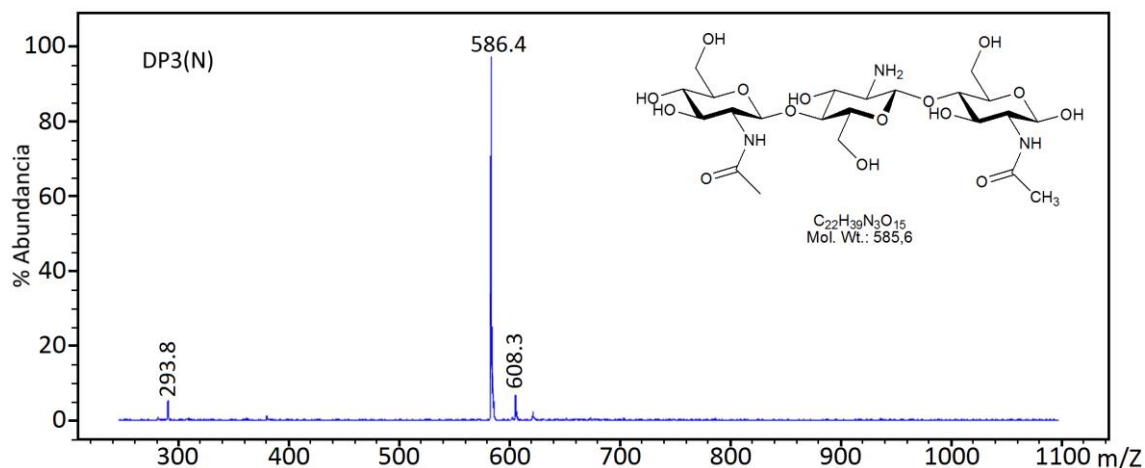


Figura 10.1-4 Espectro iónico del patrón DP3(N)

Espectro del escaneo de iones para el producto DP3(N) después de la desacetilación por VcCDA y su purificación. $m/z = 293,8$ $[DP3(N)+2H]^{2+}/2$; $m/z = 586,4$ $[DP3(N)+H]^+$; $m/z = 608,3$ $[DP3(N)+Na]^+$.

Las observaciones realizadas en los otros productos son equivalentes a lo que se observa en el espectro del producto DP4(N). $m/z = 789,4$ que se corresponde con la masa del producto monodesacetilado protonado; $m/z = 395,3$ representa el tetrámero doblemente cargado y $m/z=806,4$ es el resultado del aducto del producto monodesacetilado con un ion de Na^+ .

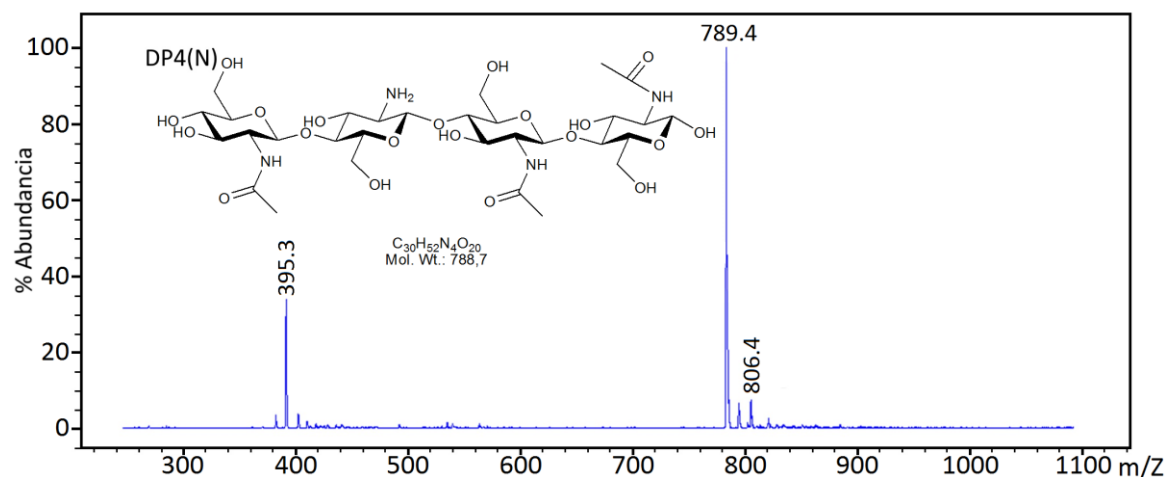


Figura 10.1-5 Espectro iónico del patrón DP4(N)

Espectro del escaneo de iones para el producto DP4(N) después de la desacetilación por VcCDA y su purificación. $m/z = 395,3$ $[DP4(N)+2H]^{2+}/2$; $m/z = 789,4$ $[DP4(N)+H]^+$; $m/z = 806,4$ $[DP4(N)+Na]^+$.

Estos tres análisis de las masas presentes en los sólidos purificados indican un grado de pureza muy elevado. Este hecho permitió confirmar que los productos obtenidos eran aptos para su uso como patrones en la validación del método y como referencia en los ensayos de cuantificación posteriores.

10.1.3. Desarrollo del método analítico

Obtenidos los productos que van a ser utilizados como estándares de referencia en todo el proceso de desarrollo es necesario identificar las etapas que van a componer el método analítico general (Figura 10.1-6).

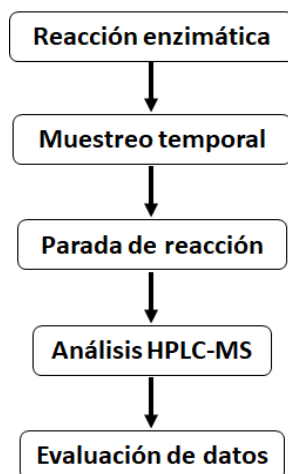


Figura 10.1-6 Mapa de todo el proceso analítico

Esquema en el que se muestran las diferentes etapas de todo el proceso analítico desde la reacción enzimática hasta la evaluación de los resultados.

Las muestras son generadas a partir de una reacción de desacetilación catalizada por un enzima. Debido a que la caracterización típica de los parámetros k_{cat} y K_M a través de la ecuación de Michaelis y Menten puede suponer un número tan elevado como varios cientos de muestras, se definió que la plataforma estandarizada más eficiente para la escala de trabajo era las microplacas de 96 pocillos.

Con el objetivo de conseguir imágenes instantáneas en el progreso de la desacetilación en intervalos muy cortos de tiempo y medir, en paralelo, varias condiciones (concentración de enzima, concentración de sustrato, pH, etc.) es necesaria la capacidad de poder detener la reacción en cualquier punto que se considere oportuno. Este requisito sería conseguido mediante el retirado de alícuotas del volumen de reacción y deteniendo su progreso mediante su adición sobre un volumen de una disolución que tendría la propiedad de bloquear cualquier progreso de la reacción enzimática sin comprometer la estabilidad de los compuestos presentes en ella. La capacidad de desenlazar la generación de muestras y la medida de las mismas en un ensayo *off-line* como el aquí definido, incrementa muy significativamente la capacidad analítica en número de muestras estudiadas por unidad de tiempo. Además incrementa la rentabilidad de los equipamientos utilizados, ya que la etapa analítica puede desplazarse en el tiempo permitiendo el análisis de muestras durante horarios nocturnos sin la presencia de operarios.

El uso de microplacas y la disposición de un tampón de parada válido, permitieron el desarrollo de un proceso completamente automatizado. Por consiguiente, todos los pasos involucrados en la generación de muestras (manipulación de líquidos, incubaciones, mezclado, etc.) son llevados a término por una plataforma robótica. En nuestra aplicación el modelo de la plataforma robótica se trata de la plataforma Bravo de Agilent, con los módulos necesarios para el control de temperatura e incubación de microplacas. Además el utilizar como contenedores de muestras

microplacas de 96 permite su traslado directo a la sección de cromatografía, ya que este formato también es un estándar generalizado en la mayoría de inyectores automáticos en cromatógrafos de HPLC. Este factor, por otro lado, condiciona el volumen máximo de la reacción enzimática. En cualquier caso se ha definido que 100 μL es un volumen idóneo para permitir un muestreo eficiente a la vez que lo suficientemente miniaturizado como para no suponer un gasto excesivo ni de enzima ni de sustrato.

Como se ha mencionado previamente, se generará un gran número de muestras en cada una de las caracterizaciones enzimáticas (en una caracterización típica: 12 concentraciones diferentes de sustrato, 8 puntos temporales por cada una, al menos dos réplicas de cada y una batería de diferentes sustrato a los que aplicar todo este proceso). Este aspecto condiciona el apartado de la separación cromatográfica de los compuestos, es decir, es necesario un método que sea lo suficientemente rápido, simple, eficiente y robusto para afrontar el volumen potencial de muestras a analizar.

Experiencias previas en el laboratorio indican la existencia de una tendencia hacia la reducción en la señal de abundancia de iones en la monitorización de productos durante periodos largos de tiempo utilizando un detector MS. Este fenómeno nos obliga a intercalar series completas de patrones cada cierto número de muestras inyectadas. De este modo, podemos evitar esta problemática a través de definir precisamente el estado del detector durante un periodo de tiempo. Así, las muestras que se encuentran inyectadas entre dos series de patrones son interpoladas en la curva patrón resultante de la combinación de estas dos.

En resumen, los aspectos clave del método de muestreo y cromatográfico a desarrollar se concretan en:

- a) Uso de microplacas para la automatización y transversalidad.
- b) Uso de un tampón de parada para desacoplar la reacción del análisis de muestras.
- c) Un método cromatográfico rápido y resolutivo que evite el uso de gradientes para gestionar el elevado número de muestras.
- d) Intercalado de series completas de patrones para definir el estado del detector.

Una vez establecidas las bases sobre las que se construirá el método analítico y estando en disposición de unos patrones obtenidos por la actividad desacetilasas de VcCDA, el siguiente paso es la definición de la composición química del tampón encargado de detener la reacción enzimática. La formulación utilizada en esta solución también será la que se utilice en la disolución de los patrones utilizados en las secuencias analíticas de muestras de caracterización.

Siguiendo la tónica general de este desarrollo, el tampón de parada debe ser lo más simple posible para aportar robustez, pero además, debe cumplir tres requisitos:

- a) La reacción enzimática debe ser parada inmediatamente.
- b) Asegurar la estabilidad de las moléculas disueltas en él. La composición de esta solución tiene como fin el mantener los sustratos y productos inalterados durante un periodo temporal lo suficientemente largo como para que se pueda realizar el análisis sin que se produzca ningún tipo de degradación.

- c) Compatibilidad con los contenedores utilizados. Este último requisito implica que las disoluciones que utilicen disolventes orgánicos no deben ser capaces de disolver o solubilizar compuestos de los plásticos que forman las microplacas u otros contenedores.

Con el objetivo de identificar el tampón de parada óptimo, se ensayaron varias condiciones: ácido fórmico, acetonitrilo, etanol, isopropanol, n-propanol, etc. Estos disolventes fueron testeados en una serie de concentraciones (diluyendo en agua) y ratios muestra/tampón.

El ensayo fue realizado a través de la toma de muestras de reacciones enzimáticas y procediendo con su dilución en la solución de parada hasta un volumen final de 100 μ L. Como control se utilizó el mismo ratio de dilución pero en el mismo tampón de reacción. Las muestras paradas fueron inyectadas en el sistema HPLC-MS para comprobar si se observaba alguna evolución en las reacciones supuestamente paradas.

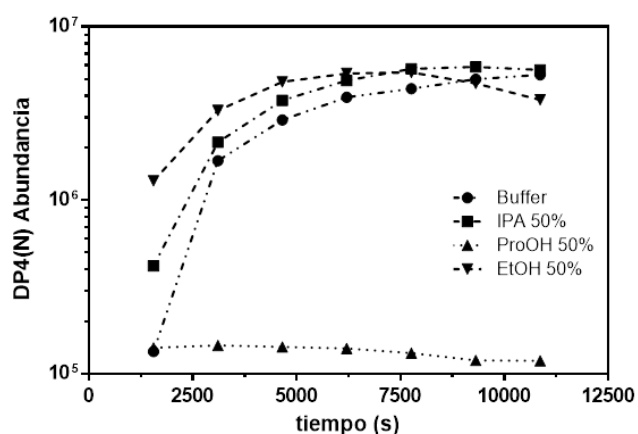


Figura 10.1-7 Comprobación del tampón de parada

Gráfico en el que se muestra la evolución de la reacción tras la adición de las muestras sobre varios tampones para obtener la parada de la reacción. IPA: 2-propanol, ProOH: 1-Propanol, EtOH: Etanol.

En la Figura 10.1-7 se demuestra como el tampón de parada 1-propanol:H₂O 1:1 es capaz de detener una reacción desacetilasa previamente iniciada. Además se observa como el isopropanol y el etanol interfieren de algún modo en la señal ya que no se encuentran al mismo nivel de partida que la muestra de la reacción en tampón.

Como resultado final se encontró que una dilución 1:9 de la muestra (10 μ L de muestra de cinética en 90 μ L) en una solución que contiene n-propanol al 50% en H₂O asegura la detención inmediata de la transformación del sustrato, a la vez que demostró cumplir con los otros requisitos: estabilidad de los compuestos por un periodo de tiempo dado y el ser compatible con todos los sistemas de manipulación y almacenamiento de líquidos.

Una vez definida la formulación del tampón de parada, la siguiente etapa del desarrollo incluye el establecer los parámetros de separación cromatográfica y de detección.

Debido a la naturaleza polar de los oligómeros de quitosano y en base a información previa disponible (Cord-Landwehr et al., 2017; Hamer et al., 2015), se decidió utilizar una metodología HILIC de separación utilizando una columna cuya matriz está funcionalizada con grupos amida. La columna escogida es XBridge BEH Amide del fabricante Waters.

Las tecnologías HILIC de separación cromatográfica están especialmente indicadas para la separación de moléculas pequeñas y polares. En cromatografía de fase normal, la fase estacionaria es más polar que la fase móvil y la retención de los compuestos se incrementa a medida que la polaridad de la fase móvil se reduce. Por el contrario, en la cromatografía de fase reversa ocurre la situación opuesta. La cromatografía líquida de interacción hidrofílica se considera en algunos casos una modalidad de la cromatografía de fase normal. Al igual que la fase normal, la cromatografía HILIC utiliza una fase estacionaria polar (sílica, amina, ciano, amida...) pero el disolvente se asemeja más a los utilizados en cromatografía de fase reversa (Buszewski & Noga, 2012).

Para el estudio de las condiciones cromatográficas los productos puros de quitoooligosacáridos monodesacetilados fueron disueltos a diferentes concentraciones en el tampón de parada (n-propanol:H₂O 1:1). Esta disolución fue utilizada en varias facetas del desarrollo del método: tanto para el estudio de la separación cromatográfica como para la construcción de las curvas patrón en el análisis real de muestras.

Los parámetros de cromatografía líquida HPLC estudiados (utilizando un equipo Agilent 1260) y optimizados incluyen: fase móvil, aditivos de la fase móvil, temperatura de columna, flujo, volumen de inyección, mecanismo de lavado, orden de secuencia, etc.

Para comprobar la capacidad resolutoria del método se utilizaron como referencias los principales compuestos que se van a encontrar en las reacciones enzimáticas: el quitoooligosacárido (sustrato) y su homólogo monodesacetilado (el producto). Sus disoluciones fueron inyectadas para todas las condiciones ensayadas. Para la detección de los compuestos se utiliza únicamente el catión monoprotonado mediante el modo *Single Ion Monitoring* (SIM+). En este modo se dedica una canal de detección a la obtención de la abundancia de los iones de una o varias masas determinadas a lo largo del cromatograma, en oposición a los modos de escaneo que detecta todos los iones en un rango de m/z definido.

Las condiciones óptimas fueron seleccionadas mediante el estudio de los efectos en la resolución conseguida y la abundancia de iones observada en el cromatograma (prestando especial atención al producto monodesacetilado). Después del estudio en profundidad las condiciones finales se resumen en la Tabla 10.1-2.

Parámetro	Valor
Volumen de inyección	5 µL
Modo de elución	isocrático
Fase móvil	Actonitrilo:H ₂ O 65:35
Aditivo	Ácido fórmico 1%
Flujo	0,4 mL/min
Temperatura de columna	60°C

Tabla 10.1-2 Condiciones optimizadas HPLC

Condiciones finales de la sección de cromatografía líquida HPLC para la separación y detección de quitoooligosacáridos y los productos resultantes de su desacetilación mediante el enzima VcCDA.

Los parámetros indicados en la tabla superior cumplen los requisitos establecidos a la vez que no generan presiones elevadas en la columna asegurando la integridad de todo el sistema y permitiendo que su vida útil no se vea reducida por un uso negligente.

En la Figura 10.1-8 se muestran los cromatogramas obtenidos utilizando el método HPLC puesto apunto. En los diferentes apartados de esta figura se demuestra claramente la ventaja de utilizar un detector MS frente a otros sistemas de detección como podría ser absorbancia o fluorescencia. Este tipo de dispositivos permiten la monitorización de varios iones en canales independientes. Esta aplicación permite separar en la detección compuestos que no son perfectamente separados en la etapa cromatográfica. Mientras la diferencia de masa entre los dos iones sea superior al margen de error establecido por el equipo, la detección individual por SIM es posible y de gran ayuda. El aprovechamiento de esta opción de detección permite llevar a buen término separaciones como la de DP3/DP3(N) y DP4/DP4(N).

Con estos resultados también se ha establecido que, independientemente del DP de los tres oligosacáridos estudiados, métodos cromatográficos con una duración igual o inferior a 3 minutos son suficientes para la segregación de moléculas completamente acetiladas de moléculas monodesacetiladas. Este aspecto permite conseguir la eficiencia necesaria para el análisis de un número elevado de muestras.

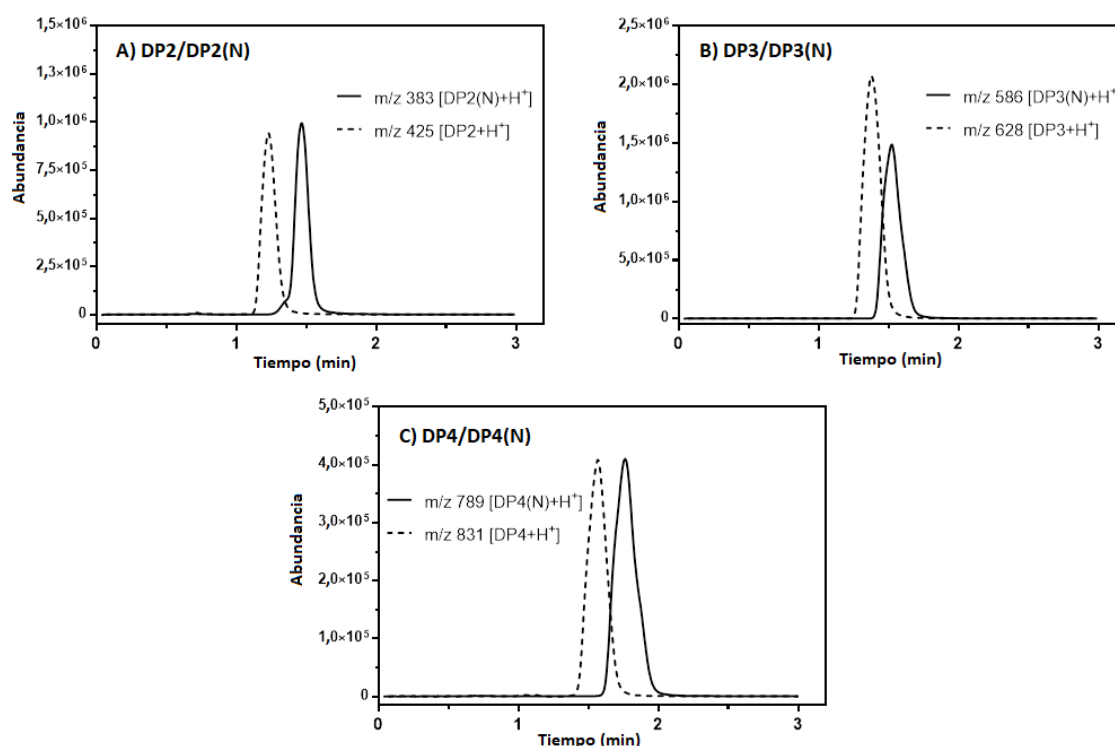


Figura 10.1-8 Cromatogramas obtenidos por el método HPLC establecido

Cromatogramas representativos del método de HPLC optimizados para la separación de quitoooligosacáridos y sus homólogos de quitosano una vez desacetilados por VcCDA. Monitorización por MS SIM+ m/z seleccionados fueron M+H⁺. A) DP2 y DP2(N) m/z 425 y 383 respectivamente; B) DP3 y DP3(N) m/z 628 y 586 respectivamente y C) DP4 y DP4(N) m/z 831 y 789 respectivamente.

Una vez determinadas las condiciones cromatográficas, los parámetros relacionados con el módulo de detección fueron ajustados para obtener la mayor sensibilidad posible (ratio

abundancia/concentración) del método analítico completo. Desde la cámara de ionización (ESI+) hasta los parámetros de detección, los aspectos optimizados incluyen: gas de secado, flujo del gas, temperatura del gas, voltaje del capilar, voltaje del cono, tiempos de trabajo por canal (*dwell time*), valores de fragmentador, etc.

El equipamiento utilizado se trata de un MSD del fabricante Agilent, específicamente el modelo G6120B acoplado a la sección de cromatografía líquida HPLC 1260. Se trata de un detector de cuadrupolo simple con capacidad para ionización por electrospray o APCI (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*). El rango de masas detectables abarca desde 1-3000Da.

Las condiciones finales se indican en la Tabla 10.1-3.

Después de haber definido todos los parámetros necesarios para el gobierno del hardware y software en este protocolo analítico, incluyendo la descripción de las etapas de muestreo, se continuó con la descripción funcional del método en términos de linealidad, variabilidad y otros.

Parámetro	Valor
Fuente de ionización	Electrospray
Modo	Positivo
Voltaje del capilar	4 kV
Gas de desolvatación	Nitrógeno
Flujo del gas de desolvatación	12 L/min
Temperatura	300°C
Fragmentor	80
Dwell time	20% para DPX y 80% para DPX(N)
Método de detección	SIM $m/z=[M+H]^+$: DP2(N): 383 // DP2: 425 DP3(N): 586 // DP3: 628 DP4(N): 789 // DP4: 831

Tabla 10.1-3 Condiciones optimizadas detección MS

Condiciones finales del módulo espectrómetro de masas Agilent G6120B para la detección de quitooligosacáridos y los productos resultantes de su desacetilación mediante el enzima VcCDA.

Se creó, por dilución seriada partiendo desde 1 mM, una recta patrón que parte como concentración más alta desde el valor de 100 μ M hasta 0,14 μ M para cada uno de los oligosacáridos de quitosano producidos como patrones: DP2(N) - AD, DP3(N) - ADA y DP4(N) - ADAA. Para cada uno de estos compuestos se realizaron 7 inyecciones repetidas de la serie completa de patrones para evaluar la repetibilidad del método (Tabla 10.1-4).

Compuesto	Concentración de la muestra	n	CV (%)
DP2(N)	100 µM	7	1,48
	33,3 µM	7	1,75
	0,41 µM	7	5,91
DP3(N)	100 µM	7	0,96
	33,3 µM	7	1,20
	0,05 µM	7	1,82
DP4(N)	100 µM	7	0,66
	33,3 µM	7	1,16
	0,14 µM	7	5,88

Tabla 10.1-4 Validación del método analítico para el di-, tri y tetrasacárido monodesacetilado

Tabla en la que se muestran los coeficientes de variación del método analítico para tres concentraciones de cada uno de los oligosacáridos de quitosano estudiados. Se obtienen los parámetros por inyección repetida de una recta patrón desde 100 µM a 0,12 µM

En la Tabla 10.1-4 se representan los valores de tres muestras pertenecientes a las rectas patrón estudiadas: Un valor de alta concentración (100 µM), uno de media (33,3 µM) y otro de concentración baja (0,14 µM). En esta misma tabla se observa que el coeficiente de variación (CV) se encuentra siempre por debajo del valor de 5,91%. Además como norma general el CV se reduce significativamente a medida que la concentración de la muestra se incrementa hasta valores tan bajos como 0,66%. Estos valores se aceptaron como lo suficientemente bajos como para que el método fuese aplicable en una situación real.

Es necesario comentar, como ya se había indicado previamente, que los coeficientes de variación finales serán más altos que los aquí indicados. Esto se debe a que cuando el equipo se mantiene en funcionamiento continuo con muestras inyectadas en una larga sucesión, el sistema sufre una deriva inevitable (pero controlable) en los valores de abundancia de las muestras. Esto implica que una misma serie de patrones inyectada repetidas veces a lo largo de un periodo de tiempo equivalente a varias horas, mostrará valores diferentes.

10.1.4. Validación del sistema analítico global

Para poder evaluar la validez de todo el proceso para la monitorización de las reacciones de desacetilación, se prepararon tres reacciones enzimáticas, una para cada sustrato: disacárido (DP2), trisacárido (DP3) y tetrasacárido (DP4).

La concentración de sustrato usado fue de 2 mM disuelto en tampón Tris 50 mM pH 8,5 y NaCl 300 mM. El volumen final de la reacción fue de 150 µL (no se usan los 100 µL mencionados en el desarrollo del método porque en esta etapa de validación era posible la necesidad de más muestreos que los utilizados en un cinética común de caracterización). La concentración de VcCDA utilizada en la reacción fue de 0,75 µM. La reacción se llevó a cabo a una temperatura de 37°C.

Para la monitorización de la desacetilación, alícuotas de 10 µL fueron tomadas del cóctel de reacción y paradas mediante su dilución en 90 µL del tampón de parada (n-propano:H₂O 1:1). Esta monitorización se mantuvo durante un período de tiempo equivalente a 40 horas. Consecuentemente, todas las muestras generadas y patrones fueron analizados con el método descrito en el apartado anterior. Las concentraciones de producto fueron calculadas utilizando el

factor de respuesta calculada con unas nuevas rectas patrón tanto para el sustrato acetilado como para el producto.

En la caracterización previamente publicada de la VcCDA, se reportó la preferencia de sustratos de este enzima (Andrés, Albesa-Jové, et al., 2014). Como se introdujo en la presentación de este enzima, cuando el DP del sustrato incrementa, la eficiencia catalítica del mismo se ve reducida. De este modo, de los sustratos ensayados, DP2 es el más activo mientras DP4 el menos eficiente al ser catalizada su reacción de desacetilación.

De acuerdo a lo descrito, en el conjunto de gráficos mostrados en la Figura 10.1-9, se observa como cuando se utiliza el disacárido como sustrato este es consumido significativamente más rápido que el trímero o el tetrámero, siendo este último el último en ser agotado. Además, esta experiencia nos permite identificar la validez del método, no solo para la cuantificación del producto formado, si no que se observa el consumo del sustrato. Es de gran relevancia observar la conversión completa de sustrato en producto.

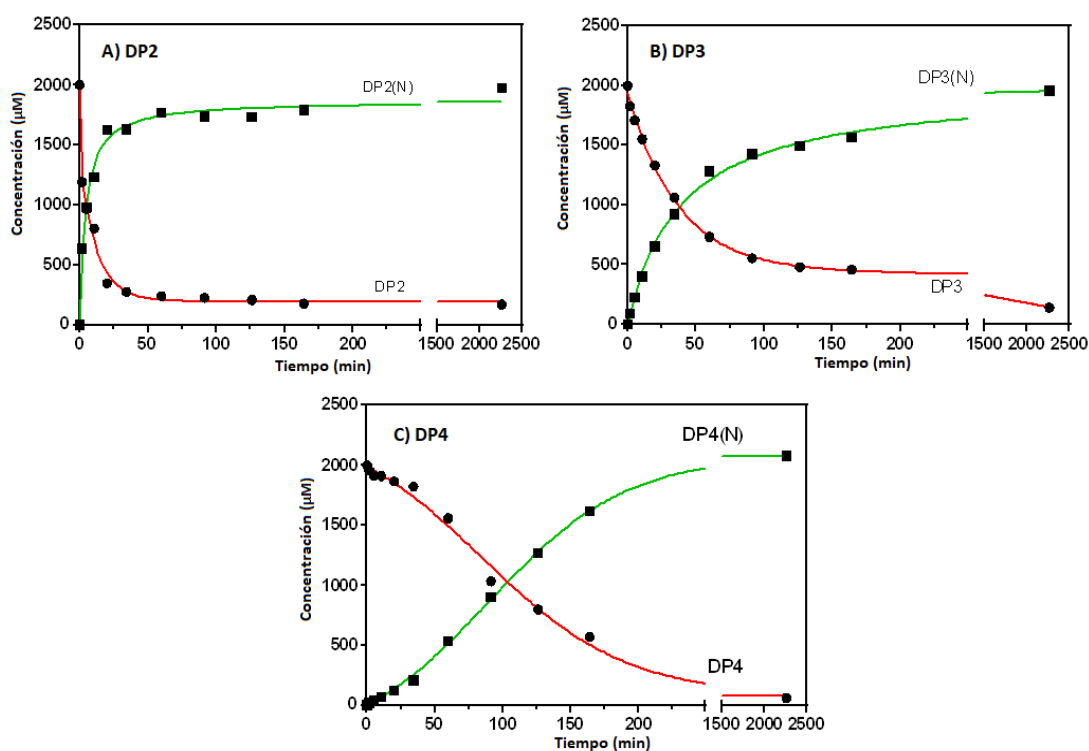


Figura 10.1-9 Evolución de las reacciones de desacetilación

Gráficos obtenidos mediante la monitorización de reacciones desacetilasa usando el método de HPLC/MS desarrollado para la separación de quitoooligosacáridos y sus homólogos de quitosano una vez desacetilados por VcCDA. Monitorización de la reacción desacetilasa para: A) DP2; B) DP3 y C) DP4.

Como ya se indicó anteriormente, el aspecto que va a afectar a la repetibilidad del método es el hecho de que realizar largas secuencias de inyecciones durante varias horas harán que la deriva que sufre el detector sea significativa. Para validar todo este proceso y, a la vez, para limitar y reducir el efecto de esta deriva se limitó el número de muestras inyectadas entre serie de patrones a un número entre 40 y 50. Este intervalo se estableció como norma general: no más de 50 muestras serán inyectadas entre una serie de patrones y otra, y cualquier número de muestras estará precedida y seguida de una inyección de los patrones. Por ejemplo, al analizar una microplaca de 96 muestras se inyectará una serie de patrones al principio, otra una vez se haya

inyectado las 48 muestras de la primera mitad y otra serie una vez se haya inyectado la segunda mitad de las muestras.

En este estudio un total de 6 series de patrones con concentraciones entre 0,05 μM y 225 μM fueron inyectadas en el HPLC/MS con 50 muestras intercaladas entre una y otra tanda. La repetibilidad fue determinada como el coeficiente de variación de las áreas de los picos del producto monodesacetilado a tres niveles de concentración diferentes (225, 50 and 1 μM). Como era de esperar, el coeficiente de variación se incrementó considerablemente con respecto al calculado en el experimento previo en el que las series de patrones eran inyectadas una detrás de otra (Tabla 10.1-4). Los valores que se encontraron varían desde el 2,1% hasta el 11,2%, cuando los valores del otro experimento variaban desde el 0,66% hasta el 5,88%. Teniendo en cuenta que existe esta fluctuación direccional en la detección y que es controlable, se aceptaron estos valores como lo suficientemente bueno como para que el ensayo sea útil en la caracterización de desacetilasas.

Compuesto	Concentración de la muestra	n	Abundancia promedio	CV (%)	Factor de Respuesta
DP2(N)	225 μM	6	14605372,5	2,09	64912,8
	50 μM	6	3639605,4	2,48	72792,1
	1 μM	6	76531,5	6,82	76531,5
DP3(N)	225 μM	6	25428643,2	6,65	113016,2
	50 μM	6	6545449,0	6,07	131507,3
	1 μM	6	115775,9	8,72	115950,5
DP4(N)	225 μM	6	4252702,7	8,08	18900,9
	50 μM	6	970259,7	9,00	19405,2
	1 μM	6	17106,6	11,22	17106,6

Tabla 10.1-5 Validación del método analítico global para el di-, tri y tetrasacárido monodesacetilado intercalando muestras reales

Tabla en la que se muestran los coeficientes de variación, abundancia promedio y factor de respuesta para el método analítico global en tres concentraciones de cada uno de los oligosacáridos de quitosano estudiados. Se obtienen los parámetros por inyección repetida de las series de patrones intercalando 45 muestras de promedio entre una serie y otra.

Continuando con la descripción del método otro parámetro a evaluar es la linealidad del método. En este caso se define la linealidad como el intervalo de concentraciones con un factor de respuesta (área del pico/concentración) que se encuentre dentro del rango $\pm 15\%$ del promedio de factores de respuesta de todos los patrones analizados. Para los tres compuestos analizados el rango lineal abarca desde 1 μM hasta 225 μM , siendo esta la mayor concentración ensayada. El límite de detección se encuentra entre los valores de 0,05 μM y 1 μM , pero de modo operativo se utilizará el 1 μM como límite de detección.

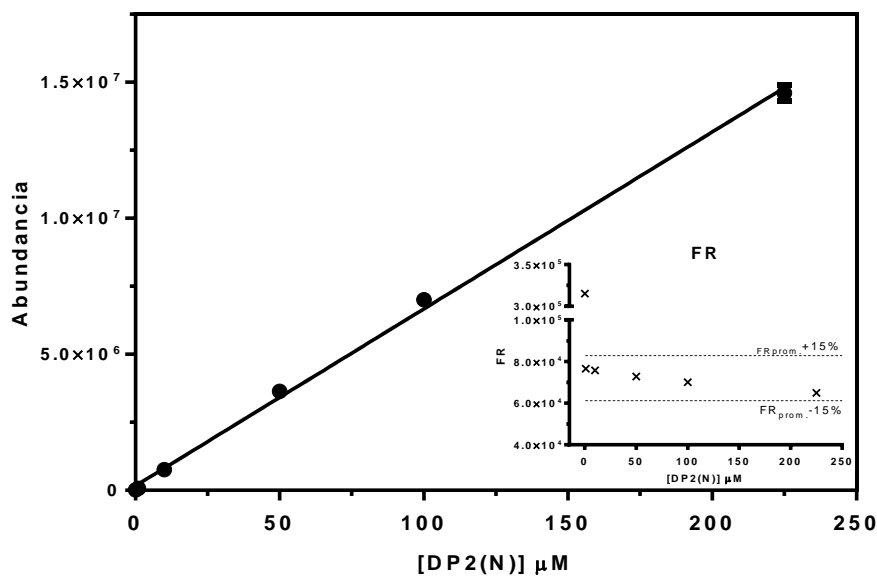


Figura 10.1-10 Recta patrón y factores de respuesta para DP2(N)

Gráfico en el que se muestra la recta patrón resultante de la inyección de 6 series de patrones correspondientes a diferentes concentraciones de DP2(N) entre las que se han intercalado 50 muestras entre una y otra, ecuación $f(x)=65048x+164206$. En el gráfico insertado se muestran los factores de respuesta.

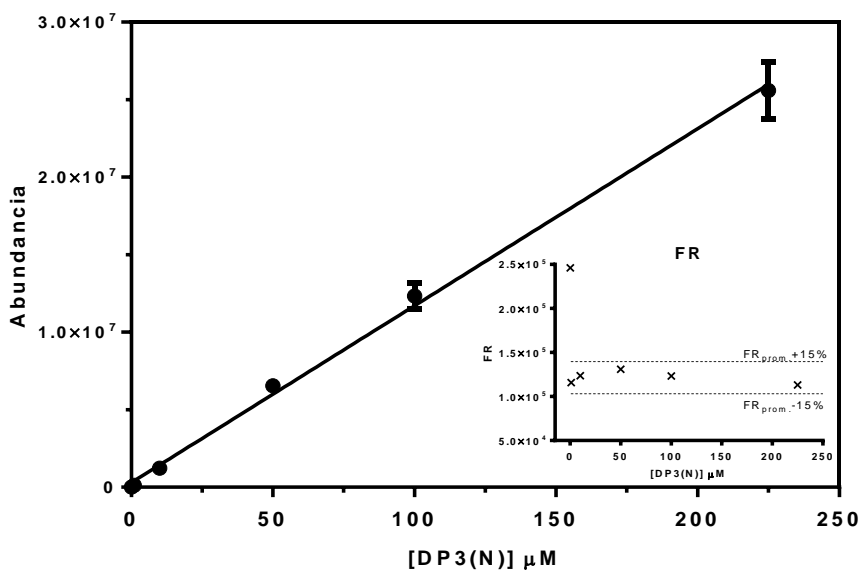


Figura 10.1-11 Recta patrón y factores de respuesta para DP3(N)

Gráfico en el que se muestra la recta patrón resultante de la inyección de 6 series de patrones correspondientes a diferentes concentraciones de DP3(N) entre las que se han intercalado 50 muestras entre una y otra, ecuación $f(x)=1141658x+293101$. En el gráfico insertado se muestran los factores de respuesta.

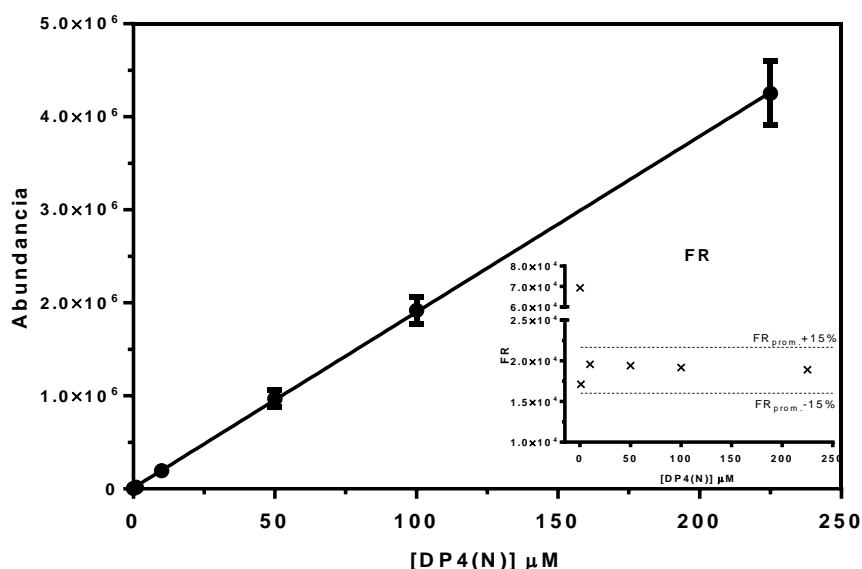


Figura 10.1-12 Recta patrón y factores de respuesta para DP4(N)

Gráfico en el que se muestra la recta patrón resultante de la inyección de 6 series de patrones correspondientes a diferentes concentraciones de DP4(N) entre las que se han intercalado 50 muestras entre una y otra, ecuación $f(x)=18902x+10362$. En el gráfico insertado se muestran los factores de respuesta.

En la Figura 10.1-13 se ha representado la evolución de los factores de respuesta de los patrones utilizado en el experimento anterior, pero en este gráfico se hace énfasis en la deriva que sufren este valor desde la primera inyección hasta la última cuando se trata de una secuencia analítica en la que se han intercalado 50 muestras de promedio entre una tanda de patrones y otra. Como se observa en el gráfico hay una tendencia clara hacia la reducción de las señales a medida que la secuencia progresa. Esta reducción se encuentra entre el 4,6% para DP2(N) hasta 13,7% en el caso de DP3(N). Como ya se había descrito, este fenómeno obliga a utilizar el par de curvas patrón que delimitan un grupo de muestras para poder calcular su concentración.

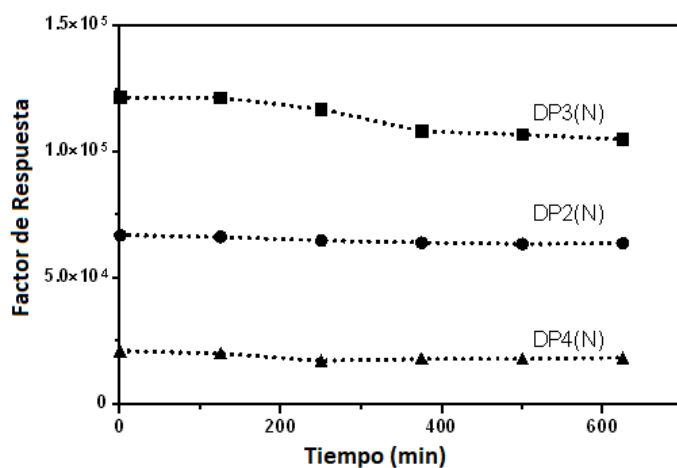


Figura 10.1-13 Evolución de los factores de respuesta frente al tiempo

Evolución de los factores de respuesta durante el tiempo correspondiente a una secuencia analítica. Entre 40 y 50 muestras fueron inyectadas entre cada grupo de patrones. La variación en porcentaje desde el factor de respuesta del primer set hasta el último obtuvo un valor de: $\Delta FR DP2(N)=4,64\%$; $\Delta FR DP3(N)=13,67\%$ y $\Delta FR DP4(N)=12,81\%$.

Con todas las pruebas mostradas hasta ahora se concluye que, a pesar de las limitaciones identificadas, el método es válido para la caracterización de la actividad desacetilasa a través de la monitorización del ión monoprotonado del producto de la actividad enzimática de VcCDA.

10.1.5. Aplicaciones del método HPLC-MS

Una vez estudiado y validado el método se realizaron una serie de experimentos para demostrar las potenciales aplicaciones en un caso real de estudio de las propiedades de un enzima.

El primer ensayo llevado a cabo fue la determinación de las actividades específicas del enzima VcCDA para los sustratos DP2 y DP4. Se utilizó un lote de enzima puro recién purificado, de esta se probaron tres concentraciones diferentes (0,10 μM – 0,16 μM – 0,21 μM) y una única concentración saturante de sustrato (2 mM) con el objetivo de construir una curva patrón de enzima. La concentración saturante de sustrato para un enzima es aquella que se encuentra significativamente por encima de la K_M particular para ese sustrato, siendo $0,69 \pm 0,02$ mM y $0,72 \pm 0,08$ mM los valores de este parámetro para DP2 y DP4 respectivamente (Andrés, Albesa-Jové, et al., 2014).

Las reacciones de desacetilación (incluyendo manipulación, incubaciones y muestreo) fueron realizadas en la plataforma robótica Bravo (Agilent). Las velocidades iniciales de la reacción fueron calculadas utilizando la región lineal de la representación gráfica de la concentración de producto vs tiempo (Figura 10.1-14).

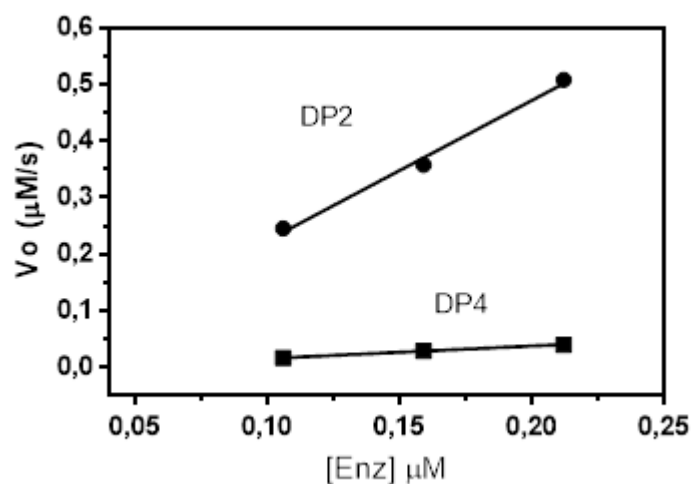


Figura 10.1-14 Curvas patrón de enzima para los sustratos DP2 y DP4
Velocidad inicial de formación de producto (v_0 ($\mu\text{M s}^{-1}$)) vs concentración de enzima ($[E]$ (μM)) a una concentración 2 mM de los sustratos DP2 y DP4. DP2: $f(x)=2,48x-0,02$ $R^2=0,99$; DP4: $f(x)=0,22x-0,01$ $R^2=0,99$

En la figura superior se representan las velocidades de aparición de producto frente a la concentración de enzima para los dos compuestos utilizados como sustrato. Los resultados obtenidos muestran como el enzima es del orden de 10 veces más activa para el dímero que para el tetrámero.

Este método será el utilizado en todos los estudios cinéticos de los enzimas WT y mutantes purificados que se desarrollan en este trabajo.

Se realizó otro ensayo para demostrar la aplicabilidad de este método en unas condiciones diferentes: la monitorización de una actividad desacetilasa utilizando el extracto de lisis clarificado de un cultivo de *E. coli* en el que se ha sobreexpresado la desacetilasa de *Vibrio cholerae*. Un inóculo de *E. coli* BL21 DE3 transformada con el plásmido pET22b con el gen de VcCDA clonado dentro de su secuencia fue incubado en medio de autoinducción para que se produjese la expresión controlada del enzima. El cultivo fue centrifugado, resuspendido en tampón Tris 50 mM pH 8,5 y NaCl 300 mM y lisado con un disruptor celular en presencia de un inhibidor de proteasas (PMSF). Los restos celulares insolubles fueron eliminados por centrifugación. Se prepararon tres mezclas de reacción diferentes y dos réplicas de cada una, usando tres volúmenes diferentes de lisado: 50, 25 y 10 μ L. Los volúmenes finales de reacción eran de 100 μ L en todos los casos y usando DP4 a una concentración de 2 mM.

La Figura 10.1-15 muestra los resultados de incremento de la concentración de producto con el tiempo de reacción. En ese gráfico se observa como a mayor cantidad de extracto introducido en la reacción mayor es la tasa de formación de producto. De las actividades enzimáticas obtenidas (pendiente de la recta [producto] vs tiempo) puede determinarse la concentración de enzima en el extracto celular utilizando el enzima purificado como patrón (Figura 10.1-14).

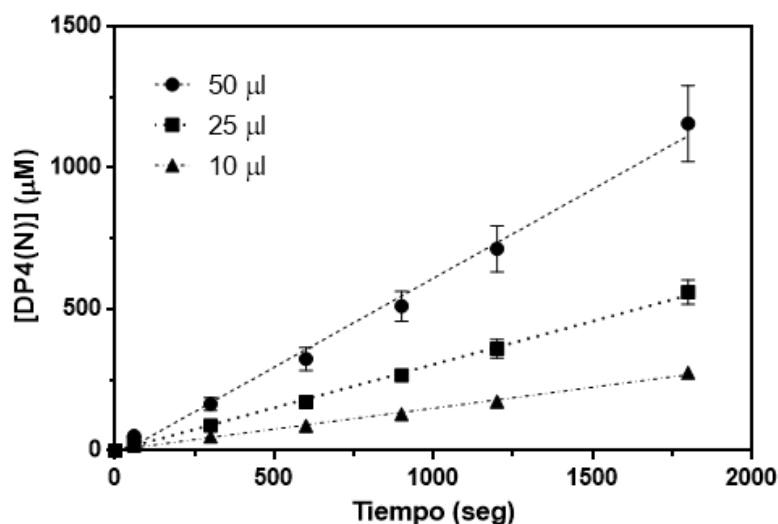


Figura 10.1-15 Monitorización de actividad desacetilasa usando extractos de *E. coli*. Caracterización cinética de un extracto clarificado de *E. coli* BL21 en el que se ha sobreexpresado el enzima VcCDA. Se representan tres reacciones diferentes incluyendo diferentes cantidades de lisado (10-25-50 μ l) en un volumen final de 100 μ l. El sustrato usado fue DP4 a una concentración 2 mM.

10.1.6. Conclusiones

En el presente capítulo de la memoria se ha conseguido desarrollar y aplicar con éxito una técnica para la monitorización de la desacetilación de oligosacáridos de quitina mediada por el enzima VcCDA a través de la medición directa de los productos formados a través del uso de un método HPLC-MS.

Este método ha sido aplicado para la caracterización de la desacetilasa de oligosacáridos de quitina de *Vibrio cholerae*, gracias a lo cual ha demostrado ser una metodología aplicable tanto para enzimas purificados como para extractos provenientes directamente de lisado celular clarificado. Se han utilizado tres sustratos diferentes para la validación de este método: DP2, DP3 y DP4.

Las ventajas de la técnica global aquí presentada incluyen desde aspectos de preparación de muestra hasta las etapas analíticas, en comparación con otros métodos (radiométricos, colorimétricos, fluorimétricos, etc.), y pueden resumirse en:

- a) No es necesaria la utilización de reacciones químicas de revelado o ensayos enzimáticos acoplados para generar productos cuantificables.
- b) Robustez, la medición directa de los oligosacáridos de quitosano facilita la simpleza del método sin interacciones de compuestos presentes en la muestra que podrían afectar a la sensibilidad de métodos indirectos.
- c) Alta eficacia a la hora de analizar un gran volumen de muestras debido a la capacidad de parar la reacción, lo cual permite segregar las etapas de preparación de muestras y las de análisis.
- d) Es una metodología completamente automatizada en la que se utiliza una plataforma robótica tanto para incubaciones como el manejo de volúmenes y muestreo.
- e) Es posible su aplicación a un amplio rango de productos y enzimas, siempre y cuando sea posible obtener patrones lo suficientemente puros.

10.2. Caracterización de VcCDA: Proteína Completa y Dominio Catalítico

10.2.1. Vector de expresión de la VcCDA FL

Para conseguir la expresión del enzima VcCDA es necesaria su clonación dentro de un vector de expresión de proteínas en *E. coli*. El plásmido deberá presentar los elementos génicos necesarios para regular o inducir su producción. El gen codificante por la proteína completa VcCDA FL (*full length*) se clonó anteriormente en el laboratorio en un vector pET22b (Figura 10.2-1).

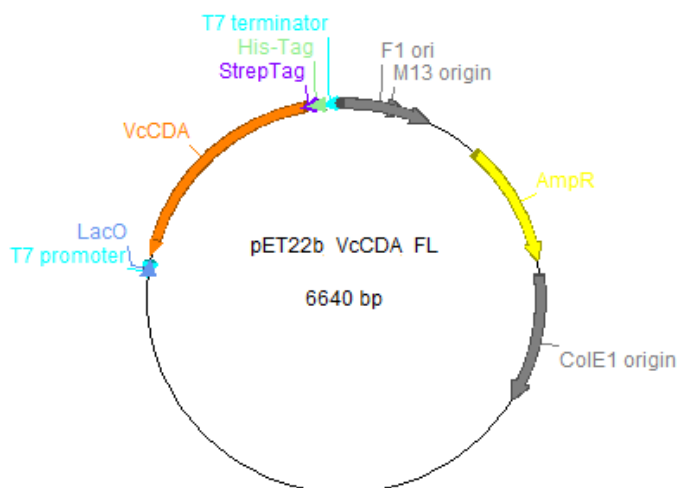


Figura 10.2-1 Mapa pET22b VcCDA FL

Mapa de la secuencia del plásmido de expresión pET22b en el que se ha clonado la secuencia de la proteína VcCDA completa incluyendo la secuencia de la *Strep-Tag II* en el extremo C terminal para su purificación por cromatografía de afinidad.

El vector pET22b es un plásmido de expresión de la proteína clonada cuya regulación está basada en el promotor del bacteriófago T7. Cuando se transfieren estos plasmidos a cepas que contienen una copia cromosómica de la polimerasa de T7 bajo el control del operador *lac* en presencia del inductor la polimerasa es producida, esta reconoce su promotor de T7 y se consigue la expresión del gen de la proteína clonada en el vector. Generalmente el inductor utilizado es el análogo IPTG. Sin embargo la expresión de la proteína se puede conseguir por otros tipos de inductores como puede ser la formulación de medios de autoinducción de la expresión de proteínas (Studier, 2005).

El plásmido original pET22b incluye una cola *His-Tag* para la purificación del enzima expresado mediante cromatografía de afinidad por Ión metálico (IMAC). Dado que las desacetilasas de quitina incluyen cationes metálicos catalíticos dentro de su sitio activo, esta técnica de purificación puede influir negativamente en la actividad del enzima. Por ese motivo se evitó el *His-Tag* e incluyó una *Strep-Tag II* en el extremo C terminal del enzima. Este oligopéptido adicional añadido a la secuencia del enzima no solo permite su purificación utilizando una técnica de cromatografía de afinidad sin la necesidad de la presencia de iones metálicos sino que además este tipo de protocolo de purificación permite obtener mayores grados de pureza. Es probable que dentro del *pool* de proteínas de *E. coli* algunas presenten una zona rica en histidinas que se unan a una columna IMAC (*His-trap* por ejemplo), sin embargo la secuencia aminoacídica correspondiente al *Strep-Tag II* es muy poco frecuente dentro de la naturaleza (WSHPQFEK).

10.2.2. Expresión y purificación de la VcCDA FL

La expresión de este enzima en el sistema descrito ya había sido llevada a término con éxito en trabajos previos realizados en el laboratorio (Andrés, Albesa-Jové, et al., 2014). Para la expresión de esta proteína se utilizó un protocolo de autoinducción de proteínas por su conveniencia y los altos rendimientos.

En la formulación de los medios de autoinducción se puede utilizar una base de medio LB en el que se añaden una serie de aditivos como sales y azúcares. Principalmente se incluyen tres fuentes de carbono: glucosa, glicerol y lactosa. En las primeras etapas de crecimiento celular el uso de glucosa como principal fuente de carbono permite que la expresión proteica esté inhibida y todo el metabolismo celular esté volcado en la multiplicación. Cuando este azúcar es agotado se pasa a utilizar las otras fuentes de carbono. Dado que la lactosa es un inductor del sistema pET se inicia la expresión de la proteína (Studier, 2005). Este tipo de medios permite que la expresión de proteína se realice de un modo desatendido sin la necesidad de realizar cambios de medio, además se consiguen densidades ópticas muy altas incrementando el rendimiento que se obtendría por otras técnicas.

El protocolo de expresión de esta proteína se inicia con un cultivo de un volumen determinado en matraz de Erlenmeyer. Este cultivo es incubado a 25°C durante 48 horas. Tras esta etapa, el cultivo es centrifugado y lisado mediante el uso de un sonicador. Se separan los restos celulares insolubles resultantes de la lisis mediante centrifugación y filtración.

La primera etapa de purificación es una cromatografía de afinidad utilizando cromatografía de afinidad con columnas *Strep-Trap* (GE-healthcare). El fundamento de este proceso se basa en la afinidad biotina-estreptavidina, este complejo presenta una de las interacciones no covalentes más fuertes conocidas. La *strep-tag* es una secuencia de 8 aminoácidos la cual fue seleccionada para unirse específicamente a la estreptotactina la cual es una versión optimizada de la estreptoavidina (Ostermeier, Harrenga, Ermler, & Michel, 1997; Schmidt & Skerra, 2007; Skerra & Schmidt, 2000). En la Figura 10.2-2 se ejemplifican los pasos de esta técnica. En este tipo de cromatografía se hace que el lisado celular clarificado atraviese la columna, en esta fase la proteína recombinante con la secuencia de la *Strep-Tag II* se queda retenida a través de la afinidad de esta señal por la estreptotactina. El resto de proteínas no unidas son lavadas mediante el uso del tampón en el que se encuentra el lisado. Una vez lavada la columna se realiza la elución de la proteína mediante una solución de destiobiotina. Este compuesto tiene mayor afinidad por la strep-tactina que la proteína recombinante, consiguiendo que esta eluya de la columna. Finalmente la columna se regenera con Ácido 2-Hidroxi-4-aminobenzoico (HABA). Este compuesto tiene el objetivo de desplazar la destiobiotina, sin embargo tienen menos afinidad que ésta por la fase estacionaria pero su gran exceso consigue desplazar la destiobiotina. Con un segundo lavado con un exceso de tampón se consigue eliminar el HABA y dejar la columna lista para la siguiente etapa de carga y elución.

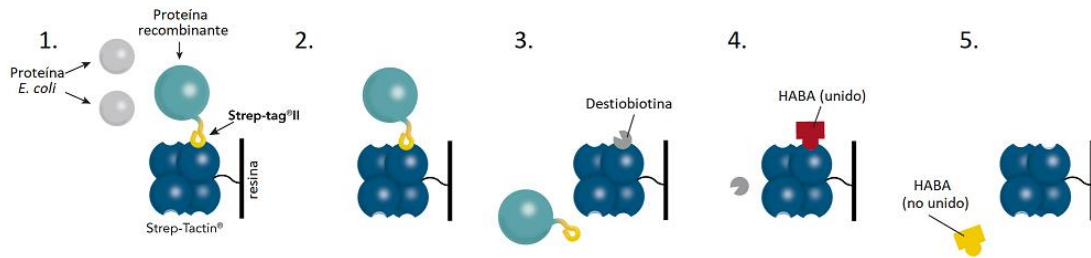


Figura 10.2-2 Proceso purificación afinidad Strep-Tag II

Esquema del protocolo de una cromatografía de afinidad *Strep-Trap*: 1. La proteína con la Strp-TagII es retenida por su afinidad con la Strep-tactina, 2. Las proteínas de *E. coli* son lavadas con tampón, 3. La destiotiotina desplaza el enzima recombinante y la proteína de interés eluida, 4. El HABA desplaza la destiotiotina para regenerar la columna, 5. El haba es eliminado por lavado y la columna regenerada.

Cuando se aplica esta técnica en la purificación de la VcCDA FL se realizan varias etapas de carga y elución de la proteína, es decir, el proceso previamente descrito es aplicado varias veces en serie sobre la misma columna dividiendo el lisado del cultivo en varios volúmenes. Como se muestra en la Figura 10.2-3 se aplicaron tres ciclos de carga y elución de la columna con todas las etapas de lavado y regeneración correspondientes.

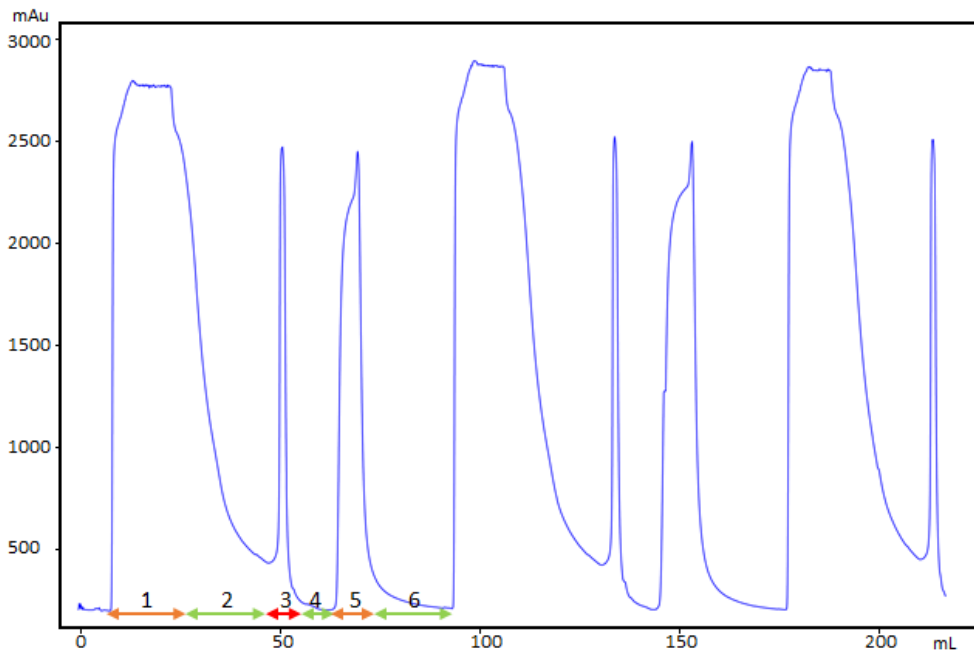


Figura 10.2-3 Cromatograma de purificación Strep-Trap de la VcCDA FL

Cromatograma resultante de la purificación por cromatografía de afinidad de la VcCDA en la que se realizaron tres cargas de columna. Los número indican las etapas de un ciclo de carga/elución: 1. Carga, 2. Lavado, 3. Elución, 4. Lavado, 5. Regeneración con HABA y 6. Lavado.

La desacetilasa con la que se realiza este trabajo se expresa en forma de varias fracciones oligoméricas, de las cuales la fracción monomérica es la que presentan una mayor actividad Figura 7.7-7 (Andrés, Albesa-Jové, et al., 2014). Para obtener las diferentes poblaciones oligoméricas por separado se realiza una cromatografía de gel filtración preparativa. Para este proceso se utiliza una columna Superdex 200 (16/600).

Todas las fracciones de proteína pura eluidas de la columna de afinidad se combinan en un único volumen y se concentra hasta un máximo de 2 mL de volumen para ser cargadas en la columna

de gel filtración. La elución se realiza a un flujo de 1 mL/min y utilizando el tampón fosfato 50 mM pH 8,5 y NaCl 300 mM, el mismo tampón que se usaba en las etapas previas.

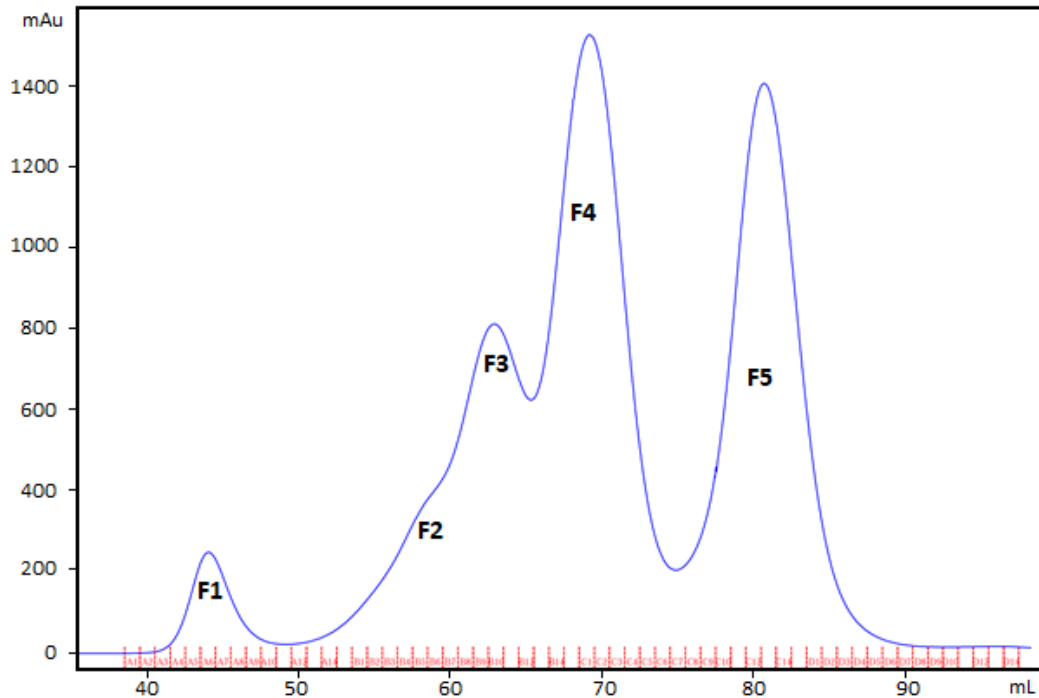


Figura 10.2-4 Cromatograma de GFC de la VcCDA FL

Cromatograma obtenido en la cromatografía de gel filtración usando una columna Superdex 200 (16/600). Se muestran cinco fracciones multiméricas dentro de las cuales F5 se corresponde con el monómero.

En la Figura 10.2-4 se muestra el cromatograma obtenido para la VcCDA FL donde la fracción monomérica eluye en un volumen de 80 mL aproximadamente (fracción F5). Se ha observado a lo largo de todo el trabajo aquí presentando que la cantidad de relativa de fracción monomérica comparada con las otras fracciones correspondientes a oligómeros de la proteína varía entre los lotes purificados. Los parámetros que afectan a este fenómeno no están claros. Utilizando la ecuación de calibrado de la columna el valor obtenido para este enzima es de 39,3 kDa, mientras que el M_w teórico es de 46,9 kDa. Esta variación puede deberse a la organización tridimensional del enzima que lo haga migrar de un modo particular.

Utilizando muestras de las diferentes etapas de purificación se realizó un gel de electroforesis SDS-PAGE para comprobar la pureza del enzima. En la Figura 10.2-5 se observa que la fracción F5 presenta una única banda que se corresponde aproximadamente con el tamaño teórico de la proteína. Las restantes fracciones (F1 a F4) también muestran exclusivamente una banda de proteína tras su desnaturalización en el tampón de carga de electroforesis, confirmando que corresponden a homooligómeros de VcCDA FL.

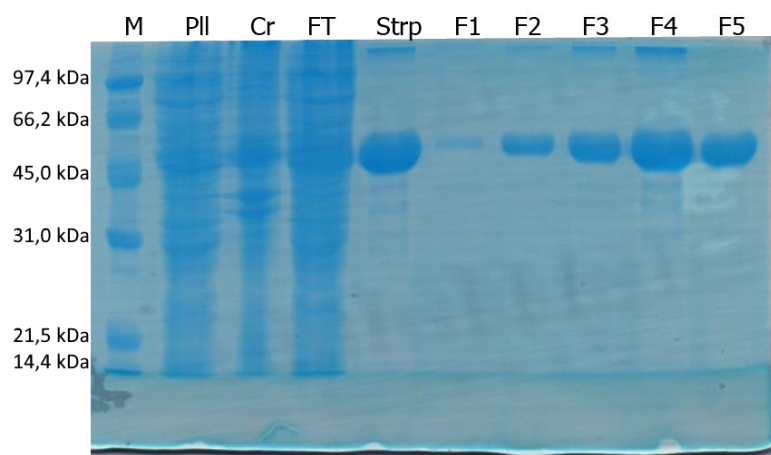


Figura 10.2-5 SDS-PAGE VcCDA FL

Gel SDS-PAGE de todo el proceso de purificación de la VcCDA FL. M: Marker Low Range, PII: *Pellet* de la centrifugación tras el lisado, Cr: crudo, fracción soluble del lisado, FT: *Flow through* de la columna, Strp: Proteína purificada por la *Strep-Trap*, F1-F5: fracciones de la 1 a la 5.

Se observa la presencia de una banda con un peso molecular similar al de la VcCDA FL en el carril de restos celulares y de una intensidad de tinción considerable. Este hecho puede tener dos justificaciones posibles: que una fracción de la proteína expresada utilizando este protocolo no consiga plegarse correctamente y forme cuerpos de inclusión insolubles, o que la lisis celular no sea completa y que esa banda se corresponda con enzima correctamente expresado pero que solo se libera tras hervir las muestras para cargarlas en el gel desnaturizante SDS-PAGE.

En el cuarto carril correspondiente al *Flow Through*, interpretado como la fracción volumétrica que ha atravesado la columna en el proceso de carga de la misma, se observa la presencia de una banda que se corresponde con el peso molecular esperado de la proteína de interés. La explicación de este hecho pasa por que en la carga se esté excediendo la capacidad de la columna y parte de la proteína expresada no pueda unirse a la matriz porque está saturada. A pesar de que la capacidad nominal descrita por el fabricante (GE Healthcare) debería encontrarse próxima a los 5 mg de proteína por cada mL de medio, en las condiciones usadas se ha observado que esto no es aplicable a nuestro protocolo, indicando que la causa más probable de la aparición de esta banda se deba a haber sobrepasado la capacidad de unión de la columna.

Una vez comprobada la pureza del enzima todo el volumen correspondiente a la fracción monomérica (F5) se une en un único recipiente. De este *pool* de enzima se calcula su concentración y rendimiento por litro de cultivo. Además se analiza por espectrometría de masas MALDI-TOF. En la Figura 10.2-6 se observa un pico de 46,9 kDa el cual se corresponde exactamente con el MW teórico.

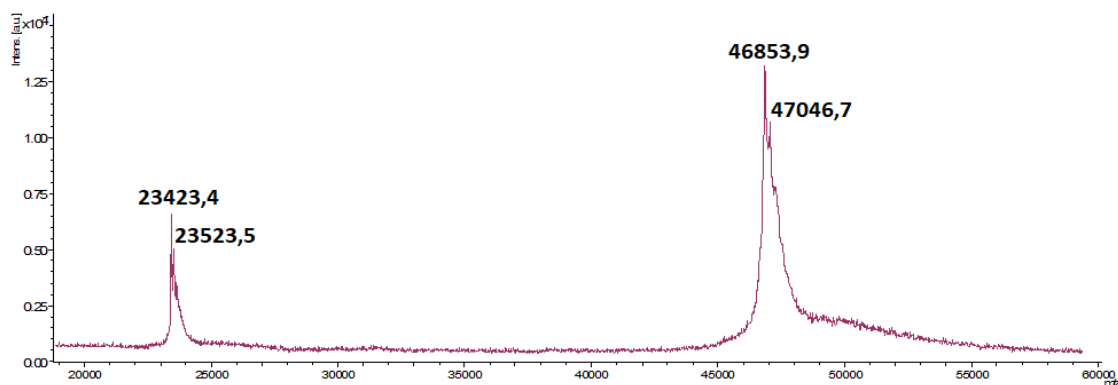


Figura 10.2-6 MALDI-TOF VcCDA FL

Espectro de masas de la fracción monomérica de la VcCDA FL analizada por espectrometría de masas MALDI-TOF. Se observa un pico de 46,9 kDa que se corresponden con la masa teórica de este enzima. Los otros picos se observa con una doble carga.

El rendimiento promedio de todo este proceso de purificación proporciona un valor de 7,14 mg/L de promedio calculado sobre 7 purificaciones.

10.2.3. Caracterización cinética de la VcCDA FL

Una vez purificado el enzima se decidió caracterizarlo de nuevo utilizando todos los sustratos disponibles: DP2, DP3, DP4 y DP5. Esto se debe a que se pudo obtener un nuevo sustrato (DP5) dentro de los acuerdos entre socios del proyecto europeo Nano3Bio en el cual se enmarca este trabajo. Además se realizaron algunos cambios en el proceso de purificado y ensayo cinético comparados con la publicación de referencia. En consecuencia era necesario reevaluar el comportamiento de este enzima.

Para la definición de los parámetros k_{cat} y K_M que describen el comportamiento enzimático, se realizaron 12 cinéticas enzimáticas a diferentes concentraciones de sustrato (25 μ M hasta 4 mM) tomando 8 puntos temporales para cada una, todo esto por duplicado. La concentración de enzima dependía del sustrato utilizado y siempre se ha encontrado dentro del rango de 0,1 μ M a 1 μ M, siendo la menor concentración utilizada para DP2 y la mayor para DP5. Para identificar las concentraciones óptimas de catalizador se realizaron experimentos previos en los que se construía una recta patrón de enzima. En esta recta patrón se probaban varias concentraciones de enzima frente a una concentración saturante de sustrato. Todas las cinéticas se realizaron a 37°C y utilizando el método analítico descrito en el capítulo anterior.

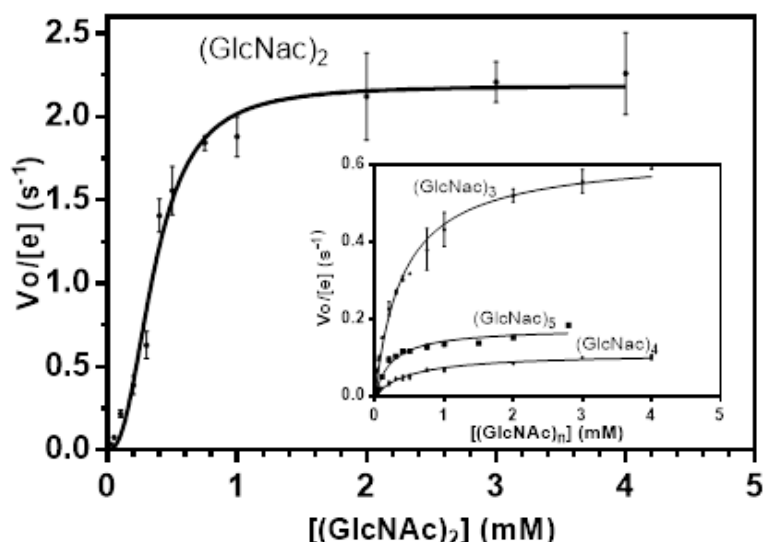


Figura 10.2-7 Caracterización cinética de VcCDA FL DP2-DP5

Caracterización de los parámetros cinéticos utilizando la fracción monomérica de VcCDA y los quitooligosacáridos DP2 a DP5 realizándose los ensayos en tampón Tris 50 mM pH8,5 NaCl 300 mM y a una temperatura de 37°C.

En los resultados obtenidos (resumidos en la Tabla 10.2-1) se sigue observando la tendencia general en la que el disacárido es desacetilado significativamente más rápido que los sustratos más largos. De acuerdo a las estructuras presentadas en la introducción de este trabajo se observa como DP3 es un mejor sustrato que DP4 pero peor que DP2. Esto se justifica por la incapacidad del *loop* 4 de tomar una conformación completamente cerrada. Sin embargo, el tetrámero y el pentámero se encuentran dentro del mismo rango de valores de k_{cat} , esto puede deberse a la necesidad de que el *loop* 5 se mueva. En el caso del DP3 este movimiento no es determinante para la acomodación del sustrato, por otro lado estos sustratos más largos implican la obligación dinámica del *loop* 5 comprometiendo la capacidad catalítica del enzima. Por otro lado, no se observa ningún fenómeno de inhibición por sustrato.

Sustrato	k_{cat} (s^{-1})	K_M (mM)	Índice de Hill (h)	k_{cat}/K_M ($M^{-1}\cdot s^{-1}$)	% k_{cat} DPX/DP2
(GlcNAc) ₂	$2,19 \pm 0,06$	$0,36 \pm 0,02$	2,45	$6,0 \cdot 10^3$	100
(GlcNAc) ₃	$0,63 \pm 0,02$	$0,41 \pm 0,04$	-	$1,5 \cdot 10^3$	29
(GlcNAc) ₄	$0,11 \pm 0,004$	$0,52 \pm 0,05$	-	$2,1 \cdot 10^2$	5
(GlcNAc) ₅	$0,18 \pm 0,006$	$0,24 \pm 0,04$	-	$7,2 \cdot 10^2$	8

Tabla 10.2-1 Parámetros cinéticos de la caracterización de VcCDA FL

Parámetros cinéticos k_{cat} y K_M obtenidos en la caracterización de VcCDA. En el caso del sustrato DP2 se observa un comportamiento cooperativo por lo que se utiliza la ecuación de Hill para fenómenos de alosterismo.

Como ya se había reportado en el laboratorio, DP2 muestra un comportamiento alostérico y en este caso la ecuación de Hill que define su comportamiento proporciona un valor de h igual a 2,45. El significado aparente de este valor nos indica que tras la unión de dos moléculas de sustrato al enzima la catálisis se ve acelerada. Para los otros sustratos no se observa tal comportamiento alostérico. De hecho, si se utiliza la ecuación de Hill y se calculan los correspondientes parámetros h se obtienen los siguientes valores: 0,69 para DP3, 0,78 para DP4, y 1,09 para DP5. En todos los casos estos valores tienden a 1.

En general se observa que el parámetro que más varía es la k_{cat} entre $0,11\text{s}^{-1}$ a $2,19\text{s}^{-1}$ lo que implica una variación de 1980%. Sin embargo la diferencia entre el valor máximo y mínimo de K_M , 0,52 mM y 0,24 mM, implica una variación de 211%. Además, a diferencia del valor de k_{cat} que si se reduce con el incremento del DP del sustrato, el valor de K_M no tienen una tendencia clara (Figura 10.2-8 A y B), aumenta ligeramente de DP2 a DP4, pero disminuye para DP5. Sin embargo el parámetro en el que se manifiesta mejor la especificidad por sustrato es k_{cat}/K_M . (Eisenthal, Danson, & Hough, 2007). Al analizar los valores de k_{cat}/K_M obtenidos en la Tabla 10.2-1 se observa una reducción de este parámetro desde DP2 hasta DP4/DP5. Con DP4 y DP5 el valor se mantiene dentro del mismo orden de magnitud. Este resultado puede interpretarse con el supuesto movimiento del *loop* 5, para DP4 es necesario que se desplace esta parte de la estructura, pero en sustratos más largos el desplazamiento del *loop* es de la misma magnitud y las unidades de GlcNAc adicionales del sustrato se mantienen suspendidos fuera del sitio activo (después del último subsitio +2) no afectando a la constante de especificidad k_{cat}/K_M .

Dado que el comportamiento de este enzima había sido previamente descrito para los sustratos DP2, DP3 y DP4 en el artículo de Andrés et al. (Andrés, Albesa-Jové, et al., 2014) es necesario comparar los resultados obtenidos. En la Figura 10.2-8 se muestra gráficamente la comparación de los parámetros k_{cat} y K_M . Se observa que la principal diferencia está en el valor de k_{cat} del disacárido. Mientras que en la publicación de Andrés et al. el valor es de $4,38 \pm 0,08 \text{ s}^{-1}$ en el trabajo aquí presentado se ha obtenido un valor de $2,19 \pm 0,06 \text{ s}^{-1}$, siendo este prácticamente la mitad del publicado. A nivel de K_M también se observa que la mayor variación ocurre en DP2, de nuevo en un factor de 2 aproximadamente. Sin embargo, se mantienen los valores de eficiencia catalítica (k_{cat}/K_M).

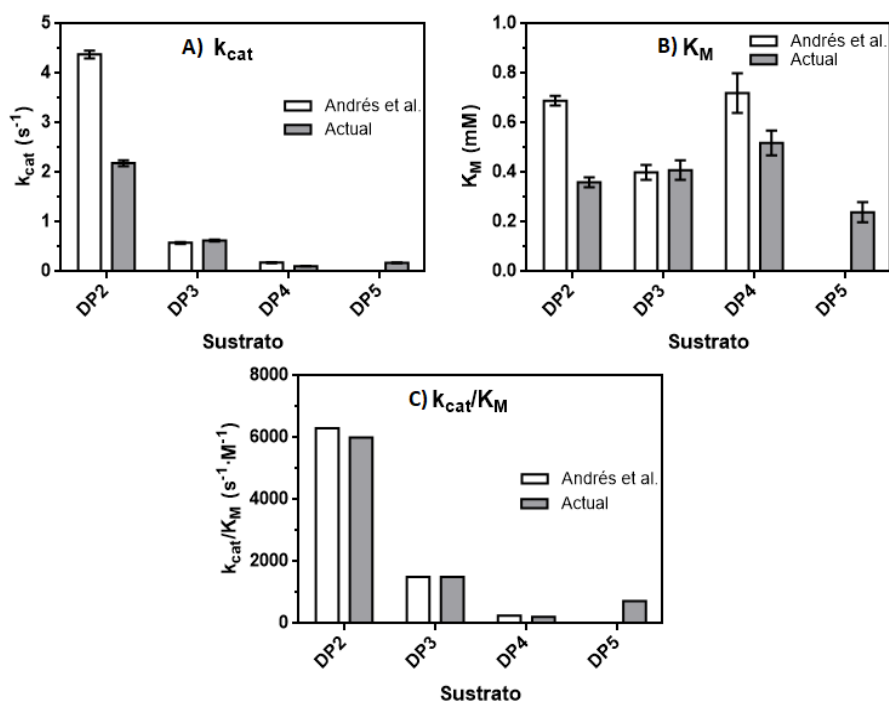


Figura 10.2-8 Comparación con los parámetros publicados

Comparación de los parámetros k_{cat} , K_M y k_{cat}/K_M entre la publicación de Andrés et al. y el trabajo aquí presentado la principal referencia se observa en el valor de k_{cat} para DP2 siendo prácticamente la mitad del publicado.

El aspecto principal causante de este cambio ha sido atribuido al tampón utilizado en la reacción enzimática ya que es una modificación del ambiente en el que se encuentra el enzima mientras está realizando la transformación del sustrato. En el trabajo de Andrés et al. el tampón utilizado en la reacción era tampón fosfato 50 mM pH 8,5 NaCl 300 mM, mientras que en este trabajo se decidió sustituir el fosfato por tris: Tris 50 mM pH 8,5 NaCl 300 mM.

10.2.4. Dependencia de la actividad de VcCDA con cationes metálicas

Un elemento importante dentro del mecanismo de desacetilación dentro de la familia de las CE4 es el catión metálico que forma parte del sitio activo. Está extensamente reconocido que los enzimas de esta familia poseen un mecanismo dependiente de un catión metálico independientemente del sustrato del que se trate. La descripción de varias desacetilasas ha revelado que el catión divalente presente en el centro activo puede variar de una a otra y que este participa en la catálisis como electrófilo activando el carbonilo amídico y estabilizando el intermediario oxianión tetraédrico (Figura 10.2-9).

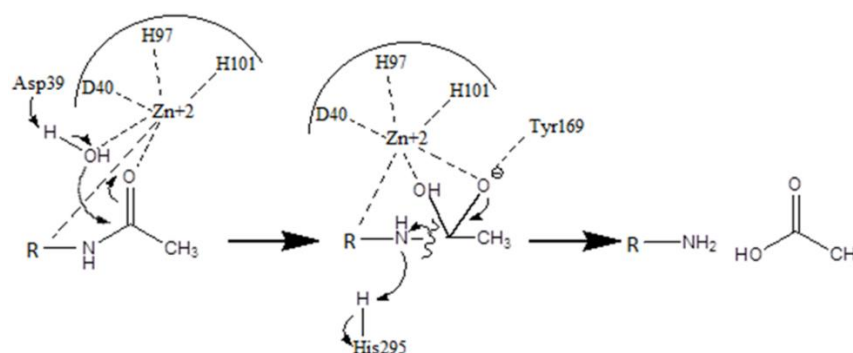


Figura 10.2-9 Esquema del mecanismo catalítico de VcCDA y la importancia del metal catalítico

Esquema de mecanismo de catálisis de la VcCDA en el que se muestran los residuos que ayudan a complejar el metal catalítico así como se representa la relevancia del mismo a la hora de establecer interacciones con el sustrato y estabilizar intermediarios de reacción.

A través de los estudios de preferencia de metal catalítico, entre los cationes descritos dentro del sitio activo de otras desacetilasas se ha encontrado: Zn^{+2} en la quitina desacetilasa de *Mucor rouxii* (Y Araki & Ito, 1975), Zn^{+2} y Co^{+2} en la quitina desacetilasa de *Colletotrichum lindemutianum* (Hekmat et al., 2003), Ca^{+2} y Mg^{+2} en la quitina desacetilasa de *Aspergillus nidulans* (Y. Wang et al., 2010), etc. La lista de cationes descritos incluye: Mn^{+2} , Mg^{+2} , Zn^{+2} , Co^{+2} , Ca^{+2} , Ni^{+2} y Fe^{+2} . Dentro de estos los más prevalentes son Zn^{+2} y Co^{+2} . Además se ha observado que en algunos casos el metal que permite desarrollar una actividad máxima a una desacetilasa en concreto puede ser un inhibidor de la capacidad catalítica de otro enzima. Este hecho manifiesta la necesidad de una determinación precisa del metal que permite desarrollar una mayor eficiencia como catalizador al enzima con el que se está trabajando.

En los cristales descritos para esta desacetilasa de *V. cholerae* en diferentes condiciones de cristalogénesis se observó la presencia de dos metales en las diferentes estructuras resultas: Zn^{+2} o Cd^{+2} . Estos dos metales están unidos al motivo típico de desacetilasas que es conocido como el "motivo HHD". En el caso de VcCDA está definido por los residuos His97, His101 y Asp40 (Figura

10.2-10). Estos tres residuos se encuentran distribuidos entre los motivos 1 y 2 de los motivos definitorios del Dominio de Homología NodB.

Este ión catalítico también realiza interacciones con el sustrato y una molécula de agua. El catión que se encuentre en el sitio activo desarrolla su función principalmente en la primera etapa del mecanismo catalítico. En esta primera etapa la molécula de agua que interacciona con el ión metálico es activada por acción de la base general (Asp39) y se forma un oxianión tetraédrico como intermediario. La carga negativa de este anión es estabilizada por el catión presente en el centro activo y por el N del *backbone* de la Tyr169. En la segunda etapa el metal no tiene un papel tan relevante. Lo que sucede en esta fase es que el ácido general (his295) protona el nitrógeno del GlcNAc conduciendo a la rotura del enlace C-N en el que se crea una amina libre en el producto monodesacetilado y se libera acetato al medio de reacción (Figura 10.2-9).

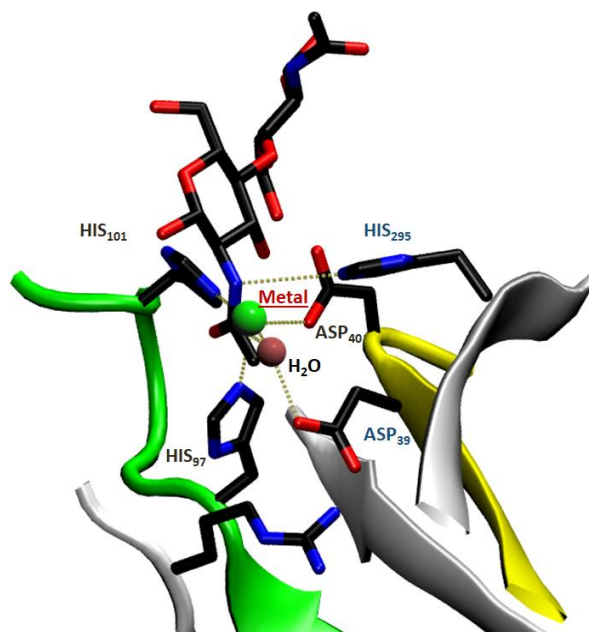


Figura 10.2-10 Representación de las interacciones del catión metálico en el sitio activo de VcCDA
Representación del sitio activo de VcCDA en el que se muestran los residuos que complejan al metal motivo
HHD: His97 His101 Asp40 y los residuos catalíticos Asp39 (Base general) y His295 (Ácido general).

La presencia de Cd^{+2} , catión no descrito para otras desacetilasas de la familia CE4, proviene de la solución de cristalogénesis e indica que el Cd^{+2} presenta una suficientemente alta afinidad para desplazar el catión Zn^{+2} nativo.

Para poder estudiar el comportamiento catalítico de este enzima a través de la sustitución del metal nativo por otros fue necesario el diseño de un experimento que consta de tres etapas básicas: a) Eliminación del metal nativo de la estructura del enzima; b) Incorporación de un nuevo metal en la estructura y c) Ensayo cinético en presencia del nuevo metal.

Con el fin de conseguir extraer el metal del sitio activo se vio que era necesario una gran concentración de quelante durante un periodo dilatado de tiempo. Para ello se realizó un tratamiento de diálisis contra una concentración de 20 mM de EDTA disuelta en PBS en un gran exceso de volumen. Este proceso duró 24 horas, durante las cuales se realizaron tres cambios de tampón con quelante. Para eliminar el EDTA luego se realizó el mismo tratamiento de diálisis pero contra tampón PBS sin EDTA. Para disponer de un control con el que poder discernir si la reducción

de actividad que se espera ver en el enzima tratado con el quelante se corresponde con una eliminación real del metal y no un efecto de dilución, se trató un lote de proteína del mismo modo pero sin presencia de EDTA. El protocolo seguido es una adaptación del aplicado por Kobayashi et al. para la péptidoglucano desacetilasa C de *Bacillus Subtilis* (PdaC) (Kobayashi et al., 2012).

Una vez recuperados los dos lotes de enzima (control y tratada con EDTA) se determinaron sus concentraciones utilizando una recta patrón de BSA por el método del BCA. Se separaron alícuotas que fueron tratadas con la siguiente lista de cationes metálicos: Zn^{+2} , Mg^{+2} , Cd^{+2} , Ca^{+2} , Mn^{+2} , Co^{+2} , Fe^{+2} y Ni^{+2} en forma de sus sales con Cl^- . El tratamiento pasaba por tratar el enzima a una concentración de $3,78 \mu M$ con $1 mM$ de la sal del catión disuelto en PBS durante aproximadamente 4 horas a una temperatura de $4^{\circ}C$. También se creó un control del enzima al que no se le añadió metal, tan solo tampón. Con la muestra control (sin haber sido tratada con EDTA) se realiza tres experiencias: incubada con Zn^{+2} , incubada con Cd^{+2} y añadiendo solo tampón.

Una vez incubada el enzima se realizaron experimentos en los que se comparó la actividad de las diferentes muestras utilizando una concentración de $0,05 \mu M$ de enzima en una cinética en la que se usa DP2 como sustrato a una concentración de $2 mM$. En el tampón de reacción se encuentra el metal correspondiente a cada tratamiento a una concentración de $1 mM$. Todas las cinéticas fueron realizadas utilizando dos réplicas.

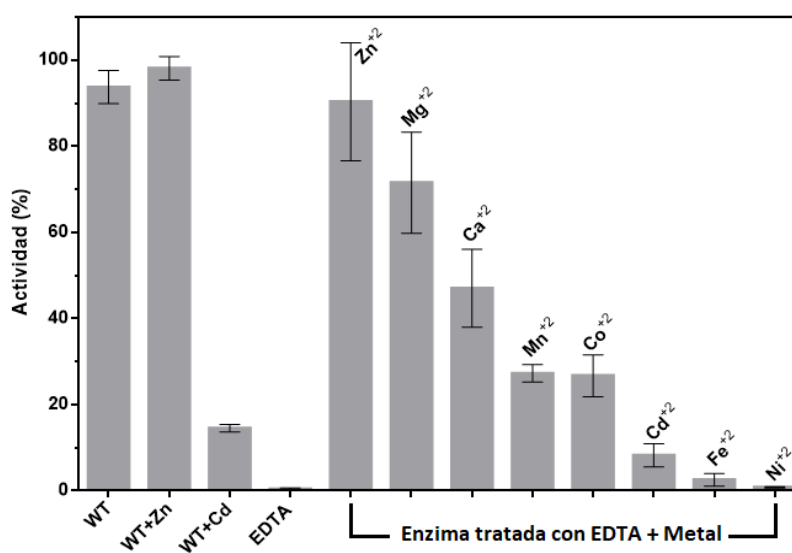


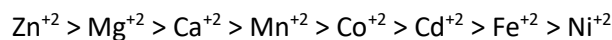
Figura 10.2-11 Ensayo de preferencia de metales de VcCDA

Porcentaje de la actividad desacetilasa de VcCDA según el efecto de diferentes metales monitorizando la desacetilación de quitooligosacárido DP2. Se observa que Zn^{+2} es el metal que permite desarrollar una mayor actividad y que en el enzima nativo se encuentra ya saturado del metal.

Según los resultados mostrados en la Figura 10.2-11 se observa que una vez tratado el enzima con EDTA la actividad del enzima se reduce prácticamente al 0%. Este es un buen punto de partida, ya que nos indica que el catión presente en el sitio activo ha sido eliminado completamente. Además se observa que el enzima no tratado con EDTA (WT en el gráfico) mantiene su actividad a pesar de la extensa diálisis contra tampón PBS, lo que indica que el metal se encuentra fuertemente retenido en el centro activo por los residuos del motivo HDD.

Adicionalmente se observa que el enzima nativo (anotado como WT en el gráfico) y el enzima nativo al que se ha añadido Zn^{+2} muestran la misma actividad. Esto indica que la totalidad del enzima resultante de la purificación se encuentra saturado con el metal y que no existe una parte significativa de la población con una deficiencia de metal.

El orden de preferencia de este enzima es el que se muestra a continuación:



En base a los resultados y a la bibliografía hasta la fecha, se observa una coincidencia en que Zn^{+2} es uno de los iones metálicos más presentes en las desacetilasas de la familia CE4. Sin embargo sorprende que el Co^{+2} , también uno de los metales más frecuentes, es uno de los peores en términos de actividad de la VcCDA. Esto ejemplifica el hecho de que la preferencia de sustrato es muy dependiente del enzima y cuya capacidad catalítica es prácticamente imposible de predecir ya que, por ejemplo, no se observa ninguna correlación en el ranking de metales aquí obtenido y el radio atómico de los mismos (Slater, 1964).

El zinc es un ión metálico el cual es frecuentemente usado por los enzimas en múltiples roles, desde ser un componente estructural, hasta desarrollar funciones catalíticas como la aquí descrita. El hecho de que sea tan frecuente dentro de las desacetilasas se debe a que presenta una serie de propiedades ventajosas frente a otros cofactores metálicos (Hernick & Fierke, 2005). Entre esas propiedades destacan:

- a) Es un ácido fuerte de Lewis que no es redox-reactivo debido a que presenta una capa completa de electrones (configuración d^{10}).
- b) Pueden catalizar reacciones hidrolíticas a través de la coordinación de una molécula de agua nucleofílica o polarizando grupos carbonilo del sustrato.
- c) Su número de coordinación variable (entre 4 y 6) y sus diferentes geometrías (tetraédrica, trigonal, bipiramidal, piramidal cuadrada y octaédrica) permiten que se adapte fácilmente a reorganizaciones estructurales.

10.2.5. Aislamiento del dominio catalítico

Una de las peculiaridades de la organización modular de la estructura de la VcCDA es que se encuentra dividida en tres módulos: un dominio catalítico de homología NodB C terminal y dos Módulos de Unión a Carbohidratos (CBMs) en su extremo N terminal. Estos módulos pertenecen a la familia 12.

Los CBMs son módulos estructurales no catalíticos que son capaces de reconocer y unir polisacáridos. En la base de datos CAZy están definidos como una secuencia de aminoácidos contigua a un enzima activo en carbohidratos con un *fold* particular con la capacidad de unir carbohidratos. Como se indica en su definición, estas estructuras actúan normalmente como módulos de reconocimiento sinérgicamente con otro módulo catalíticamente activo facilitando su función. A diferencia de lectinas y proteínas de transporte de azúcares que pueden ser

encontradas como entes individuales, los CBMs siempre se van a encontrar formando parte de un macrocomplejo con otros módulos dentro de la misma secuencia polipeptídica.

En un principio estos módulos fueron identificados como *Cellulose Binding Domains*, *CBDs* dado que fueron los primeros en ser identificados siendo su función la de unir celulosa cristalina (Gilkes, Warren, Miller, & Kilburn, 1988; Van Tilbeurgh, Tomme, Claeysens, Bhikhabhai, & Pettersson, 1986), pero en las décadas siguientes se observó que existían módulos similares con la capacidad de unir polisacáridos de naturaleza diferente. En la actualidad se han establecido 81 familias de CBMs dentro de la clasificación CAZy con una gran variedad de sustratos poliméricos como ligandos. Los CBMs presentan tres funciones básicas de colaboración con el módulo catalítico al que acompañan (Boraston, Bolam, Gilbert, & Davies, 2004):

- a) Efecto de proximidad: a través de su capacidad de unirse a carbohidratos, los CBMs pueden concentrar enzimas en zonas ricas en sus correspondientes sustratos, este hecho lleva a una degradación más eficiente del polisacárido.
- b) Función de atracción de sustratos: por su capacidad de unir polisacáridos consiguen atraer compuestos al centro activo o que el enzima se mantenga unido al mismo mientras se llevan a cabo uno o varios eventos catalíticos.
- c) Función disruptiva: ayuda en la exposición de las cadenas del polisacárido permitiendo que el módulo catalítico puede llevar a cabo la transformación del sustrato.

Los diferentes CBMs descritos contienen de 30 a 200 aminoácidos dentro de su secuencia. Además pueden encontrarse solos o en tándems de dos o tres módulos de unión por proteína (Shoseyov, Shani, & Levy, 2006). En base a las estructuras tridimensionales obtenidas de múltiples CBMs de diversas familias, se ha visto que la gran mayoría son estructuralmente similares y que su capacidad de unión está atribuida, al menos en parte, a la presencia de varios aminoácidos aromáticos en las superficies de los mismos. Por ejemplo en la Figura 10.2-12 se muestra el elevado número de residuos aromáticos presentes en la superficie de los CBMs expuestos al solvente. Esta acumulación permite que se establezcan diferentes tipos de interacciones con los polisacáridos con el fin de acoplar el enzima a la cadena de azúcares.

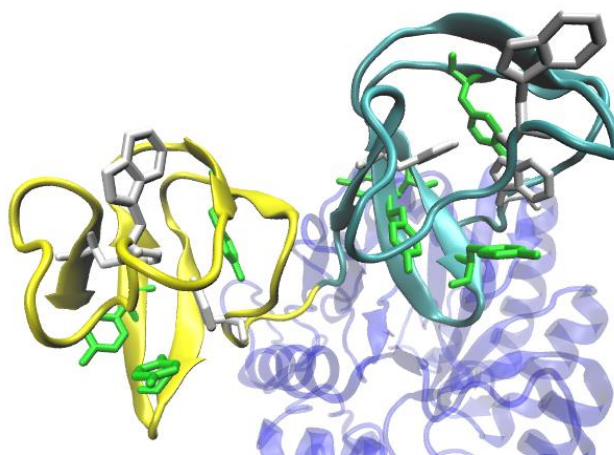


Figura 10.2-12 Residuos aromáticos en los CBMs de VcCDA

Imagen de la estructura de los dos CBMs de VcCDA (CBM N terminal en azul claro y C terminal en amarillo) en los que se resalta el elevado número de residuos aromáticos para establecer interacciones con polisacáridos.

En general su principal rol es colaborar en la degradación de polisacáridos insolubles dado que las hidrolasas por si mismas no son capaces de atacar eficientemente este tipo de compuestos ya que el sustrato no es accesible al sitio activo de las mismas. Sin embargo, este comportamiento no entra en acuerdo con las evidencias bioquímicas observadas para la VcCDA, ya que esta presenta una gran preferencia tanto *in vivo* como *in vitro* por el disacárido de N-acetilglucosamina. El hecho de que la quitobiosa sea el sustrato principal de este enzima hace improbable que las funciones de estos CBMs sean los encargados de llevar a cabo tareas disruptivas o de atracción de sustratos al centro activo. Por otro lado, parece que no ayudan a situar el sustrato en el centro activo, ya que estos módulos se encuentran en el hemisferio opuesto al del centro activo. En consecuencia la función más plausible es la que está relacionada con la de dirigir el enzima a zonas ricas en sus sustrato (localización celular).

La presencia de CBMs en las estructuras de las desacetilasas pertenecientes a la familia CE4 no es algo anecdótico (Tabla 10.2-2). Se ha descrito mediante el análisis de la secuencias de estos enzimas que existen diferentes CBMs de diversas familias en la estructura de desacetilasas. La distribución de estos dominios no sigue ningún patrón ya que se pueden encontrar individualmente, en parejas, flanqueando el dominio catalítico, etc. Además se ha hipotetizado que algunos dominios *GH13-like* como los de la poli-1,6-GlcNac de-N-acetilasa de *E.coli* (PgaB) pueden realizar una función de orientar el sustrato similar a la de algunos CBMs.

Enzima	Uniprot AC	# aa	Estructura modular
VcCDA	Q9KSH6_VIBCH	431	CE 4 DOMAIN, CBM Fam 12, CBM Fam 12
PesCDA	A0A1L3THR9_9PEZI	298	CE 4 DOMAIN, CBD Type 1
PcCDA	--	455	CBM Fam 18, CE 4 DOMAIN, CBM Fam 18
SIAXeA	Q54413_STRLI	335	CE 4 DOMAIN, CBD Type 2
CtAxe (XynA)	O87119_CLOTM	683	GH11 DOMAIN, CBM Family 6, Dockerin Domain, CE 4 DOMAIN
EcPgaB	PGAB_ECOLI	672	CE 4 DOMAIN, GH13-Like Domain
AaPgaB	A5HJW8_AGGAC	638	CE 4 DOMAIN, GH13-Like Domain
BbBpsB	A0A058YIS5_BORBO	701	CE 4 DOMAIN, GH13-Like Domain

Tabla 10.2-2 Miembros de la familia CE4 con módulos de unión a carbohidratos

Enzimas activas en sustratos que continen GlcNAc pertenecientes a la familia con módulos de unión a carbohidratos (CBM) o modulos cuya función supuesta es equivalente a la de estos, como pueden ser los dominios *GH13-like*.

Las estructuras cristalográficas de la proteína completa obtenidas y descritas en el artículo de Andrés et al. siempre han sido dímeros. Tal como se muestra en la Figura 10.2-13 la principal zona de interacción entre los dos monómeros es a través de estos CBMs. Específicamente el CBM N terminal de una cadena interacciona con la superficie del CBM N terminal de la otra cadena, y el CBM C terminal interacciona con la superficie del dominio catalítico. Sin embargo todas las caracterizaciones bioquímicas se han hecho con el monómero. El monómero es una forma estable cuya dimerización no dependen de la concentración del mismo (resultados previos del laboratorio de Bioquímica no presentados en este trabajo). La existencia de un dímero también se ha

comprobado en el perfil de elución de la cromatografía de gel filtración descrita en el apartado anterior.

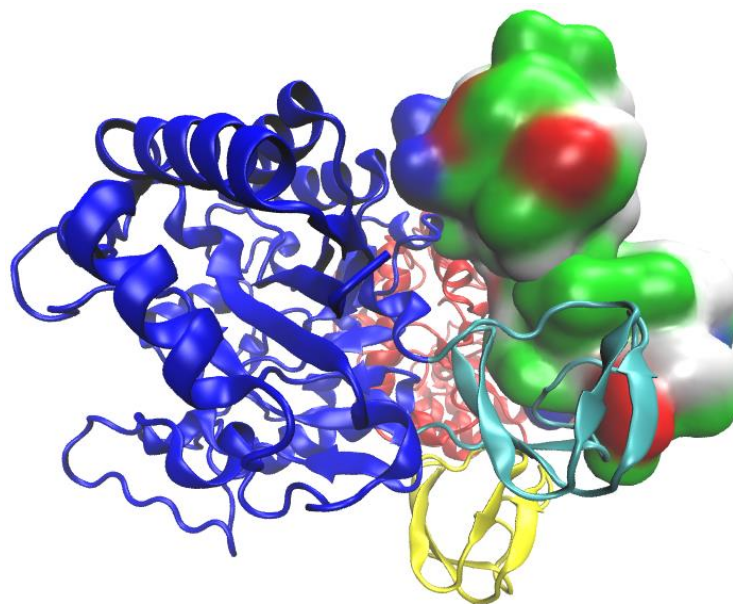


Figura 10.2-13 Interacción a través de CBMs en el dímero cristalográfico
Imagen del dímero cristalográfico en el que se muestran las dos cadenas polipeptídicas y como la interacción se realiza a través de los CBMs. Específicamente interacciones CBM-CBM y CD-CBM.

Después de la cristalización y caracterización de VcCDA en nuestro grupo (Andrés et al. 2014), Hirano et al. describieron la estructura cristalográfica de la desacetilasa de quitooligosacáridos de *Vibrio parahaemolyticus*, VpCOD (3WX7) (Hirano et al., 2015). La VcCDA y la VpCOD son enzimas altamente emparentadas con un 78,8% de identidad y un 85,4 de similitud según el alineamiento de secuencias usando EMBOSS Needle. En esta publicación estudian los efectos de los CBMs en la función desacetilasa de la VpCOD. Sus experimentos están basados en la construcción de una versión truncada del enzima y la comprobación de la capacidad del enzima en cuanto a su unión a una matriz de quitina. Concluyeron que el enzima se expresa correctamente sin la necesidad de los CBMs y que además su propiedades catalíticas no se ven afectadas por lo que estos módulos no son clave ni para el reconocimiento de sustrato ni es un requerimiento estructural del enzima.

En base a los precedentes descritos se decidió realizar experimentos de truncado del enzima objetivo de este trabajo. El objetivo principal de este proceso es determinar en que medida la eliminación de los dos CBMs presentes en la VcCDA afectan a su capacidad catalítica y expresión y poder trabajar con el dominio catalítico aislado como objeto sobre el que realizar ingeniería enzimática para la modulación de la especificidad por sustrato con el fin de ser utilizado como un biocatalizador.

VcCDA	1	MNSTPKGTIYLTFDGDPVNASVEVIKVLNQGGVKATFFYNHAWHLDGIGDE	50
		. .	
VpCOD	1	----TKGTIYLTFDGDPINASIDVINVLNQEEVKATFFYNHAWHLDGIGDE	46
VcCDA	51	NEDRALEALKLALDSGHIVGNHSYDHMIHNCVEEFGPTSGADCNATGNHQ	100
		. .	
VpCOD	47	NEDRALEALKLALDSGHIVANHSYDHMVHNCVEEFGPNSAAECNATGDHQ	96
VcCDA	101	IHSYQDPVRDAASFQNLITLEKYLPTIRSYPNYKGYELARLPYTNQWRV	150
		. .	
VpCOD	97	INSYQDPAYDASMFANLSVLEKYLPNITSYPNYKANEFARLPYTNQWRV	146
VcCDA	151	TKHFQADGLCATSDNLKPWEPEGYVCDPANPSNSVKASIQVQNILANQGYQ	200
		. .	
VpCOD	147	TKDFKADGLCATSDDLKPWEPEGYACDTANPSNSVKAIAVQNILANNGYQ	196
VcCDA	201	THGWDVDWAPENWGIAMPANSLTEAVPFLAYVDKALNSCSPTTIEPINSK	250
		. .	
VpCOD	197	THGWDVDWAPENWGIAMPANSLTEAEVFLGYVDSALNTCAPTTINPINSK	246
VcCDA	251	TQEFPCGTPHADKVIIVLTHDFLFEDGKRGMGATQNLPKLAEFIRIAKEA	300
		. .	
VpCOD	247	AQEFPCGTPHADKVIIVLTHEFLFEDGKRGMGATQNLPKLTKFIQLAKQA	296
VcCDA	301	GYVFDMDNYTPRNSVGKTYQAGEYVLYQGVVYKAVISHTAQDQWAPSST	350
		. .	
VpCOD	297	GVVFDMDNYTPNMQVGNYSAGDYVHLGLTVYQAVTSHTAQDQWAPSPT	346
VcCDA	351	SSLWTNADPATNWTLNVSYEQGDIVNYYKGRYLVSVPHVSQQDWTPTDQ	400
		. .	
VpCOD	347	SSLWTNADPATNWTQNSYKQGDVVTYQGLRYLVNVPVHSQADWSPSSQN	396
VcCDA	401	TLFTALELRRQWSHPQFEK	419
		
VpCOD	397	TLFTAL-----	402

Figura 10.2-14 Alineamiento VcCDA vs VpCOD

Alineamiento de secuencia de la VcCDA y la VpCOD en las que se observa una alta conservación en los residuos que la componen. Se destacan las partes del alineamiento correspondientes a los CBMs en las dos proteínas. Alineamiento en base a la secuencia de las estructuras depositadas en el PDB.

Una de las primeras etapas en el diseño del nuevo constructo génico a expresar es la decisión del punto de truncado del enzima. Se ha identificado en la secuencia de VcCDA que los CBMs están definidos por T336-N382 y A385-L431 utilizando el análisis de Interpro. Por otro lado, la observación de la estructura indica que los CBMs están conectados con el módulo catalítico por un pequeño *linker* que va de Y335 hasta la S340 los cuales comprenden la secuencia YTPRWS (Figura 10.2-15).

La existencia de esta secuencia puente nos indica que el punto de truncado debe encontrarse dentro de este polipéptido. Para definir el punto de escisión se tuvieron en cuenta una serie de requisitos:

- No dejar como extremo C terminal un residuo hidrofóbico.
- Limitar la secuencia sin estructura secundaria que estará libre tras el corte.

En base a estos dos puntos se decidió que el lugar óptimo era tras la T336, convirtiéndose este aminoácido en el último del nuevo enzima.

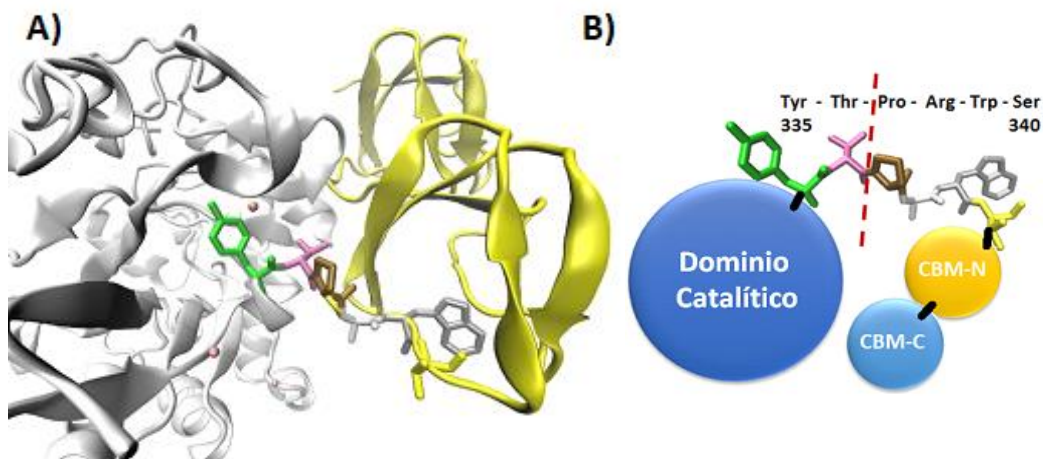


Figura 10.2-15 Linker entre CBMs y dominio catalítico de VcCDA

A) Estructura de la secuencia de aminoácidos que sirven de unión entre los CBMs y el dominio catalítico. Este elemento abarca desde Y335 hasta la S340 definiendo la secuencia: YTPRWS. En blanco el dominio catalítico, en amarillo los CBMs. B) Esquema de la estructura WT FL en el que se indica el lugar de corte T336.

Una vez definida la secuencia del dominio catalítico aislado (CD) se realizó una comprobación de la nueva superficie expuesta del enzima para comprobar si existe algún parche altamente hidrofóbico expuesto al solvente. Esta consideración es un aspecto relevante debido a que la presencia de zonas hidrofóbicas pueden llevar a un mal plegamiento del enzima o a una condensación aberrante que conllevaría a una precipitación del enzima expresado.

En la Figura 10.2-16 se muestra el análisis gráfico de la nueva superficie del dominio catalítico. Este análisis se fundamenta en la naturaleza hidrofóbica, polar, ácida o básica de los aminoácidos expuestos al solvente. Como se observa en la comparación entre a figura A (en la que se muestran los CBMs) y la B (en la que se han eliminado los CBMs), no existe un gran parche hidrofóbico que se encuentre enmascarado por la estructura de estos módulos eliminados. Además la proporción de superficie no polar expuesta en el nuevo enzima truncado es muy similar a la proporción de superficie de la proteína nativa expuesta al medio.

El siguiente elemento a tener en cuenta es la decisión del plásmido en el que se va a clonar el nuevo constructo. En el plásmido original en el que se encontraba clonada la proteína completa VcCDA FL (pET22b) se encontraba la secuencia *Strep-Tag II* a continuación de los CBMs en el extremo C terminal del enzima (Figura 10.2-17). Dado que se va a eliminar esta porción C terminal del enzima se consideró oportuno utilizar un vector de expresión el cual incluyese esta secuencia en el extremo N terminal. Además este diseño permitiría clonar la proteína completa para ser utilizada como referencia en pruebas de expresión, para futuros estudios de generación de proteínas con un truncado parcial (por ejemplo, eliminar solo uno de los CBMs presentes en la secuencia) u otros experimentos.

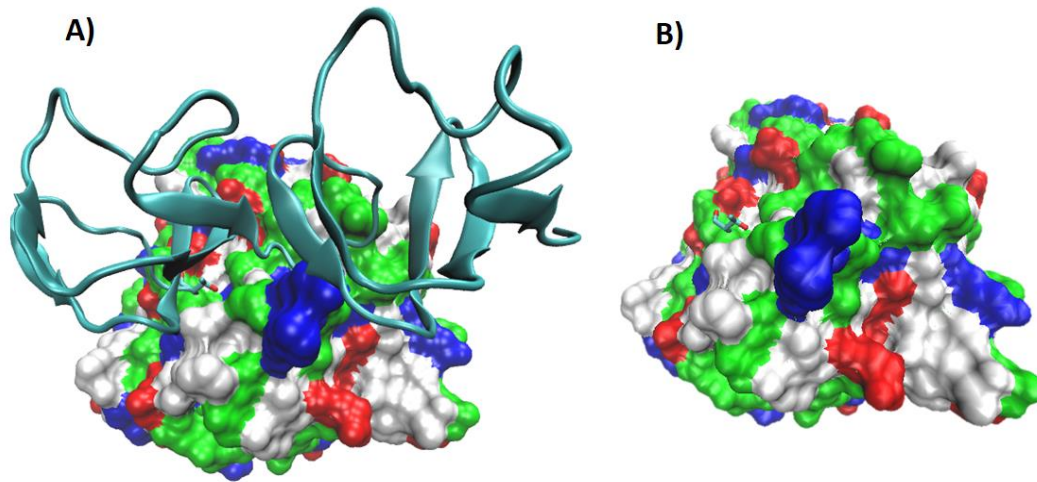


Figura 10.2-16 Análisis de la superficie expuesta del dominio catalítico

Representación de la superficie expuesta al solvente de la estructura del dominio catalítico de VcCDA en función de los residuos presentes. A) En presencia de los CBMS B) Superficie tras eliminar los CBMs. Color en función del tipo de residuo: Blanco no polar, Azul básico, rojo ácido, verde polar.

El plásmido utilizado para este nuevo constructo es el vector pPR IBA2 (Figura 10.2-17). Este plásmido de la casa comercial *Iba lifesciences*, es un vector de expresión controlada mediante el sistema pET con promotores T7 al igual que el pET22b en el que se encontraba la proteína original. Este plásmido además incluye un pequeño *linker* GA codificado dentro de la diana del enzima Kasi (que se utilizará para clonar la proteína) y una diana PstI en el extremo 3' del sitio de clonaje múltiple (MCS) que también será utilizado para el clonaje direccional de la secuencia del enzima. Este *linker* se encuentra entre la *Strep-Tag II* N terminal y la secuencia de la proteína clonada. Las dianas definidas no están presentes en el plásmido original por lo que se añadirán por PCR en la amplificación para extraer el inserto. Como mecanismo de selección este plásmido cuenta con un gen de resistencia a ampicilina.

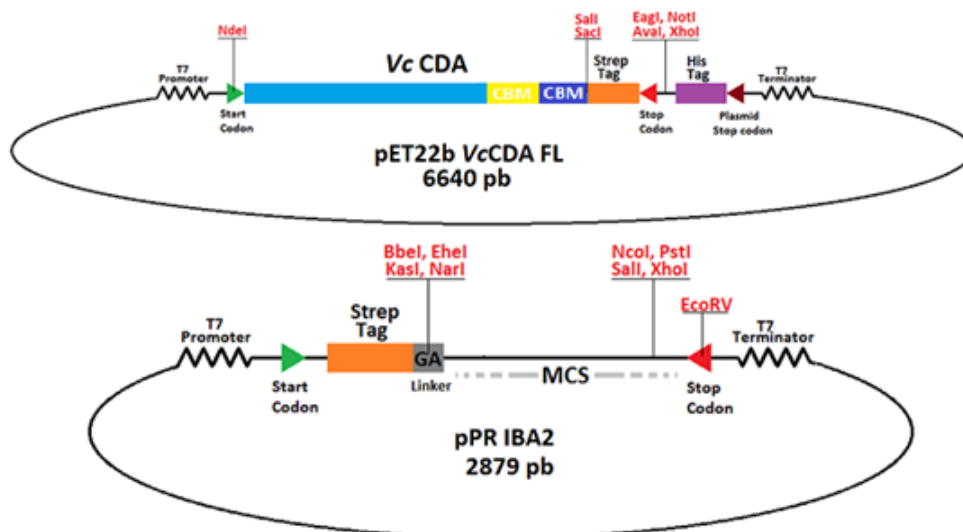


Figura 10.2-17 Mapa de pET22b VcCDA FL y pPR IBA2

Mapa del vector original en el que se encontraba clonada las proteína completa VcCDA con la secuencia *Strep-Tag II* en el extremo C terminal y del nuevo vector pPR IBA2 con la secuencia *Strep-Tag II* en el extremo N terminal.

Se decidió realizar la clonación tanto de la proteína completa como del dominio catalítico aislado. Este proceso se inició con dos PCRs, una para cada constructo, en las que se extrajo el inserto correspondiente y a la vez se incorporaban las dianas KasI en el extremo N terminal (antes de la Met del codón de inicio de la construcción en pET22b) e incorporando un codón de parada y la secuencia de la diana de PstI tras el aminoácido correspondiente al final de cada versión (L431 en el caso de la proteína completa y T336 en el caso del dominio catalítico aislado, Figura 10.2-18). Tras la PCR se realizó la digestión con estos dos enzimas de restricción tanto de los insertos como del vector. Los fragmentos purificados fueron ligados usando la ligasa de T4 y siguiendo el protocolo estándar. Tras este protocolo se extrajo ADN de las colonias resultantes de la transformación en *E. coli* DH5 α , y se comprobó la identidad de las secuencias obtenidas mediante secuenciación utilizando los dos cebadores T7. Se obtuvieron exitosamente los dos nuevos constructos.

Como se observa en la Figura 10.2-18 se obtiene un plásmido de 3762 pares de bases para el dominio catalítico y de 4047 pares de bases para la proteína completa.

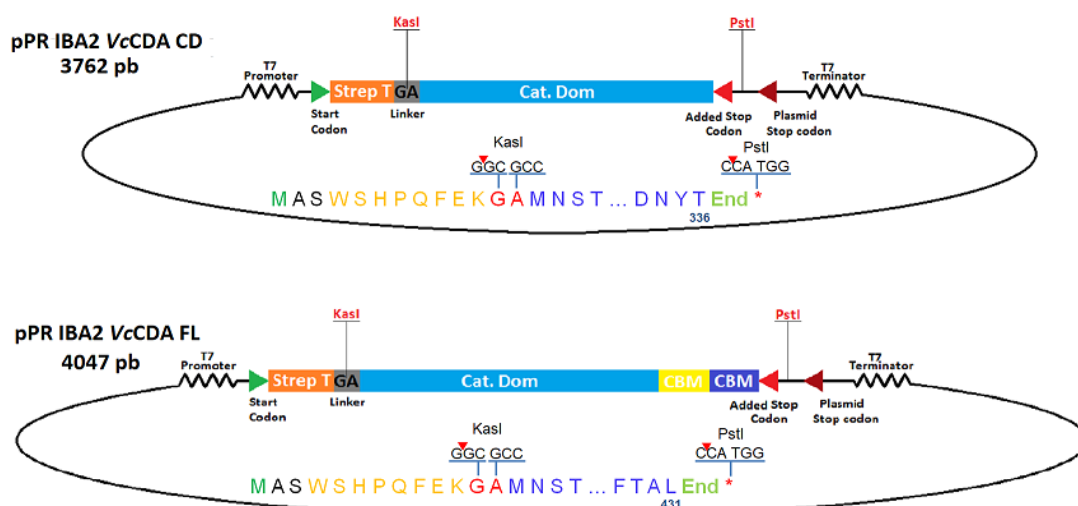


Figura 10.2-18 Mapas de los plásmidos pPR IBA2 VcCDA CD y pPR IBA2 VcCDA FL

Mapa de los vectores construidos con el dominio catalítico aislado (pPR IBA2 VcCDA CD) así como para la proteína completa (pPR IBA2 VcCDA FL) dentro del vector pPR IBA2 con *Strep-Tag II* N terminal así como el esquema de las secuencias resultantes y dianas utilizadas.

Se realizó un estudio predictivo de los parámetros de estos dos nuevos constructos en comparación con la construcción original del enzima utilizando la herramienta ProtParam (Expasy) como se muestran en la Tabla 10.2-3. La eliminación de los CBMs implica una reducción en el tamaño de la secuencia de 95 aminoácidos, esto se traduce en un MW de 35,905 kDa para el dominio catalítico y de 46,879 kDa y 46,613 kDa para el constructo de la proteína completa proveniente del vector pET22b y pPR IBA2 respectivamente. El dominio catalítico ha visto reducido su punto isoeléctrico ligeramente, desde 5,27-5,18 hasta los 5,07. El índice de inestabilidad es una estimación teórica *in silico* a partir de la secuencia primaria de una proteína, valores inferiores a 40 indican que la proteína es estable en esta situación. En este estudio todas las proteínas son estables con valores que oscilan entre 24,91 y 27,31. El índice alifático hace referencia al volumen relativo que ocupan aminoácidos como alanina, valina, isoleucina y leucina, los cuales tienen una cadena alifática en su estructura. En las tres proteínas estudiadas los valores son muy próximos y dentro del rango delimitado por 71,48 y 71,93. El índice GRAVY para una proteína se obtiene

sumando los valores de hidropatía de cada aminoácido y dividido entre el número total de residuos en una secuencia (Kyte & Doolittle, 1982), valores positivos crecientes indican una mayor hidrofobicidad siendo esto negativo en la capacidad de expresión de una proteína soluble. Todas ellas muestran un valor negativo, siendo el que más se aproxima a valores positivos el del dominio catalítico, pero sin esto significar un problema en la expresión de la proteína. Esta última observación está de acuerdo con los resultados vistos en el análisis de la superficie de la proteína en la Figura 10.2-16.

	VcCDA FL (pET22b)	VcCDA CD	VcCDA FL (pPR IBA2)
Longitud secuencia	419	324	419
MW (kDa)	46,879	35,905	46,613
PI	5,27	5,07	5,18
Índice de Inestabilidad	27,31 (estable)	25,91 (estable)	24,91 (estable)
Índice alifático	71,93	71,70	71,48
GRAVY (Grand average of hydropathicity)	-0,492	-0,432	-0,452

Tabla 10.2-3 Parámetros calculados para los constructos de VcCDA

Cuadro resumen de los parámetros calculados a partir de la estructura primaria de las proteínas resultantes de la expresión de los constructos pET22b VcCDA FL, pPR IBA2 VcCDA CD y pPR IBA2 VcCDA FL utilizando la herramienta Protparam de Expasy.

10.2.6. Expresión y purificación del dominio catalítico VcCDA CD

Una vez obtenido los constructos y calculados los parámetros bioquímicos indicados en la Tabla 10.2-3, se continuó el estudio de estas proteínas realizando un test de expresión de las mismas. Dado que con la proteína expresada en el plásmido pET22b utilizando la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) *star* y el protocolo de autoinducción se habían obtenido muy buenos rendimientos de purificación, se decidió partir de esta base para la comprobación de si esta proteína se expresaba adecuadamente. En las pruebas se realizaron cultivos a pequeña escala en matraz de Erlenmeyer utilizando el protocolo para expresión de proteínas en medio de autoinducción indicado en la sección de material y métodos. Se probaron dos temperaturas diferentes 25°C (la que se utiliza para pET22b VcCDA FL) y 30°C. Se probaron tres cultivos de *E. coli* BL21 (DE3) *Star* en los que se transformaron los plásmidos pET22b VcCDA FL (a modo de control del constructo clásico dentro del laboratorio), pPR IBA2 VcCDA FL (a modo de control dentro de este nuevo vector) y pPR IBA2 VcCDA CD (que es la proteína de interés). Además se incluyó una serie de muestras cultivadas en medio LB (Ctrl en la Figura 10.2-19) para confirmar la capacidad inductora de la expresión del medio de autoinducción.

Una vez incubados durante 48 horas en agitación a las temperaturas indicadas, se extrajeron alícuotas de los medios de cultivo, se centrifugaron, se resuspendieron en PBS y las células fueron lisadas mediante sonicación durante 1 minuto. El crudo resultante del lisado fue sometido a una centrifugación para separar las fracciones soluble e insoluble, las cuales fueron sometidas a un análisis en electroforesis en gel desnaturante SDS-PAGE (Figura 10.2-19).

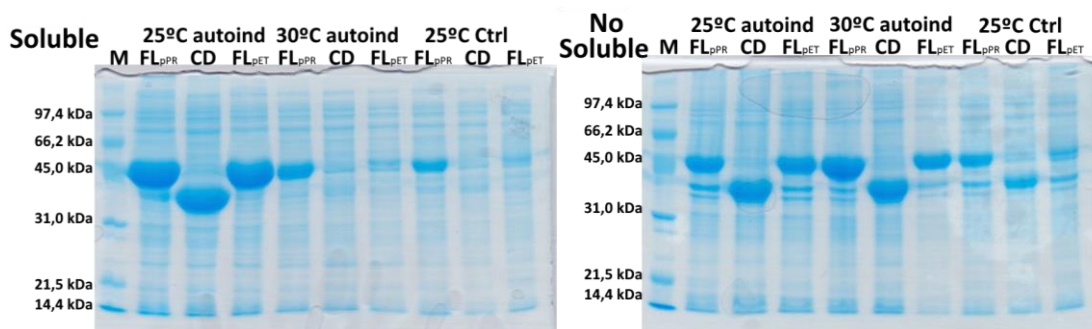


Figura 10.2-19 Prueba de expresión de VcCDA CD

Imágenes de los geles SDS-PAGE en los que se analizan la fracción soluble e insoluble de las pruebas de expresión de pPR IBA2 VcCDA CD en los que se han usado como control a pPR IBA2 VcCDA FL y pET22b VcCDA FL. Las proteínas FL tienen una masa de 46,7 kDa de promedio y la CD de 35,9 kDa. Se observa que hay proteína en las dos fracciones pero lo relevante es que en la fracción soluble las tres se expresan al mismo nivel.

Se observa que en la fracción soluble están presentes las bandas correspondientes al peso molecular de las tres proteínas, principalmente, en las muestras correspondientes a la temperatura de 25°C. En las muestras correspondientes al ensayo a 30°C y al medio no inductivo, se observan bandas muy tenues de expresión de proteínas en el rango de 45 kDa y 35 kDa. Incluso la banda de menor tamaño no es fácilmente distinguible de las bandas de base de *E. coli* en comparación con los carriles vecinos. Al analizar el gel de electroforesis de la fracción insoluble se manifiestan bandas de expresión de proteína tanto en los carriles correspondientes al medio inductivo como al no inductivo, siendo las de este último considerablemente más tenues.

El hecho de que se observen bandas tanto en la fracción soluble como insoluble dentro del experimento a 25°C puede deberse a que la lisis sea parcial o a que haya una parte de la población de esta proteína que no se haya plegado correctamente y que forme cuerpos de inclusión no activos. Por otro lado, el que se hayan obtenido como resultado bandas intensas en la fracción insoluble del experimento de expresión realizado a 30°C y no en la fracción soluble nos indica que no es una condición óptima para la expresión de estas proteínas. Este fenómeno puede deberse a que a esta temperatura el metabolismo de *E. coli* se encuentra más próximo a su óptimo (37°C) lo cual se puede traducir en una expresión demasiado acelerada de la proteína recombinante implicando un plegamiento artefactual o aberrante llevando a la formación de cuerpos insolubles. El hecho de una lisis deficiente se descarta por dos aspectos: el resto de muestras (sobre todo la de 25°C) muestra bandas correspondientes a los pesos moleculares esperados de las proteínas recombinantes y estas muestras han sufrido el mismo proceso; la otra justificación es que la intensidad de las bandas que se corresponden con proteínas provenientes de la cepa de *E. coli* usada muestran intensidades idénticas a lo largo de todas las muestras ensayadas, algo que indica una eficiencia de lisis equivalente entre todas las muestras. En las muestras control (sin inducción) las bandas son mucho más tenues y se observa cierta fuga (*leaking*) de la expresión de proteína. Esto puede deberse a que el medio LB es un medio complejo, y puede que alguna de las fuentes de carbono presentes en los extractos de su formulación contenga capacidad inductora de este sistema de expresión.

Como conclusión de este experimento se extrae que las mismas condiciones de expresión utilizadas para la proteína en su plásmido de expresión original (pET22b VcCDA FL) son igual de válidas para el dominio catalítico aislado utilizando el plásmido pPR IBA2 como vector de

expresión. Estas condiciones implican una temperatura de 25°C durante 48h utilizando el medio de autoinducción.

Una vez definidas las condiciones en las que se van a realizar la inducción a nivel preparativo, se decidió expresar proteína en una escala suficiente como para realizar su caracterización bioquímica. El protocolo seguido para la obtención de este enzima es idéntico al utilizado para la proteína VcCDA FL ya descrito en el capítulo anterior. Tras la expresión de la proteína en matraz de Erlenmeyer utilizando el medio LB suplementado para un protocolo de autoinducción, se realizó la lisis mediante sonicador de una resuspensión de las células en tampón fosfato 50 mM pH 8,5 NaCl 300 mM. El lisado fue clarificado por centrifugación y filtrado. Con el sobrenadante se realizaron las correspondientes etapas cromatográficas.

En la Figura 10.2-20 se muestra el cromatograma resultante de la cromatografía de afinidad *Strep-Trap*. En el perfil de absorbancia se observa que se han realizado tres ciclos de carga-elución-regeneración. Los picos de elución (en un único paso, sin necesidad de gradiente) son de una magnitud considerable. A pesar de que este proceso no es cuantitativo, la magnitud de los valores de absorbancia obtenidos en este cromatograma para la elución (número 3) parecen ser proporcionalmente similares a los obtenidos para la proteína VcCDA FL (Figura 10.2-3).

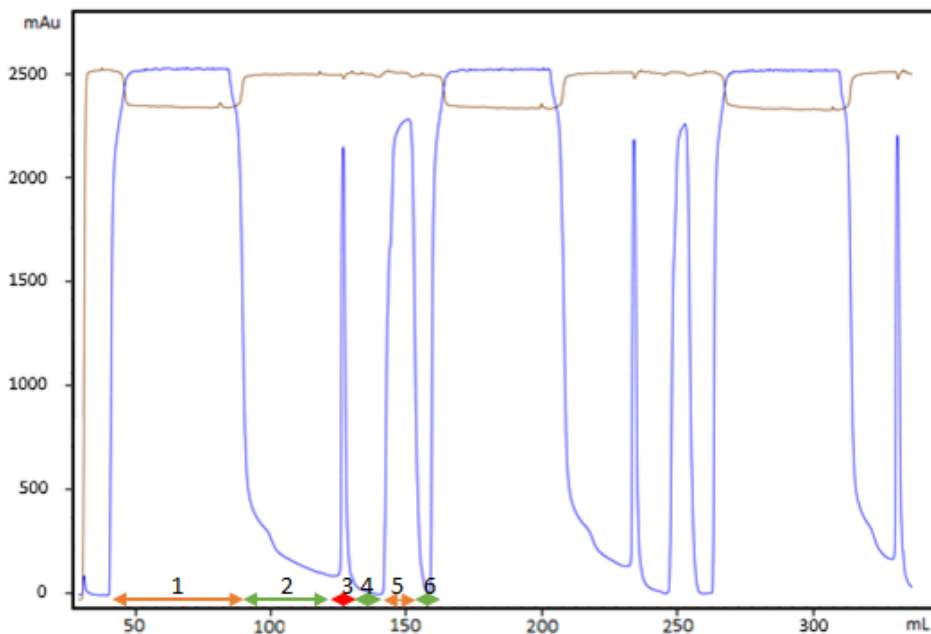


Figura 10.2-20 Cromatograma de purificación *Strep-Trap* de la VcCDA CD

Cromatograma resultante de la purificación por cromatografía de afinidad de la VcCDA en la que se realizaron tres cargas de columna. Los números indican las etapas de un ciclo de carga/elución: 1. Carga, 2. Lavado, 3. Elución, 4. Lavado, 5. Regeneración con Haba y 6. Lavado. Azul: absorbancia 280nm, Marrón: conductividad.

La siguiente etapa en la purificación de la proteína se corresponde con una filtración en gel utilizando una columna Superdex 200 (16/600) y usando tampón fosfato 50 mM pH 8,5 NaCl 300 mM como eluyente. En la Figura 10.2-21 se muestra el perfil de elución una vez cargado el total de enzima obtenido en la etapa anterior una vez concentrado. Al igual que para la VcCDA FL se obtienen cinco fracciones, de las cuales, la de menor tamaño se correspondería con el monómero. En función del volumen de elución y utilizando la ecuación de calibración de la columna (Ecuación 3), se obtiene que el máximo de este pico tiene un peso molecular de 30,03 kDa, un valor próximo a los 35,9 kDa del valor teórico calculado en función de la secuencia de la proteína. Esta variación

puede deberse a que la forma de la proteína estudiada y su radio hidrodinámico influyan en como se eluye a lo largo de la proteína en comparación con las proteínas utilizadas como patrón en la calibración de la columna.

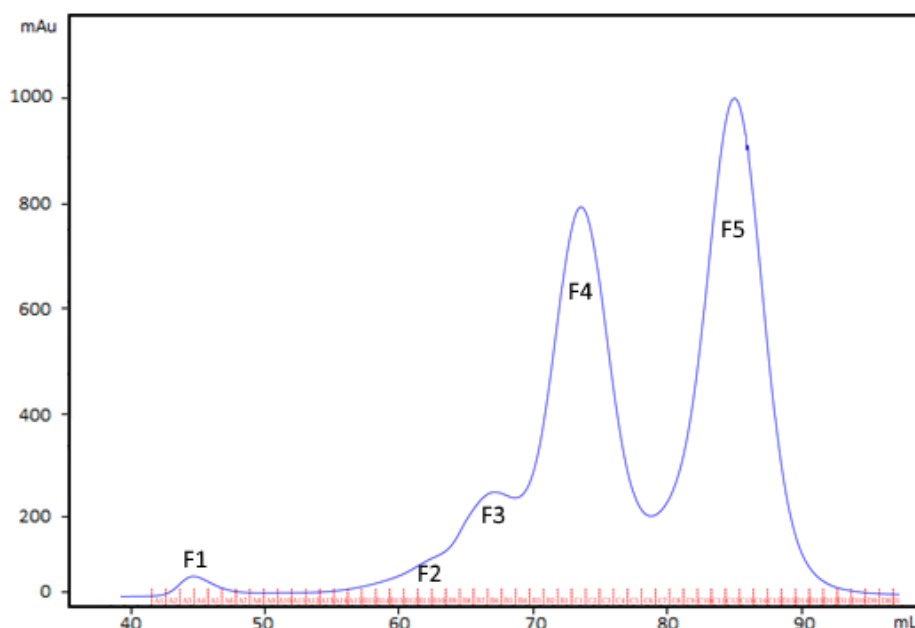


Figura 10.2-21 Cromatograma de GFC de la VcCDA CD

Cromatograma obtenido en la cromatografía de gel filtración usando una columna Superdex 200 (16/600). Se muestran cinco fracciones multiméricas dentro de las cuales F5 se corresponde con el monómero.

Otra hecho puesto de manifiesto a lo largo de múltiples purificaciones de la VcCDA CD es que la fracción monomérica está proporcionalmente más presente que en la VcCDA FL. Esto puede explicarse mediante las estructuras diméricas obtenidas en los experimentos de cristalización. En las estructuras mencionadas previamente (Figura 10.2-13) se ejemplificaba el hecho de que en el empaquetamiento cristalográfico la interacción entre monómeros estaba mediada por interacciones CBM-CBM y CBM-CD de cada una de las cadenas. La eliminación de los CBMs es muy probable que interfiera en la dimerización, por lo que el monómero aumente su presencia. El hecho de que se sigan observando otras fracciones oligoméricas también nos indica que, probablemente, en condiciones fisiológicas o en disolución, la dimerización pueda utilizar superficies e interacciones alternativas a las vistas en las estructuras resueltas.

De cada una de las etapas mencionadas en la purificación, se guardaron muestras o alícuotas para su análisis por SDS-PAGE (Figura 10.2-22). Las muestras abarcan desde el proceso de lisis hasta las fracciones de gel filtración. En la fracción insoluble obtenida en el clarificado del crudo de lisis, se observa que hay una banda intensa a la altura de la masa molecular esperada para el dominio catalítico aislado. Este hecho ya se había visto en las pruebas de expresión de la proteína. La explicación de su naturaleza es equivalente en los dos experimentos: proteínas no plegadas correctamente y que han formado cuerpos de inclusión insolubles y/o es una manifestación de una lisis no completa de las células de *E. coli* que han expresado la proteína recombinante. De cualquier modo, la banda obtenida en la fracción soluble es lo suficientemente significativa como para que todo el proceso de purificación se haya llevado a cabo exitosamente como se ha visto en los perfiles cromatográficos previos.

En el carril equivalente al volumen que ha atravesado la columna de afinidad *Strep-Trap* se observa una banda del peso equivalente al del CD, que indica, al igual de lo que se ha discutido para la proteína completa (Apartado 10.2.2), que se ha sobrepasado la capacidad de la columna. Dado que se obtiene en cantidad suficiente este procedimiento no se ha optimizado pero, sin lugar a duda, es una purificación subóptima.

En el mismo gel se carga la proteína resultante tras la cromatografía de afinidad y de las diferentes fracciones oligoméricas vistas en el perfil de la cromatografía de gel filtración. De la muestra de la cromatografía de afinidad se extrae que la proteína es altamente pura, ya que solo se observa una banda del peso molecular correcto. En las diferentes fracciones oligoméricas (F1 a F5) se concluye que todas están formadas por una única proteína de un único peso molecular equivalente al monómero del dominio catalítico aislado. Además se observa una correlación en la intensidad de las bandas y los valores de absorbancia obtenidos en el perfil de GFC.

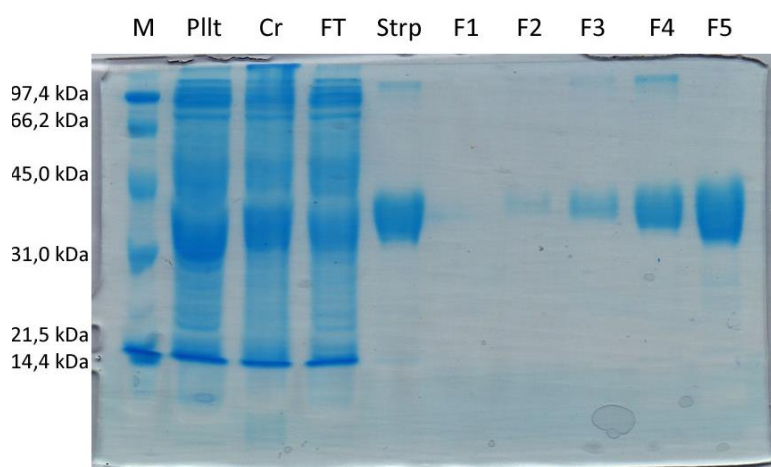


Figura 10.2-22 SDS-PAGE VcCDA CD

Gel SDS-PAGE de todo el proceso de purificación de la VcCDA CD (35,9 kDa). M: Marker Low Range, Pllt: *Pellet* de la centrifugación tras el lisado, Cr: crudo, fracción soluble del lisado, FT: *Flow through* de la columna, Strp: Proteína purificada por la *Strep-Trap*, F1-F5: fracciones de la 1 a la 5.

Las fracciones de gel filtración también se estudian en base a su actividad con un sustrato artificial, el acetato de metil umbeliferona (AcOMU). La metilumbeliferona (MU) es una cumarina fluorescente en condiciones básicas. Así, una vez desacetilado el AcOMU por acción de una desacetilasa se libera acetato y MU, de tal modo que es posible correlacionar el incremento de fluorescencia con la actividad catalítica de cada fracción (Figura 10.2-23).

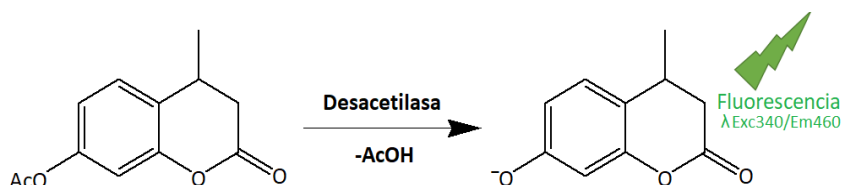


Figura 10.2-23 Desacetilación de la AcOMU

Reacción de desacetilación del sustrato artificial de desacetilasas AcOMU. La eliminación del grupo acetato libera AcO⁻ y MU que se traduce en que esta es una molécula fluorescente.

En estas cinéticas se depositan 200 μ L de una disolución 0,5 mM de AcOMU en PBS en una microplaca negra para medición de fluorescencia y se preincuba a 37°C durante 5 minutos. Sobre este volumen se añaden 10 μ L de las fracciones obtenidas en la GFC. Esto implica que la

concentración efectiva en la cinética es de 0,48 mM de AcOMU. Además se incluyen blancos en los que no se añade enzima, solo tampón. Una vez iniciada la reacción por la adición del enzima se monitoriza la fluorescencia con una $\lambda_{Exc}=340\text{nm}$ y $\lambda_{Em}=460\text{nm}$ periódicamente con agitación constante. Las concentraciones se obtienen interpolando los valores de fluorescencia punto a punto en una curva patrón de MU en PBS (0-0,5 mM) (Figura 10.2-24). El porcentaje de actividad se calcula usando las velocidades calculadas en la porción de la recta [MU] vs tiempo, siendo el 100% aquella fracción que muestra el máximo de actividad.

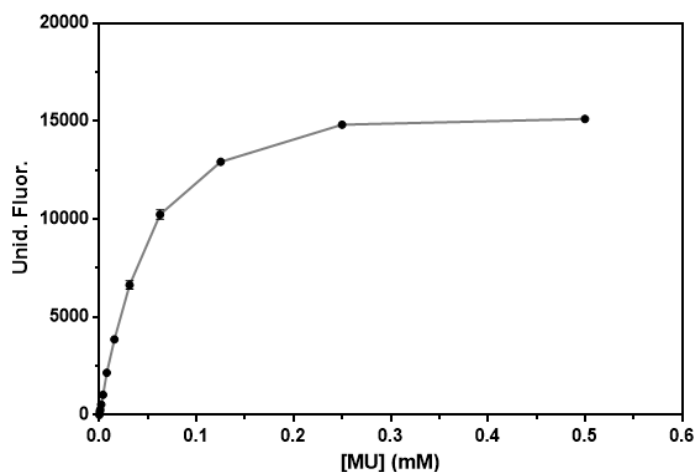


Figura 10.2-24 Curva patrón MU

Curva patrón de MU disuelta en PB 50 mM pH8,5 NaCl 300 mM utilizada para la interpolación punto a punto de los valores obtenidos en las cinéticas de las fracciones de GFC de la VcCDA.

En la Figura 10.2-25 se muestra la superposición del perfil de elución de GFC de la VcCDA CD y el porcentaje de actividad de cada fracción aislada. Como resultado general se ha demostrado que el enzima purificado es activo, al menos, sobre el sustrato artificial AcOMU. Esto indica que la eliminación de los CBMs no implica una pérdida de la capacidad catalítica del enzima. Se pone de manifiesto que, en mayor o menor medida, todas las fracciones son activas a excepción de la F1. Esta F1 se ha asociado a agregados moleculares de alto peso molecular (que se eluyen en el volumen muerto de la columna). Otra conclusión que se extrae del gráfico, es que proporcionalmente la fracción F5, la cual se corresponde con el monómero, es la más activa. Este resultado es coincidente con la distribución de actividades entre oligómeros vista para la VcCDA FL (Figura 7.7-7).

En base a todo lo descrito, se define que el monómero de la VcCDA CD será la fracción de trabajo para su caracterización bioquímica.

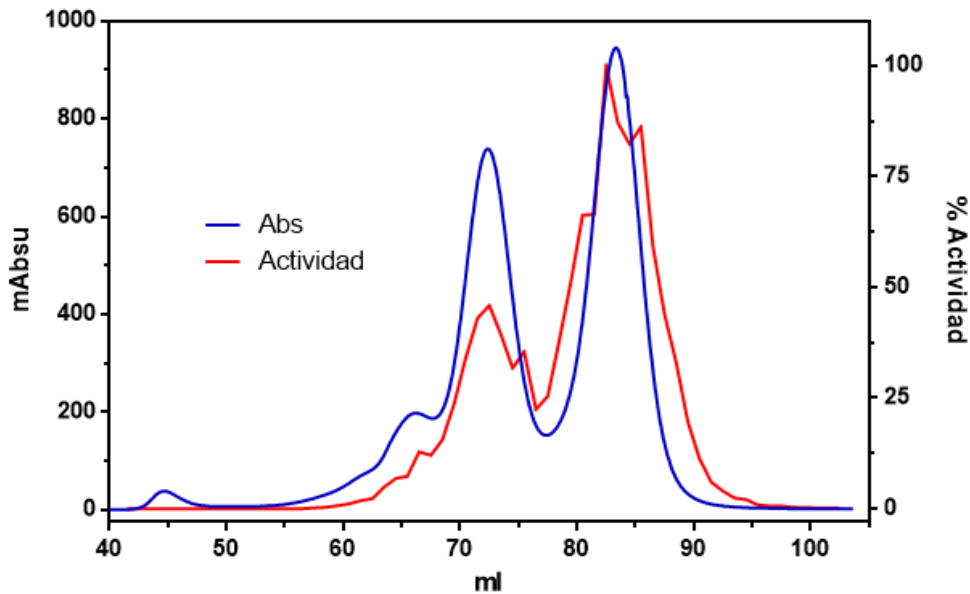


Figura 10.2-25 Perfil de elución GFC de VcCDA CD vs AcOMU

Perfil de actividad de las fracciones sobre el sustrato artificial AcOMU superpuesto al perfil de elución de la cromatografía de gel filtración. Se observa que la fracción más activa es la monomérica.

Tras combinar todas las fracciones que se corresponden al monómero, se calcula la concentración del monómero para poder calcular el rendimiento y se analiza por espectrometría de masas MALDI-TOF. En la Figura 10.2-26 se observan dos picos uno de 35,75 kDa y otro de 35,9 kDa, este último se corresponde directamente con el MW calculado para el dominio catalítico. El de menor masa puede ser debido a la pérdida de la Met N-terminal puesto que la diferencia de masa es exactamente 150 Da.

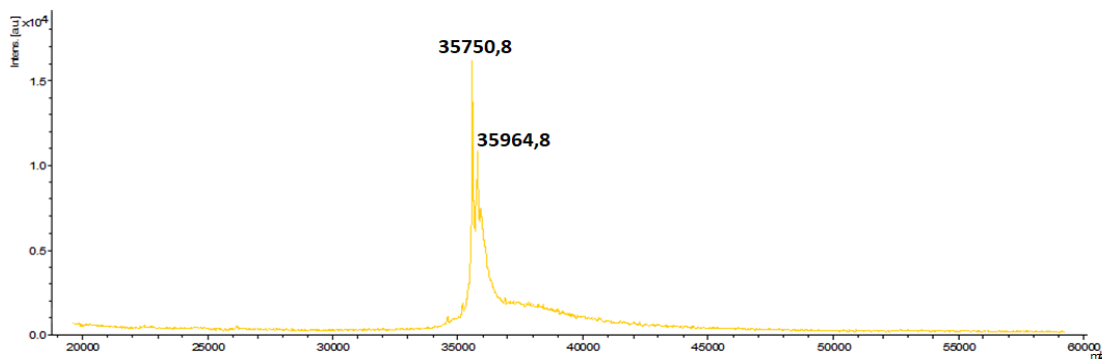


Figura 10.2-26 MALDI-TOF VcCDA CD

Espectro de masas de la fracción monomérica de la VcCDA CD analizada por espectrometría de masas MALDI-TOF. Se observa un pico de 35,75-35,9 kDa que se corresponden con la masa teórica de este enzima.

El rendimiento promedio de todo este proceso de purificación proporciona un valor de 4,12 mg/L de promedio calculado sobre 3 purificaciones. Este valor se sitúa próximo a los 7,14 mg/L de promedio de la VcCDA FL clonada dentro del plásmido pET22b.

10.2.7. Estudio de la estabilidad de la VcCDA CD

La eliminación de los CBMs implica una disrupción significativa de la estructura de la VcCDA FL. De hecho esta modificación implica una reducción del 22% del número de aminoácidos en la secuencia de la proteína completa. A pesar de que por definición los CBMs son módulos independientes unidos por un conector (*linker*) a un dominio catalítico, es posible que tenga algún efecto en la estabilidad en la proteína a través de diferentes propiedades. Por ejemplo, dentro del área de la ingeniería de proteínas es habitual el utilizar la fusión de MBPs (*Maltose Binding Proteins*) a enzimas recombinantes para incrementar su solubilidad (Kapust & Waugh, 1999).

Uno de los parámetros más fáciles de calcular para estimar la estabilidad de una proteína es la determinación de su T_m (*Melting temperature*). Este parámetro se define como aquella temperatura a la que la mitad de la población de proteína se encuentra en forma desnaturalizada y la otra mitad en forma nativa. Cuanto más térmicamente estable sea una proteína mayor será la energía a proporcionar para desestabilizar su estructura y, por consiguiente, mayor será su T_m . El estudio de la T_m también se utiliza en muchos otros aspectos como puede ser la unión de ligandos, interacciones proteína-proteína, efecto de agentes desnaturalizantes, etc.

Un ensayo desarrollado para el estudio de T_m son los denominados *Thermal Shift Assays* o TSA. En este tipo de ensayos se mide el cambio de temperatura de desnaturalización de una proteína sometida a diferentes condiciones. Si estas condiciones se mantienen constantes es un rápido método para la comparación de la T_m de diferentes proteínas. En el año 1991 se desarrolló un TSA basado en el uso de una sonda fluorescente, el *Thermofluor* (Semisotnov et al., 1991) que posteriormente se adaptó a ensayos miniaturizados en microplacas de 96 pocillos (Pantoliano et al., 2001). Una revisión posterior de esta metodología instauró el uso de una nueva sonda, el *Sypro Orange* (Lo et al., 2004), cuyas ventajas son una gran sensibilidad y que las longitudes de onda usadas tanto en su excitación como la detección de la radiación emitida (483nm y 560nm respectivamente) se encuentran en la mayoría de equipos de PCR a tiempo real. Este hecho facilitaba la monitorización de la fluorescencia de muchas muestras en un sistema en el que se podía controlar muy eficientemente la rampa de temperatura de desnaturalización. Una vez establecido este método como un protocolo de referencia para el estudio de la desnaturalización de proteínas se bautizó como *Differential Scanning Fluorimetry* o DSF (Niesen, Berglund, & Vedadi, 2007).

El mecanismo que hace que el *Sypro Orange* sea una sonda de desnaturalización se ejemplifica en el conjunto de imágenes de la Figura 10.2-27. Este compuesto se une inespecíficamente a superficies hidrofóbicas. De tal modo, cuando la temperatura se incrementa y el enzima alcanza estados de desnaturalización se exponen zonas del núcleo hidrofóbico que antes estaban apantallados en su interior por lo que pasan a ser accesibles para la sonda (Figura 10.2-27A). La exclusión de la capa de agua que rodea al *Sypro Orange* permite que este incremente muy significativamente su fluorescencia. Llegado cierto punto donde la desnaturalización está muy avanzada se pueden formar agregados de proteína desnaturalizada que hacen que la fluorescencia global se vea reducida (Figura 10.2-27B). El tratamiento matemático de los resultados permite ajustar la una ecuación sigmoideal la cual proporciona como resultado la T_m de esa proteína en esas condiciones (Figura 10.2-27C).

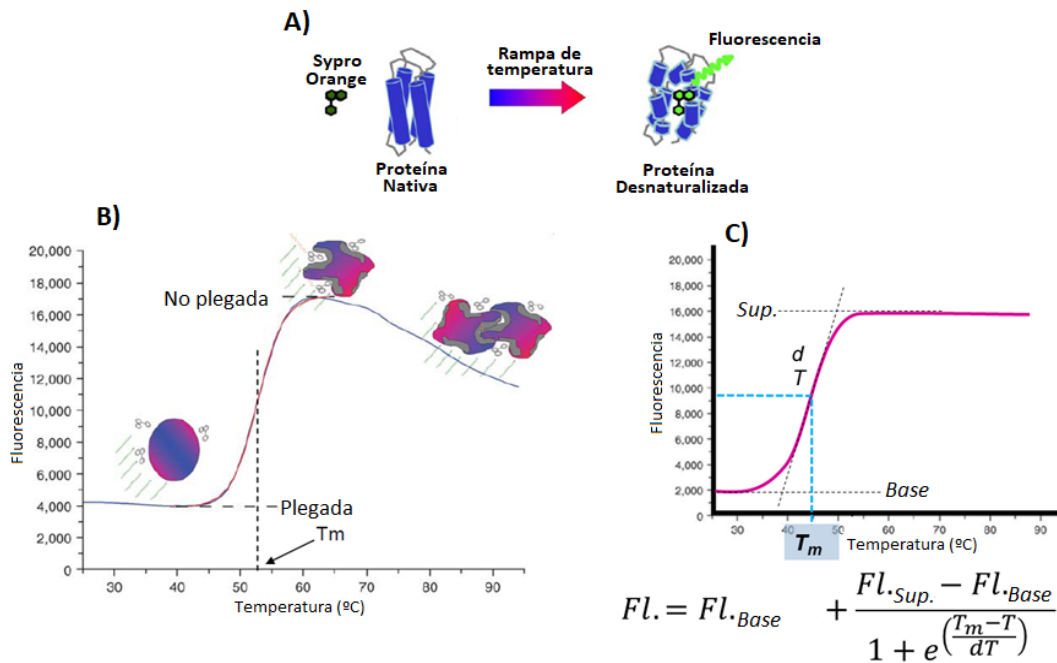


Figura 10.2-27 Mecanismo de acción y cálculo de T_m usando Sypro Orange en un ensayo de DSF

A) Esquema de funcionamiento del reactivo Sypro Orange usado en un protocolo de DSF en el que se monitoriza el incremento de su fluorescencia al unirse a las zonas hidrofóbicas de las proteínas expuestas al solvente en la desnaturalización. B) Ejemplo del resultado crudo que se obtiene en un experimento de DSF en el que una vez alcanzado un punto máximo la fluorescencia se reduce por la formación de agregados de proteínas C) Esquema del ajuste realizado y la ecuación sigmoideal utilizada para el cálculo de la T_m .

Esta metodología fue aplicada a las proteínas descritas hasta este punto: la VcCDA FL y la VcCDA CD en presencia y ausencia de Zn^{+2} (0,1 mM). El volumen de reacción fue de tan solo 25 μ L en los que se incluía una concentración de proteína de entre 1 y 5 μ M disuelta en PBS y en presencia de Sypro Orange. Se incluyeron controles en los que solo se mezclaba la sonda con tampón. Tanto muestras con proteína como controles se realizaron por duplicado. Todas las muestras fueron sometidas a una rampa de desnaturalización desde 25°C hasta los 95°C en escalones de 1°C cada 30 segundos. La monitorización de la señal se realiza mediante la excitación de las muestras a 483 nm y la detección de la señal emitida a 560 nm.

En la Figura 10.2-28 se muestran los resultados del ajuste de las curvas de desnaturalización obtenidas del análisis de la VcCDA FL y la VcCDA CD. Se observa que en ausencia de Zn^{+2} los valores de T_m son de $56,1 \pm 0,1^\circ C$ para la proteína completa y $54,4 \pm 0,12^\circ C$ para el dominio catalítico. Esto implica que las dos proteínas tienen una T_m distinta (1,7°C de diferencia) y que es menor para el CD, esto implica que este último es ligeramente menos estable. La presencia de Zn^{+2} en el ensayo permite aumentar la T_m de las proteínas a $58,69 \pm 0,04^\circ C$ para la proteína completa y a $57,6 \pm 0,2^\circ C$ para el dominio catalítico aislado. En los dos casos el valor ha aumentado +2,6°C para la FL y +3,2°C para la CD.

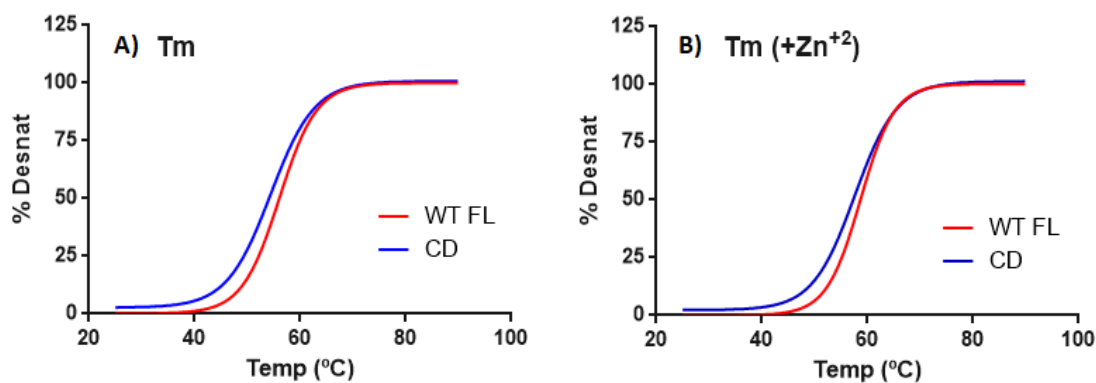


Figura 10.2-28 Prueba de estabilidad DSF para el cálculo de T_m de VcCDA FL y CD

Cálculo de las T_m para VcCDA FL y VcCDA CD mediante una curva de desnaturalización usando *Sypro Orange* como reactivo de monitorización en ausencia de Zn^{+2} (A) y en presencia de 0,1 mM Zn^{+2} (B). FL: $56,07 \pm 0,10^\circ C$; CD: $54,41 \pm 0,12^\circ C$; FL+ Zn^{+2} : $58,69 \pm 0,04^\circ C$; CD+ Zn^{+2} : $57,60 \pm 0,18^\circ C$

En conclusión el nuevo enzima purificado es estable en las condiciones en las que se van a realizar los ensayos cinéticos pero su T_m es ligeramente, pero de modo significativo, inferior a la de la proteína completa.

10.2.8. Caracterización cinética de la VcCDA CD

Una vez purificado el dominio catalítico y estudiados algunos de sus parámetros bioquímicos se decidió realizar la caracterización cinética del mismo siguiendo el mismo protocolo antes descrito para la proteína completa (VcCDA FL).

Previo a la realización de la cinética completa y para identificar las concentraciones óptimas también se construyó una recta patrón de enzima. Se utilizó una concentración de 2 mM de los sustratos DP2 y DP4, y varias concentraciones de enzima. Aprovechando este hecho se decidió analizar la muestra de mayor concentración paralelamente mediante HPLC-MS en modo SIM en modo positivo de las masas del producto de partida, el monodesacetilado y el didesacetilado, para comprobar si la alteración realizada afectaba al DA del producto resultante.

El resultado que se muestra en la Figura 10.2-29 pone de manifiesto que el enzima es activo sobre quitoooligosacáridos y que el DA no se ve afectado por la modificación realizada al truncar los CBMs.

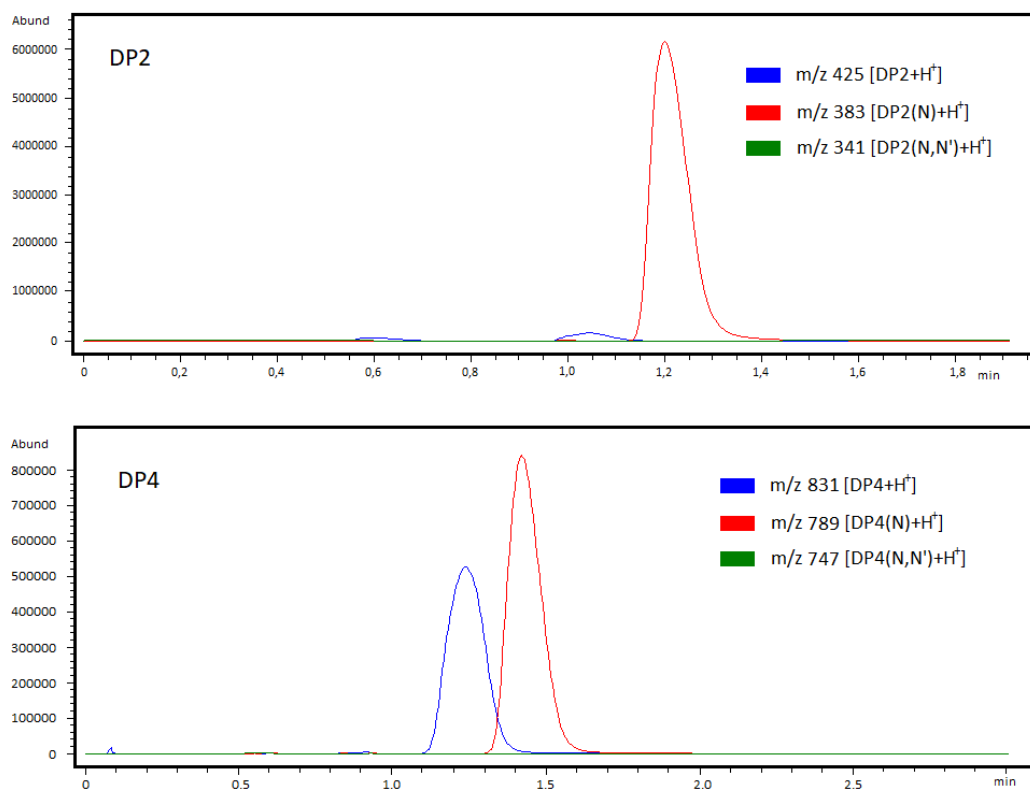


Figura 10.2-29 Comprobación del DA en los productos de VcCDA CD

Cromatogramas resultantes de la monitorización de sustratos y productos monodesacetilados y didesacetilados tras la reacción de DP2 y DP4 con VcCDA CD. En ninguno de los dos casos se observa la presencia de producto doblemente desacetilado.

El hecho de que solo se observe el producto monodesacetilado indica que el grado de desacetilación del producto se ha mantenido a pesar de que se hayan eliminado los CBMs. Además, la conservación del patrón de desacetilación fue comprobada experimentalmente tal como se describe en el apartado siguiente (10.2.9).

En resumen, para el cálculo de k_{cat} y K_M se realizaron 12 cinéticas enzimáticas a diferentes concentraciones de sustrato (25 μ M hasta 4 mM) tomando 8 puntos temporales para cada una, y todas ellas por duplicado. La concentración de enzima dependía del sustrato utilizado y siempre se ha encontrado dentro del rango de 0,1 μ M-1 μ M, siendo la menor concentración utilizada para DP2 y la mayor para DP5. Solo se monitorizará por HPLC-MS en modo SIM la generación de producto monodesacetilado.

En la Figura 10.2-30 y Tabla 10.2-4 se muestran los resultados obtenidos para los cuatro sustratos, en la tabla además se muestra los valores previamente obtenidos para la proteína completa. En términos generales se sigue observando que DP2 es el mejor sustrato en términos de k_{cat}/K_M , luego DP3-DP4-DP5 se muestran dentro del mismo orden de magnitud. Esto ya pone de manifiesto que este enzima muestra una mejora en la capacidad de catalizar sustratos mayores que DP4.

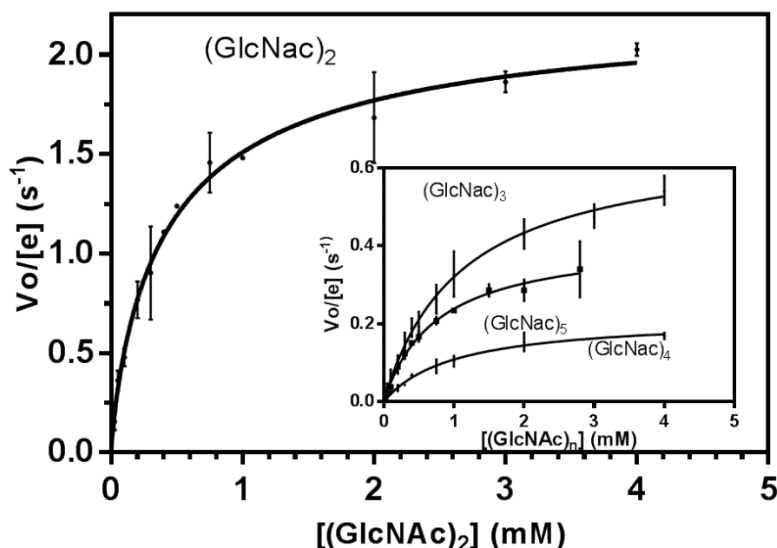


Figura 10.2-30 Caracterización cinética de VcCDA CD DP2-DP5

Caracterización de los parámetros cinéticos utilizando la fracción monomérica de VcCDA CD y los quitooligosacáridos DP2 a DP5 realizándose los ensayos en tampón Tris 50 mM pH8,5 NaCl 300 mM y a una temperatura de 37°C.

La mejora descrita se ejemplifica aún más claramente si se observan los valores de k_{cat} . En el caso de DP2 y DP3 este parámetro es prácticamente idéntico al del enzima completo (FL), de ahí que el porcentaje de k_{cat} del ratio CD/FL sea prácticamente 100%. Sin embargo, este mismo ratio obtiene un valor de 200% para DP4 y 233% para DP5. Una posible justificación de este incremento puede deberse al papel dinámico del *loop* 5. Como se había descrito y en comunión con el “*Subsite Capping Model*” es necesario el movimiento del *loop* 5 para generar subsitios positivos en el centro activo que permitan acomodar sustratos mayores que DP3. Es una posibilidad que la eliminación de los CBMs permita una mayor flexibilidad de este *loop* facilitando la integración de los quitooligómeros.

Por otro lado se observa que las K_M se han visto ligeramente afectadas y en todos los casos reduciendo la afinidad por el sustrato.

Sustrato	Constructo	k_{cat} (s^{-1})	K_M (mM)	Índice de Hill	k_{cat}/K_M ($M^{-1}\cdot s^{-1}$)	% k_{cat} CD/FL
(GlcNAc) ₂	FL	$2,2 \pm 0,08$	$0,36 \pm 0,02$	2,45	$6,1 \cdot 10^3$	102
	CD	$2,26 \pm 0,17$	$0,44 \pm 0,1$	0,84	$5,1 \cdot 10^3$	
(GlcNAc) ₃	FL	$0,63 \pm 0,02$	$0,41 \pm 0,03$	-	$1,5 \cdot 10^3$	106
	CD	$0,67 \pm 0,03$	$1,10 \pm 0,11$	-	$6,0 \cdot 10^2$	
(GlcNAc) ₄	FL	$0,11 \pm 0,003$	$0,52 \pm 0,05$	-	$2,1 \cdot 10^2$	200
	CD	$0,22 \pm 0,01$	$1,01 \pm 0,13$	-	$2,2 \cdot 10^2$	
(GlcNAc) ₅	FL	$0,18 \pm 0,01$	$0,24 \pm 0,03$	-	$7,5 \cdot 10^2$	233
	CD	$0,42 \pm 0,02$	$0,76 \pm 0,09$	-	$5,5 \cdot 10^2$	

Tabla 10.2-4 Parámetros cinéticos de la caracterización de VcCDA CD comparados con VcCDA FL

Parámetros cinéticos k_{cat} y K_M obtenidos en la caracterización de VcCDA CD. En el caso del sustrato DP2 ya no se observa un comportamiento cooperativo. El CD aislado parece ser más efectivo en la catálisis de sustratos largos.

En resumen este enzima truncado sigue mostrando una preferencia por la quitobiosa como sustrato, sin embargo es capaz de desarrollar una mayor actividad catalítica en sustratos mayores que DP4 manifestándose este aspecto en un ligeramente mayor valor de k_{cat} . Este resultado pone

de manifiesto que esta forma de la proteína es una buena base para la realización de protocolos de ingeniería para la mejora de la eficiencia de la actividad desacetilasa.

10.2.9. Caracterización del patrón de desacetilación de la VcCDA CD

En la caracterización cinética se supuso que el patrón de desacetilación no había cambiado, pero este es uno de los parámetros que quedan por determinar en este nuevo constructo. Para obtener esta información se realizó una breve estancia en el laboratorio del Dr. Bruno M. Moerschbacher en el “*Institute of Plant Biotechnology and Biology*” en Münster (Alemania). El método aplicado ha sido desarrollado por personal de este laboratorio y publicado recientemente (Cord-Landwehr et al., 2017).

Los oligosacáridos de quitosano están definidos por tres parámetros básicos DP, DA y PA. No solo el tamaño de estas moléculas (DP) ni el porcentaje de acetilación (DA) son los que condicionan sus bioactividades, igual de importante es la distribución de los residuos desacetilados. Hasta recientemente conseguir esta información era un proceso analíticamente complejo. Sin embargo para poder conseguir interpretaciones estructura-función es un parámetro imprescindible. Algunas técnicas que se han usado son:

- a) RMN: para la cual es necesaria una cantidad considerable de compuesto y este debe ser homogéneo en términos de DP. Además la información que aporta es limitada (Stockinger et al., 2015; Tegl et al., 2016).
- b) Degradación enzimática: La acción combinada y secuencial de quitinasas y quitosanas con un patrón de corte altamente específico permite conocer el PA del sustrato en función de los productos resultantes. Sin embargo conocer los requerimientos a nivel de subsitios de estas enzimas es una tarea laboriosa y a veces las preferencias no están 100% dirigidas a un tipo de residuo (Hamer, Moerschbacher, & Kolkenbrock, 2014).

Todo el proceso de identificación del patrón de acetilación de quitoooligosacáridos y cuantificación de las diferentes especies dentro de la muestra se fundamenta en la detección de los fragmentos de estos tras haber sido doblemente marcados isotópicamente (reacetilados con anhídrido acético [$^2\text{H}_6$] y en su extremo reductor con ^{18}O) mediante UHPLC-MS². La reconstrucción de la secuencia a partir de estos fragmentos permite conocer el PA o PAs iniciales.

Esta metodología presenta múltiples ventajas con respecto a sus predecesores:

- a) Puede analizar mezclas complejas en DP, DA y PA.
- b) Tiene una sensibilidad elevada que permite utilizar cantidades de muestra en la escala de mg.
- c) Permite determinar simultáneamente y cuantitativamente el patrón de acetilación de mezclas presentes en la muestra.
- d) Es un protocolo estandarizado que permite el análisis de un número elevado de muestras en cada ronda analítica.

La reacetilación tiene un doble objetivo, por una parte consigue que todas las moléculas de un DP idéntico se eluyan dentro del mismo intervalo de tiempos. Esto se debe a que independientemente del DA de partida todas acabarán siendo 100% DA. Esto permite que cuando se trata de una muestra compleja la separación cromatográfica HILIC segregará las moléculas solo por su DP, en consecuencia se podrán generar segmentos de análisis para cada longitud de oligómero y se podrán calcular las abundancias de cada DA original. El otro objetivo es identificar por diferencia de masa aquellos residuos que han sido desacetilados. La reacetilación con anhídrido acético [$^2\text{H}_6$] implica un incremento de masa de 45 g/mol mientras que el acetato no isotópico tiene una masa de 42 g/mol. Así una molécula monodesacetilada y reacetilada con este reactivo mostrará una masa 3 unidades mayor que aquella que naturalmente muestra un DA del 100%.

La otra etapa es el marcaje del extremo reductor con ^{18}O . Esta etapa permite la reconstrucción de la secuencia de la molécula ya que dentro de los fragmentos identificaremos cual pertenece al extremo reductor. En dos fragmentos con una acetilación equivalente, el fragmento que proviene del extremo reductor mostrará una masa 2 unidades mayor que uno que no procede del extremo reductor. Dado que el punto de fragmentación dentro de un análisis MS^2 generalmente se produce en los enlaces glicosídicos, podremos encontrar todos los fragmentos incrementales del oligómero, así podemos identificar el PA de la molécula completa utilizando principalmente aquellos que contienen el extremo reductor marcado.

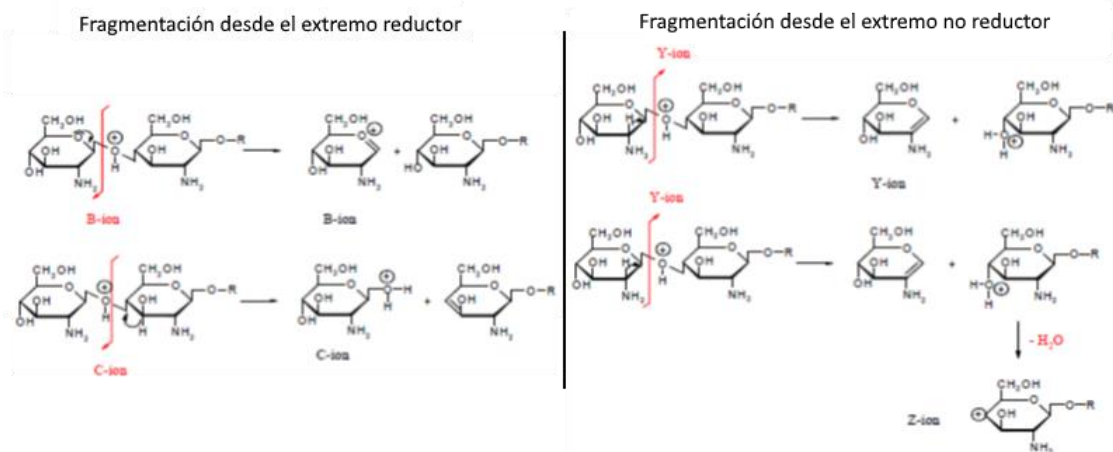


Figura 10.2-31 Fragmentación MS^2 de quitooligosacáridos

Esquema de fragmentación dentro de un protocolo de análisis MS^2 de un quitooligosacárido. Se muestran los principales tipos de iones generados. De entre todos ellos los más útiles para la identificación del PA son el ión Y y B por ese orden.

Dentro de todas las posibles fragmentaciones que se pueden dar en un ensayo MS^2 , aquellos que nos serán más interesantes son los iones Y y B (Figura 10.2-31). Los iones B son aquellos en los que la fragmentación de la molécula produce que la carga se mantenga en la porción del extremo no reductor y el ion Y es aquel en el que la carga permanece en el fragmento del extremo reductor. De principal interés es el ion Y ya que siempre será único para cada oligosacárido ya que será el único que esté marcado en el extremo reductor. Este hecho es de vital importancia, ya que en el caso de azúcares largos pueden generarse iones B de fragmentación interior de la cadena. También se generan otro tipo de iones en la rotura en la trampa iónica como los C o Z pero no son relevantes para este análisis.

Combinando tres tipos de información, las abundancias cromatográficas de cada DP y DA, con las tablas de masas teóricas de cada fragmento y las abundancias de cada ion proveniente de la fragmentación, se puede obtener como resultado el PA de todos los compuestos presentes en la muestra y sus abundancias relativas.

En la Figura 10.2-32 se muestra el ejemplo de secuenciación de dos oligosacáridos de quitosano con un mismo DP pero diferentes DA y PA. En el esquema se muestra como influyen los diferentes marcajes en el m/z de los iones. A partir de los iones Y de menor tamaño, se puede hacer la reconstrucción de la secuencia a partir de las masas obtenidas en el espectro y las masas teóricas descritas en base a cada fragmentación posible.

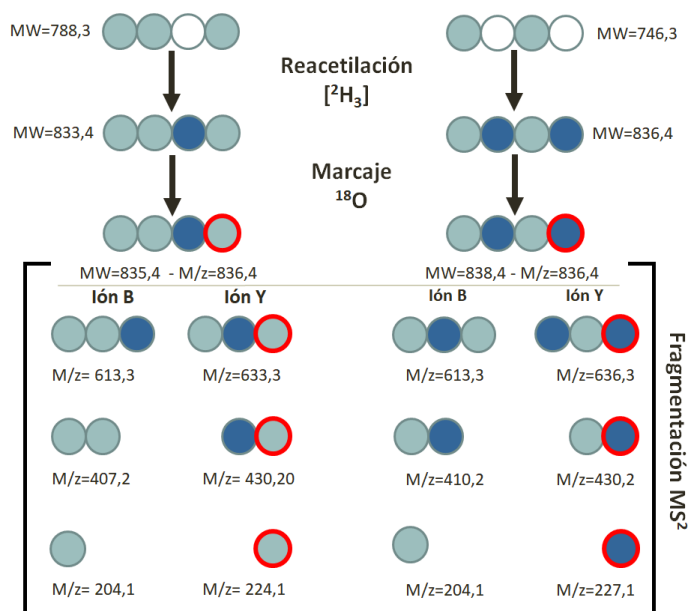


Figura 10.2-32 Ejemplo de un protocolo de secuenciación de PA

Esquema gráfico de dos ejemplos de secuenciación de los patrones de acetilación de dos moléculas con un idéntico PA pero diferentes DA. Esfera blanca: GlcN, Esfera azul claro: GlcNAc, Esfera azul oscuro: GlcNAc reacetilado con anhídrido acético [$^2\text{H}_6$], Esfera con borde rojo: Extremo reductor marcada con ^{18}O .

Para la caracterización del patrón del dominio catalítico de la VcCDA aislado se realizaron tres reacciones de desacetilación preparativas con los sustratos DP2, DP4 y DP5. No se realizó con DP3 debido a que es el sustrato menos disponible.

De cada uno de los sustratos se utilizaron 10 mg en un volumen de 1,75 mL lo que implica unas concentraciones de 13,9 mM para DP2, 6,9 mM para DP4 y 5,4 mM para DP5. La concentración de enzima utilizada fue de 1,42 μM . Las reacciones se incubaron durante 48h a 37°C. Una vez transcurrido este tiempo y haber realizado una monitorización por el método HPLC-MS, se liofilizaron los productos y se conservaron hasta su estudio de secuenciación.

Ya en el laboratorio del Dr. Bruno M. Moerschbacher se hizo todo el protocolo de comprobación marcaje y análisis MS². Cabe mencionar que entre cada etapa de marcaje se realizaba una comprobación de los espectros de los productos obtenidos para comprobar el éxito de los procedimientos químicos realizados.

Se observa que el patrón de desacetilación del dominio catalítico aislado no había variado con respecto a la proteína completa (en la sección de anexos 15.1 se pueden encontrar los

cromatogramas y el desarrollo del proceso de secuenciación pág 317). Es decir, solo se desacetila el segundo residuo desde el extremo no reductor: AD, ADAA y ADAAA para DP2, DP4 y DP5, respectivamente. Este resultado era el esperado ya que se había visto que el enzima solo daba como resultado la monodesacetilación de los sustratos independientemente de su DP y las modificaciones estructurales realizadas han sido en módulos independientes y cuya localización topológica implica una gran distancia con el sitio activo.

10.3. Demostración del *Subsite Capping Model*: Primera generación de mutantes

El enunciado del *Subsite Capping Model* presentado en la introducción mencionaba que: “El patrón de desacetilación y la preferencia de sustrato de los enzimas de la familia CE4 están regidos por las limitaciones impuestas por unos loops específicos y los fenómenos de remodelación dinámica de los mismos”. Sin embargo su formulación se ha basado en observaciones de estructuras de desacetilasas y en conclusiones extraídas de los resultados obtenidos en la caracterización bioquímica de la VcCDA, por lo que es necesaria la aportación de evidencias experimentales que soporten este enunciado.

Los elementos, ya mencionados en la introducción, sobre los que se construyó el *Subsite Capping Model* son los siguientes:

- a) La presencia de subsitios potenciales que se encuentran bloqueados por la estructura de los *loops* que rodean el sitio activo.
- b) Los *loops* no son estructuras rígidas e inmóviles, son dinámicos.
- c) El desplazamiento de los *loops* permite la exposición de subsitios necesarios para la acomodación de ciertos sustratos.
- d) Diferentes desacetilasas muestran *loops* muy diversos en secuencia, tamaño y estructura decorando los sitios activos.

El trabajo *in silico* realizado en el modelaje del *loop* 5 para demostrar estructuralmente la acomodación de sustratos largos como DP4 podría ser interpretado como una primera aproximación experimental en la demostración del *Subsite Capping Model*.

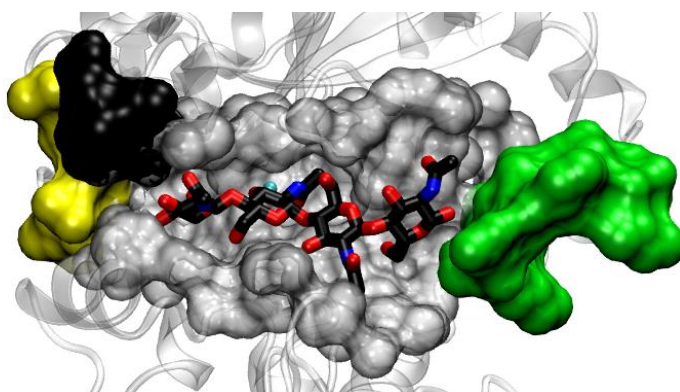


Figura 10.3-1 Modelo del *loop* 5 dinámico

Modelo bioinformático demostrando el posible comportamiento dinámico de DP5 para permitir la acomodación de sustratos más largos que DP3. (*Loop* 5 en verde)

En resumen, en el modelo bioinformático realizado (Figura 10.3-1) se muestra como tras forzar la conformación abierta del *loop* 5 se comprueba como el *docking* del tetrámero es capaz de producir un complejo energéticamente estable y competente para catálisis.

Utilizando como hipótesis de partida el requerimiento de que el *loop* 5 debe ser dinámico y permitir la creación de subsitios positivos adicionales con su reestructuración, se crearon dos estrategias experimentales para demostrar el mecanismo funcional del *Subsite Capping Model* en

un ensayo *in vitro*. Estas dos estrategias son complementarias y meridianamente opuestas en su concepción:

- a) Bloqueo del *Loop 5*, en la que se busca inmovilizar el *loop 5*, y se esperaría la pérdida de actividad desacetilasa sobre sustratos mayores que DP3.
- a) Eliminación del *Loop 5*, para generar subsitios positivos adicionales, traduciéndose en una mayor actividad de acetilasa con sustratos iguales o mayores que el tetrámero.

10.3.1. Estrategia 1: Bloqueo del *loop 5*

En comparación con la estructura cristalográfica obtenida para la VcCDA FL en complejo con DP2, el modelo computacional ha sido capaz de crear dos subsitios positivos adicionales permitiendo la acomodación de DP4.

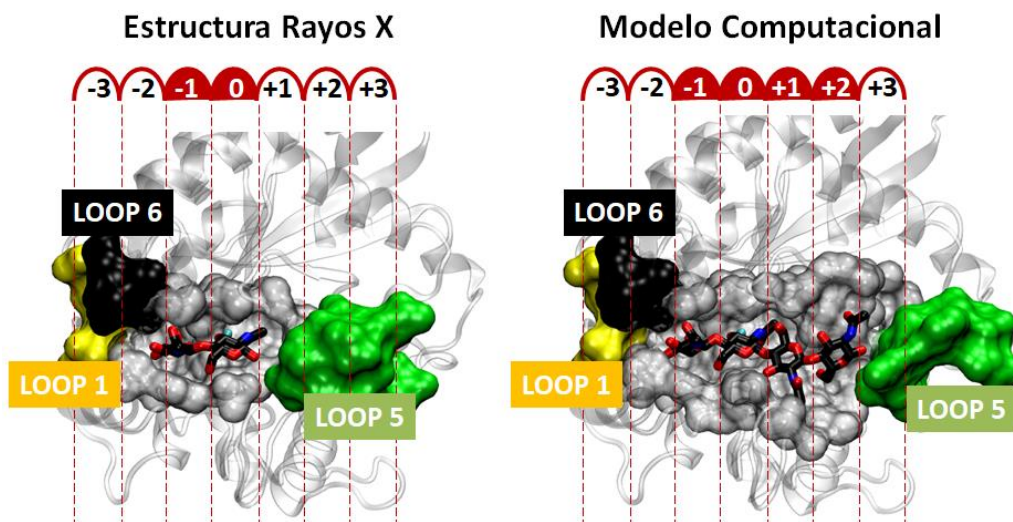


Figura 10.3-2 Comparación estructura cristalográfica y modelo computacional

Esquema comparativo de la estructura cristalográfica obtenida en complejo con DP2 y el modelo computacional en el que se ha desplazado el *loop 5* y realizado el *docking* de DP4. Se observa la exposición de dos subsitios positivos adicionales. Se muestra como el *loop 1* y *6* bloquean los subsitios negativos adicionales.

En la Figura 10.3-2, además, se puede observar como los *loops 1* y *6* bloquean los subsitios negativos. Sin embargo, todas las evidencias indican que los subsitios que se generan para la acomodación de sustratos mayores que DP3 son por el extremo reductor. Estas evidencias son las siguientes:

- a) El patrón de desacetilación del enzima no depende del DP del sustrato. La VcCDA siempre desacetila la segunda posición desde el extremo no reductor del oligómero. Este resultado indica que los subsitios que ocupa el sustrato son positivos, por lo que es el *loop 5* el candidato más probable a desplazarse
- b) Los *loop 1* y *6* (en menor medida el *2*) están altamente interconectados por una extensa red de interacciones de diferentes naturalezas. Este hecho hace que su capacidad plástica de reestructuración se encuentre muy limitada. Estos *loops* son los que definen el patrón de desacetilación.

Para fijar el *loop* 5 y limitar su dinámica se pensó en introducir un puente disulfuro en una posición adecuada que fijara el loop al tiempo que no alterase el plegamiento de la proteína. Con este fin se analizó la estructura del *loop* 5 y sus inmediaciones para identificar el punto óptimo para la creación del anclaje.

Primero se buscó la existencia de puentes disulfuro en la estructura nativa del enzima. En la estructura de la VcCDA existen tres puentes disulfuro nativos situados en el interior de tres *loops* respectivamente:

- C106 - C118 *Loop* 2 (secuencia total H97 - D131)
- C185 - C200 *Loop* 3 (secuencia total D182 - S206)
- C264 - C281 *Loop* 5 (secuencia total L261 - D288)

Por otro lado, dentro de la secuencia de la VcCDA sobreexpresada no existen otras cisteínas más allá de las involucradas en estos puentes disulfuro.

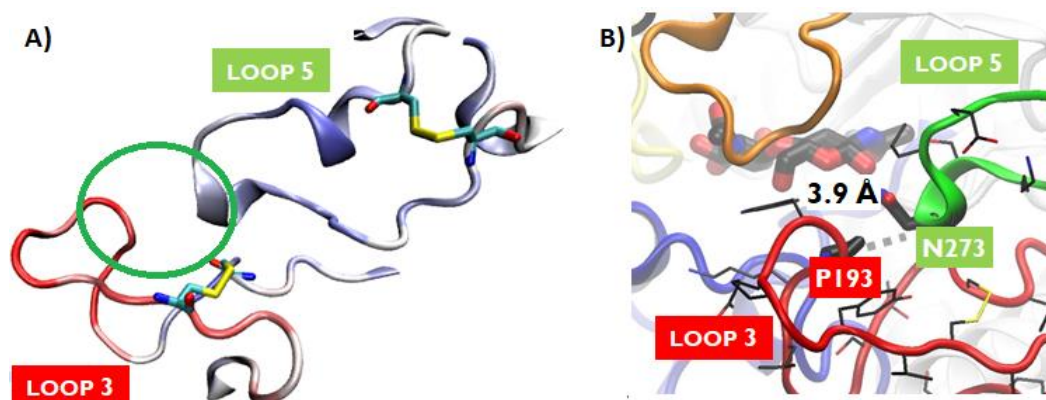


Figura 10.3-3 Localización del punto de bloqueo del Loop 5 por puente disulfuro

Estudio estructural para el establecimiento de un puente disulfuro para el bloqueo del *loop* 5. A) Localización general del punto óptimo de mutación entre *loop* 5 y *loop* 3. B) Detalle de aminoácidos concretos y distancia entre ellos.

En la Figura 10.3-3 se muestra el resultado del análisis estructural para la determinación del punto idóneo para la creación de la doble mutación. Se identificó una única zona donde se podría crear el puente disulfuro y que este fuese efectivamente un factor determinante en el movimiento del *loop*. En la Figura 10.3-3 A se observa que la posición de este nuevo puente disulfuro se sitúa en la zona apical del *loop* 5, este hecho presupone una limitación máxima del movimiento.

Los dos residuos a mutar son P193 y la N273, que se encuentran a una distancia de 3,9Å entre carbonos α . Esta distancia se encuentra dentro del rango de distancias en las que se encuentran los puentes disulfuro nativos (5,2 Å para el puente del *loop* 1, 4,9 Å para el *loop* 3 y 5,4 Å para el puente del *loop* 5). Sin embargo, la Figura 10.3-3 nos muestra que en la proximidad de los dos candidatos se encuentra el puente disulfuro del *loop* 3. La distancia con el carbono α de N273 es de 4,9 Å de C185 y 8,7 Å de C200. En este caso, una vez obtenido el doble mutante habrá que descartar experimentalmente que no se ha producido un entrecruzamiento de cisteínas en los puentes disulfuro que altere la estructura y estabilidad del enzima. Por otro lado, las distancias de P193 con las cisteínas del puente disulfuro del *loop* 3 son de 8,9 Å a la C185 y 8,2 Å a la C200, por lo que es improbable que se produzcan interferencias dado que se encuentran fuera del rango habitual.

Se consideró que la mejor estrategia para la obtención del doble mutante P193C/N273C era mediante dos PCRs *Quick Change* consecutivas. Dado que se quiere dar una base experimental al *Subsite Capping Model* se decidió que el mejor molde para el experimento era la VcCDA FL. De tal modo, que en la comparación con resultados previos u otras desacetilasas no existan factores adicionales como la eliminación de los CBMs.

Tras la realización de los protocolos de biología molecular (Materiales y métodos, apartado 13.1.2), se extrajo ADN plasmídico de las colonias resultantes y se comprobó por secuenciación que la doble mutación se llevó a cabo exitosamente.

10.3.1.1. Expresión y purificación de la VcCDA FL P193C/N273C

Dado que este mutante es altamente similar a la proteína WT, como se puede ver en la Tabla 10.3-1, se decidió aplicar directamente el mismo protocolo de expresión y purificación de la proteína VcCDA WT FL al doble mutante VcCDA FL P193C/N273C en células de *E. coli* BL21(DE3) con el vector pET22b. El protocolo consiste en una expresión en matraz de Erlenmeyer utilizando medio LB suplementado para un procedimiento de producción de proteína por autoinducción y dos etapas cromatográficas: afinidad usando una columna Strep-Trap y filtración en gel con una columna Superdex200.

	VcCDA WT FL (pET22b)	VcCDA FL P193C/N273C (pET22b)
Longitud secuencia	419	419
MW (kDa)	46,879	46,874
PI	5,27	5,27
Índice de Inestabilidad	27,31 (estable)	28,12 (estable)
Índice alifático	71,93	71,93
GRAVY (Grand average of hydrophaticity)	-0,492	-0,468

Tabla 10.3-1 Parámetros calculados para la VcCDA FL P193C/N273C

Cuadro resumen de los parámetros calculados a partir de la estructura primaria de las proteínas resultantes de la expresión de los constructos pET22b VcCDA FL, y pET22b VcCDA FL P193C/N273C utilizando la herramienta ProtParam de Expasy.

En la Figura 10.3-4 se muestra el cromatograma resultante de la cromatografía de afinidad. En este gráfico se observa que se han realizado tres ciclos de carga y descarga con un perfil muy similar al de la proteína WT FL.

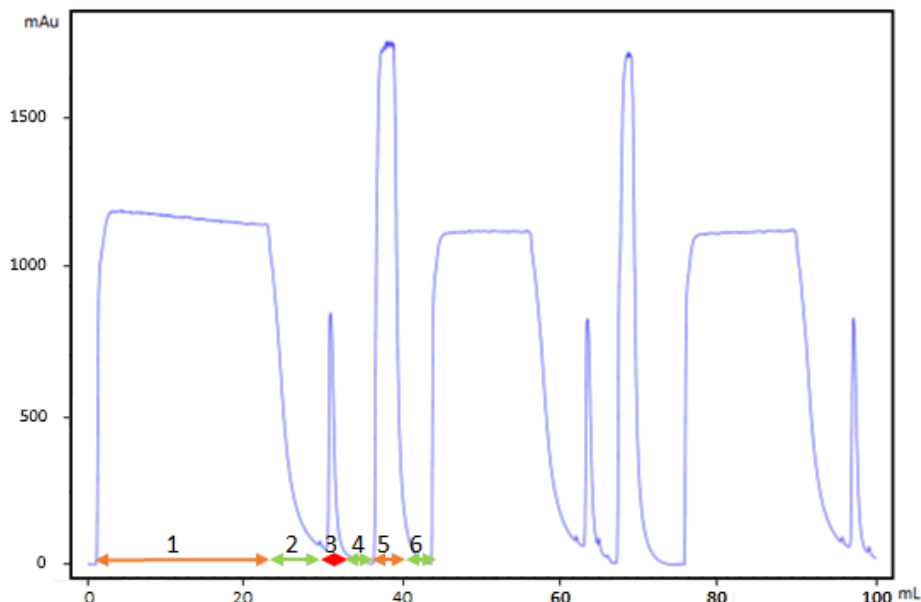


Figura 10.3-4 Cromatograma de purificación Strep-Trap de la VcCDA FL P193C/N273C
 Cromatograma resultante de la purificación por cromatografía de afinidad del doble mutante VcCDA FL P193C/N273C en la que se realizaron tres cargas de columna. Los número indican las etapas de un ciclo de carga/elución: 1. Carga, 2. Lavado, 3. Elución, 4. Lavado, 5. Regeneración con Haba y 6. Lavado.

En la siguiente etapa de purificación se realizó la cromatografía de gel filtración (Figura 10.3-5). En ella se siguen observando 5 fracciones, suponiendo que la número 5 es la fracción monomérica. Llama la atención la disminución del ratio de abundancia de la población correspondiente a la fracción monomérica en comparación con la proteína WT FL.

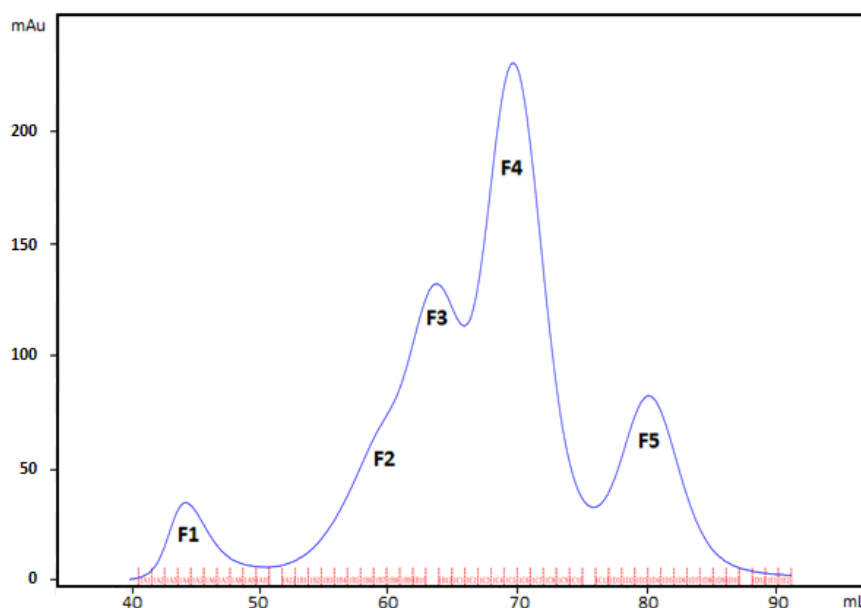


Figura 10.3-5 Cromatograma de GFC de la VcCDA FL P193C/N273C
 Cromatograma obtenido en la cromatografía de gel filtración usando una columna Superdex 200 (16/600). Se muestran cinco fracciones multiméricas dentro de las cuales F5 se corresponde con el monómero.

El pico de la fracción monomérica tiene su máximo próximo a los 80 mL de elución, por lo que usando la Ecuación 3 se calcula un peso molecular de 37,5 kDa, ligeramente inferior a los 46,8 kDa

según la secuencia de la proteína. Esta diferencia no es real tal como se muestra en el gel SDS-PAGE (Figura 10.3-6). En esta imagen se observan resultados equivalentes a los ya mencionados para las otras versiones de esta proteína. Además se observa que las bandas correspondientes a la VcCDA FL P193C/N273C están ligeramente por encima del marcador de 45 kDa como era de esperar. Además se observa una alta pureza del enzima purificado.

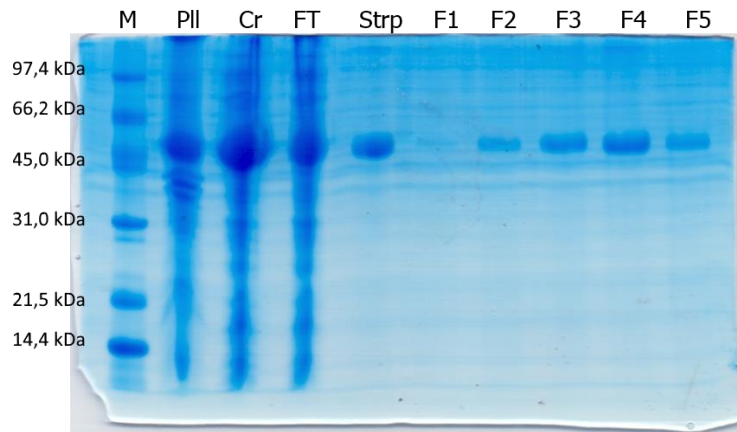


Figura 10.3-6 SDS-PAGE VcCDA FL P193C/N273C

Gel SDS-PAGE de todo el proceso de purificación de la VcCDA FL P193C/N273C. M: Marker Low Range, PII: Pellet de la centrifugación tras el lisado, Cr: crudo, fracción soluble del lisado, FT: Flow through de la columna, Strp: Proteína purificada por la Strep-Trap, F1-F5: fracciones de la 1 a la 5.

Como protocolo ya rutinario se analizó el perfil de actividad de las diferentes fracciones usando el sustrato inespecífico AcOMU. En la Figura 10.3-7 se observa como la fracción monomérica es la más activa, mientras que los otros oligómero presentan una muy baja actividad desacetilasa.

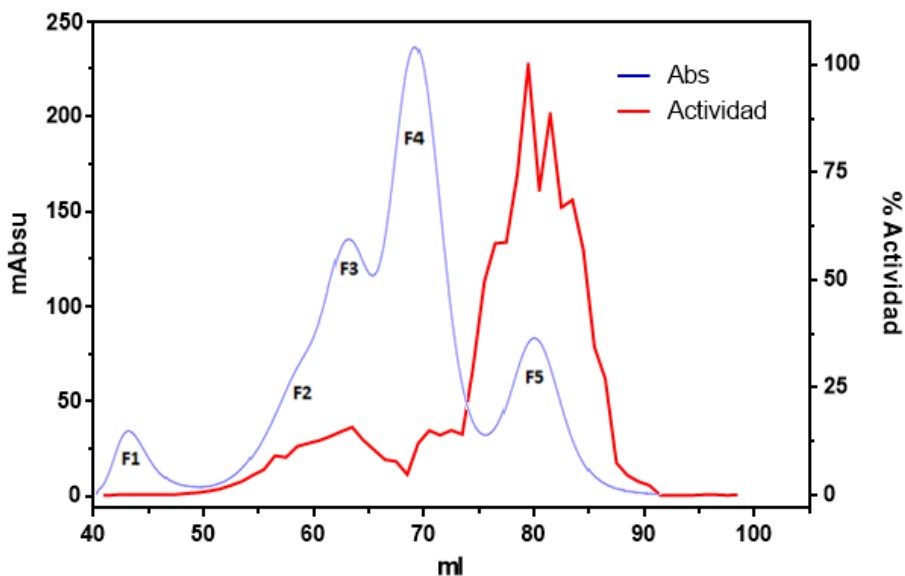


Figura 10.3-7 Perfil de elución GFC de VcCDA CD vs AcOMU del doble mutante

Perfil de actividad de las fracciones sobre el sustrato artificial AcOMU superpuesto al perfil de elución de la cromatografía de gel filtración. Se observa que la fracción más activa es la monomérica.

El rendimiento de todo el protocolo de purificación da como resultado un promedio de 3,23 mg/L utilizando los datos de dos purificaciones. Este valor se sitúa por debajo de la mitad del valor obtenido para la VcCDA WT FL, 7,14 mg/L de promedio.

10.3.1.2. Comprobación de la formación del puente disulfuro C193-C273

Para comprobar el correcto establecimiento del nuevo puente disulfuro se procedió con la titulación de cisteínas libres. Las cisteínas que no se encuentran formando un puente disulfuro exponen un grupo tiol, cuya reactividad distintiva permite su cuantificación.

Para la cuantificación de grupos tiol en el enzima se utilizó el método de Ellman (Ellman, 1959; Riener, Kada, & Gruber, 2002). En este método, el reactivo de Ellman, ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico), o DTNB, reacciona con grupos tiol libres formando un puente disulfuro mixto entre la molécula que contenía el grupo tiol y un TNB. El TNB liberado al medio acuoso se ioniza a TNB^{2-} el cual muestra un color amarillo que puede ser seguido por su incremento en absorbancia a 412nm (Figura 10.3-8).

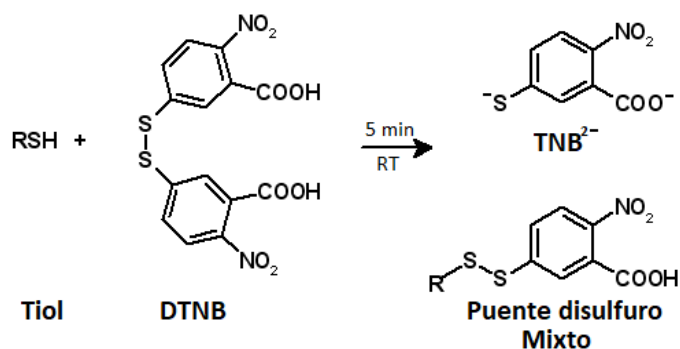


Figura 10.3-8 Mecanismo del reactivo de Ellman: DTNB

Esquema de la reacción que se produce en el método de Ellman. El Puente disulfuro se rompe en presencia de un tiol liberando 2-nitro-5-tiobenzoato (TNB) que al ionizarse en agua adquiere un color amarillo.

Para poder realizar la titulación en muestras enzimáticas primero se realiza una recta patrón en la que se utiliza hidrocloreto de L-cisteína. La recta de calibración se muestra en la Figura 10.3-9.

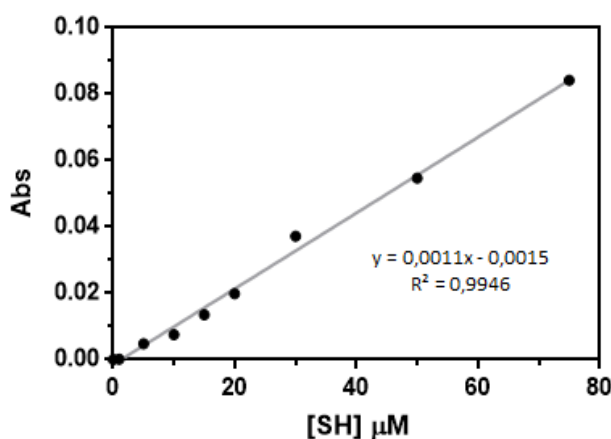


Figura 10.3-9 Recta patrón obtenida mediante el método de Ellman para la titulación de cisteínas libres

Recta patrón en la que se representa la absorbancia a 412nm de una serie de muestras de concentración conocida de hidrocloreto de L-cisteína sometidas al método de Ellman. La recta obtenida es $y=0,0011x-0,0015$ con un $R^2=0,9946$.

Cuando se aplica esta metodología a muestras de enzimas correspondientes a la VcCDA WT FL y la VcCDA FL P193C/N273C se obtienen los valores que aparece en la Tabla 10.3-2. En estos valores se observa que no existen cisteínas libres debido a que el ratio de grupos tiol por enzima es próximo a 0.

Proteína	[Proteína] μM	Abs 412nm	[SH] μM	Promedio [SH] μM	[SH]/[Proteína]
VcCDA WT FL	59,13	0,0067 0,0053	7,21 5,99	6,60 \pm 0,86	0,11
VcCDA FL P193C/N273C	14,29	0,0005 0,0003	1,80 1,63	1,72 \pm 0,12	0,12

Tabla 10.3-2 Resultados de la titulación de cisteínas para la VcCDA FL y P193C/N273C

Tabla resumen con los resultados obtenidos al someter la proteína VcCDA WT FL y la VcCDA FL P193C/N273C al método de Ellman para la titulación de cisteínas libres. Los resultados indican que no existen cisteínas libres.

Estos resultados, junto con el hecho de que el enzima es funcional (ver más adelante), indica que se ha formado el nuevo puente disulfuro P193C-N273C y que no se ha perturbado la estructura de puentes disulfuro nativos del enzima.

10.3.1.3. Caracterización cinética de la VcCDA FL P193C/N273C

Una vez caracterizados diferentes aspectos del enzima se procedió a la caracterización de sus capacidades catalíticas. Al igual que con los otros constructos se realiza una exploración de la actividad del enzima realizando una recta patrón de enzima con los sustratos de referencia DP2 y DP4. En este experimento se observó que el enzima es activo sobre oligosacáridos de quitina y que el producto formado es el monodesacetilado.

Este enzima se caracterizó utilizando los mismos sustratos (DP2, DP3, DP4 y DP5) y el mismo protocolo utilizado con las otras versiones del enzima previamente descritas.

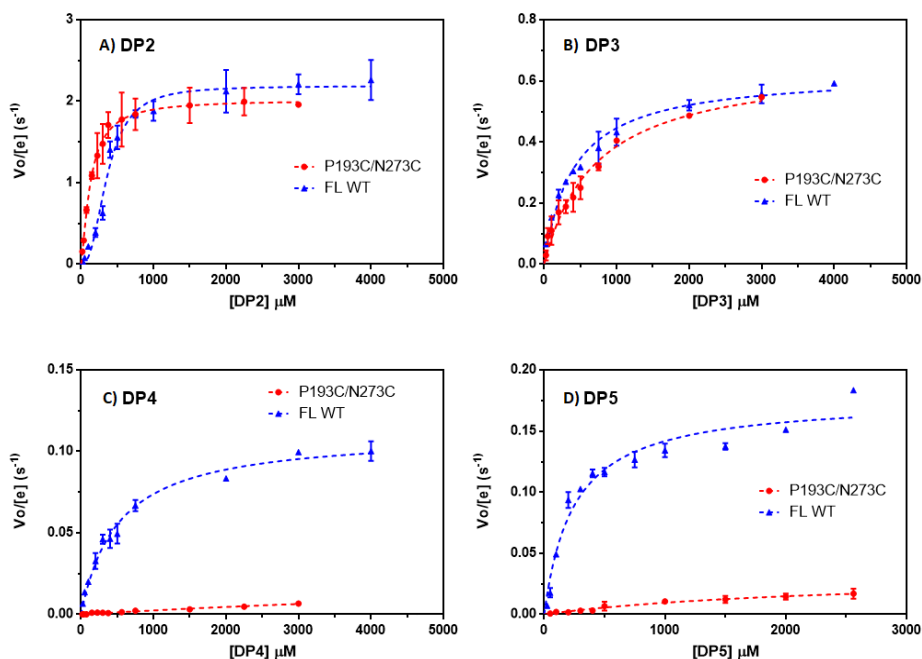


Figura 10.3-10 Caracterización cinética de VcCDA FL P193C/N273C comparada con WT FL

Caracterización de los parámetros cinéticos utilizando la fracción monomérica de VcCDA FL P193C/N273C (en rojo) comparada con la proteína WT FL (en azul) utilizando como sustrato los quitooligosacáridos DP2 (A), DP3 (B), DP4 (C) y DP5 (D). Todos los ensayos se producen en tampón Tris 50 mM pH 8,5 NaCl 300 mM y a una temperatura de 37°C.

En la Figura 10.3-10 se muestra la representación gráfica de las cinéticas enzimáticas realizadas para cada sustrato. En los diferentes apartados de la figura ya se observa un comportamiento muy diferenciado de la proteína que presenta el puente disulfuro y la proteína original. Para los sustratos DP2 y DP3 el comportamiento de los dos enzimas es prácticamente idéntico. Por otro lado, con DP4 y DP5 se observa que el enzima con el puente disulfuro es mucho menos activo.

En la Tabla 10.3-3 se observan los parámetros cinéticos obtenidos para la VcCDA FL P193C/N273C. Al analizar los valores de k_{cat} se pone de manifiesto lo mencionado a partir del análisis visual de las gráficas. Los valores de este parámetro para DP2 y DP3 varían menos del 10% del valor obtenido para la proteína WT. Esto es debido a que estos dos sustratos no necesitan los subsitios adicionales que proporcionaría el movimiento del *loop* 5. Además parece que el comportamiento cooperativo con DP2 se ha perdido, ya que el valor del índice de Hill se reduce a 1,36. En el otro extremo, con DP4 y DP5 como sustratos, la actividad se reduce drásticamente, no alcanzándose saturación del enzima, por lo que no pueden determinarse los valores individuales de k_{cat} y K_M . Sin embargo los valores de k_{cat}/K_M ejemplifican claramente que el enzima ha perdido la capacidad de catalizar estos compuestos.

En base a estos resultados se concluye que se ha conseguido bloquear el *loop* 5, y que este hecho hace que los subsitios necesarios para el acomodamiento de sustratos largos dejan de ser accesibles. En definitiva se ha conseguido generar una enzima en la que se ha modificado la especificidad por sustratos mediante la ingeniería de *loops*. Esta nueva versión es un enzima altamente específico para oligómeros DP2 o DP3.

Sustrato	Constructo	k_{cat} (s^{-1})	K_M (mM)	Índice de Hill	k_{cat}/K_M ($M^{-1}\cdot s^{-1}$)
(GlcNAc) ₂	WT FL	2,2 ± 0,08	0,36 ± 0,02	2,45	6,1 · 10 ³
	P193C/N273C	2,02 ± 0,07	0,13 ± 0,01	1,36	1,5 · 10 ⁴
(GlcNAc) ₃	WT FL	0,63 ± 0,02	0,41 ± 0,03		1,5 · 10 ³
	P193C/N273C	0,66 ± 0,05	0,71 ± 0,11		9,3 · 10 ²
(GlcNAc) ₄	WT FL	0,11 ± 0,003	0,52 ± 0,05		2,1 · 10 ²
	P193C/N273C	n.d.	> 3		2,1
(GlcNAc) ₅	WT FL	0,18 ± 0,01	0,24 ± 0,03		7,5 · 10 ²
	P193C/N273C	n.d.	> 3		6,4

Tabla 10.3-3 Parámetros cinéticos de la caracterización de VcCDA FL P193C/N273C comparados con los de la VcCDA WT FL

Parámetros cinéticos k_{cat} y K_M obtenidos en la caracterización de la VcCDA FL P193C/N273C. En el caso del sustrato DP2 ya no se observa un comportamiento cooperativo (índice de Hill próximo a 1). Se observa la pérdida de actividad con el incremento del DP del sustrato.

10.3.1.4. Caracterización del patrón de desacetilación de la VcCDA FL P193C/N273C

Una vez caracterizado bioquímica y cinéticamente era necesario secuenciar los productos de este enzima para determinar su patrón de desacetilación.

Con este doble mutante se realizó el mismo ensayo previamente descrito para el dominio catalítico aislado. También se usaron 10 mg de sustrato (en este caso DP2 y DP4) y una concentración de enzima de 2 μ M en el ensayo.

Como resultado se obtuvo que para DP2 solo existe un producto de monodesacetilación y es equivalente al de VcCDA WT FL: AD. Sin embargo para DP4, solo se obtiene una conversión del 48% en producto(s) monodesacetilado, quedando el 52% de producto de partida sin reaccionar tras 48h de incubación debido a la baja actividad del mutante con sustratos largos. Se observan dos patrones de desacetilación: el que se corresponde con la proteína WT en la que se desacetila el segundo residuo desde el extremo no reductor (ADAA) y representa un 78% de todo el producto desacetilado y otro patrón en el que se desacetila el tercer residuo desde el extremo no reductor (AADA) que representa el 22% restante. En ninguno caso se observa presencia de compuestos didesacetilados. La formación de este segundo producto no es fácilmente explicable al no haberse modificado los subsitios negativos que definen el patrón de desacetilación.

10.3.2. Estrategia 2: Eliminación del *loop* 5

En el apartado anterior se comprobó mediante el bloqueo del *loop* 5, que es necesario el movimiento del mismo para la exposición de subsitios positivos. En este apartado se estudiará la segunda estrategia: la eliminación de este *loop*.

La hipótesis de partida de esta estrategia se basa en que la exposición permanente de los subsitios situados hacia el extremo reductor del sustrato conseguirá aumentar la actividad del enzima con sustratos cuyo DP sea mayor que tres.

Se consideró que la mejor opción era realizar la sustitución del *loop* 5 de VcCDA por uno proveniente de una de las desacetilasas previamente cristalizadas y cuya secuencia sea más corta. En la Figura 10.3-11 se muestra el alineamiento del *loop* 5 en diversas desacetilasas. De entre todas ellas se decidió escoger la peptidoglucano desacetilasa de *Bacillus subtilis* o BsPdaA (PDB:1NY1).



Figura 10.3-11 Secuencias del *loop* 5 en diferentes desacetilasas

Alineamiento de la secuencia de *loop* 5 a lo largo de diferentes desacetilasas relevantes de la familia CE4. Destaca el tamaño del *loop* en VcCDA mientras que el de BsPdaA es de los más cortos

La función biológica de la BsPdaA de *Bacillus subtilis* está relacionada con la capacidad germinativa de sus esporas a través de la desacetilación de los residuos de MurNAc del peptidoglucano que forma la pared celular de las mismas (Fukushima, Kitajima, & Sekiguchi, 2005; Gilmore, Bandyopadhyay, Dean, Linnstaedt, & Popham, 2004). Así, es un enzima que no se encuentra en células vegetativas, solo se expresa en estructuras celulares relacionadas con la esporulación (Fukushima et al., 2002). A pesar de que ha sido cristalizada en presencia de N-acetilglucosamina (PDB: 1NY1, Figura 10.3-12), este sustrato no se encuentra en un complejo productivo (D. E. Blair & van Aalten, 2004). Este enzima solo es capaz de desacetilar las unidades de MurNAc de peptidoglucano que previamente ha sido procesado con peptidasas para eliminar la parte peptídica. No es capaz de reconocer como sustrato un péptidoglucano no tratado, quitina soluble, oligómeros de quitina o GlcNAc (Fukushima et al., 2005). Dado que desacetila cada dos residuos MurNAc de la cadena, se supone que su unidad mínima reconocida es un tetrámero y sus productos de desacetilación presentan el siguiente patrón de acetilación: [GlcNAc-MurN-GlcNAc-MurNAc]_n (Fukushima et al., 2005; Gilmore et al., 2004).

En la Figura 10.3-12 se muestra la comparación de las estructuras de la VcCDA y de la BsPdaA. Resulta evidente que a pesar de que los dos centros activos se encuentran decorados con el mismo número de *loops*, los del enzima de *Vibrio cholerae* muestran un tamaño significativamente mayor que los del enzima de *Bacillus subtilis*. Este hecho puede interpretarse a través del *Subsite Capping Model*, la VcCDA es un enzima especializado en la desacetilación de la quitobiosa un sustrato muy pequeño mientras que la BsPdaA está especializada en la desacetilación de polímeros de un alto

DP como es el peptidoglucano de las paredes celulares. En consecuencia la desacetilasa de *Bacillus* tiene un centro activo más disponible y menos bloqueado para que el sustrato polimérico pueda acomodarse en diferentes modos de unión en el centro activo.

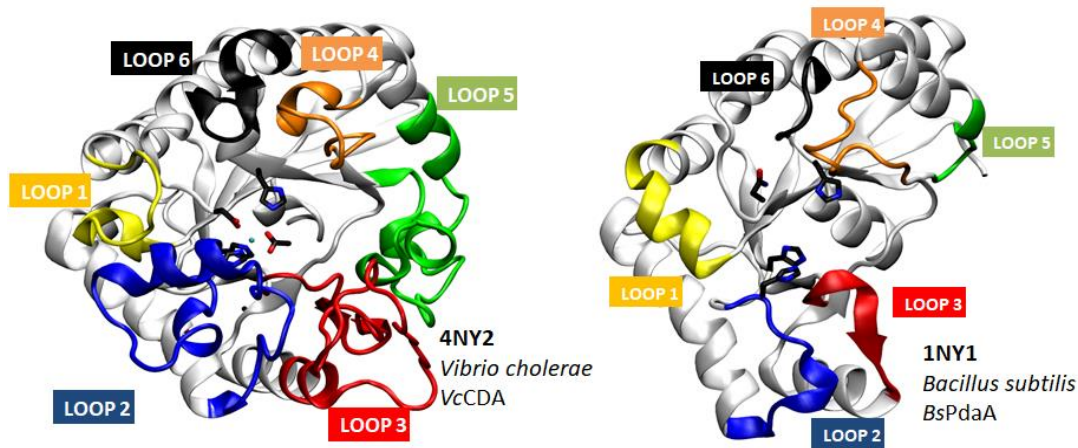


Figura 10.3-12 Loops en VcCDA vs BsPdaA
Comparación de las estructuras tridimensionales de la VcCDA y de la BsPdaA. Destaca la gran diferencia general en el tamaño de los loops siendo más largos en el enzima de *Vibrio cholerae*.

Conforme a lo presentado, la sustitución de un loop 5 adaptado a oligómeros cortos por uno evolutivamente adaptado a polímeros, es la situación ideal para la segunda demostración experimental del *Subsite Capping Model*. En la Figura 10.3-13 se muestran las secuencias a intercambiar entre las BsPdaA y la VcCDA, se tomará desde la Q212 hasta la A217 del enzima de *Bacillus* por la secuencia que abarca desde la Y256 hasta la V290. Esto implica una reducción de 34 aminoácidos a tan solo 6.

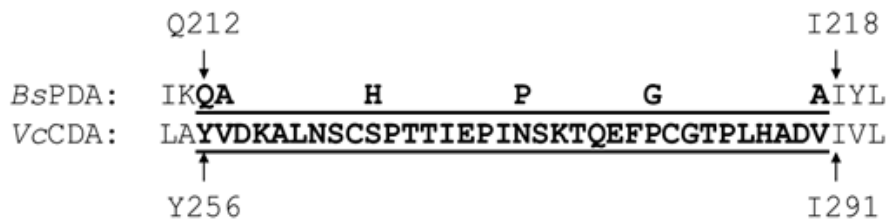


Figura 10.3-13 Secuencias del loop 5 de VcCDA y BsPdaA
Alineamiento e identificación de la secuencia a intercambiar entre BsPdaA y VcCDA. Se produce un intercambio de 34 aminoácidos por 5 de la secuencia de la desacetilasa de *Bacillus*.

Para comprobar si esta quimera sería capaz de liberar los subsitios esperados y acomodar un sustrato como DP4, se creó un modelo bioinformático en el que se realizó *in silico* la sustitución del loop mencionada. En la Figura 10.3-14 se muestra el resultado de esta simulación en el que se compara la estructura de la VcCDA WT y la del modelo de la VcCDA L5-BsPdaA, ambas con el loop 4 en conformación cerrada (la correspondiente al complejo VcCDA-DP2). Se observa claramente la gran diferencia en cuanto a volumen ocupado por el loop 5, además se muestra como, a pesar de que el loop 4 tiene una conformación completamente cerrada, la exposición permanente de los subsitios +1 y +2 permiten la acomodación del tetrámero. Este fenómeno debería traducirse experimentalmente en una capacidad catalítica aumentada a la hora de desacetilar sustratos mayores que DP3.

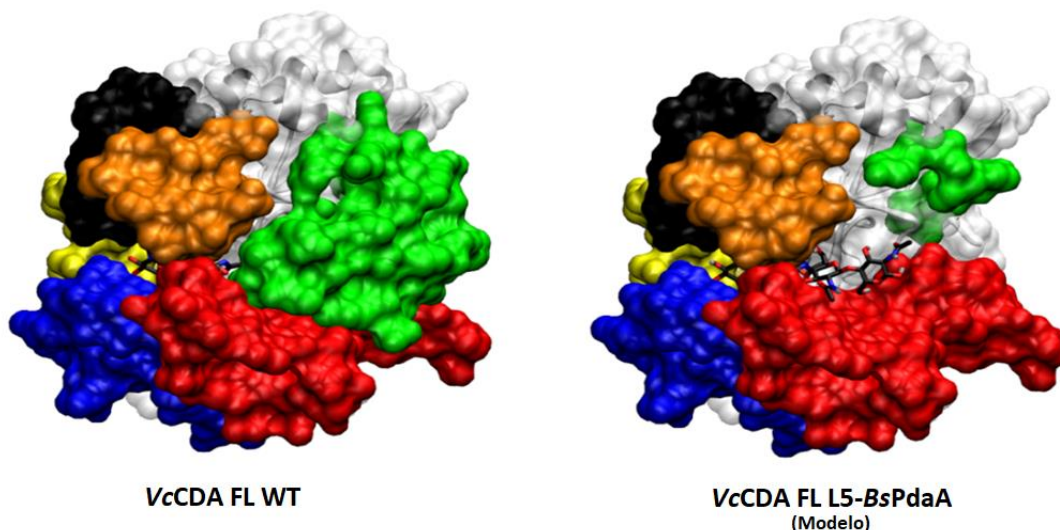


Figura 10.3-14 Modelo de la VcCDA FL L5-BsPdaA

Comparación de la estructura de la VcCDA WT FL (complejo con DP2) y un modelo construido con el intercambio de la *loop* 5 por el de BsPdaA en el que se incluye el sustrato DP4 localizado en el sitio activo. Se observa la apertura de subsitios positivos con los que acomodar sustratos más largos.

Para crear esta quimera, al igual que en el caso anterior del puente disulfuro, se usó como molde la secuencia del constructo pET22b VcCDA WT FL. Tras la construcción de la quimera mediante varias reacciones de PCR en las que se eliminó la secuencia del *loop* de *Vibrio* y se sustituyó por la de *Bacillus*, el ADN plasmídico obtenido tras los protocolos de biología molecular fue secuenciado y confirmado. La estrategia de biología molecular para la construcción de esta quimera se detalla en el apartado 13.1.3 de la sección de *Materiales y métodos*.

10.3.2.1. Expresión y purificación de la VcCDA FL L5-BsPdaA

El peso molecular de la quimera es de 43,7 kDa, mientras que el de la proteína completa es de 46,9 kDa, y el punto isoeléctrico estimado prácticamente no varía (Tabla 10.3-4).

	VcCDA WT FL (pET22b)	VcCDA L5-BsPdaA (pET22b)
Longitud secuencia	419	390
MW (kDa)	46,879	43,653
PI	5,27	5,32
Índice de Inestabilidad	27,31 (estable)	25,38 (estable)
Índice alifático	71,93	71,79
GRAVY (Grand average of hydrophaticity)	-0,492	-0,499

Tabla 10.3-4 Parámetros calculados para la VcCDA L5-BsPdaA

Cuadro resumen de los parámetros calculados a partir de la estructura primaria de las proteínas resultantes de la expresión de los constructos pET22b VcCDA FL, y pET22b VcCDA L5-BsPdaA utilizando la herramienta ProtParam de ExPasy.

Dado que se ha realizado una intervención considerable a nivel estructural, el siguiente paso es la comprobación de la expresión de esta nueva quimera. El primer protocolo testado es el que se usaba con la VcCDA original, es decir, utilizando medio LB suplementado para autoinducción.

Para esta prueba se probaron tres temperaturas: 20°C, 25°C y 30°C. El volumen de cultivo era de 35 ml y se mantuvo en agitación durante 48 h. Se tomaron muestras de 8 ml y fueron centrifugadas, resuspendidas en PBS y lisadas por sonicación.

En la Figura 10.3-15 se muestran los resultados de las fracciones soluble (S) e insoluble (P). En todas las condiciones ensayadas no se observa la presencia de una banda diferenciada de sobreexpresión en la parte soluble. Por el contrario en la fracción insoluble del lisado se observa una gran banda perteneciente al tamaño esperado para la quimera VcCDA-BsPDA.

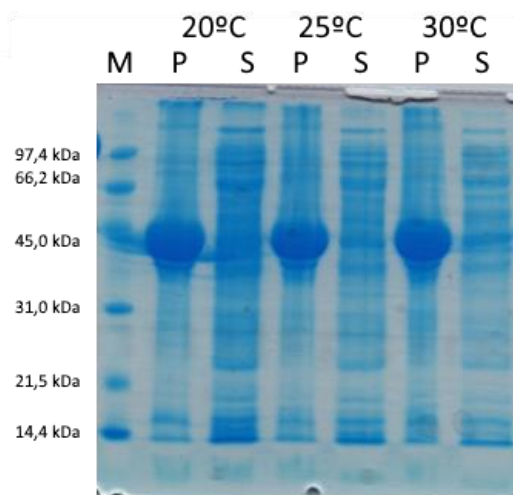


Figura 10.3-15 Prueba de expresión de VcCDA L5-BsPdaA con autoinducción
Imagen del gel SDS-PAGE en el que se analizan la fracción soluble (S) e insoluble (P) de las pruebas de expresión de la VcCDA L5-BsPdaA. El MW teórico es de 43,6 kDa.

La producción de proteínas recombinantes por autoinducción se basa en el alcanzar densidades de cultivos muy elevadas prolongando los tiempos de incubación hasta 48 horas, algo infrecuente en cultivos de *E. coli* en matraz de Erlenmeyer. Es posible que una producción tan intensa de proteína sobreexpresada suponga la formación de agregados de las mismas que se acumulen en la fracción insoluble.

En base a la ineficacia del método de autoinducción para la expresión de la quimera soluble, se realizó un estudio más en profundidad de las condiciones para la producción de esta proteína. Se modificarán tres parámetros: el método de autoinducción se sustituirá por inducción por IPTG, se testeará la aplicación de un choque térmico para inducir la expresión de chaperonas y se comprobarán los niveles de expresión a diferentes espacios temporales tras la inducción.

Todos los cultivos, incluso un control con el plásmido vacío, se incubaron a 37°C, 250 rpm hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0,3. Una vez alcanzada esta densidad óptica el grupo de muestras sometidas a choque térmico se mantuvo a 42°C en un baño de agua. Luego todos los cultivos fueron incubados a 200 rpm y 20°C añadiendo el IPTG necesario para una concentración final de 1 mM.

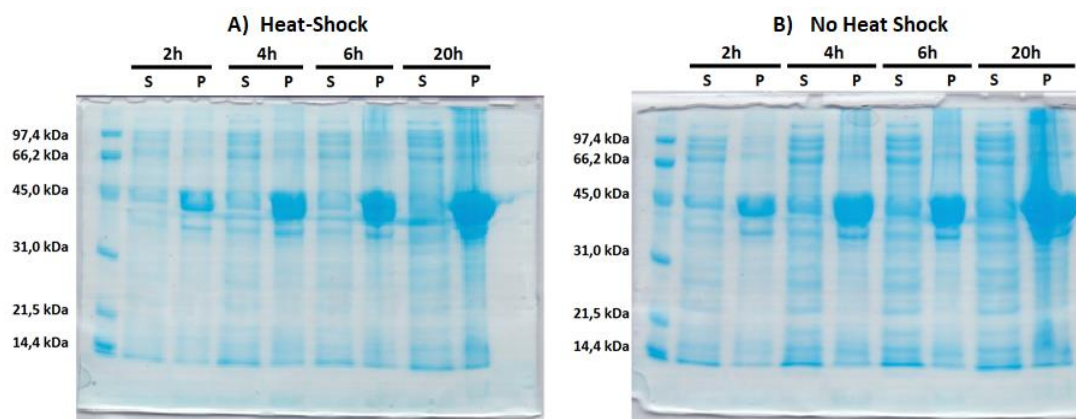


Figura 10.3-16 Prueba de expresión de VcCDA L5-BsPdaA con IPTG y Choque Térmico

Imágenes de los geles SDS-PAGE en los que se analizan las fracciones soluble (S) e insoluble (P) de las pruebas de expresión de la VcCDA L5-BsPdaA utilizando IPTG como inductor en un cultivo sin choque térmico (A) y con choque térmico (B). El MW teórico es de 43,6 kDa.

En la Figura 10.3-16A se muestra el resultado en la expresión de la proteína en un cultivo inducido con IPTG y al que se le ha realizado un protocolo de choque térmico. Se observa que mayoritariamente la proteína se encuentra en la fracción insoluble. Sin embargo, parece detectarse la presencia de una ligera banda a la misma altura en la fracción soluble. Mas es posible que esta sea una proteína propia de *E. coli*. En el caso de la Figura 10.3-16B se muestra el resultado de un cultivo inducido con IPTG en fase exponencial sin haberlo sometido a un choque térmico. Puesto que el tratamiento térmico no incrementa la fracción de proteína soluble, se prescinde de esta etapa en la producción preparativa.

En base a los resultados anteriores se han podido extraer dos conclusiones de relevancia a la hora de establecer un protocolo de expresión y purificación de esta proteína: Es una proteína que de expresarse en forma soluble lo hará con un rendimiento muy bajo y que tiene una alta tendencia a formar cuerpos de inclusión insolubles muy probablemente debido a un plegamiento aberrante.

Conforme a estas observaciones se decidió expresar la proteína en un volumen preparativo mediante un protocolo de inducción por IPTG sin choque térmico: inducción a una OD600 de 0,3 en la cual se inicia la expresión de proteínas con una concentración final de IPTG de 1 mM y esta fase de producción de proteína se mantiene a 20°C durante 6 horas. El protocolo de purificación es idéntico al realizado en los otros constructos ya descritos. En este caso se espera que la alta afinidad que existe entre la *Strep-Tag II* y la estreptotactina de la resina de la columna sea capaz de retener la pequeña fracción de proteína recombinante soluble.

En la Figura 10.3-17 se muestra el resultado de la cromatografía de afinidad en la que se ha cargado el lisado proveniente de un cultivo de 600 mL. Se observa que, efectivamente, al utilizar la destibiotina para eluir lo que se haya retenido en la columna se observa la elución de un pico que muy probablemente sea la VcCDA L5-BsPdaA. Como era de esperar, el área de este pico es considerablemente inferior en comparación con el obtenido para la proteína WT (Figura 10.2-3).

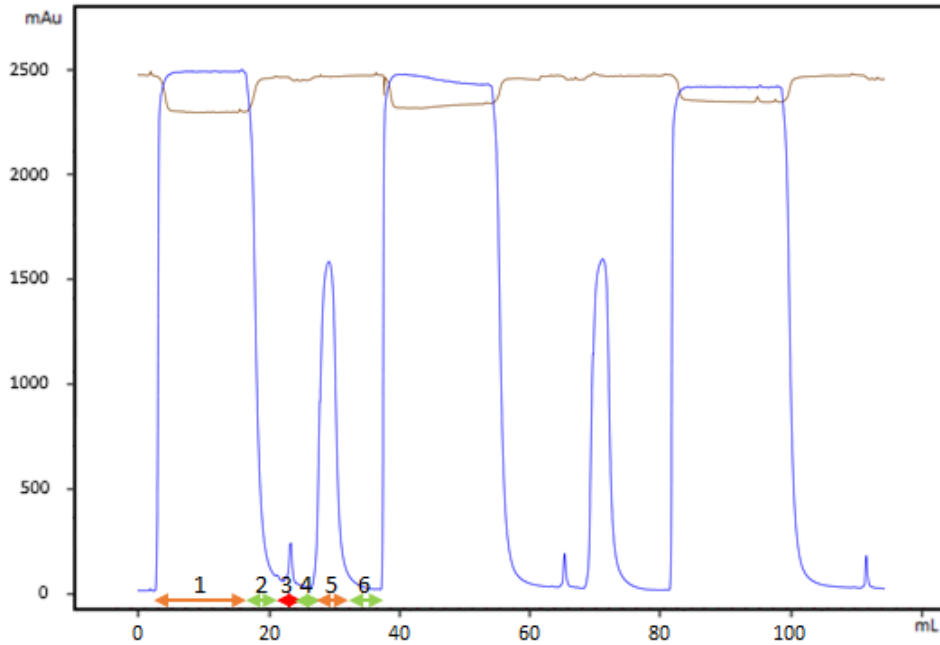


Figura 10.3-17 Cromatograma de purificación Strep-Trap de la VcCDA L5-BsPdaA
 Cromatograma resultante de la purificación por cromatografía de afinidad de la VcCDA en la que se realizaron tres cargas de columna. Los picos de elución muestran un muy bajo rendimiento de expresión de proteína. Los números indican las etapas de un ciclo de carga/elución: 1. Carga, 2. Lavado, 3. Elución, 4. Lavado, 5. Regeneración con HABA y 6. Lavado.

Una vez se ha obtenido la fracción soluble de la proteína se continúa con una cromatografía de gel filtración (Superdex 200) para obtener la fracción monomérica y además comprobar si el perfil de formas oligoméricas es equivalente a los obtenidos hasta ahora.

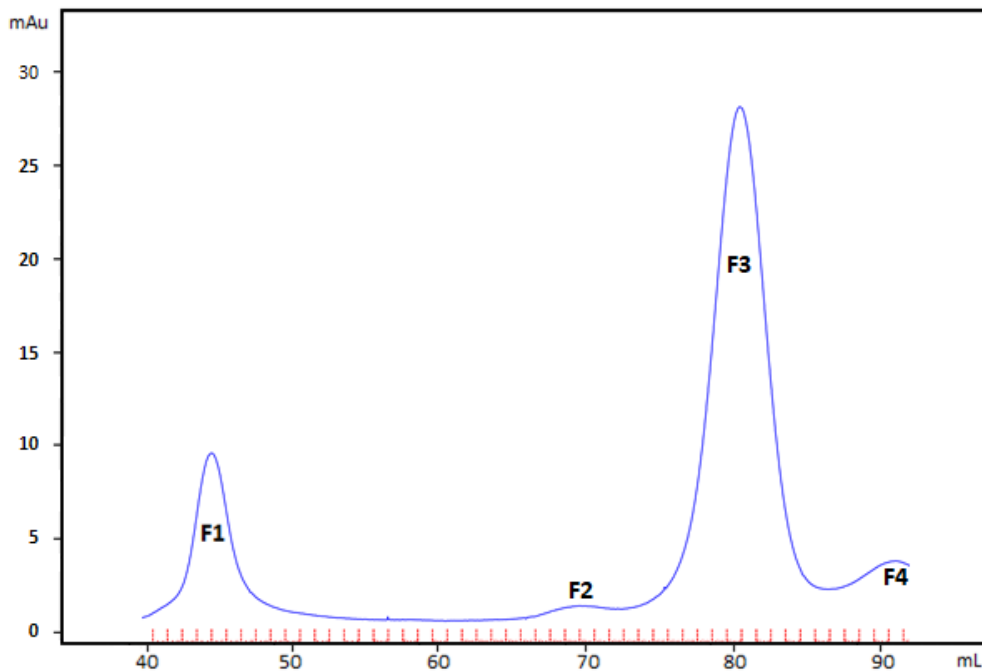


Figura 10.3-18 Cromatograma de GFC de la VcCDA L5-BsPdaA
 Cromatograma obtenido en la cromatografía de gel filtración usando una columna Superdex 200 (16/600). Se muestran 4 fracciones multiméricas dentro de las cuales F3 se corresponde con el monómero y la F4 de naturaleza desconocida.

En la Figura 10.3-18 se muestra el perfil obtenido, en el que solamente se observan 4 fracciones. Además, la F2 y F4 son muy pequeñas y principalmente la F4 se corresponde con un volumen de elución para una proteína más pequeña que el monómero. En conclusión el monómero es la fracción F3, la cual se eluye en un volumen próximo a los 80 mL (un valor idéntico al de las otras proteínas FL).

Para terminar de identificar la proteína se realizó un gel SDS-PAGE en el que se cargaron muestras provenientes de todas las etapas de purificación (Figura 10.3-19). En él se observa que la fracción 3 muestra una masa equivalente a la esperada teóricamente para la VcCDA L5-BsPdaA. Por otro lado no se observan bandas de proteína en las otras fracciones, esto puede ser debido a que la cantidad de proteína es tan baja que no es detectable por este método.

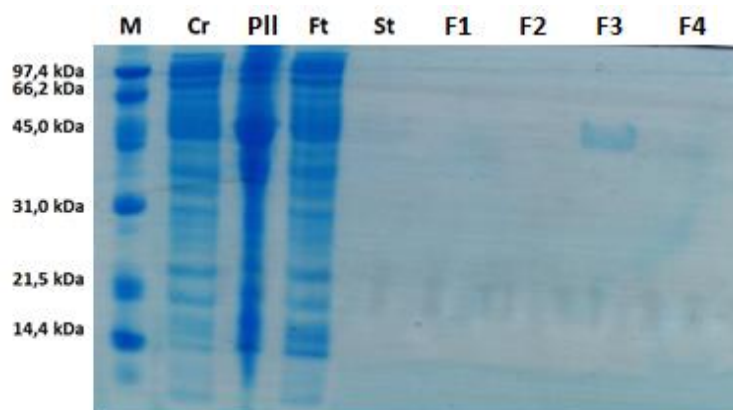


Figura 10.3-19 SDS-PAGE VcCDA L5-BsPdaA

Gel SDS-PAGE de todo el proceso de purificación de la VcCDA L5-BsPdaA. M: Marker Low Range, PII: *Pellet* de la centrifugación tras el lisado, Cr: crudo, fracción soluble del lisado, FT: *Flow through* de la columna, St: Proteína purificada por la *Strep-Trap*, F1-F4: fracciones de la 1 a la 4.

Una vez obtenida la fracción monomérica soluble de la quimera se intentó realizar el perfil de actividad utilizando AcOMU como sustrato, sin embargo fue imposible debido a dos aspectos: la baja concentración de enzima y probablemente la baja actividad de la misma. Así su actividad se comprobará directamente utilizando los quitooligosacáridos como sustrato.

Se unificaron todas las fracciones correspondientes al monómero obteniéndose un rendimiento promedio de 0,2 mg/L a partir de los valores obtenidos en dos purificaciones. Este valor es más de 35 veces inferior al de la proteína VcCDA WT FL. Así es lógico presuponer que esta alteración de la estructura está afectando considerablemente su expresión y plegamiento.

10.3.2.2. Caracterización cinética de la VcCDA FL L5-BsPda

La primera aproximación que se hizo en todas las proteínas previas es la obtención de una recta patrón de enzima para obtener una idea aproximada del comportamiento del enzima con dos sustratos de referencia (DP2 y DP4): si es activa sobre quitooligosacáridos y como es el ratio de actividades aproximado. Por otro lado este experimento nos permite identificar hasta que extensión es capaz de desacetilar los oligómeros. Este experimento es el que se muestra en la Figura 10.3-20.

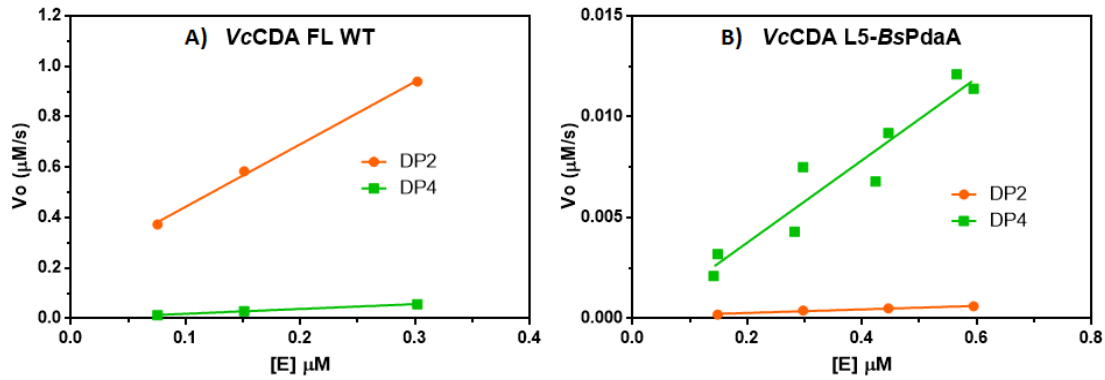


Figura 10.3-20 Comparación de velocidades específicas entre VcCDA WT FL y VcCDA L5-BsPdaA
 Caracterización de las velocidades específicas de los enzimas VcCDA WT FL (A) y VcCDA L5-BsPdaA (B). Destaca la inversión de la preferencia de sustrato entre estos dos enzimas. Rectas obtenidas para VcCDA WT FL (A) DP2: $y=2,482x+0,195$ $R^2=0,998$; DP4 $y=0,191x$ $R^2=0,998$; y VcCDA L5-BsPdaA (B) DP2 $y=8,747 \cdot 10^{-4}+9,99 \cdot 10^{-5}$ $R^2=0,966$; DP4 $y=2,04 \cdot 10^{-2}x-3,22 \cdot 10^{-4}$ $R^2=0,914$.

Como se observa gráficamente esta quimera, además de ser expresada en mucha menor cantidad, también es significativamente menos activa si atendemos a la escala de v_0 mostrada en los ejes. En la Tabla 10.3-5 se muestran los valores de las $v_0/[E]$ tanto para la proteína VcCDA WT FL como para la quimera con BsPdaA. Como se observa de los valores para cada sustrato, la actividad se ha reducido en varios órdenes de magnitud mostrando solo un 0,04% de la actividad de la proteína original para DP2 y un 10,7% para DP4. Esta reducción no está afectando por igual a los dos sustratos, algo que se manifiesta más claramente cuando nos centramos en los ratios DP2/DP4 y DP4/DP2. Cuando analizamos el ratio DP2/DP4 se observa inequívocamente que el enzima WT presenta una preferencia clara hacia DP2, más de 10 veces más activa sobre DP2 que sobre DP4. Por el contrario el nuevo enzima muestra un ratio DP4/DP2 con un valor de 23,3 lo que indica que es más de 20 veces más activa sobre DP4 que sobre DP2.

	DP2 ($v_0/[E]$)	DP4 ($v_0/[E]$)	DP2/DP4	DP4/DP2
VcCDA WT FL	$2,482 \text{ s}^{-1}$	$0,191 \text{ s}^{-1}$	12,99	0,08
VcCDA L5-BsPdaA	$8,747 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$	$2,04 \cdot 10^{-2}$	0,04	23,3
% L5/WT	0,04%	10,7%		

Tabla 10.3-5 Velocidades específicas para VcCDA WT FL y VcCDA L5-BsPdaA
 Cuadro resumen con las velocidades específicas para VcCDA WT FL y para la VcCDA L5-BsPdaA y los ratios obtenidos comparando sustratos y constructos. Se demuestra la inversión de la preferencia de sustratos en la quimera.

Efectivamente se ha invertido la preferencia de sustratos del enzima, pero los valores absolutos de $v_0/[E]$ también muestran que esta inversión conlleva un coste de eficiencia catalítica muy elevado. Debido a la baja capacidad catalítica del nuevo enzima y su bajo rendimiento de expresión no ha sido posible realizar el estudio cinético completo ni la caracterización de su patrón de desacetilación. Dado que solo se observa producto monodesacetilado, se interpreta que el patrón permanece invariable.

En conclusión, el reducir el tamaño del *loop* 5 de 34 aminoácidos a 6, parece haber expuesto los subsitios positivos que antes estaban limitados por el bloqueo de *loop* 5. Este cambio se traduce en una inversión de la preferencia de sustratos en función de su DP. La quimera VcCDA L5-BsPdaA es 23 más activa sobre DP4 que sobre DP2. La gran intervención estructural parece haberse

tomado un gran peaje estructural reduciendo significativamente el nivel de expresión del enzima y su actividad.

10.3.3. Conclusiones en la demostración del *Subsite Capping Model*

Se han realizado dos experimentos cuyo objetivo final era dar soporte experimental al enunciado del *subsite capping model*. La base de estos dos experimentos básicamente era determinar como los *loops* que rodean el sitio activo de las desacetilasa de la familia CE4 influyen en la preferencia de sustratos mediante el bloqueo de subsitios. Este trabajo se realizó sobre la desacetilasa que se definió como modelo debido a ser la única con complejos enzima sustrato cristalizados: la VcCDA.

Las dos estrategias de modificación del enzima a pesar de ser completamente opuestas han respondido como era esperado según las hipótesis de partida.

El bloqueo del *loop* 5 mediante la creación un puente disulfuro ha reducido significativamente la actividad del enzima en sustratos que necesitan los subsitios positivos (en especial el +2) mientras que aquellos sustratos que no lo necesitan no se ven afectados (DP2 y DP3). Esto demuestra que el *loop* 5 es móvil y su reestructuración en posición abierta es necesaria para la acomodación de sustratos largos. Este hecho justifica por qué este enzima en su versión WT prefiere sustratos cortos que no necesitan el desplazamiento de este bucle.

La segunda estrategia buscaba exponer continuamente los subsitios positivos que controla el desplazamiento del *loop* 5. Este cambio debería traducirse en un incremento considerable de la actividad de sustratos cuyo DP es mayor que 3. Esta modificación se realizó mediante la construcción de una quimera con un *loop* 5 mínimo, el de la BsPdaA. Los resultados experimentales indican que se ha invertido la preferencia de sustrato, este hecho soporta el *Subsite Capping Model*, ya que el incremento de subsitios de unión disponibles permite que los sustratos se puedan unir mejor al centro activo y establecer un número mayor de interacciones. Por otro lado esta modificación ha demostrado ser muy invasiva y se ha traducido en un bajo nivel de expresión y actividad en general.

Estos dos resultados además de demostrar la hipótesis del *Subsite Capping Model* establecen las bases para la futura ingeniería de este enzima. Se abren las puertas a una segunda generación de mutantes en los que una ingeniería fina del *loop* 5 permitirá controlar la preferencia de sustratos intentando no suponer un hándicap ni estructural ni catalítico.

10.4. Segunda generación: Ingeniería de la especificidad por sustratos de la VcCDA

El *Subsite Capping Model*, cuya demostración experimental ha sido proporcionada en el apartado previo, no es solo una teoría para explicar el patrón de desacetilación de los enzimas de la familia CE4. Su enunciado también asienta las bases para la ingeniería de la especificidad por sustratos de estos mismos enzimas.

En esta sección del trabajo se realizará la ingeniería del *loop* 5 de la VcCDA con el objetivo de incrementar su actividad con sustratos oligoméricos largos sin afectar drásticamente a la estructura del enzima y, por lo tanto, su estabilidad y capacidad de ser expresada en *E. coli*.

Para crear esta segunda generación se realizó un análisis minucioso de la estructura del *loop*, así como una evaluación en detalle de las posibles causas de la severa reducción de la actividad global del enzima en la estrategia de eliminar el *loop* 5 usada en la demostración del *Subsite Capping Model* para proponer nuevas estrategias de ingeniería “fina”.

La evaluación de la estructura de la quimera VcCDA L5-BsPdaA, con la nueva perspectiva de los resultados obtenidos, nos indica que la eliminación de un número tan elevado de aminoácidos de la secuencia es demasiado extensa. Con esta observación en mente se buscó delimitar la parte de la secuencia del *loop* 5 a intervenir en esta segunda fase. Como se comentó en la estrategia de bloqueo del *loop* 5, este elemento estructural contiene un puente disulfuro nativo entre las cisteínas C264 y C281. En consecuencia se decidió tomar estos dos residuos como los elementos limitantes de la zona de trabajo. Esta decisión se fundamentó en varias observaciones:

- a) Función estabilizadora del puente disulfuro: Se considera que esta interacción covalente dentro del *loop* puede servir como una especie de cortafuegos estructural que permita que la gran mayoría de intervenciones en la zona delimitada por las cisteínas no influyan más allá del puente disulfuro ya que las distancias en este punto se mantendrán y el plegamiento del núcleo y demás elementos estructurales no se vean afectados
- b) Definición de la zona apical del *loop*: la secuencia que se encuentra entre las dos cisteínas se corresponde con la parte de la estructura que realmente bloquea los subsitios positivos. Toda alteración que no sea dentro de esta porción de secuencia puede, además de no tener un efecto positivo, comprometer la integridad estructural del enzima.

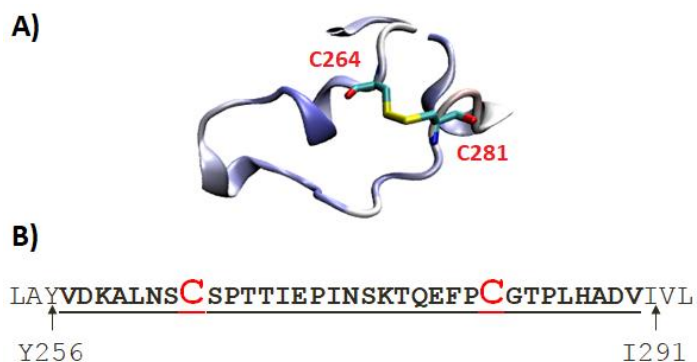


Figura 10.4-1 Delimitación del loop 5 para la segunda generación de mutantes

A) Representación de la estructura del loop 5 en el que se muestra la zona delimitada por el puente disulfuro C264-C281. B) Secuencia del loop 5 en la que se resaltan las cisteínas involucradas en el puente disulfuro y la secuencia entre ellas.

Adicionalmente y dado que el loop 5 se demostró que es móvil, se estudió la flexibilidad de los diferentes loops en la estructura cristalizada de la VcCDA. Para analizar este factor se investigó la distribución del β -Factor estructural a lo largo de la secuencia de esta desacetilasa. En general este parámetro mide la dispersión de los átomos desde las coordenadas promedio de estos en una estructura cristalográfica. Cuanto mayor sea el valor del β -Factor mayor es la dispersión y por lo tanto más flexible es esa zona de la estructura de la proteína en cuestión (Trueblood et al., 1996). Cabe mencionar que esta interpretación se debe hacer con cautela, ya que las condiciones de cristalización de una proteína no representan al 100% el estado del enzima en disolución.

En la Figura 10.4-2 se muestra la estructura de la VcCDA coloreada en función del β -factor cristalográfico (pdb 4NY2). Se observa que todo el núcleo conservado (la parte de la secuencia que no incluye los loops) muestra un color azul generalizado (bajo β -factor), algo de esperar ya que en esta zona no se esperan movimientos significativos a nivel estructural. Al contrario, el loop 4 es el que muestra la tonalidad roja más intensa (alto β -factor). Esto se debe a que este loop es dinámico y es el que se cierra tras la inclusión del sustrato en el sitio activo para generar un ambiente catalítico propicio. Llama la atención, que de los loops más próximos a los subsitios positivos el 3 presenta una tonalidad claramente roja, mientras que el loop 5 se muestra con una tonalidad más azulada. Esta comparación nos indica que el loop 5 es aparentemente más rígido, de ahí que la eficiencia a la hora de desacetilar sustrato como DP4 este significativamente penalizada en comparación con DP2 que no necesita el desplazamiento de este loop.

De acuerdo a los criterios definidos y a las observaciones realizadas sobre el loop 5 se definieron una serie de estrategias a la hora de afrontar la ingeniería de este loop. Estas estrategias se resumen en tres enfoques:

- a) Eliminación del loop 5 hasta el puente disulfuro
- b) Incremento de la flexibilidad del loop 5
- c) Reducción del tamaño del loop 5 eliminando motivos estructurales concretos

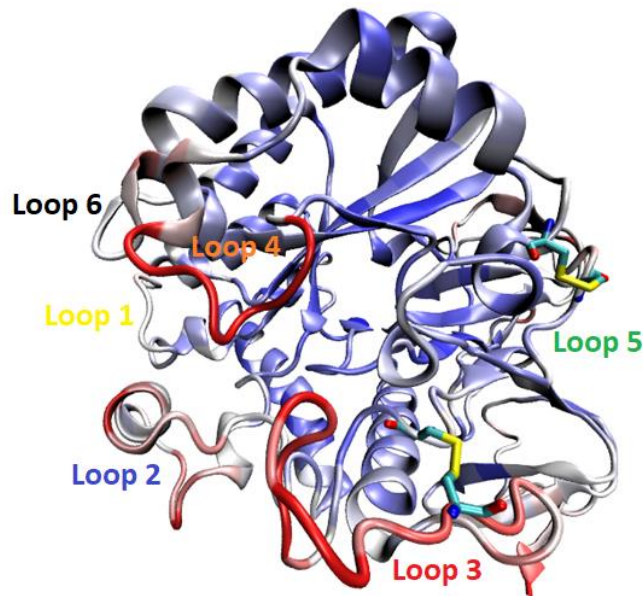


Figura 10.4-2 β -factor en la estructura de la VcCDA
Estructura de la VcCDA representada en base a los diferentes valores del β -factor a lo largo de su secuencia.
Coloración en escala gradual: azul, valores mínimos – Rojo valores máximos. Código de acceso pdb 4NY2

En la primera estrategia (Figura 10.4-3), se persigue el mismo objetivo que en la quimera VcCDA L5-BsPdaA: liberar permanentemente los subsitios positivos. En este caso la intervención es más comedida ya que en este caso el puente disulfuro nativo será el límite. Esta mutación tendrá como resultado el eliminar una secuencia de 18 aminoácidos (cisteínas incluidas) y sustituirlo por la secuencia AGA. De este modo, este tripéptido adoptará la función del puente disulfuro a la vez que reduce sensiblemente el tamaño del *loop* 5 liberando los subsitios positivos. En la naturaleza existen puentes disulfuro con cisteínas que se encuentran tan solo a dos aminoácidos de distancia (...CXXC...) por lo que esta sustitución por un elemento mínimo tiene una gran probabilidad de éxito de mantener la estructura que precede y sucede al *loop* 5 (Ogawa et al., 2007).

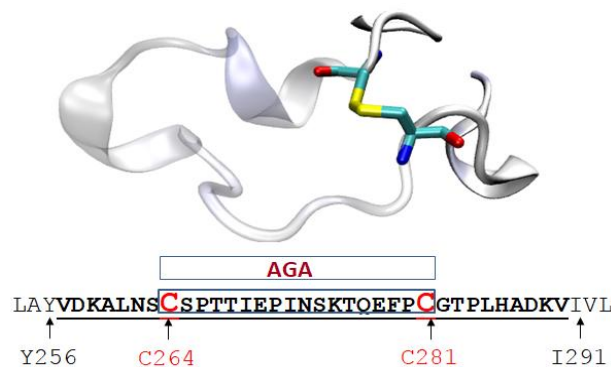


Figura 10.4-3 Eliminación del *loop* 5: AGA
Resumen de la primera estrategia de ingeniería del *loop* 5: Eliminación completa del *loop* 5. Se elimina por completo el *loop* hasta las cisteínas (estas incluidas) sustituyendo toda la secuencia por AGA.

En la segunda estrategia se busca incrementar la flexibilidad del *loop* 5. El β -factor nos mostró que el *loop* 5 presenta una rigidez superior a la de otros *loops*. Al analizar en detalle la estructura y secuencia de esta zona de la proteína se observó la presencia de tres prolina muy próximas entre ellas en la secuencia delimitada entre las cisteínas del puente disulfuro (Figura 10.4-4). Debido a la peculiar cadena lateral de este aminoácido, formando un anillo con el propio *backbone*, estas

son responsables de limitar en gran magnitud la capacidad de rotación de los enlaces en los que está involucrado. Esta limitación se traduce en una rigidez que se transmite a la estructura en la que se encuentren. Para aumentar la movilidad del *loop* se propuso la mutación de estos tres residuos a glicina (P266G, P271G y P280G). A diferencia de las prolinas, las glicinas no presentan ningún tipo de cadena lateral. Este hecho permitirá que el *loop* sea flexible, lo cual puede traducirse en que el desplazamiento del *loop* 5 sea más eficiente y la acomodación de sustratos largos en los subsitios se vea favorecida, o que al incrementar la flexibilidad el *loop* 5 cambie su configuración y adopte una conformación permanentemente abierta en la que los subsitios hacia el extremo reductor siempre se muestren disponibles.

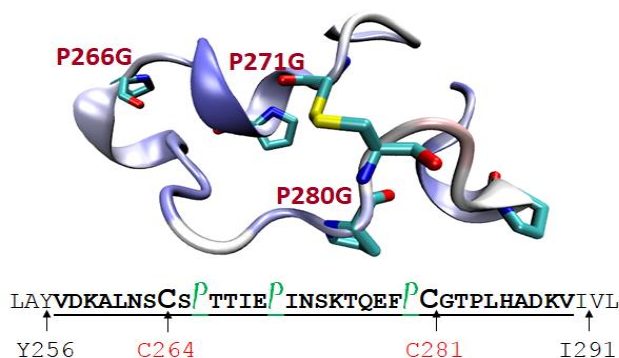


Figura 10.4-4 Incremento de flexibilidad P → G

Resumen de la segunda estrategia de ingeniería del *loop* 5: Incremento de la flexibilidad del *loop* 5. Se mutan las tres prolinas por glicinas, un tipo de aminoácido que aporta más flexibilidad al *backbone* de una proteína.

La última estrategia supone una reducción parcial de la secuencia del *loop* 5 mediante la eliminación de motivos estructurales que se encuentran dentro de la secuencia previamente delimitada. En la Figura 10.4-5 se muestra que entre la C264 y la C281 se encuentran dos hélices: la hélice 1 (S265-T268) y hélice 2 (P271-T276). Estas dos estructuras secundarias de plegamiento del enzima se localizan específicamente sobre los subsitios +1 y +2, en particular, la hélice 2 se sitúa en el extremo más distante del *loop* 5. Con la eliminación de estas dos estructuras se espera que los subsitios se liberen. Esta modificación puede interpretarse como una versión más comedida de la primera estrategia ya que el objetivo es reducir el tamaño del *loop* 5 pero sin eliminar por completo todos los aminoácidos

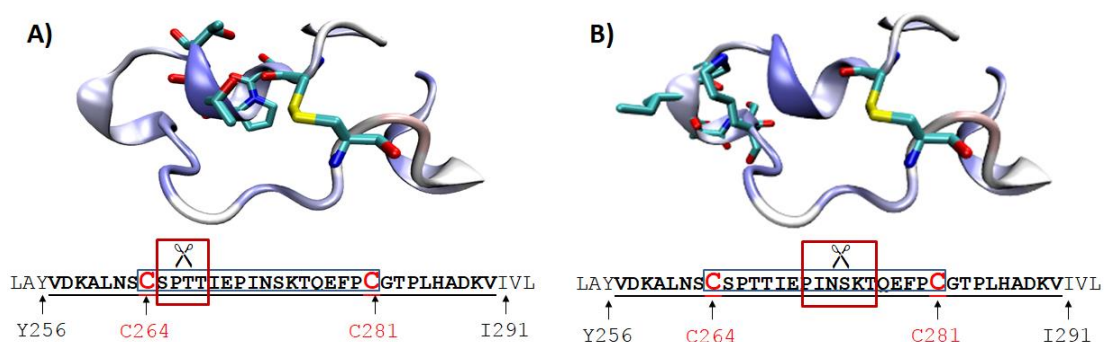


Figura 10.4-5 Eliminación de motivos estructurales: ΔHélice1 y ΔHélice2

Resumen de la tercera estrategia de ingeniería del *loop* 5: eliminación de motivos estructurales del *loop* 5. Se reduce parcialmente el tamaño del *loop* 5 mediante: A) la eliminación de la hélice 1 (S265-T268) y B) la eliminación de la hélice 2 (P271-T276).

En este caso para realizar todas estas modificaciones se utilizó la secuencia de ADN de la VcCDA CD. Este hecho se debe a que el dominio catalítico aislado es una versión más compacta del enzima

y además mostró ser ligeramente superior al catalizar la desacetilación de DP4 y DP5 (Tabla 10.2-4). Como en este caso se busca la mejora de la VcCDA como biocatalizador este constructo se erige como la mejor opción de partida.

Para la obtención de estos nuevos constructos se aplicó una versión modificada del protocolo de mutagénesis descrito por Lee et al (J. Lee, Shin, Ryu, Kim, & Ryu, 2010). En este método se divide el gen de la VcCDA CD en dos partes en las que se ha eliminado la secuencia del *loop* 5. Mediante una serie de PCRs se incluyen las secuencias modificadas como un casete cuyas extremos solapantes con la secuencias de los dos fragmentos previos permite la reconstrucción del gen completo. La estrategia de biología molecular para la construcción de estos mutantes se detalla en el apartado 13.1.4 de la sección de *Materiales y métodos*. Una vez obtenidos todos los constructos y comprobada su identidad por secuenciación se iniciaron los experimentos de expresión y caracterización bioquímica.

10.4.1. Expresión y purificación de los mutantes de segunda generación

La primera aproximación previa a la expresión preparativa de los mutantes fue el estudio de ciertos parámetros teóricos basado en la secuencia aminoacídicas. Estos valores se resumen en la Tabla 10.4-1, en la que se observa que AGA es el mutante de menor peso molecular, ya que es al que se le ha eliminado una mayor porción del *loop* y que todas son proteínas estables, siendo el propio AGA la que muestra una peor perspectiva de este índice.

	VcCDA CD	AGA	P→G	ΔHélice 1	ΔHélice 2
Longitud secuencia	324	309	324	320	318
MW (kDa)	35,905	34,127	35,784	35,518	35,264
PI	5,07	5,12	5,07	5,07	5,00
Índice de Inestabilidad	25,91 (estable)	21,13 (estable)	23,07 (estable)	24,74 (estable)	26,45 (estable)
Índice alifático	71,70	73,3	71,70	72,59	71,82
GRAVY (Grand average of hydropathicity)	-0,432	-0,411	-0,421	-0,425	-0,421

Tabla 10.4-1 Parámetros calculados para los constructos de segunda generación

Cuadro resumen de los parámetros calculados a partir de la estructura primaria de las proteínas resultantes de la expresión de los constructos obtenidos según las estrategias definidas en la ingeniería del *loop* 5.

Dado que la creación de la quimera VcCDA L5-BsPdaA tuvo un gran impacto en el nivel de expresión de la proteína, y ya que algunos de los nuevos mutantes también implican la remoción de una extensión considerable de la secuencia del *loop* 5, se realizó un estudio exploratorio sobre la expresión de estos constructos en *E.coli* BL21 (DE3) star. En este caso se procedió a utilizar el medio de autoinducción siguiendo el protocolo aplicado para la proteína original: 48h de incubación a 25°C y agitación. En estas pruebas se aplicó la metodología previamente presentada (y recogida en detalle en el apartado de material y métodos) en la que se toman alícuotas tras la incubación las cuales son lisadas por sonicación y tanto la fracción soluble como la insoluble son analizadas por gel SDS-PAGE.

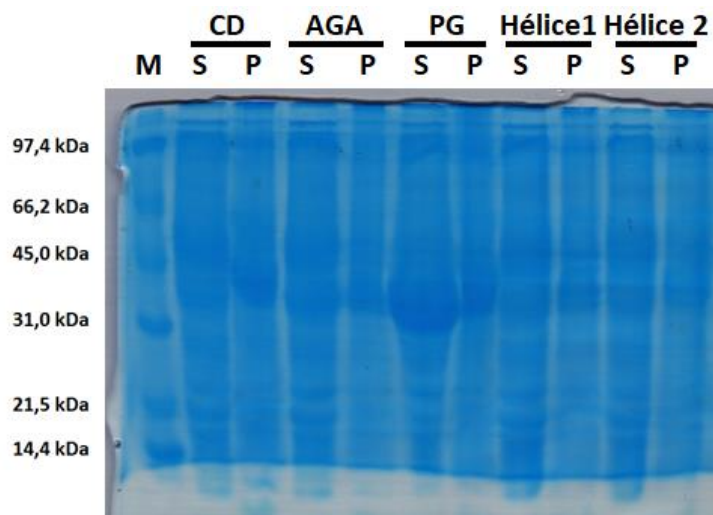


Figura 10.4-6 Prueba de expresión de los mutantes de segunda generación

Imágenes del gel SDS-PAGE en los que se analizan la fracción soluble (S) e insoluble (P) de las pruebas de expresión de los mutantes de segunda generación. Destaca la gran banda de expresión soluble para el mutante P-G.

En la Figura 10.4-6 se muestran los resultados obtenidos para todos los mutantes de segunda generación. En este caso la proteína de referencia es el dominio catalítico. En base al perfil de bandas en el gel se demuestra que el mutante P-G (en el que las prolinas del *loop* 5 se han sustituido por glicinas) es el que se sobreexpresa de manera clara en la fracción soluble, incluso a un nivel superior que el dominio catalítico aislado usado como referencia. En los otros tres casos (AGA, Δ Hélice 1 y Δ Hélice 2) no se observa una banda clara de sobreexpresión al mismo nivel que la P-G, pero sí que se observa una serie de bandas tanto en la fracción soluble como insoluble a la misma distancia de migración que la proteína patrón.

Ya que se observaron buenos niveles de expresión de proteína se decidió escalar el proceso a un cultivo preparativo en el que se aplicaron las mismas condiciones usadas para la proteína original. Las etapas de purificación son idénticas a las aplicadas en los otros casos: lisis celular por sonicación, centrifugación y dos etapas cromatográficas, afinidad usando una columna *Strep-Trap* y filtración en gel con una columna Superdex200.

En la Figura 10.4-7 se muestran los resultados de la cromatografía de afinidad aplicada a los cuatro constructos de ingeniería del *loop* 5. Como era previsible en base a los resultados de la prueba de expresión, los picos resultantes de la elución del mutante P-G (Figura 10.4-7 B) son de mayor magnitud que en el caso de los otros 3 constructos.

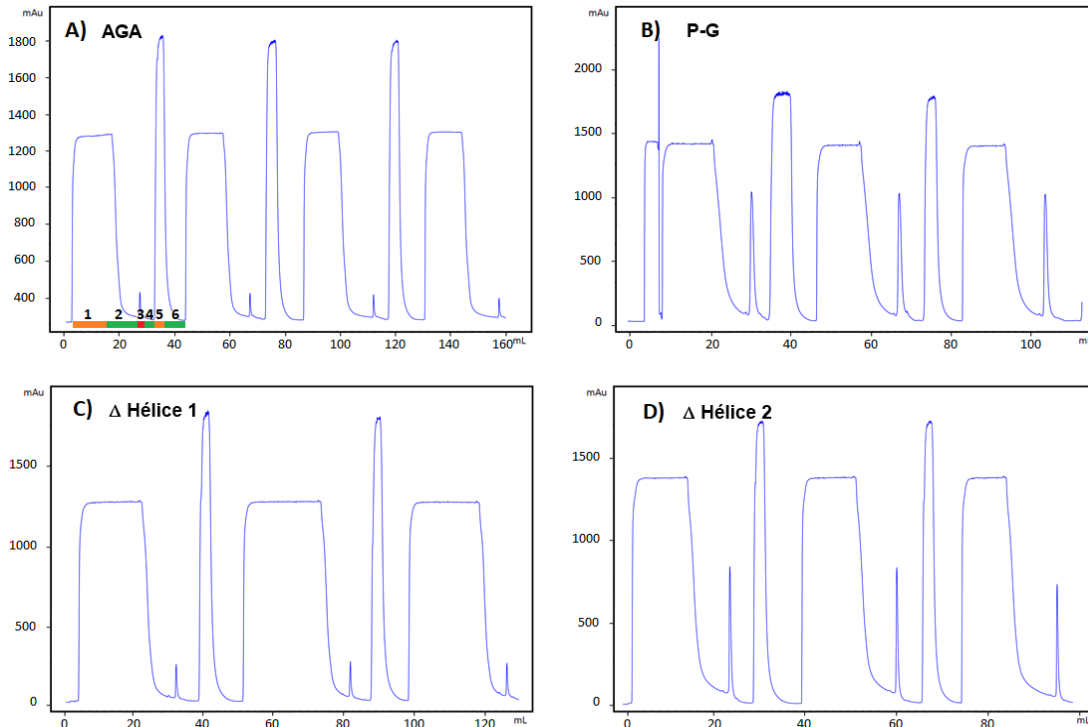


Figura 10.4-7 Cromatograma de purificación Strep-Trap de los mutantes de segunda generación

Cromatograma resultante de la purificación por cromatografía de afinidad de los mutantes de segunda generación: A) AGA, B) P-G, C) Δ Hélice 1 y D) Δ Hélice 2. Se realizaron entre 3 y 4 cargas de columna en la que se realizaron tres cargas de columna y se siguió el protocolo habitual de cargas lavados y eluciones. Los números indican las etapas de un ciclo de carga/elución: 1. Carga, 2. Lavado, 3. Elución, 4. Lavado, 5. Regeneración con Haba y 6. Lavado.

En la siguiente etapa se aplicó una cromatografía de filtración en gel en la que se cargaron todas las fracciones resultantes de la purificación de la cromatografía de afinidad *Strep-Trap*.

En la Figura 10.4-8 se muestran los perfiles de elución de los cuatro mutantes. En este caso ya se empiezan a observar resultados considerablemente dispares en cuanto a la distribución poblacional de las fracciones oligoméricas. En la Figura 10.4-8A se muestra el perfil del mutante AGA en el que solo se observan tres fracciones. Si se calculan los pesos moleculares de las fracciones F2 y F3 usando la ecuación de calibrado de la columna (Ecuación 3) se obtiene que la fracción F2 tiene un MW de 55,33 kDa y la F3 24,81 kDa. A pesar de que estos valores se alejan del valor teórico (un aspecto ya discutido previamente) nos son igualmente útiles para interpretar que esta última fracción F3 es la monomérica. En el caso del mutante P-G (Figura 10.4-8B) se observa un perfil de 5 fracciones similar al de la VcCDA CD pero con una muy baja presencia de la fracción monomérica F5. Si se calculan las masas moleculares para la fracción F4 se obtiene un valor de 62,6 kDa mientras que para la fracción F5 es de 31,2 kDa. Para el mutante Δ Hélice 1 se observan tres fracciones con los pesos moleculares de 53,7 kDa (F2) y 25,3 (F3). En el caso de este mutante (Figura 10.4-8C), el perfil es muy similar al del AGA y las explicaciones son las mismas. Para el mutante Δ Hélice 2 (Figura 10.4-8D) se observa un perfil intermedio de los dos casos anteriores, existen 4 fracciones identificables: una F1 de agregados de alto peso molecular, una F2 de 86,5 kDa, una F3 de 58,8 kDa y una F4 28,2 kDa.

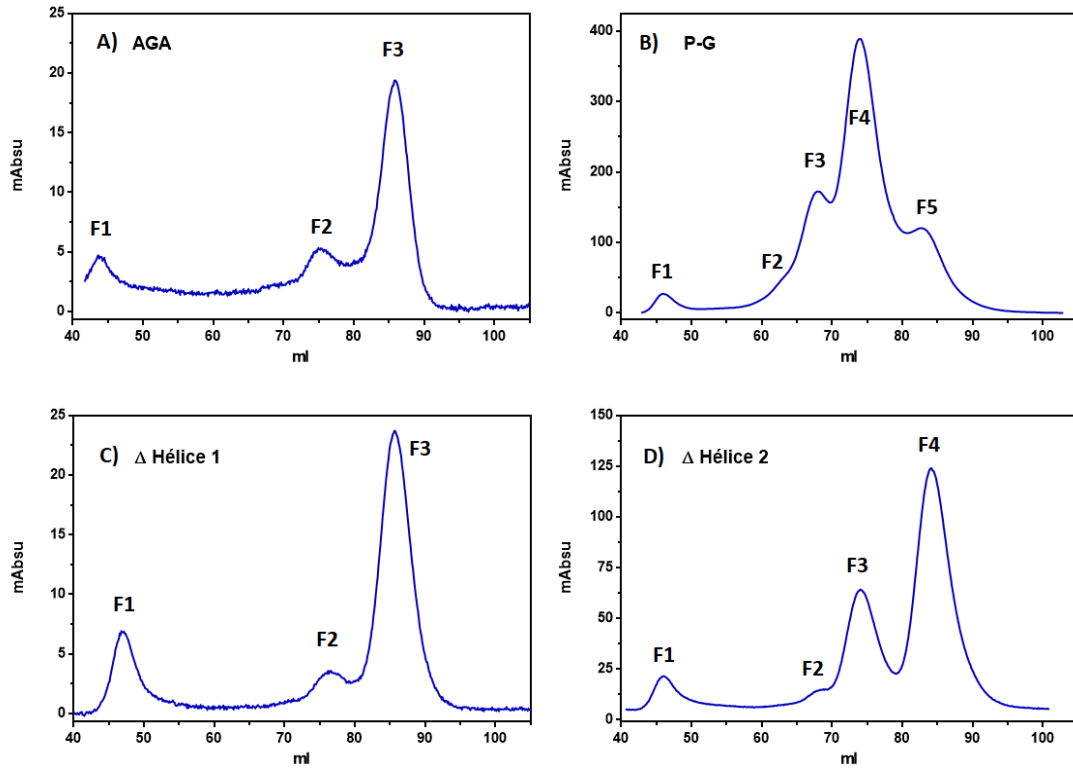


Figura 10.4-8 Cromatogramas de GFC de los mutantes de segunda generación

Cromatograma obtenido en la cromatografía de gel filtración usando una columna Superdex 200 (16/600). A) AGA: se observan 3 fracciones, B) P-G: se observan 5 fracciones, C) Δ Hélice 1: se observan 3 fracciones y D) Δ Hélice 2: se observan 4 fracciones.

Las observaciones en cuanto al perfil de agregación de las proteínas pueden resumirse en que una eliminación total o parcial del *loop* 5 conlleva un desplazamiento del perfil poblacional de oligómeros hacia la fracción monomérica.

Las muestras provenientes de todas las fases de purificación, desde la lisis y clarificado, hasta las diferentes fracciones del perfil de elución de filtración en gel se analizaron por SDS-PAGE (Figura 10.4-9).

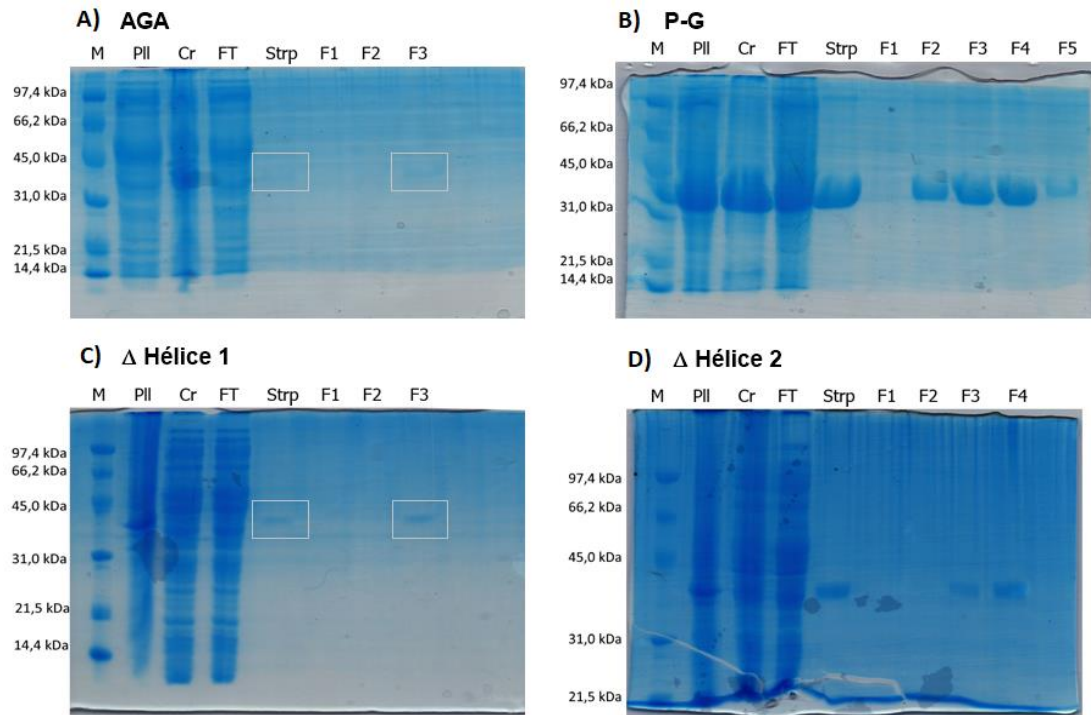


Figura 10.4-9 SDS-PAGE de los mutantes de segunda generación

Geles SDS-PAGE de todo el proceso de purificación los mutantes de segunda generación A) AGA: 34,12 kDa; B) P-G: 35,78 kDa; C) Δ Hélice 1: 35,52 kDa y D) Δ Hélice 2: 35,26 kDa. M: *Marker Low Range*, PII: *Pellet* de la centrifugación tras el lisado, Cr: crudo, fracción soluble del lisado, FT: *Flow through* de la columna, Strp: Proteína purificada por la *Strep-Trap*, F1-F5: fracciones de la 1 a la 5.

En los geles se observa que las proteínas presentan una alta pureza y que en todos los casos las fracciones de diferente tiempo de elución en la GFC se muestran como una única banda, lo que demuestra que están formadas por agregación de una única proteína. En el caso del mutante P-G (Figura 10.4-9B) se observa presencia de proteína en la fracción insoluble.

A su vez, se analizó el perfil de actividad con el sustrato AcOMU (Figura 10.4-10). En tres de los cuatro casos (AGA, Δ Hélice 1 y Δ Hélice 2) las fracciones que han sido seleccionadas por su actividad son las monoméricas (F3, F3 y F4 respectivamente). Llama la atención el caso del mutante P-G (Figura 10.4-10) que, a pesar de mostrar el perfil típico de 5 fracciones de la VcCDA, solo la fracción dimérica F4 presenta actividad sobre este sustrato inespecífico, así, esta es la fracción seleccionada para su caracterización. Adicionalmente, se conservó la fracción F5 para comprobaciones de actividad con quitooligosacáridos.

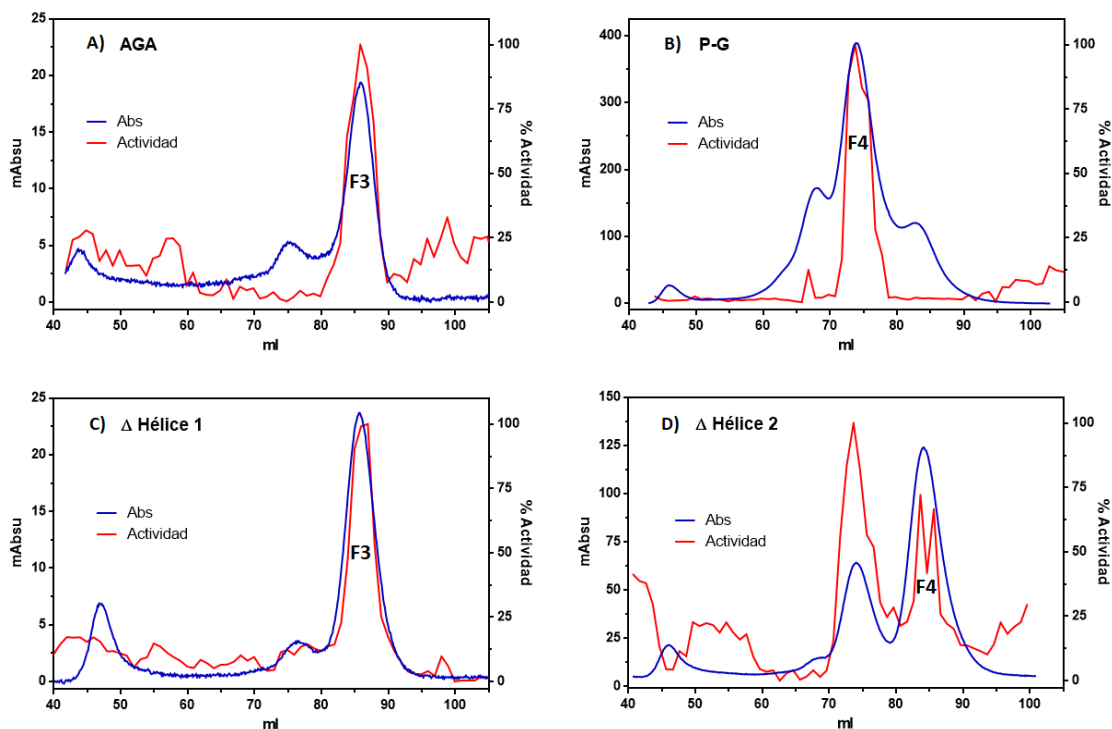


Figura 10.4-10 Perfil de elución GFC de VcCDA CD vs AcOMU de los mutantes de segunda generación
 Perfil de actividad de las fracciones sobre el sustrato artificial AcOMU superpuesto al perfil de elución de la cromatografía de gel filtración. Las fracciones seleccionadas son: A) AGA: F3, B) P-G: F4, C) Δ Hélice 1: F3 y D) Δ Hélice 2: F4.

Se juntaron todos los volúmenes correspondientes a cada fracción (AGA: F3, P-G: F4, Δ Hélice 1: F3 y Δ Hélice 2: F4) y de cada solución de proteína final se tomó una alícuota para ser analizado por espectrometría de masas MALDI-TOF (Figura 10.4-11).

En todos los casos la masa molecular experimental corresponde a los valores teóricos esperados (Figura 10.4-11). Se cuantificó la concentración de cada una de las proteínas mediante el método de BCA utilizando como referencia una recta patrón de BSA, y se calcularon los rendimientos por litro de cultivo de cada una de las proteína (Tabla 10.4-2).

Mutante	MW Calculado	MW MALDI-TOF	Fracción	Nº de purificaciones	Rendimiento mg proteína/L cultivo
VcCDA CD	35,91 kDa	35,75-35,9 kDa	Monomérica	3	4,12 mg/L
AGA	34,12 kDa	33,98-34,17 kDa	Monomérica	3	1,55 mg/L
P-G	35,78 kDa	35,62-35,82 kDa	Dimérica	2	14,11 mg/L
Δ Hélice 1	35,52 kDa	35,11-35,29 kDa	Monomérica	1	0,86 mg/L
Δ Hélice 2	35,26 kDa	35,11-35,29 kDa	Dimérica	1	2,32 mg/L

Tabla 10.4-2 Resumen de purificación de los mutates de segunda generación.

Cuadro resumen de los datos de purificación de los mutantes de segunda generación en comparación con la proteína de referencia VcCDA CD.

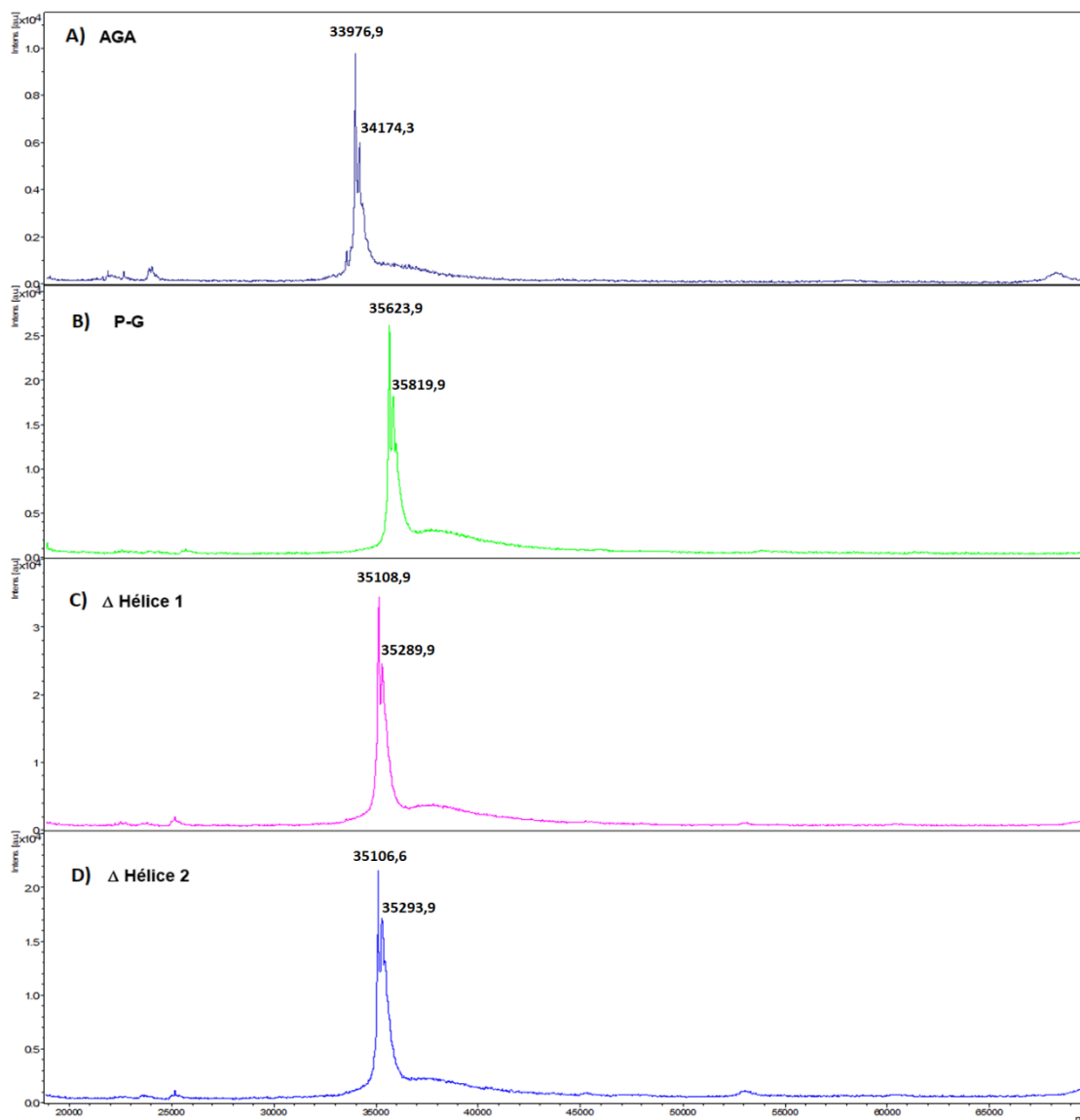


Figura 10.4-11 MALDI-TOF de los mutantes de segunda generación

Espectro de masas de la fracción monomérica de la VcCDA FL analizada por espectrometría de masas MALDI-TOF. generación A) masas teóricas: AGA: 34,12 kDa; B) P-G: 35,78 kDa; C)ΔHélice 1: 35,52 kDa y D)ΔHélice 2: 35,26 kDa

10.4.2. Estudio de la estabilidad de los mutantes de segunda generación

Como en casos anteriores, se utilizó la metodología DSF usando *Sypro orange* como sonda. Se empleó la VcCDA CD como proteína de referencia.

En la Figura 10.4-12 se muestran las curvas obtenidas para los diferentes mutantes. La primera conclusión que se extrae de la inspección visual de los gráficos es que la presencia de Zn^{+2} homogeniza los valores de T_m , mientras que en su ausencia se observa una mayor diferencia.

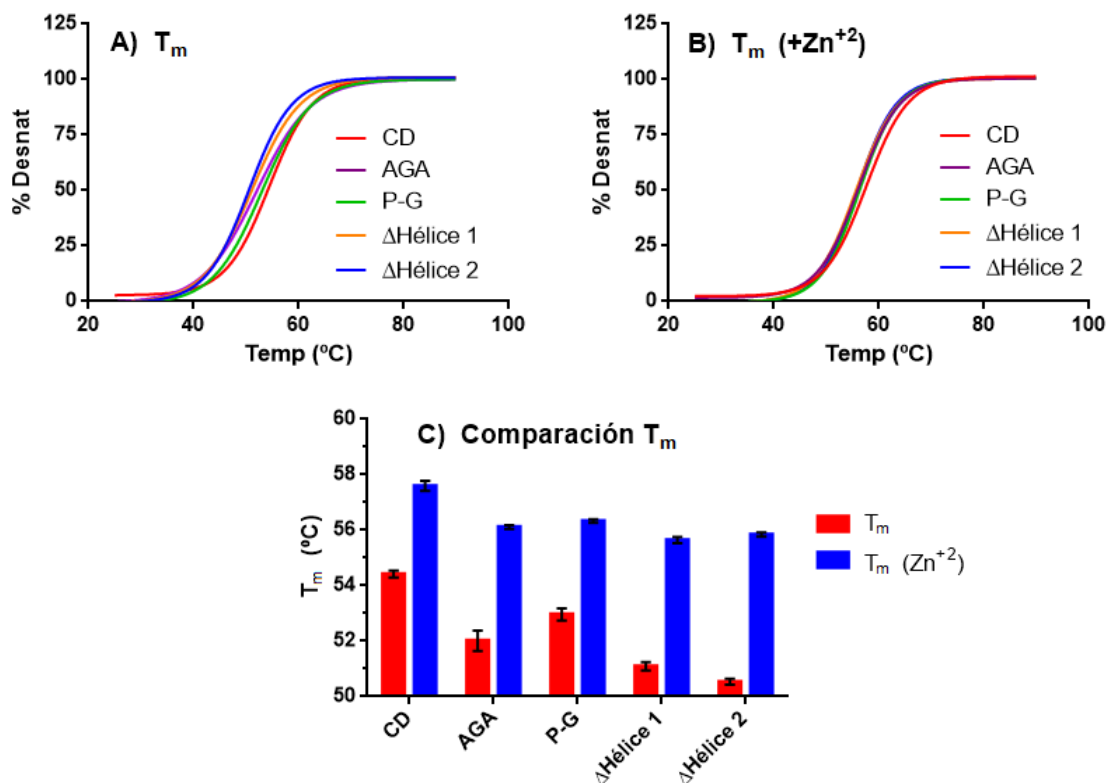


Figura 10.4-12 Prueba de estabilidad DSF para el cálculo de T_m de los mutantes de segunda generación. Cálculo de las T_m para VcCDA (como referencia) y los mutantes de segunda generación mediante una curva de desnaturación usando *Sypro Orange* como reactivo de monitorización en ausencia de Zn^{+2} (A) y en presencia de 0,1 mM Zn^{+2} (B). Comparación de los valores de T_m en presencia y ausencia de Zn^{+2} (C)

En Tabla 10.4-3 se muestran los valores de T_m en las condiciones ensayadas obtenidos tras el ajuste de la Ecuación 4. En ausencia de Zn^{+2} el valor de las T_m es generalmente menor y la desviación estándar de las T_m en conjunto es de 1,54°C, mientras que el mismo cálculo realizado con las T_m procedentes de las curvas en presencia de Zn^{+2} da como resultado 0,77°C.

Enzima	T_m	ΔT_m (CD-Mut)	$T_m + Zn^{+2}$	$\Delta T_m + Zn^{+2}$ (CD-Mut)
CD	54,41 ± 0,12°C		57,60 ± 0,18°C	
AGA	52,01 ± 0,37°C	2,40	56,11 ± 0,07°C	1,49
P-G	52,96 ± 0,22°C	1,45	56,33 ± 0,06°C	1,27
ΔHélice 1	51,09 ± 0,15°C	3,32	55,64 ± 0,11°C	1,96
ΔHélice 2	50,53 ± 0,10°C	3,88	55,84 ± 0,08°C	1,76

Tabla 10.4-3 Comparación de T_m en los mutantes de segunda generación

Cuadro de comparación de los valores de la T_m obtenidos para los diferentes constructos de segunda generación usando la VcCDA CD en ausencia y presencia de Zn^{+2} (0,1 mM) usando una metodología de DSF con *Sypro Orange*. Promedio de dos réplicas

En la misma tabla se observa que el CD es el enzima con la T_m más alta y, por lo tanto, más termoestable. El siguiente enzima más estable es el mutante P-G, donde las mutaciones puntuales posiblemente no modifican la topología del *loop* 5. Además la variación de T_m entre el ensayo sin y con Zn^{+2} muestra un valor muy próximo al del CD, algo que también está de acuerdo con la explicación aportada. Para los mutantes en los que se eliminó total o parcialmente el *loop* 5 se obtienen valores de T_m inferiores, curiosamente el valor del mutante AGA es ligeramente mayor al de los ΔHélice 1 y 2. Además, estos son los que presentan una ΔT_m y $\Delta T_m + Zn^{+2}$ mayor. Este

fenómeno puede interpretarse a través del rol en la estabilización de la estructura del metal catalítico, es posible que en estos mutantes se haya reducido la afinidad por el Zn^{+2} y que en la población de enzimas el activo no se encuentre saturado con el catión.

Se concluye que todos los mutantes presentan una estabilidad térmica similar pero ligeramente inferior (de 1 a 2°C) a la del enzima WT CD, y que son estables a la temperatura de los ensayos de actividad (37°C) que siguen.

10.4.3. Caracterización cinética de los mutantes de segunda generación

Como en las caracterizaciones anteriores, se realiza una exploración de la actividad del enzima realizando un estudio de la actividad a diferentes concentraciones de enzima usando los sustratos de referencia DP2 y DP4. Por otro lado este experimento se aprovecha para identificar el número de eventos de desacetilación que es capaz de realizar por molécula.

Los cuatro nuevos mutantes son activos en la desacetilación de quitooligosacáridos y el producto principal obtenido es el monodesacetilado.

La caracterización de estos mutantes se realizó utilizando los mismos sustratos (DP2, DP3, DP4 y DP5) y el mismo protocolo utilizado con las otras versiones del enzima previamente descritas. Al igual que en los estudios de estabilidad, la proteína que se utiliza como referencia es el dominio catalítico aislado (WT CD). Para la obtención de los parámetros cinéticos se utilizó el monómero en todos los casos menos para el mutante P-G, ya que el perfil de actividades de las fracciones oligoméricas con AcOMU mostraba que el dímero es la forma activa.

En el conjunto de gráficos mostrados en la Figura 10.4-13 A-D se muestran los perfiles de actividad al representar $v_0/[E]$ frente a concentración de sustrato para poder obtener los valores de k_{cat} y K_M por ajuste de los datos a la ecuación de Michaelis-Menten (Ecuación 1). El análisis visual ya demuestra unos resultados muy sorprendentes: todos los enzimas muestran una mayor actividad para sustratos largos que para sustratos cortos sin excepción. Además se observa un comportamiento peculiar del mutante Δ Hélice 2, ya que no se observa saturación en las cinéticas con DP4 y DP5, mientras con DP2 y DP3 si que se observa cierta saturación a pesar de los valores tan bajos obtenidos.

En la Tabla 10.4-4 se muestran los valores de k_{cat} , K_M y otros parámetros derivados obtenidos para cada uno de los cuatro mutantes en comparación con el dominio catalítico aislado. Al igual que con el enzima WT CD, no se observa comportamiento cooperativo para ningún sustrato.

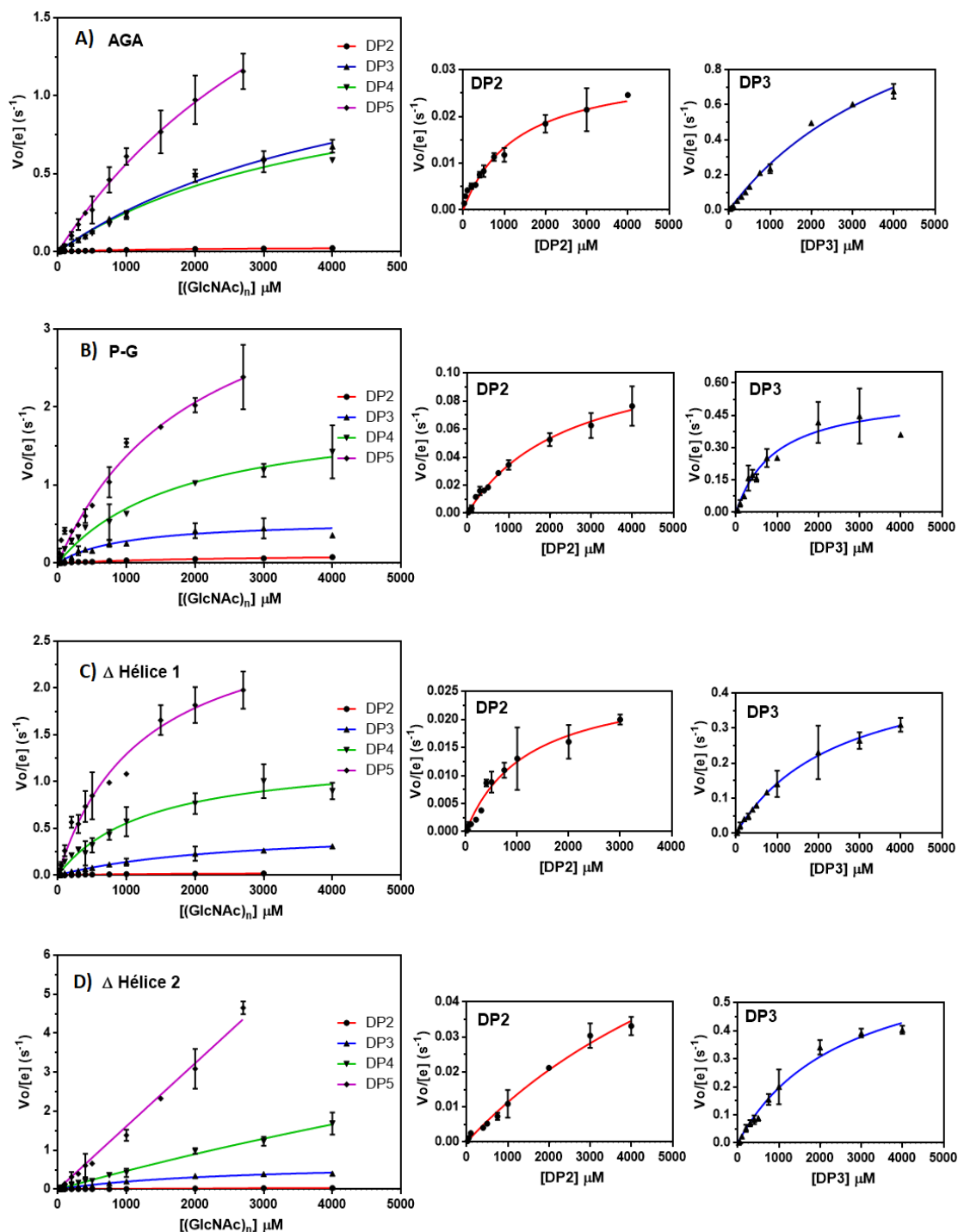


Figura 10.4-13 Caracterización cinética de los mutantes de segunda generación

Caracterización de los parámetros cinéticos de los mutantes de segunda generación A) AGA, B) P-G, C) ΔHélice 1 y D) ΔHélice 2 utilizando como sustrato los quitooligosacáridos DP2, DP3, DP4 y DP5. Todos los ensayos se realizan en tampón Tris 50 mM pH 8,5 NaCl 300 mM y a una temperatura de 37°C.

En el caso del mutante AGA, la actividad con DP2 como sustrato se ve altamente reducida representando tan solo el 1,48% del valor de k_{cat} de la proteína de referencia WT CD. Al contrario, desde DP3 hasta DP5 su actividad se ve incrementada con respecto al CD. Son muy llamativos los valores de k_{cat} para DP4 ($1,27 \pm 0,16 \text{ s}^{-1}$) y DP5 ($3,18 \pm 0,61 \text{ s}^{-1}$) que mejoran el valor de k_{cat} respecto

a WT CD en un 577% y un 757%, respectivamente. Al mismo tiempo los valores de K_M también se ven afectados, siendo todos significativamente más altos que para el dominio catalítico aislado. Además, en comparación con los otros mutantes sus valores de K_M son los más altos para DP3, DP4 y DP5.

Sustrato	Mutante	k_{cat} (s^{-1})	K_M (mM)	k_{cat}/K_M ($M^{-1}\cdot s^{-1}$)	$v_0/[E]$ 2 mM Sustrato (s^{-1})	% k_{cat} Mut/CD
(GlcNAc) ₂	CD	2,26 ± 0,17	0,44 ± 0,1	5,1 · 10 ³	1,68 ± 0,23	
	AGA	0,03 ± 0,002	1,32 ± 0,22	2,3 · 10 ¹		1,48
	P-G	0,12 ± 0,01	2,47 ± 0,41	4,8 · 10 ¹		5,28
	ΔHélice 1	0,03 ± 0,003	1,19 ± 0,29	2,5 · 10 ¹		1,32
	ΔHélice 2	n.s. ²	n.s. ²	9,7	0,021 ± 0,001	(1,3% $v_0/[E]$) ¹
(GlcNAc) ₃	CD	0,67 ± 0,03	1,10 ± 0,11	6,0 · 10 ²	0,43 ± 0,04	
	AGA	1,56 ± 0,14	4,94 ± 0,68	3,2 · 10 ²		232,83
	P-G	0,56 ± 0,06	0,96 ± 0,41	5,8 · 10 ²		82,97
	ΔHélice 1	0,50 ± 0,05	2,50 ± 0,47	2,0 · 10 ²		74,62
	ΔHélice 2	≈ 0,70	≈ 2,58	2,7 · 10 ²	0,34 ± 0,03	(79,2% $v_0/[E]$) ¹
(GlcNAc) ₄	CD	0,22 ± 0,01	1,01 ± 0,13	2,2 · 10 ²	0,15 ± 0,02	
	AGA	1,27 ± 0,16	4,04 ± 0,84	3,6 · 10 ²		577,27
	P-G	1,98 ± 0,22	1,84 ± 0,44	1,1 · 10 ²		900
	ΔHélice 1	1,30 ± 0,11	1,33 ± 0,27	1,0 · 10 ²		590,91
	ΔHélice 2	n.s. ²	n.s. ²	4,2 · 10 ²	0,98 ± 0,07	(653,3% $v_0/[E]$) ¹
(GlcNAc) ₅	CD	0,42 ± 0,02	0,76 ± 0,09	5,5 · 10 ²	0,29 ± 0,03	
	AGA	3,18 ± 0,61	4,62 ± 1,24	6,9 · 10 ²		757,14
	P-G	4,14 ± 0,47	2,01 ± 0,40	2,8 · 10 ³		984,76
	ΔHélice 1	2,89 ± 0,23	1,23 ± 0,20	2,3 · 10 ³		688,10
	ΔHélice 2	n.s. ²	n.s. ²	1,7 · 10 ³	3,09 ± 0,51	(1065,5% $v_0/[E]$) ¹

Tabla 10.4-4 Parámetros cinéticos de la caracterización de los mutantes de segunda generación

Parámetros cinéticos k_{cat} y K_M obtenidos en la caracterización de la VcCDA CD como referencia y de los mutantes AGA, P-G, ΔHélice 1 y ΔHélice 2. Como no se observa comportamiento cooperativo se utiliza la ecuación de Michaelis Menten en todos los casos. ΔHélice 2 no se satura con DP4 y DP5 por lo que solo se determina el parámetro k_{cat}/K_M y se comparan los valores de $v_0/[E]$ a 2 mM de sustrato. Los valores de k_{cat}/K_M para el mutante ΔHélice 2 se obtienen de un ajuste lineal de los valores obtenidos en el que la pendiente obtenida equivale a k_{cat}/K_M .¹ Ratio de $v_0/[E]$ mut/CD a 2 mM de sustrato. ² n.s. parámetro no calculado debido a que no se observa saturación del enzima

En el caso del mutante P-G, del cual se caracterizó la fracción dimérica, también se observa un comportamiento similar, se pierde capacidad en la desacetilación de DP2 pero se incrementa con sustratos largos. Sin embargo el comportamiento hacia DP3 no es coincidente con el del mutante AGA. En este caso el nivel de actividad en términos de k_{cat} se mantienen en el nivel de la proteína de referencia (P-G 0,56 ± 0,06 s^{-1} vs CD 0,67 ± 0,03 s^{-1}), pero, no solo k_{cat} , también la K_M se mantiene en el mismo nivel (P-G 0,96 ± 0,41 mM vs CD 1,10 ± 0,11 mM). El fenómeno reportado en DP3 puede deberse a que al no haberse eliminado el *loop* 5 el comportamiento con este sustrato es similar a lo que ocurre en la proteína WT. Podría esperarse que la actividad se viese incrementada pero la presencia del *loop* 5 completo haga que el sustrato retenido solo por el subsitio +1 adicional no sea lo suficientemente fuerte para mantenerlo en una posición lineal en el sitio activo permitiendo el cierre completo del *loop* 4, así este adopta la conformación semicerrada. Para DP4 y DP5 el valor de k_{cat} se ha incrementado entre un 900% y 985%, un incremento muy significativo. Estos sustratos más largos pueden acomodarse linealmente sobre un número adicional de subsitios gracias a la mayor flexibilidad del *loop* 5 manteniendo una disposición lineal sobre el

surco del centro activo y permitiendo que el *loop* 4 pueda cerrarse completamente y desarrollar una mayor actividad catalítica. Este resultado nos indica que no solo la eliminación del *loop* 5 ha sido exitosa (mutante AGA), sino que el haber flexibilizado el *loop* también proporciona unos resultados satisfactorios. En este caso también se ha invertido la preferencia de sustratos en base a su DP.

Cuando se analizó el perfil de actividades de las diferentes fracciones oligoméricas del mutante P-G con el sustrato AcOMU (Figura 10.4-10) se obtuvo como resultado que la fracción más activa era la dimérica, observándose prácticamente 0 actividad en el monómero. Por norma general, el monómero siempre había sido en todas las otras construcciones la fracción con mayor actividad. Dado que el AcOMU es un sustrato artificial (aunque inespecífico) se decidió comprobar las actividades específicas de la fracción dimérica y monomérica para ver si realmente hay un comportamiento diferencial entre una y otra al usar quitooligosacáridos como sustratos. En la Figura 10.4-14 se observa que realmente la fracción monomérica F5 es activa. Sin embargo si atendemos a la velocidad específica de cada población obtenida por las pendientes de las rectas v_0 vs $[E]$, se observa que la fracción monomérica es menos activa tanto para DP2 como para DP4. Así se puede considerar que, en términos generales, la fracción dimérica muestra un mejor comportamiento como biocatalizador para su aplicación *in vitro*.

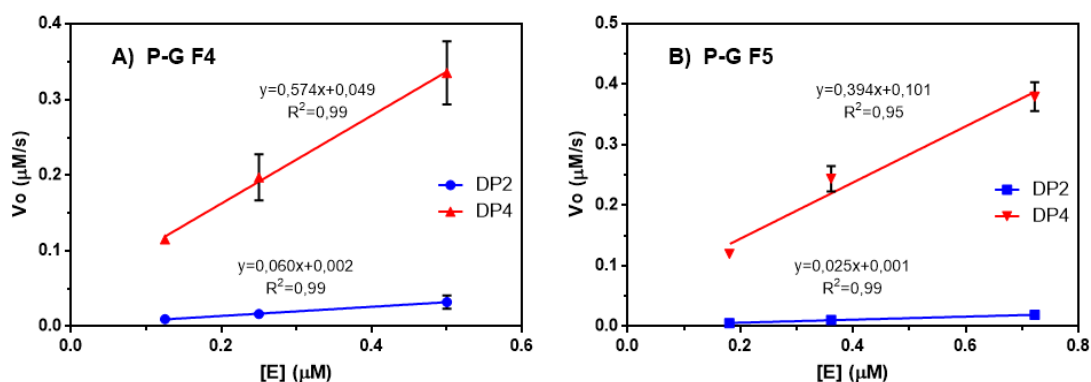


Figura 10.4-14 Comparación de la fracción monomérica y dimérica del mutante P-G

Gráficos en los que se muestra la comparación de las velocidades específicas para la fracción monomérica (F5) y dimérica del mutante P-G cuando desacetilan los sustratos DP2 y DP4.

El comportamiento del mutante Δ Hélice 1 sigue el patrón general reportado: pérdida de actividad con DP2 e incremento sustancial de su capacidad catalítica con DP4 y DP5. Los parámetros obtenidos para DP2, DP4 y DP5 son muy similares a los descritos para el mutante AGA ya que los porcentajes de k_{cat} calculados se mantienen dentro del mismo rango. Por otro lado el comportamiento con DP3 es más parecido a lo descrito con el mutante P-G, con una k_{cat} similar a la de la proteína de referencia. Es probable que la explicación mecanística de este fenómeno sea similar a la aportada para el mutante P-G. Para DP2, DP3, DP4 y DP5 las K_M de este mutante son ligeramente más bajas que las que muestra el mutante AGA (con el que comparte comportamiento en términos de k_{cat} , excepto con DP3). Al igual que en los otros dos mutantes presentados, el Δ Hélice 1 también muestra una inversión del patrón de preferencias de sustratos, habiendo demostrado que la truncación parcial del *loop* es suficiente para la acomodación de sustratos largos. Por otro lado, muestra un comportamiento intermedio entre el mutante AGA y P-G.

Al analizar las cinéticas del mutante Δ Hélice 2 se observa que el perfil de preferencias de sustratos se ha invertido al igual que en los otros candidatos, pero además llama la atención un comportamiento cinético no coincidente con ninguno de los otros tres mutantes. Se observa la pérdida de actividad habitual con DP2, el mantenimiento del valor de k_{cat} para DP3, pero su actividad sobre DP4 y DP5 es muy diferente. Cabe mencionar que con DP3 es con el único de los sustratos en los que se observa curvatura en la representación de $v_0/[E]$ frente a [sustrato]. En el caso de DP2, DP4 y DP5 no se llega a saturar el enzima en las concentraciones ensayadas. Es difícil interpretar este resultado, pero indica una notable disminución de la afinidad por estos sustratos. Este fenómeno obliga a utilizar la actividad específica $v_0/[E]$ a 2 mM de sustrato para comparar el comportamiento del enzima. Analizando este valor se observa que sigue el perfil general de comportamiento mostrando un porcentaje de $v_0/[E]$ de hasta 1000% en comparación con el dominio catalítico para el sustrato DP5.

En resumen, se observa que las tres estrategias globales para la ingeniería del *loop* 5 con el fin de incrementar la actividad desacetilasa usando sustratos mayores que DP3 ha sido exitosa. En todos ellos el incremento de k_{cat} en DP4 y DP5 se encuentra en el rango del 500% y 1000%. Sin embargo, estas modificaciones tienen una contrapartida que afecta negativamente a la actividad cuando DP2 es el sustrato. Este hecho puede deberse a varias causas difíciles de esclarecer en base a los datos disponibles: Es probable que para llegar a una conformación cerrada estable el *Loop* 4 se ayude de interacciones que establece con el *loop* 5, de tal modo que las intervenciones realizadas en el *loop* 5 penalizan gravemente este fenómeno. En el caso de DP2, el cual es un sustrato que solo está estableciendo interacciones en los subsitios -1 y 0 este hecho se muestra muy relevante. Por otro lado los sustratos más largos son capaces de establecer interacciones con subsitios adicionales (+1, +2 e incluso +3 para los sustratos DP3, DP4 y DP5) esto supone un estabilización incremental que ayuda al proceso catalítico, de ahí que se observe un aumento de la actividad con el DP de los sustratos. Otra opción que explique la menor actividad con DP2, es el hecho de que ahora existen más subsitios disponibles en los que se puede unir de modo no productivo, que se refleja en una menor actividad aparente.

10.4.4. Caracterización del patrón de desacetilación de los mutantes de segunda generación

Una vez definido el comportamiento cinético de los cuatro mutantes y haber demostrado que son más eficientes con sustratos como DP4 y DP5 es necesaria la obtención de reacciones enzimáticas preparativas para comprobar si el patrón de desacetilación se ha visto afectado. Para este estudio se analizaron los sustratos de referencia DP2 y DP4, con excepción del mutante P-G con el que también se probó DP5 debido al especial interés que generaba este enzima por sus niveles de expresión, estabilidad y eficiencia catalítica.

Las concentraciones de enzima utilizadas para cada mutante son las que constan a continuación: AGA 2,0 μ M, P-G 2,1 μ M, Δ Hélice 1 1,0 μ M, y Δ Hélice 2 2,9 μ M. La fracción oligomérica utilizada para la caracterización del mutante P-G fue la dimérica debido a su mejor comportamiento catalítico. La cantidad de sustrato en cada reacción fue de 10 mg lo que implica concentraciones entre 7 mM y 20 mM en función del DP del sustrato empleado. Las reacciones se mantuvieron en incubación a 37°C durante 48 horas en las que se fue monitorizando la evolución de la

desacetilación por HPLC-MS. Al igual que en las secuenciaciones del PA anteriores, una vez detectada la falta de evolución, las muestras son congeladas y liofilizadas hasta su análisis mediante la metodología de HPLC-MS² tras el marcado isotópico de los productos de reacción (ver apartado 9.2.9).

Mutante	Sustrato	Patrón	Abundancia desacetilado
CD	DP2	AD	100 %
	DP4	ADAA	100 %
	DP5	ADAAA	100 %
AGA	DP2	AD	100 %
		ADAA	74 %
	DP4	AADA	17 %
		DAAA	9 %
P-G	DP2	AD	100 %
	DP4	ADAA	100 %
	DP5	ADAAA	100 %
Δ Hélice 1	DP2	AD	100 %
	DP4	ADAA	100 %
Δ Hélice 2	DP2	AD	100 %
	DP4	ADAA	100 %

Tabla 10.4-5 Patrón de desacetilación de los mutantes de segunda generación

Resumen de los PA obtenidos en la secuenciación de los productos de desacetilación de los diferentes mutantes de segunda generación AGA, P-G, Δ Hélice 1 y Δ Hélice 2. A: GlcNAc, D: GlcN.

En la Tabla 10.4-5 se muestran los resultados obtenidos. A excepción del mutante AGA, todos los demás mutantes mantienen el patrón del enzima originario independientemente del sustrato empleado. Sin embargo, los productos resultantes de la desacetilación del mutante AGA en DP4 presentan tres patrones diferentes de desacetilación: ADAA, AADA y DAAA. El más frecuente es el patrón del enzima WT (ADAA) con un 74% de abundancia. Le sigue el AADA con un 17% y por último DAAA con un 9%. Es difícil encontrar una explicación a estos nuevos patrones encontrados sin disponer de una estructura cristalográfica del complejo enzima sustrato. Explicar el patrón DAAA es más sencillo, la exposición de subsitios positivos podría permitir un desplazamiento del sustrato hacia los subsitios positivos siendo posible un modo de unión en los subsitios 0 a +3 situando el extremo no reductor del sustrato en el subsitio 0 y que estuviese lo suficientemente estabilizado por las interacciones que se crean en los subsitios positivos como para que tenga lugar la desacetilación. El patrón AADA es más difícil de explicar dado que los subsitios negativos siguen estando bloqueados.

Por lo general se encontró que en los mutantes la cantidad de DP2 sin haber sido desacetilado era considerablemente superior a la de la proteína de referencia VcCDA CD a tiempos largos de reacción. Por el contrario, en el caso de DP4 y DP5 no se detectaban sustratos no reaccionados. Esta observación se muestra en concordancia con los resultados cinéticos en los que se vio que los nuevos mutantes perdían capacidad de desacetilar DP2, mientras que ganaban eficiencia en la modificación de sustratos más largos. En ningún caso se observan productos didesacetilados.

10.4.5. Conclusiones en la ingeniería del loop 5

En el presente apartado se ha demostrado que el *Subsite Capping Model* no es solo una teoría que permite explicar el comportamiento de las desacetilasas en cuanto a la preferencia de sus sustratos en términos de DP. El *Subsite Capping Model* se ha confirmado como una herramienta útil en el rediseño de los *loops* que decoran el sitio activo para modular estas características.

Siendo el punto de partida la generación de tres estrategias de ingeniería del *loop* 5 para el incremento de la actividad del enzima hacia sustratos mayores que DP3: eliminación completa, flexibilización y reducción parcial del tamaño, se han conseguido unos resultados espectaculares en todas y cada una de ellas tal como se ejemplifica en la Figura 10.4-15.

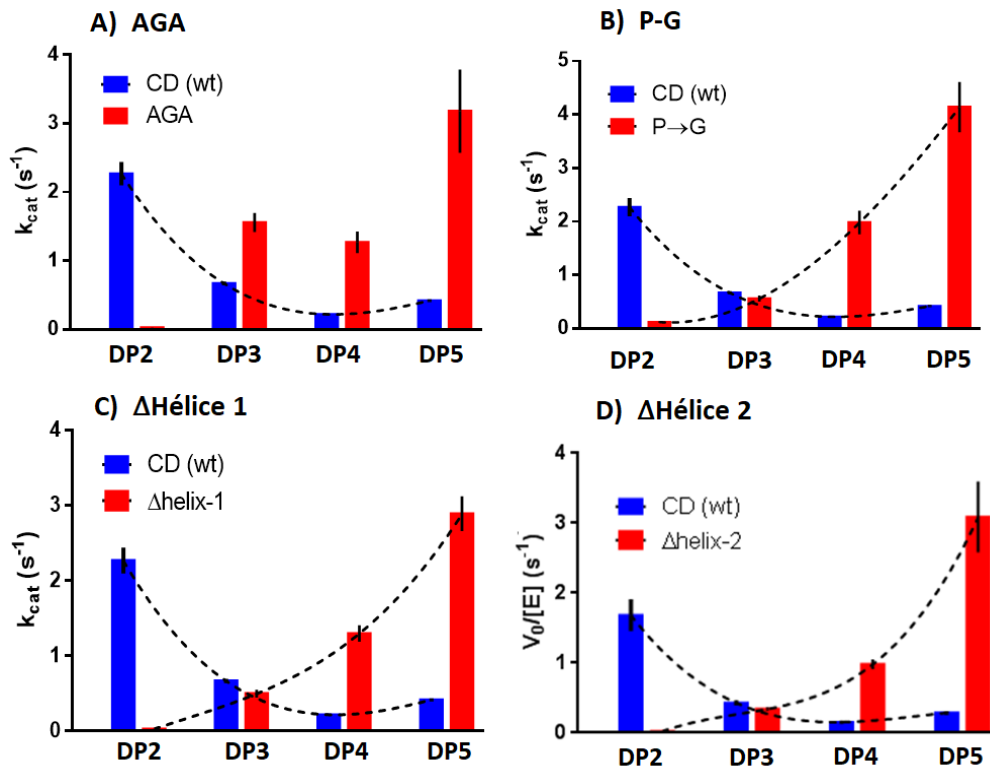


Figura 10.4-15 Evolución de actividades en función del DP del sustrato.

Gráficos resumen de la tendencia de actividades con diferentes sustratos para los mutantes de segunda generación AGA, P-G, ΔHélice 1 y ΔHélice 2 en comparación con la proteína de referencia VcCDA CD. Se representan los valores de k_{cat} con excepción del mutante ΔHélice 2 en el que se representan los valores de $v_0/[E]$.

A pesar de que no todos presentan niveles de expresión muy elevados, sí que se ha conseguido un gran potencial: el mutante P-G. Sus principales características son: altos niveles de expresión, estabilidad similar a la de las proteínas de referencia y un perfil de actividad mejorado y de gran interés. Estos hechos han conseguido que se haya implementado dentro de cepas de *E. coli* de producción dentro del proyecto Nano3Bio en las cuales se han realizado intervenciones de ingeniería metabólica para aumentar la producción de oligómeros de quitosano (*Cell Factory approach*). Esta parte del trabajo está siendo realizada por el grupo de la Dra. Marjan de Mey en la Universidad de Ghent. En la mencionada cepa, se coexpresan NodC (una sintasa de quitooligosacáridos) proveniente del operon NOD del género *Rhizobium* y el mutante VcCDA CD P-G. Este sistema ha ayudado a incrementar la pureza de los productos obtenidos. Previamente a la incorporación del gen mutante en el sistema de expresión se obtenían mezclas de DP4 y DP4(N)

como productos, tras la incorporación del gen con la versión mejorada del enzima la producción se ha desplazado por completo hacia el producto monodesacetilado.

Debido a las grandes repercusiones que han tenido las modificaciones en el perfil de actividad de los enzimas modificados se han realizado múltiples intentos de cristalización del mutante P-G en colaboración con el grupo del Dr. Marcelo Guerin. Para esto se han creado las versiones inactivas D39S de este mutante tanto habiendo usado como molde el dominio catalítico aislado (como es la proteína descrita en todo este apartado), como la proteína completa incluyendo la mutación en las tres prolinas. También se intentó la cocrystalización del enzima en presencia de sustratos como DP4 o DP5. A pesar de que en algunas condiciones se encontraron pequeños cristales, ninguno fue capaz de difractar con la suficiente calidad como para poder resolver la estructura del enzima.

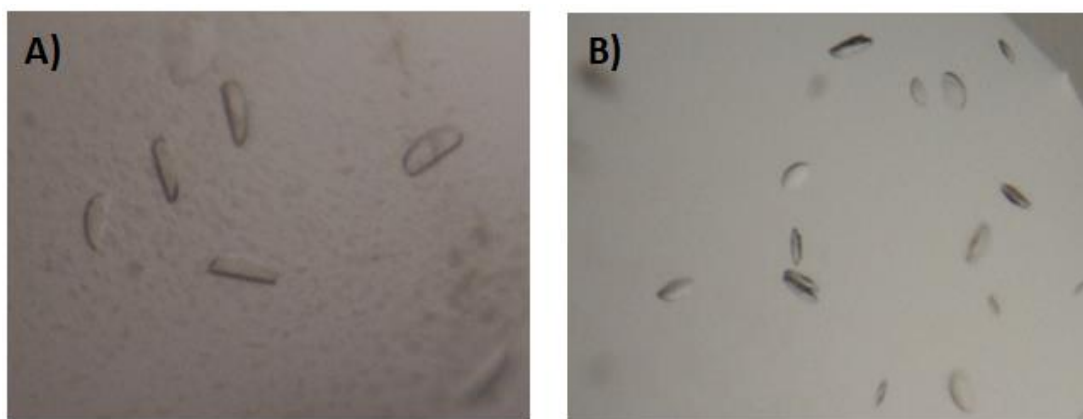


Figura 10.4-16 Intentos de cristalización del mutante P-G

Ejemplos de los cristales obtenidos para el mutante VcCDA FL P-G D39S A) 6 mg/mL enzima en ausencia de sustrato, B) 6 mg/mL enzima en presencia de DP5 0,5 mM. Condiciones: Cacodilato de sodio pH 6,5, 0.16 M Calcio acetato hidrato, 14.4% PEG8000.

Se proseguirán los trabajos de cristalogénesis con este y otros mutantes del *loop 5* con el fin de obtener información detallada sobre la implicación de las modificaciones estructurales realizadas y el comportamiento cinético observado.

10.5. Discusión global VcCDA

En la presente memoria se ha presentado la evolución del trabajo realizado en el área de las desacetilasas. La base de conocimiento de la que se disponía generaba un gran abanico de posibilidades a la hora del estudio de esta familia de enzimas. El hecho de que el laboratorio en el que se realizó el presente trabajo de investigación fuese el primero en resolver la estructura de una CE4 en complejo productivo con sustrato en colaboración con el grupo del Dr. Marcelo Guerin (Andrés, Albesa-Jové, et al., 2014), centraba las perspectivas en buscar aproximaciones que permitieran definir las relaciones estructura-función de la VcCDA. Este enzima se ha convertido en un modelo de las CE4 debido al conocimiento estructural del que se dispone gracias a los complejos enzima-sustrato.

Se inició con el establecimiento y validación de un método analítico HPLC-MS para la monitorización de la actividad enzimática de desacetilasas. Toda la metodología descrita demostró ser un elemento crucial en la exploración y caracterización de todos los mutantes descritos. Los elementos de automatización implementados demostraron ser un aspecto central además de la selectividad que aporta la detección por espectrometría de masas de los productos. Más allá de ser un herramienta de caracterización, esta metodología se ha convertido en un elemento de análisis rutinario a la hora de realizar una aproximación rápida a la actividad de los enzimas mediante el cálculo de velocidades específicas. Su aplicación en modo de escaneo permite estimar rápidamente el DA de los productos.

Hasta el establecimiento de esta técnica no se había descrito en la bibliografía publicada hasta la fecha una metodología con las capacidades analíticas de la aquí descrita. Dentro del marco de todo el trabajo realizado, se ha aplicado en exclusiva al estudio de la VcCDA y los mutantes derivados, pero la potencialidad de esta metodología asegura que la adaptación a otros enzimas relacionados sea prácticamente directa tras la obtención de los patrones correspondientes.

Parte del trabajo aquí presentado consistía en una evaluación de la proteína VcCDA en cuanto a diferentes parámetros como pueden ser su actividad con diferentes sustratos o la dependencia de esta actividad en base al catión divalente presente en el centro activo (resultados que ya fueron incluidos en el artículo publicado por Andrés et al. (Andrés, Albesa-Jové, et al., 2014)). En esta caracterización de base también se incluye la construcción de una versión de este enzima en el que se eliminan los dos CBM que se encontraban en su extremo C terminal. Esta modificación no solo demostró mejorar ligeramente la actividad del enzima en sustratos largos, sino que demostró no afectar significativamente en términos de expresión ni de estabilidad del enzima. El poder disponer de una unidad enzimática de menor tamaño que sea capaz de llevar a cabo las mismas tareas enzimáticas que una de mayor peso molecular siempre supone una ventaja productiva a la hora de su incorporación en una cepa de producción.

Más allá de estos trabajos de exploración y caracterización, el proyecto aquí desarrollado se abordó el reto de demostrar la hipótesis del *Subsite Capping Model*. Este hecho sitúa el trabajo dentro de un marco teórico-experimental en el que definir experimentos que sean concluyente a la hora de apoyar esta hipótesis y que a su vez asienten el *Subsite Capping Model* como una teoría capaz de definir las directrices en la modificación e ingeniería de desacetilasas. Estas directrices buscarían el ser capaces de generar enzimas mutantes en los que es posible predefinir la preferencia de sustratos e incluso el patrón de desacetilación de los mismos.

Los resultados obtenidos dentro de este campo, no solo han demostrado que el *Subsite Capping Model* es una realidad en cuanto la desacetilasa de *Vibrio cholerae*, sino que es posible generar hipótesis con esta base que permiten modificar el comportamiento del enzima mediante la ingeniería de *loops*. Este hecho abre una nueva puerta dentro de la ingeniería de desacetilasas. La capacidad de generar desacetilasas a medida en las que, a partir de una librería de *loops*, ser capaces de definir no solo que sustratos usan, sino que también el patrón de sus productos podrían llegar a convertirse en uno de los puntos cruciales en la producción de estos compuestos de forma biotecnológica. Este avance sería capaz de proporcionar patrones que quizás no existan en la naturaleza o incluso llegar a incorporar sustratos no naturales a ser desacetilados.

Sin duda, a pesar del potencial de los resultados obtenidos es necesario una extensión del trabajo en el que se persiga un conocimiento profundo de las relaciones estructura-función de la implicación de los *loops* en la actividad de estos enzimas. Hitos como la resolución de la estructura de alguno de los mutantes obtenidos o la obtención de modelos y simulaciones bioinformáticas serían de gran utilidad a la hora de aportar luz sobre la relevancia de los *loops*. Adicionalmente, en el Laboratorio de Bioquímica del IQS se están desarrollando otros trabajos para extender el modelo del *Subsite Capping Model* a otras desacetilasas y para el rediseño de los subsitios negativos dentro de la propia VcCDA.

En resumen, el trabajo aquí presentado no solo ha demostrado la capacidad del *Subsite Capping Model* como mecanismo definitorio de la preferencia de sustratos y del patrón de desacetilación de los miembros de la familia CE4, sino que además ha ejemplificado la potencia de la ingeniería de *loops* con el fin de la producción biotecnológica de oligosacáridos de quitosano con un patrón definido y a medida.

Capítulo 2.

Glicosintasas

11. Capítulo 2. Glicosintasas

Las glicosintasas se están imponiendo como unas muy eficientes herramientas enzimáticas capaces de sintetizar oligosacáridos, polisacáridos, glicoconjugados tanto naturales como artificiales. Sin embargo, no existen muchas herramientas que permitan analizar su actividad siguiendo una filosofía HTS para la aplicación de procesos de ingeniería enzimática mediante estrategias de evolución dirigida o semirracional. Habiéndose convertido los protocolos de edición del ADN y de generación de variabilidad casi en un elemento rutinario dentro de los laboratorios, el factor limitante es el método de cribado. Disponer de una metodología de cribado de bibliotecas de glicosintasas mutantes robusto, genérico, simple y eficiente era uno de los retos a superar en la ingeniería de glicosintasas. Disponer de estas herramientas permitirá expandir considerablemente el rango de sustratos utilizados y por consiguiente los productos obtenidos, optimizar actividades con el fin de aumentarla u obtener nuevas propiedades.

En este capítulo se desarrollan los siguientes objetivos:

1. Desarrollo y validación de una metodología de cribado HTS para bibliotecas de glicosintasas mutantes en procesos de evolución dirigida.
2. Aplicación del método HTS desarrollado en el cribado de una biblioteca de saturación del residuo nucleófilo en la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*.
3. Caracterización bioquímica de todos los mutantes que surjan de este cribado.
4. Realizar estudios mecanísticos con los nuevos mutantes con el fin de incrementar el conocimiento sobre la reacción glicosintasa.

Este capítulo se presenta en forma de dos artículos ya publicados sobre el trabajo realizado con la 1,3-1,4- β -glucanasa de *Bacillus licheniformis*. En el primer artículo se detalla el desarrollo y aplicación de un método de cribado de bibliotecas de glicosintasas mutantes basado en un sensor fluorescente de fluoruro para su aplicación en protocolos de evolución dirigida. Como resultado de la aplicación de esta metodología a una biblioteca de saturación del residuo nucleófilo (E134) de este enzima, además de los mutantes glicosintasa típicos, se obtuvo como resultado el mutante E134D. La similitud entre el residuo original (Glu) y el identificado en el ensayo (Asp) hacen que la actividad glicosintasa desarrollada sea sorprendente. El segundo artículo busca caracterizar e interpretar el mecanismo catalítico que permite que este mutante sea capaz de desarrollar un mecanismo catalítico de glicosintasa. Finalmente se concluye con una discusión general en la que se valora la significancia de los resultados.

11.1. Método HTS para el cribado de librerías de glicosintasas

Biochemical Journal, 458(2), 355-363, (2014)

Screening glycosynthase libraries with a fluoride chemosensor assay independent of enzyme specificity. Identification of a transitional hydrolase to synthase mutant.

Eduardo Andrés, Hugo Aragunde, Antoni Planas

Laboratory of Biochemistry, Institut Químic de Sarrià, Universitat Ramon Llull. 08017 Barcelona, Spain

Abstract

Glycosynthases have become efficient tools for the enzymatic synthesis of oligosaccharides, glycoconjugates and polysaccharides. Enzyme directed evolution approaches are applied to improve the performance of current (and new to come) glycosynthases and engineer specificity for non-natural substrates. However, simple and general screening methods are required since most of the reported assays are specific for each particular enzyme. We here report a general screening assay independent of the enzyme specificity, and implemented in HTS format for the screening of cell extracts in directed evolution experiments. Fluoride ion is a general by-product released in all glycosynthase reactions with glycosyl fluoride donors. The new assay is based on the use of a specific chemical sensor (a silyl ether of a fluorogenic methylumbelliferone) to transduce fluoride concentration into a fluorescence signal. As a proof-of-concept it has been applied to a nucleophile saturation mutant library of *Bacillus licheniformis* 1,3-1,4- β -glucanase. Beyond the expected mutations at the Glu (catalytic) nucleophile, other variants have shown to acquire glycosynthase activity. Surprisingly, an Asp for Glu replacement renders a highly active glycosynthase, but still retaining low hydrolase activity. It appears as an intermediate state between glycosyl hydrolase and glycosynthase.

Keywords

Glycosynthase, screening, fluoride sensor, directed evolution, β -glucanase, nucleophile mutant.

Introduction

Retaining glycosidases, through their ability to catalyze transglycosylation reactions, have found many synthetic applications for the preparation of oligosaccharides and glycoconjugates [1]. However, with exception of natural transglycosidases (which act by the same retaining glycosidase mechanism but with residual hydrolase activity in favor to transglycosylation activity), the use of retaining glycosidases for kinetically-controlled transglycosylation is severely hampered by the predominant hydrolase activity, where the product formed is necessarily a hydrolysable substrate of the enzyme.

The glycosynthase concept was introduced to overcome these limitations for the efficient enzymatic synthesis of oligosaccharides and glycoconjugates. Glycosynthases are engineered glycoside hydrolases in which replacement of the catalytic nucleophile renders an inactive hydrolase but they efficiently catalyze glycosyl transfer to an acceptor when using activated glycosyl fluoride donors with the opposite anomeric configuration than the original substrate of the parental wt hydrolase reaction (Figure 1a). Since the first reports in 1998 [2,3], retaining glycosidases from more than 12 different GH families (according to the CAZY database classification [4]) have been converted into glycosynthases. They cover different specificities and relevant applications have been developed (for reviews see [5-8]).

Expanding the proficiency of current glycosynthases towards novel specificities and improved efficiencies is a major goal in enzyme engineering. Main drawbacks of the glycosynthase technology are: 1) reactions catalyzed by glycosynthases are rather slow in comparison with their parental glycosidase activities (reduced k_{cat}), requiring large amount of enzymes and extended incubation times; 2) reaction conditions, with regard to temperature and pH, are restricted to those in which the activated glycosyl donors (glycosyl fluorides) are stable enough, often far from the conditions of optimal enzyme performance; 3) for many exo-glycosynthases, the synthase reaction is not highly regiospecific, often yielding mixtures of products with different glycosidic bonds; *endo*-glycosynthases, on the contrary, are often highly regiospecific; and 4) enzyme specificity limits the acceptance of modified donor and acceptor substrates to extend the application to non-naturals substrates.

Improving the performance of current (and new to come) glycosynthases with regard to the above drawbacks is being addressed by enzyme directed evolution approaches [9,10]. The success of these approaches not only depends on the strategy to create mutant libraries (random or focused libraries) but also depends on the selection or screening methodology for the property of interest. In particular, screening methods have to be implemented to allow for the analysis of large libraries with good sensitivity and robustness [11].

Few methods have been reported for the screening of directed evolution libraries of glycosynthases. Most methods rely on the detection of the product formed in the glycosynthase reaction: a) coupled enzyme assay in which the product formed by the glycosynthase is a substrate of another glycosidase which releases an easily detectable chromophoric aglycon (e.g. β -glucosidase from *Agrobacterium* [12]); b) ELISA-based assay where the acceptor is immobilized on a plate and the glycosynthase product detected by a specific antibody (e.g. *Rhodococcus sp.* *endo*-glycoceraminiidase [13,14]); and c) chemical complementation in which a yeast three-hybrid system is used to link glycosynthase activity to the transcription of a reporter gene making cell growth dependent on glycosynthase product formation (e.g. *Humicola insolens* cellulase 7B [15,16]). These methods have shown good screening capacity, yet at the price of a narrow applicability since they are specific for each enzyme. In the search of universal methods to screen glycosynthase activity, a pH-based assay has been recently developed taking advantage of the hydrofluoric acid released as byproduct of the glycosynthase reaction, which is detected by color change of a pH-indicator (e.g. β -xylosidase from *Geobacillus stearothermophilus* [17]). Although it is a general method, pH changes as the result of glycosynthase activity in culture plates and cell

extracts when screening a library are not very sensitive and difficult to implement due to matrix sample variations.

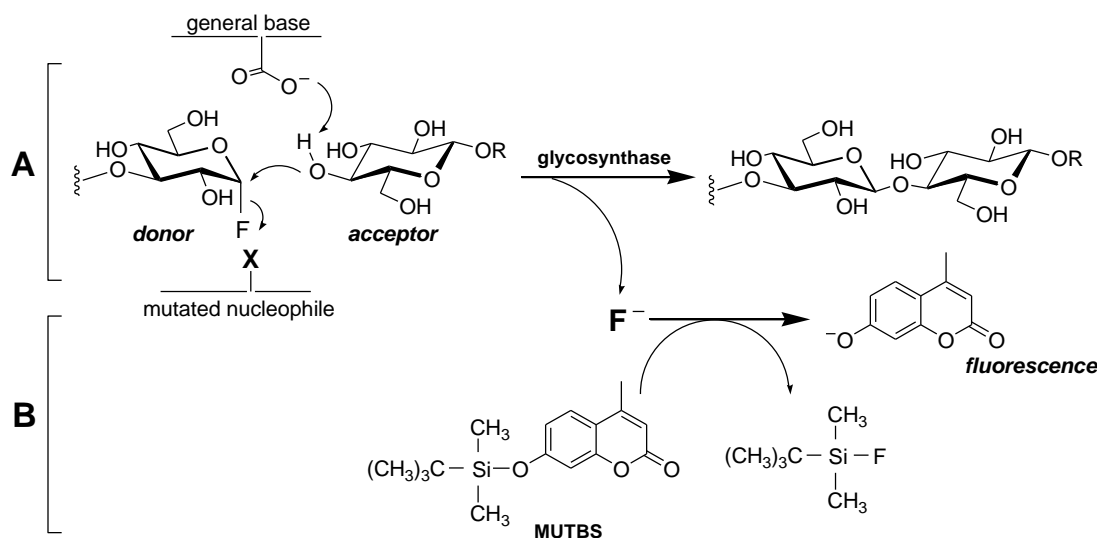


Figure 1 Fluoride chemosensor assay for monitoring glycosynthase reactions

A) Glycosynthase reaction between a glycosyl fluoride donor and an acceptor. X represents the replaced catalytic nucleophile by a non-catalytic residue that confers glycosynthase activity with a glycosyl fluoride donor of opposite anomeric configuration to that of the natural substrate of the wt hydrolase. B) Fluoride sensor reaction coupled to the release of F⁻ in the glycosynthase reaction.

Here we report a novel general assay independent of the enzyme specificity for the screening of glycosynthases based on the quantification of the fluoride ion released as byproduct in all glycosynthase reactions with glycosyl fluoride donors (Figure 1). It is based on the use of a specific chemical sensor to transduce fluoride concentration into a fluorescence signal which enables the quantification of glycosynthase activity. To implement the concept, we first selected an appropriate “fluoride sensor” compatible with HTS of glycosynthase reactions with cell extracts expressing the enzyme variants to be analyzed. Relevant classes of fluorescent fluoride chemosensors reported for analytical applications include amine coordination fluorophores (by intramolecular charge transfer (ICT)) [18,19], boron coordination compounds (in boron-containing π -systems) [20-22], and silyl ethers of fluorogenic alcohols [23-27]. We selected the latter class since they can be utilized in aqueous solutions, a stable Si-F bond is formed resulting in a stable signal, and they are highly specific not to expect interferences when used with cell extracts. As a proof-of-concept, the HTS method was validated and applied to the screening of a nucleophile saturation mutant library of *Bacillus licheniformis* 1,3-1,4- β -glucanase. It is an *endo*-glycosidase that hydrolases mixed-linked 1,3-1,4- β -glucans (such as barley β -glucan and liquenan). Glycosynthase variants of this enzyme have been characterized and used in oligosaccharide synthesis [28-31]. More recently, they have shown to be efficient catalysts for the preparation of artificial polysaccharides with regular structures through glycosynthase-catalyzed donor selfcondensation [19], but improved glycosynthase variants are required to reach high molecular mass polysaccharides. The screening assay applied to a nucleophile library has identified an unexpected mutation with glycosynthase activity. As implemented, the here reported fluoride sensor screening assay is of general application for further evolution experiments addressed to engineer new specificities and highly active glycosynthases.

Experimental

Chemicals

4-Methylumbelliferone (MU) was from Fluka, *tert*-butyldimethylsilyl chloride and *p*-nitrophenyl β -D-glucopyranoside (Glc-pNP) were from Sigma-Aldrich,. The fluoride sensor 4-methylumbelliferyl *tert*-butyldimethylsilyl ether (MUTBS) was prepared as described in [24]. α -Laminaribiosyl fluoride (Glc β 3Glc α F) and β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -D-glucopyranosyl fluoride (Glc β 4Glc β 3Glc α F) were prepared as previously reported [33].

Nucleophile saturation mutagenesis library generation

Saturation mutagenesis libraries of *Bgl* nucleophile position were prepared using the gene encoding for wt 1,3-1,4- β -glucanase in a pET16b vector [34], and partially overlapping oligonucleotides containing NNK degenerated codon for E134 codon: 5'- TGG GAT NNK ATC GAC ATC GAA TTT CTA GG-3' and 5'- AT GTC GAT MNN ATC CCA AGG CGT ACC-3', following a modified QuickChange protocol with extended primers [35]. The mutagenesis reaction was directly used to transform electrocompetent BL21 Star *E.coli* cells. 168 colonies were replated on LB (50 mg/L ampicillin) and used to inoculate 96-deepwell plates containing 1.4 ml LB (50 mg/L ampicillin). Library growth was carried out in deepwell plates for 24 h at 37°C, 150 rpm in orbital shaker. The final cultures were centrifuged, the supernatants discarded, and cell pellets were resuspended in 200 μ l LB medium containing 50 mg/ml ampicillin and 15% glycerol. These were then transferred to new 96-well microplates for storage at -80°C to be used as inoculum.

Fluoride sensor assay.

The assay to quantify the fluoride ion released in the glycosynthase reaction is based on the fluoride sensor MUTBS [24] under conditions adapted for polystyrene microplates and conditions compatible for HTS implementation of glycosynthase reactions using cell extracts.

Reaction conditions were set with fluoride standards. A solution of potassium fluoride (0-500 μ M) in 50 mM phosphate buffer pH 7.0 was mixed with a MUTBS sensor (0.5 or 1 mM) in DMF at a 95:5 to 75:25 ratios (final volume 100 μ L), and let react for 40 min at 25°C. Then, 100 μ L of NH₃/NH₄Cl buffer (0.5M, pH 9.4) was added, and the fluorescence measured at λ_{ex} 365 nm, λ_{em} 460 nm in a microplate reader. The corresponding blank fluorescence (F_0 , at 0 mM fluoride) was subtracted from each measurement to give ($F-F_0$) which was plotted against fluoride concentration in the reaction. Reaction time with the sensor was assessed with a 300 μ M fluoride solution following the same procedure as above, at 90:10 (v/v) fluoride to MUTBS solutions, and stopping the reaction at different time intervals (0 to 120 min).

Final fluoride sensor assay conditions were as follows: 30 μ L of 0.5 mM MUTBS in DMF/water 1:1 were added to 120 μ L fluoride solutions (standards or glycosynthase reactions), and the mixtures incubated for 40 min at 25°C. Then, 50 μ L NH₃/NH₄Cl buffer (0.5M, pH 9.4) were added and the fluorescence was measured at λ_{ex} 365 nm, λ_{em} 460 nm. A standard curve ($F-F_0$) vs. $[F^-]$ (μ M) was determined (3 repetitions) to validate the procedure.

Library expression and screening.

Deep well microplates containing 1.4 ml LB (supplemented with 50 mg/L ampicillin and 2% glucose) were inoculated with 20 μ l of the -80°C glycerol stock library. Each microplate contained 84 clones, two replicas of negative controls (pET16b and pET16b-Bgl), and eight wells were reserved for fluoride standards and glycosyl fluoride donor substrate control. This plate design was maintained along all of the cell growth and analysis procedures. Plates were sealed with a gas-permeable film and incubated for 8 h at 37°C in an orbital shaker at 150 rpm. Once growth reached late exponential phase, growth medium was changed to 1.4 ml LB (containing 50 mg/L ampicillin and 1 mM IPTG) to induce expression, and cells grown overnight at 25°C. Overnight cultures were rinsed once with 0.9% NaCl solution, and lysed by ten consecutive freeze/thaw cycles (2 min at -80°C followed by 8 min at 4°C) followed by toluene permeabilization of the cellular pellet in 150 μ l reaction buffer (50 mM phosphate buffer pH7.0, 0.1 mM CaCl₂, 3% toluene). After 30 min incubation at 4°C, microplates were centrifuged for 1h and 3000 rpm and 120 μ l of supernatant was recovered for each well. Glycosynthase reactions were done in a new microplate. 60 μ l of the lysate supernatant containing each mutant were mixed with 60 μ l of glycosyl fluoride in 50 mM phosphate buffer pH 7.0 to give a final 1.5 mM substrate concentration. Microplates were sealed and incubated for different times at 30°C. Next, 30 μ l of 0.5 M MUTBS solution DMF/water (1:1) were added. Microplates were further incubated for 40 min protected from light at room temperature. After addition of 50 μ l NH₃/NH₄Cl buffer (0.5 M, pH 9.4), fluorescence was measured at λ_{ex} 365 nm, λ_{em} 460 nm. Fluoride concentrations were calculated by interpolation into a fluoride standard curve (0-500 μ M) included in each microplate.

Expression and purification of glycosynthase mutants

Positive hits from the above screening were sequenced and were recovered from the -80°C library stock for preparative expression and purification. A 3-mL culture (LB medium, 100 mg/mL ampicillin, 2% glucose) was inoculated with the corresponding glycerol stock and incubated overnight at 37°C. This was then used to inoculate 200 mL LB medium (100 mg/mL ampicillin, 2% glucose) which was incubated for 8 h at 37°C and 250 rpm until late exponential phase. The medium was changed to 200 mL LB containing 1 mM IPTG and 100 mg/mL ampicillin for protein expression (16 h at 25°C). Cells were harvest by centrifugation, rinsed with 200 mL NaCl 0.9%, and resuspended in 50 mL phosphate buffer 50 mM, pH 7.0, 0.1 mM CaCl₂. Proteins were purified essentially as reported for the WT enzyme by means of metal affinity chromatography of the His-tagged proteins [34]. Cells were lysed by sonication and centrifuged at 12,000 rpm. The supernatant was loaded onto a HiTrap 1 ml column (GE Healthcare) previously equilibrated with loading buffer (50 mM phosphate pH 7.0, 0.1 mM CaCl₂). The column was rinsed to remove unbound proteins and then eluted with a gradient of 0.5 M imidazole in 50 mM phosphate pH 7.0, 0.1 mM CaCl₂. Protein fractions were dialyzed twice against 50 mM phosphate pH 7.0, 0.1 mM CaCl₂, followed by a last dialysis against water. Proteins were lyophilized for storage, and redissolved in 50 mM phosphate pH 7.0, 0.1 mM CaCl₂ prior to use. Enzymes were >95% homogeneous as judged by SDS-PAGE. Concentration was determined by absorbance at 280 nm using an extinction coefficient of $3.53 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [36].

Enzyme kinetics of the glycosynthase variants

a) *Glycosynthase activity.*- Kinetic parameters for glycosynthase activity were determined with Glc β 4Glc3Glc α F as donor and Glc-pNP as acceptor substrates [36]. Reactions were prepared in microplates by mixing 20 mM Glc-pNP (saturating) and varying concentrations of Glc β 4Glc3Glc α F donor (0-8 mM) in 50 mM phosphate buffer pH 7.0, 0.1 mM CaCl₂, and initiated by adding the enzyme (0.5 μ M) in a final 200 μ L volume. Reactions were incubated at 35°C with shaking. At different time intervals, 20 μ L aliquots were withdrawn and added to 180 μ L formic acid (2%) in a new microplate. These samples were analyzed by HPLC (Agilent HPLC 1100 chromatograph) in a Novapack C-18 column (4,9x150 mm, 4 μ m, Waters) with isocratic elution with water/methanol (87:13) at 45°C and UV detection at 300 nm. Product was quantified by interpolation of peak areas on an external Glc-pNP standard curve. Initial rates were calculated as the slope of product concentration vs. time. Kinetic parameters (k_{cat} and K_M for the donor substrate) were determined by fitting initial rates vs. donor concentration to the Michaelis-Menten equation by non-linear regression with FigP[®] software.

Donor hydrolysis was analyzed by thin layer chromatography (TLC) on Silica plates (Silicagel 60 F₂₅₄, Merck Millipore) eluted with acetonitrile/water 7:3.

The pH dependence of the glycosynthases activity was determined from k_{cat}/K_M values at different pHs. Reactions were done as above in 50 mM phosphate, 50 mM citrate buffer, 0.1 mM CaCl₂, and constant ionic strength of 0.5 M with added KCl, adjusted to different pH values in the range of 5 to 7 (at pH>7.5, the solution becomes cloudy due to protein precipitation). k_{cat}/K_M vs. pH data were adjusted to a single ionization curve for base catalysis (eq. 1) by non-linear regression with FigP[®] software.

$$\frac{k_{cat}}{K_M} = \frac{A}{1+10^{(pK_a-pH)}} \quad \text{eq. 1}$$

b) *Hydrolase activity.*- Specific activities for hydrolysis of the chromogenic substrate Glc β 4Glc3Glc β MU (4-methylumbelliferyl β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranoside) were evaluated as reported for wt 1,3-1,4- β -glucanase [37]. Kinetics were performed by following changes in UV absorbance due to the release of 4-methylumbelliferone in an Evolution 300 spectrophotometer (Thermo Scientific). Rates of the enzyme-catalyzed hydrolyses were determined by incubating Glc β 4Glc3Glc β MU substrate (5 mM final concentration) in citrate-phosphate buffer (6.5 mM citric acid, 87 mM Na₂HPO₄) pH 7.2, 0.1 mM CaCl₂ for 5 min in the thermostated cell holder at 55°C. Reactions were initiated by the addition of the enzyme (0.1-1 μ M) and monitoring the absorbance change at λ 365 nm ($\Delta\epsilon = 5440 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). Specific activities were expressed as $v_0/[E]$ (s^{-1}).

The pH profile of the hydrolase activity was performed by determining v_0 at 1mM Glc β 4Glc3Glc β MU substrate in the pH range 5 to 7, in 50 mM phosphate, 50 mM citrate buffer, 0.1 mM CaCl₂, and constant ionic strength of 0.5 M with added KCl. The molar extinction coefficient of 4-methylumbelliferone was determined under the same conditions at each pH. Data were adjusted to a single ionization curve for acid catalysis (eq. 2) by non-linear regression with FigP[®] software.

$$\frac{v_0}{[E]} = \frac{A}{1+10^{(pH-pK_a)}} \quad \text{eq. 2}$$

Results and Discussion

1.- The fluoride sensor assay

The principle of the assay is to transduce the fluoride ion released in the glycosynthase reaction into a fluorescence signal. The selected fluoride sensor consists of a silyl ether of a fluorogenic coumarin, which reacts with the fluoride ion to form a stable Si-F bond with release of the fluorescent probe (Figure 1b). 4-MUTBS (4-methylumbellyferyl *tert*-butyldimethylsilyl ether) has been reported for the quantification of F⁻ in toothpaste and tap water samples [24]. The original protocol used acetone as organic cosolvent to enhance the nucleophilicity of F⁻ in the aqueous sample, but the high acetone content (70%) is not appropriate for HTS implementation. Using a set of standard fluoride solutions in the same buffer and concentration range to be used in the glycosynthase activity assays (0-500 μM F⁻ in 50 mM phosphate buffer, pH 7.0), other cosolvents were assayed and reaction conditions were optimized. DMF at 10% in aqueous solution proved to give best results. With the optimized protocol (see *Experimental*) a standard curve (F-F₀) vs. [F⁻] was established (Figure 2a). The response was proportional up to 500 μM fluoride with a variation coefficient < 5% at 500 μM and 15% at 25 μM, and the quantification limit was determined to be approximately 10 μM.

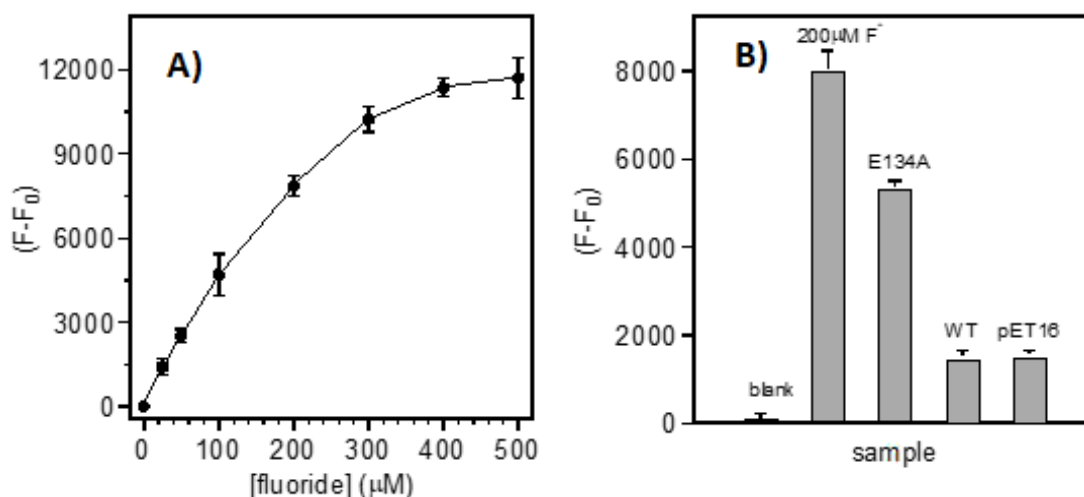


Figure 2 Set-up of the fluoride chemosensor assay with positive and negative controls

A) Fluoride standard curve with the fluoride sensor MUTBS. Sensor reaction in 10% DMF in phosphate buffer, pH 7.0. B) Positive and negative controls for the full procedure of glycosynthase activity assay with the fluoride sensor. Fluoride standards: blank (0 μM), 200 μM F⁻, glycosynthase reactions: E134A (positive), wt (negative), pET16 (negative). Z-factor (fluoride standards) = 0.72, Z'-factor (E134S vs. wt) = 0.64.

2.- Developing the assay for glycosynthase activity

The enzyme here used to develop the proof-of-concept of the glycosynthase HTS assay is a *B. licheniformis* 1,3-1,4-β-glucanase. The enzyme is intracellularly expressed in recombinant *E. coli* cells harboring the pET16b-*bgl* plasmid [34]. The expression set-up in deepwell microplates was

first optimized with the wild-type enzyme. Best condition were induction after 8h growth at 37°C and expression at 25°C for 16h, followed by freeze/thaw cycles combined with membrane cell permeation with added toluene [38] to release the intracellular enzyme. These conditions were then used in the glycosynthases screening assay.

Next, the screening assay was validated with an inactive and an active glycosynthase enzymes as control references. Cells containing an empty plasmid (pET16b), the plasmid encoding for the wt enzyme (pET16b-*bgl*, template for mutant library generation), and a plasmid expressing a known glycosynthase mutant (pET16-*bgl*-E134A) were subjected to the full screening assay: protein expression, cell lysis, glycosynthase reaction, fluoride sensor assay, and fluorescence measurement.

E. coli cells harboring the corresponding plasmids were grown, induced for protein expression, and lysed. Glycosynthase activity was evaluated with α -laminaribiosyl fluoride as substrate, which is known to act as donor and acceptor in self-condensation reactions with the E134A glycosynthase mutant of 1,3-1,4- β -glucanase [33]. Equal volumes of the clarified cell lysate containing the enzyme and substrate solution in reaction buffer (final 1.5 mM concentration in 50 mM phosphate pH 7.0, 0.1 mM CaCl₂) were incubated at 30°C. The fluoride released by the glycosynthase reactions and fluoride standards (0 and 200 μ M) were then quantified by the fluoride sensor as described above. Results are summarized in Figure 2b, in which mean fluorescence values (as F-F₀) and standard deviations for each sample (n=8 repetitions) are given. Visual inspection clearly shows good discrimination between positive and negative samples. The quality of the method in HTS assays is often expressed by Z-factors defined as in eq. 3 [39]:

$$Z = 1 - \frac{3\sigma_+ + 3\sigma_-}{|\mu_+ - \mu_-|} \quad \text{eq. 3}$$

Where μ is the mean signal value ((F-F₀) in this case) for positive (+) and negative (-) levels, and σ_+ and σ_- are their corresponding standard deviations. The intrinsic Z-factor applies to the sensor reaction (standard fluoride solutions at 0 and 200 μ M as negative and positive levels, respectively), and the Z'-factor evaluates the quality of the overall process of library screening. *E. coli* cells harboring the empty vector (pET16b) and the vector expressing the wt enzyme (pET16b-*Bgl*) are taken as negative levels, whereas cells expressing a glycosynthase mutant (pET16-*Bgl*-E134A) are the positive level. For the fluoride standards, the Z-factor was 0.72, whereas for enzyme samples were Z' = 0.69 (glycosynthase mutant vs. empty plasmid) or Z' = 0.64 (glycosynthase mutant vs. wt glucanase). These values indicate a good discrimination between negative and positive hits [39]. The variation coefficients for (F-F₀) values are lower than 5% for all samples, which is a low variability considering the number of steps involved in the overall assay. This complies with a reliable method for the screening of glycosynthase activities implemented in an HTS format.

3.- Saturation mutagenesis library at position 134 of 1,3-1,4- β -glucanase

Mutation of the catalytic nucleophile Glu134 of 1,3-1,4- β -glucanase to Ala, Gly, or Ser residues renders a glycosynthase [33]. As a proof-of-concept of the screening assay, and to search for any other possible nucleophile mutant with glycosynthase activity in our target enzyme, a saturation

mutagenesis library at the nucleophile residue was prepared. Mutagenesis used the gene encoding for the wt (hydrolase) enzyme as template and partially overlapping oligonucleotides containing a NNK degenerated codon. 168 clones were taken into two 96-well microplates. The library was screened according to the validated protocol (see *Experimental*). The final fluorescence measured in each well was converted to fluoride concentration by means of the fluoride standards included in each plate. Results are shown in Figure 3, in which R-factor= $([F^-]-[F^-]_0)/[F^-]_0$ for each clone are presented, where $[F^-]$ is the fluoride concentration of a given clone and $[F^-]_0$ is the fluoride concentration of the negative control (the one with the highest signal of pET16b or pET16b-bgl). Two clusters are clearly segregated: those clones with R-factor around 0, corresponding to negative clones, and those with R-factor >1.5. The 30 positives (out of 168 clones) were recovered, and plasmid DNA sequenced. Mutations found in the positive clones were Ser, Ala, Gly, Cys, Thr, and Asp (Table 1). The first three (Ser, Ala, Gly) were already known glycosynthase variants for this enzyme, and are the common amino acid substitutions reported for glycosynthases, where their relative glycosynthase activity depends on the particular enzyme [6]. Cys mutant was not previously known as having glycosynthase activity for 1,3-1,4- β -glucanase, but it has been reported as a glycosynthase mutation in few other enzymes [40]. Interestingly two new amino acid substitutions have shown here to render active glycosynthases: Thr, which is a reasonable substitution similar to Ser, and Asp which was fully unexpected.

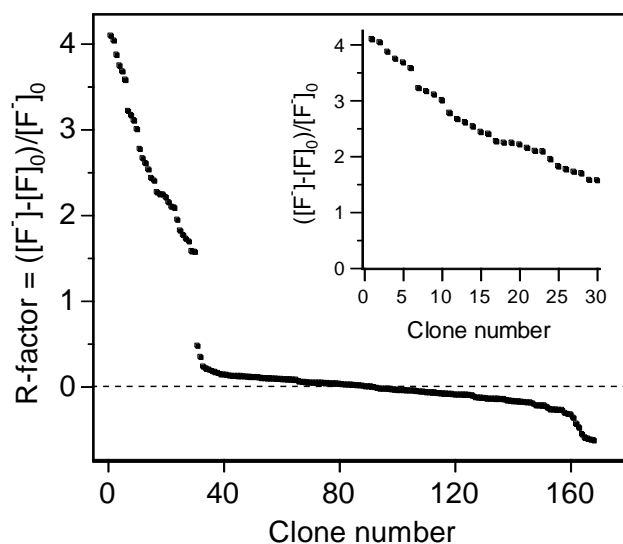


Figure 3 Library screening with the fluoride sensor for screening

Screening results of the saturation E134X mutant library, representing R-factor (normalized fluoride concentration) for all clones in the library (168 clones). Inset: Positive hits with R-factor > 1.5. Clone axes: clone number ordered by R-factor.

To assess that positive hits were true glycosynthases and that the activity observed as fluoride release was not due to hydrolysis of the donor substrate (although not expected due to the α -fluoride configuration, opposite to the normal substrate for hydrolysis by the wt β -glycosidase), one clone of each mutation was expressed and purified for enzyme characterization. For general application with larger libraries (*i.e.* coming from random libraries), a secondary screening can be included to discard mutants with high hydrolase activity on the α -glycosyl fluoride donor (*e.g.* by a reducing sugar assay) before proceeding with the characterization of the positive glycosynthase mutants.

Aa	# Clones	Codons found	Codons in NNK*
Ser	6	1xAGT, 2xTCG, 3xTCT	3
Ala	4	1xGCG, 3xGCT	2
Thr	8	5xACT, 3xACG	2
Gly	3	3xGGT	2
Asp	5	5xGAT	1
Cys	1	1xTGT	1
n.d.	3	--	-

Table 1 Positive hits for glycosynthase activity from the saturation library at position 134

* The number of codons for each amino acid in an NNK codon degeneracy. Mutants found cover all codons (except for Gly) showing good quality of the library. N.d. sequence not determined

4.- Characterization of positive glycosynthase hits

The six hits (E134A, E134S, E134T, E134C, E134G, E134D) were grown in 200 mL scale. Glucanase mutants were expressed and purified by affinity chromatography as reported for E134S [34]. Their glycosynthase activities were determined with Glc β 4Glc3Glc α F as donor and Glc-pNP as acceptor substrates at pH 7.0, 35°C, monitoring product formation by HPLC. In all cases a time-dependent formation of the condensation product was observed, and no donor hydrolysis was detected (TLC). Hydrolase activity with the chromogenic substrate Glc β 4Glc3Glc β MU was also evaluated to detect any residual β -glycosidase activity of the mutant variants.

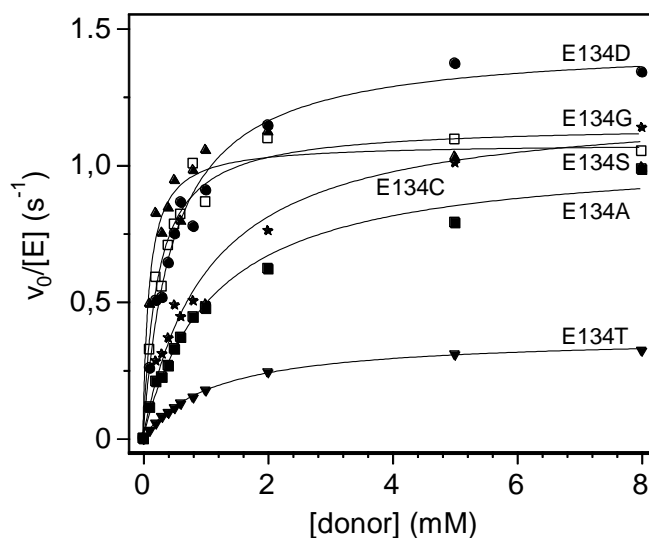


Figure 4 Kinetics of the glycosynthase variants

Conditions: 0-8 mM donor (Glc β 4Glc β 3Glc α F), 20 mM acceptor (Glc-pNP), 0.5 μ M enzyme, 50 mM phosphate pH 7.0, 0.1 mM CaCl₂, 35°C.

Mutant	k_{cat} (s^{-1})	$K_{M,donor}$ (mM)	$(k_{cat}/K_{M})_{donor}$ ($M^{-1}s^{-1}$)	% k_{cat}	% k_{cat}/K_{M}
E134S	1.08 ± 0.04	0.10 ± 0.02	$1.08 \cdot 10^4$	75	100
E134G	1.15 ± 0.05	0.23 ± 0.03	$4.92 \cdot 10^3$	80	46
E134D	1.44 ± 0.05	0.49 ± 0.05	$2.95 \cdot 10^3$	100	27
E134C	1.22 ± 0.07	1.03 ± 0.15	$1.19 \cdot 10^3$	85	11
E134A	1.04 ± 0.04	1.12 ± 0.12	$9.27 \cdot 10^2$	72	9
E134T	0.374 ± 0.003	1.14 ± 0.03	$3.29 \cdot 10^2$	26	3

Table 2 Kinetic parameter for the glycosynthase mutants

Conditions: 0-8 mM donor (Glc β 4Glc β 3Glc α F), 20 mM acceptor (Glc-pNP), 0.5 μ M enzyme, 50 mM phosphate pH 7.0, 0.1 mM CaCl₂, 35°C.

Glycosynthase kinetics are plotted in Figure 4 and kinetic parameters summarized in Table 2. In terms of k_{cat}/K_M values, the Ser mutant is the most efficient glycosynthase, mainly due to its low K_M for the donor substrate, followed by Gly, Asp, Cys, Ala, and Thr mutants. But comparing k_{cat} values, E134D is the most active. Nucleophile mutations to Ser, Ala, and Gly were already known glycosynthases for 1,3-1,4- β -glucanase [3,33]. The Cys mutant also behaves as a glycosynthase as observed in other enzymes, and the Thr mutant (to our knowledge a mutation not reported for other glycosynthases) is also active but having the lowest activity. But the Asp mutant was not expected to have glycosynthase activity. This is a surprising result since it is a conservative substitution of the wild-type glutamate acting as nucleophile in the hydrolase reaction catalyzed by the wt enzyme. When testing the hydrolase activity with a β -glycoside substrate (Glc β 4Glc β 3Glc β MU), all mutants gave no detectable activity except E134D, which retained 2% of wt activity. Shortening the side chain of the nucleophile residue (Glu to Asp) was already known to decrease significantly the hydrolase activity of β -glycosidases (e.g. lacZ β -galactosidase [41], *Agrobacterium* β -glucosidase [42], *B. circulans* xylanase [43]).

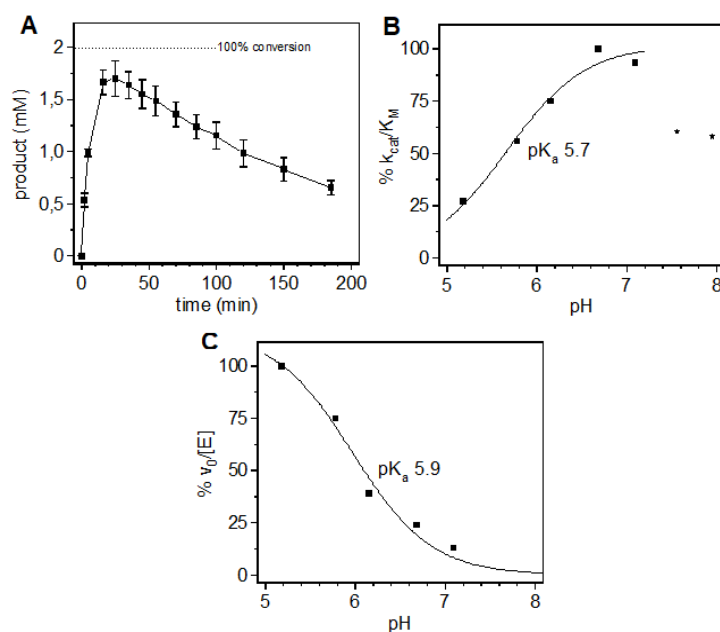


Figure 5 Time-course and pH dependence of the reactions catalyzed by the E134D mutant

A) Time-course monitoring of the glycosynthase reaction catalyzed by the E134D mutant (2 mM Glc β 4Glc β 3Glc α F donor + 20 mM Glcp-NP acceptor, 2 μ M E134D enzyme, pH 7.0, 35°C). B) pH dependence of $(k_{cat}/K_M)_{donor}$ for the glycosynthase activity of E134D.

The glycosynthase reaction of E134D was monitored during long incubation times. As shown in Figure 5a, the condensation product was rapidly formed up to 90% conversion, but then slowly hydrolyzed upon long incubation. Therefore, E134D can be seen as a transitional mutant between hydrolase and synthase activities.

5.- The E134D nucleophile mutant is an intermediate between hydrolase and glycosynthase

Based on the 3D structure of the enzyme/product complex of the hydrolase reaction [44] and our theoretical calculations on the hydrolase mechanism of the 1,3-1,4- β -glucanase [45], the glycosynthase mutants with bound α -glycosyl fluoride substrate were modeled in an attempt to rationalize the results here obtained (Figure 6). Whereas a β -glycoside substrate binds with a 1S_3 distorted conformation in the Michaelis complex with the wt enzyme (preactivated conformation for catalysis in the hydrolase mechanism [46,47]), the α -glycosyl fluoride donor in the glycosynthase mutants remains in a chair (4C_1) conformation (as recently observed in the X-ray 3D structures of glycosynthase mutants of rice BGl1 [48]). The shorter side chain of the mutants at position 134 relative to the wild-type creates a cavity that accommodates the fluoride aglycon with α -configuration. For the Ser mutant (Figure 6a), the hydroxyl oxygen is at approximately 4.3 Å of the fluoride atom, with an orientation that may allow for a weak hydrogen bonding interaction to assist the departure of the fluoride aglycon in the S_N2 displacement reaction by the acceptor. This rationale has also been given to explain the higher activity of Ser mutants as compared to Ala or Gly mutants in other glycosynthases [49,50]. Additionally, the occurrence of this H-bond R-F \cdots H-O-Ser will result in better binding, which is in agreement with the lower K_M (donor) observed for the E134S mutant.

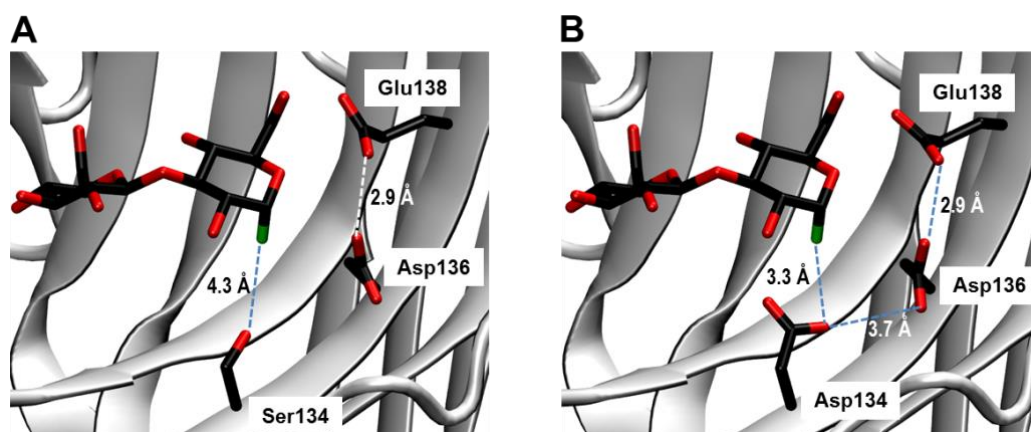


Figure 6 E134S and E134D modeled structures

Modeled structure of enzyme-donor complexes for E134S and E134D mutant 1,3-1,4- β -glucanases with α -laminaribiosyl fluoride donor.

An essential aspect of the glycosynthase mechanism is the need of a deprotonated carboxylate to act as a general base to activate the acceptor substrate (Figure 1). In the wt 1,3-1,4- β -glucanase, Glu138 is the general acid (with a pK_a 7.2) in the first step leading to the covalent glycosyl-enzyme intermediate in the hydrolase mechanism [3]. This high pK_a is in part due to the presence of the negatively charged catalytic nucleophile Glu134 which destabilizes the conjugate base of Glu138. It drops in the glycosyl-enzyme intermediate due to neutralization of the negative charge in the

covalent complex allowing Glu138 to act as a general base in the deglycosylation step leading to the hydrolysis product [51]. In the glycosynthase mechanism catalyzed by the original E134A mutant, Glu138 has a lower pK_a of 5.2 [36] because of the Ala for Glu134 replacement. The same concept applies for the other glycosynthase variants having a neutral residue in the position of the original nucleophile. But the here identified E134D mutation is at least surprising. To explain that the mutant E134D behaves as a glycosynthase, Glu138 should also be able to act as a base. The E134D mutant shows a pH dependence corresponding to general base catalysis, with a kinetic pK_a (on k_{cat}/K_M) of 5.7 and maximum activity at pH 7 (Figure 5b). At pH values higher than 7.5 the protein is less stable and precipitates, precluding kinetic measurements. The observed pK_a is similar to that previously obtained with the original E134A glycosynthase mutant of 1,3-1,4- β -glucanase ($pK_a = 5.2$), which corresponds to Glu138 acting as general base (as assigned in the E134A mutant by titration with a water-soluble carbodiimide) [36]. This is also consistent with the pH profile of the residual hydrolase activity of the mutant with a β -glycoside substrate (Figure 5c), where the hydrolase activity decreases with pH, with a pK_a value of 5.9, assigned to Glu138 as general acid (pK_a 7.2 in the wt enzyme).

Possible reasons for the low pK_a of Glu138 in the E134D mutant are that the longer distance between the carboxylates reduces the electrostatic effect of the negatively charged Asp134, or that the carboxylate of Glu138 is stabilized by a H-bonding interaction with Asp136, a third auxiliary residue of the so called catalytic triad in family GH16 which participates in modulating the pK_a s of the catalytic residues. The latter is consistent with the observed X-ray structures of the free wt enzyme (Asp136 is hydrogen bonding with Glu134), of a covalent enzyme-ligand complex (Asp136 has been rearranged and hydrogen bonds with Glu138), and of an enzyme-product complex (where Asp136 occupies an intermediate position) [52]. Therefore, it is reasonable in the E134D glycosynthase that, even with Asp134 being deprotonated, the carboxylate of Glu138 might be stabilized by Asp136, thus being able to act as a base (Figure 6b). Another possible effect is the partial shielding of the negative charge of Asp134 by an halogen bonding interaction with the fluorine atom of the glycosyl donor in the enzyme-substrate complex. Although this interaction might be very weak with fluoride (more significant for heavier halogens), the modeled structure in Figure 6b proposes a distance F \cdots O of 3.3 Å and a C1-F \cdots O angle of $\approx 160^\circ$ that perfectly fit the average geometry of halogen bonding interactions found in protein-ligand complexes [53]. Work is in progress to get a deeper understanding on the mechanism of the different glycosynthase variants, and explain the efficiency of the E134D mutant.

Conclusions

The here reported glycosynthase screening assay based on a chemical fluoride sensor is a general method applicable to any glycosynthase with a glycosyl fluoride donor. It is independent of the substrate specificity of the particular enzyme since it is based on the detection and quantification of the fluoride ion released, which is a general by-product in the reaction. There are two main objectives in evolving a glycosynthase: modify substrate specificity to accept a non-natural (or modified) substrate, and improve the efficiency of a given glycosynthase reaction. In the first case, a glycosynthase mutant active on its “natural” substrate and inactive on the new “non-natural” substrate will be the negative control and template for evolution. The assay as here implemented will identify positive variants with glycosynthase activity. In the second case, an

active glycosynthase with the substrate to be used in the screening is the initial template for evolution, and therefore the parameter to be evaluated is the increase of glycosynthase activity. The assay as reported allows for two variables to be adjusted to different levels of activity: reduce the amount of enzyme in the glycosynthase reaction and/or reduce the incubation time so that to bring the initial glycosynthase template to a negative level for the fluoride sensor assay. The sensitivity window is therefore shifted to detect more active glycosynthase variants.

Application of the screening assay to a nucleophile saturation library of 1,3-1,4- β -glucanase has identified, in addition to the known Ala, Ser, and Gly mutations, two new variants, Thr and Asp. The E134D mutant was an unexpected glycosynthase with improved k_{cat} value, but still with residual hydrolase activity. It appears as an intermediate state between hydrolase and glycosynthase for which further studies will contribute to decipher the fine tuning of active site pK_a values in the glycosynthase mechanism.

Acknowledgements

This work was supported in part by the Ministry of Economy and Competitiveness, Spain, Grant BFU2010-22209-C02-02. H.A. acknowledges a predoctoral fellowship from Generalitat de Catalunya. We thank Dr. Xevi Biarnés for modeling studies, and Estela Castilla for pH studies of the E134D mutant.

References

- 1 Wang, L. and Huang, W. (2009) Enzymatic transglycosylation for glycoconjugate synthesis. *Curr.Opin.Chem.Biol.* **13**, 592-600
- 2 Mackenzie, L. F., Wang, Q., Warren, R. A. J., and Withers, S. G. (1998) Glycosynthases: Mutant glycosidases for oligosaccharide synthesis. *J.Am.Chem.Soc.* **120**, 5583-5584
- 3 Malet, C. and Planas, A. (1998) From β -glucanase to β -glucansynthase: glycosyl transfer to α -glycosyl fluorides catalyzed by a mutant endoglucanase lacking its catalytic nucleophile. *FEBS Lett.* **440**, 208-212
- 4 Coutinho, P. M. and Henrissat, B. (1999) Carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach. In *Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering* (Gilbert, H. J., Davies, G. J., Henrissat, B., and Svensson, B., eds.), pp. 3-12, The Royal Society of Chemistry, Cambridge
- 5 Perugino, G., Trincone, A., Rossi, M., and Moracci, M. (2004) Oligosaccharide synthesis by glycosynthases. *Trends Biotechnol.* **22**, 31-37
- 6 Faijes, M. and Planas, A. (2007) *In vitro* synthesis of artificial polysaccharides by glycosidases and glycosynthases. *Carbohydr.Res.* **342**, 1581-1594

- 7 Shaikh, F. A. and Withers, S. G. (2008) Teaching old enzymes new tricks: engineering and evolution of glycosidases and glycosyl transferases for improved glycoside synthesis. *Biochem.Cell Biol.* **86**, 169-177
- 8 Cobucci-Ponzano, B., Perugino, G., Strazzulli, A., Rossi, M., and Moracci, M. (2012) Thermophilic glycosynthases for oligosaccharides synthesis. *Methods Enzymol.* **510**, 273-300
- 9 Leemhuis, H., Kelly, R. M., and Dijkhuizen, L. (2009) Directed evolution of enzymes: Library screening strategies. *IUBMB.Life.* **61**, 222-228
- 10 Kittl, R. and Withers, S. G. (2010) New approaches to enzymatic glycoside synthesis through directed evolution. *Carbohydr.Res.* **345**, 1272-1279
- 11 Turner, N. J. (2009) Directed evolution drives the next generation of biocatalysts. *Nat.Chem.Biol.* **5**, 567-573
- 12 Kim, Y. W., Lee, S. S., Warren, R. A., and Withers, S. G. (2004) Directed evolution of a glycosynthase from *Agrobacterium* sp. increases its catalytic activity dramatically and expands its substrate repertoire. *J.Biol.Chem.* **279**, 42787-42793
- 13 Hancock, S. M., Tarling, C. A., and Withers, S. G. (2008) High-throughput screening of cell lysates for ganglioside synthesis. *Anal.Biochem.* **382**, 48-54
- 14 Hancock, S. M., Rich, J. R., Caines, M. E., Strynadka, N. C., and Withers, S. G. (2009) Designer enzymes for glycosphingolipid synthesis by directed evolution. *Nat.Chem.Biol.* **5**, 508-514
- 15 Lin, H., Tao, H., and Cornish, V. W. (2004) Directed evolution of a glycosynthase via chemical complementation. *J.Am.Chem.Soc.* **126**, 15051-15059
- 16 Tao, H., Peralta-Yahya, P., Decatur, J., and Cornish, V. W. (2008) Characterization of a new glycosynthase cloned by using chemical complementation. *ChemBioChem.* **9**, 681-684
- 17 Ben-David, A., Shoham, G., and Shoham, Y. (2008) A universal screening assay for glycosynthases: directed evolution of glycosynthase XynB2(E335G) suggests a general path to enhance activity. *Chem.Biol.* **15**, 546-551
- 18 Liu, B. and Tian, H. (2005) A ratiometric fluorescent chemosensor for fluoride ions based on a proton transfer signaling mechanism. *J.Mater.Chem.* **15**, 2681-2686
- 19 Lee, S. H., Kim, H. J., Lee, Y. O., Vicens, J., and Kim, J. S. (2006) Fluoride sensing with a PCT-based calix[4]arene. *Tetrahedron Lett.* **47**, 4373-4376
- 20 Nishimura, T., Xu, S. Y., Jiang, Y. B., Fossey, J. S., Sakurai, K., Bull, S. D., and James, T. D. (2012) A simple visual sensor with the potential for determining the concentration of fluoride in water at environmentally significant levels. *Chem.Commun.* **49**, 478-480

- 21 Hudnall, T. W. and Gabbai, F. P. (2008) A BODIPY boronium cation for the sensing of fluoride ions. *Chem.Commun.* 4596-4597
- 22 Xu, S., Chen, K., and Tian, H. (2005) A colorimetric and fluorescent chemodosimeter: fluoride ion sensing by an axial-substituted subphthalocyanine. *J.Mater.Chem.* **15**, 2676-2680
- 23 Yang, X. F., Ye, S. J., Bai, Q., and Wang, X. Q. (2007) A fluorescein-based fluorogenic probe for fluoride ion based on the fluoride-induced cleavage of tert-butyldimethylsilyl ether. *J.Fluoresc.* **17**, 81-87
- 24 Yang, X. F. (2007) Novel fluorogenic probe for fluoride ion based on the fluoride-induced cleavage of tert-butyldimethylsilyl ether. *Spectrochim.Acta A Mol.Biomol.Spectrosc.* **67**, 321-326
- 25 Kim, S. Y. and Hong, J. I. (2007) Chromogenic and fluorescent chemodosimeter for detection of fluoride in aqueous solution. *Org.Lett.* **9**, 3109-3112
- 26 Kim, S. Y., Park, J., Koh, M., Park, S. B., and Hong, J. I. (2009) Fluorescent probe for detection of fluoride in water and bioimaging in A549 human lung carcinoma cells. *Chem.Commun.* 4735-4737
- 27 Zheng, F., Zeng, F., Yu, C., Hou, X., and Wu, S. (2012) A PEGylated Fluorescent Turn-On Sensor for Detecting Fluoride Ions in Totally Aqueous Media and Its Imaging in Live Cells. *Chemistry* **19**, 936-942
- 28 Planas, A. (2000) Bacterial 1,3-1,4- β -glucanases: structure, function and protein engineering. *Biochim.Biophys.Acta* **1543**, 361-382
- 29 Fort, S., Christiansen, L., Schulein, M., Cottaz, S., and Driguez, H. (2000) Stepwise synthesis of cellodextrins assisted by a mutant cellulase. *Israel J.Chem.* **40**, 217-221
- 30 Faijes, M., Fairweather, J. K., Driguez, H., and Planas, A. (2001) Oligosaccharide synthesis by coupled endo-glycosynthases of different specificity: a straightforward preparation of two mixed-linkage hexasaccharide substrates of 1,3/1,4- β -glucanases. *Chem.Eur.J.* **7**, 4651-4655
- 31 Fairweather, J. K., Faijes, M., Driguez, H., and Planas, A. (2002) Specificity studies of *Bacillus* 1,3-1,4- β -glucanases and application to glycosynthase-catalyzed transglycosylation. *ChemBioChem.* **3**, 866-873
- 32 Faure, R., Saura-Valls, M., Brumer, H., III, Planas, A., Cottaz, S., and Driguez, H. (2006) Synthesis of a library of xylogluco-oligosaccharides for active-site mapping of xyloglucan endo-transglycosylase. *J.Org.Chem.* **71**, 5151-5161
- 33 Perez, X., Faijes, M., and Planas, A. (2011) Artificial mixed-linked β -glucans produced by glycosynthase-catalyzed polymerization: tuning morphology and degree of polymerization. *Biomacromolecules.* **12**, 494-501

- 34 Addington, T., Calisto, B., Alfonso-Prieto, M., Rovira, C., Fita, I., and Planas, A. (2011) Re-engineering specificity in 1,3-1,4- β -glucanase to accept branched xyloglucan substrates. *Proteins* **79**, 365-375
- 35 Zheng, L., Baumann, U., and Reymond, J. L. (2004) An efficient one-step site-directed and site-saturation mutagenesis protocol. *Nucleic Acids Res.* **32**, e115
- 36 Fajjes, M., Perez, X., Perez, O., and Planas, A. (2003) Glycosynthase activity of *Bacillus licheniformis* 1,3-1,4- β -glucanase mutants: specificity, kinetics, and mechanism. *Biochemistry* **42**, 13304-13318
- 37 Malet, C. and Planas, A. (1997) Mechanism of *Bacillus* 1,3-1,4- β -D-glucan 4-glucanohydrolases: kinetics and pH studies with 4-methylumbelliferyl β -glucan oligosaccharides. *Biochemistry* **36**, 13838-13848
- 38 Berrow, N. S., Bussow, K., Coutard, B., Diprose, J., Ekberg, M., Folkers, G. E., Levy, N., Lieu, V., Owens, R. J., Peleg, Y., Pinaglia, C., Quevillon-Cheruel, S., Salim, L., Scheich, C., Vincentelli, R., and Busso, D. (2006) Recombinant protein expression and solubility screening in *Escherichia coli*: a comparative study. *Acta Crystallogr.D.Biol.Crystallogr.* **62**, 1218-1226
- 39 Zhang, J. H., Chung, T. D., and Oldenburg, K. R. (1999) A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *J.Biomol.Screen.* **4**, 67-73
- 40 Mayer, C., Jakeman, D. L., Mah, M., Karjala, G., Gal, L., Warren, R. A., and Withers, S. G. (2001) Directed evolution of new glycosynthases from *Agrobacterium* β -glucosidase: a general screen to detect enzymes for oligosaccharide synthesis. *Chem.Biol.* **8**, 437-443
- 41 Cupples, C. G., Miller, J. H., and Huber, R. E. (1990) Determination of the roles of Glu-461 in β -galactosidase (*Escherichia coli*) using site-specific mutagenesis. *J.Biol.Chem.* **265**, 5512-5518
- 42 Withers, S. G., Rupitz, K., Trimbur, D. E., and Warren, R. A. J. (1992) Mechanistic consequences of mutation of the active site nucleophile Glu 358 in *Agrobacterium* β -glucosidase. *Biochemistry* **31**, 9979-9985
- 43 Wakarchuk, W. W. and Campbell, R. L. (1994) Mutational and crystallographic analyses of the active site residues of the *Bacillus circulans* xylanase. *Prot.Sci.***3**, 467-475
- 44 Gaiser, O., Piotukh, K., Ponnuswamy, M. N., Planas, A., Borriss, R., and Heinemann, U. Structural basis for the substrate specificity of a *Bacillus* 1,3-1,4- β -glucanase. *J.Mol.Biol.* **357**, 1211-1225. 2006.
- 45 Biarnes, X., Ardevol, A., Iglesias-Fernandez, J., Planas, A., and Rovira, C. (2011) Catalytic itinerary in 1,3-1,4- β -glucanase unraveled by QM/MM metadynamics. Charge is not yet fully developed at the oxocarbenium ion-like transition state. *J.Am.Chem.Soc.* **133**, 20301-20309

- 46 Biarnes, X., Nieto, J., Planas, A., and Rovira, C. (2006) Substrate distortion in the Michaelis complex of *Bacillus* 1,3-1,4- β -glucanase. Insight from first principles molecular dynamics simulations. *J.Biol.Chem.* **281**, 1432-1441
- 47 Davies, G. J., Planas, A., and Rovira, C. (2012) Conformational analyses of the reaction coordinate of glycosidases. *Acc.Chem.Res.* **45**, 308-316
- 48 Wang, J., Pengthaisong, S., Cairns, J. R., and Liu, Y. (2013) X-ray crystallography and QM/MM investigation on the oligosaccharide synthesis mechanism of rice BGlu1 glycosynthases. *Biochim.Biophys.Acta* **1834**, 536-545
- 49 Mayer, C., Zechel, D. L., Reid, S. P., Warren, A. J., and Withers, S. G. (2000) The E358S mutant of *Agrobacterium* sp. β -glucosidase is a greatly improved glycosynthase. *FEBS Lett.* **466**, 40-44
- 50 Ducros, V., Tarling, C. A., Zechel, D. L., Brzozowski, A. M., Frandsen, T. P., Ossowski, I., Schülein, M., Withers, S. G., and Davies, G. (2003) Anatomy of glycosynthesis: structure and kinetics of the *Humicola insolens* Cel7B E197A and E197S glycosynthase mutants. *Chem.Biol.* **10**, 619-628
- 51 McIntosh, L. P., Hand, G., Johnson, P. E., Joshi, M. D., Korner, M., Plesniak, L. A., Ziser, L., Wakarchuk, W. W., and Withers, S. G. (1996) The pK(a) of the general acid/base carboxyl group of a glycosidase cycles during catalysis: A C-13-NMR study of *Bacillus circulans* xylanase. *Biochemistry* **35**, 9958-9966
- 52 Heinemann, U., Aÿ, J., Gaiser, O., Müller, J. J., and Ponnuswamy, M. N. (1996) Enzymology and folding of natural and engineered bacterial β -glucanases studied by X-ray crystallography. *Biol.Chem.* **377**, 447-454
- 53 Wilcken, R., Zimmermann, M. O., Lange, A., Joerger, A. C., and Boeckler, F. M. (2012) Principles and applications of halogen bonding in Medicinal Chemistry and Chemical Biology. *J.Med.Chem.* **36**, 1363-1388

11.2. Mutante transicional de hidrolasa a glicosintasa

Carbohydrate Research, 389, 85-92. 2014

A transitional hydrolase to glycosynthase mutant by Glu to Asp substitution at the catalytic nucleophile in a retaining glycosynthase

Hugo Aragunde, Estela Castilla, Xevi Biarnés, Magda Faijes, Antoni Planas

Laboratory of Biochemistry, Institut Químic de Sarrià, Universitat Ramon Llull. 08017 Barcelona, Spain

Abstract

Glycosynthases from more than 16 glycosidase families have been developed for the efficient synthesis of oligosaccharides and glycoconjugates. β -1,3-1,4-Glucan oligo- and polysaccharides with defined sequences can be quantitatively achieved with the glycosynthases derived from *Bacillus licheniformis* β -1,3-1,4-glucanase. The screening of a nucleophile saturation library of this enzyme yielded the unexpected E134D mutant which has high glycosynthase efficiency (25% higher k_{cat} than the best glycosynthase to date, E134S) but also retains some hydrolase activity (2% relative to the wild-type enzyme). Here, we report the biochemical and structural analyses of this mutant compared to E134S and wild-type enzymes. E134D shows a pH profile of general base catalysis for the glycosynthase activity, with a kinetic $\text{p}K_{\text{a}}$ (on $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$) assigned to Glu138 of 5.8, whereas the same residue acts as a general acid in the hydrolase activity with the same $\text{p}K_{\text{a}}$ value. The $\text{p}K_{\text{a}}$ of Glu138 in the wt enzyme was 7.0, a high value due to the presence of the catalytic nucleophile Glu134 which destabilizes the conjugate base of Glu138. Thus, the $\text{p}K_{\text{a}}$ of Glu138 drops 1.1 pH units in the mutant relative to the wild-type enzyme meaning that the larger distance between carboxylates in positions 138 and 134 (5.6 Å for wt, 7.0 Å for E134D) and/or a new hydrogen bonding interaction with a third Asp residue (Asp136) in the mutant reduces the effect of the negatively charged Asp134. In consequence, the $\text{p}K_{\text{a}}$ of Glu138 has a similar $\text{p}K_{\text{a}}$ value in the E134D mutant than in the other glycosynthase mutants having a neutral residue in position 134. The behavior of the E134D mutant shows that shortening the side chain of the nucleophile, despite maintaining a carboxylate group, confers glycosynthase activity. Therefore E134D is a transitional hydrolase to glycosynthase mutation.

Keywords

Glycosynthase, β -glucanase, *Bacillus licheniformis*, hydrolase, β -1,3-1,4-glucans, $\text{p}K_{\text{a}}$.

1. Introduction

Retaining glycosidases (or glycoside hydrolases, GH) catalyze the hydrolysis of glycosidic bonds of oligosaccharides, polysaccharides, and glycoconjugates by general acid/base catalysis in a double displacement reaction with net retention of the anomeric configuration. The catalytic

mechanism involves two essential residues, a general acid/base and a catalytic nucleophile, the reaction proceeding through the formation of a covalent glycosyl-enzyme intermediate¹ (Figure 1A). A variation of this mechanism is found in some hexosaminidases which operate by substrate-assisted catalysis; they lack the catalytic nucleophile and the 2-acetamido group of the substrate acts as an internal nucleophile^{2,3}. Retaining GH have been extensively used for enzymatic synthesis of oligosaccharides and glycoconjugates through their ability to catalyze transglycosylation reactions⁴. However, kinetically-controlled transglycosylation is severely hampered by the predominant hydrolase activity, where the product formed is necessarily a hydrolysable substrate. The introduction of the glycosynthases concept in 1998^{5,6} overcomes this limitation for the efficient enzymatic synthesis of oligosaccharides and glycoconjugates.

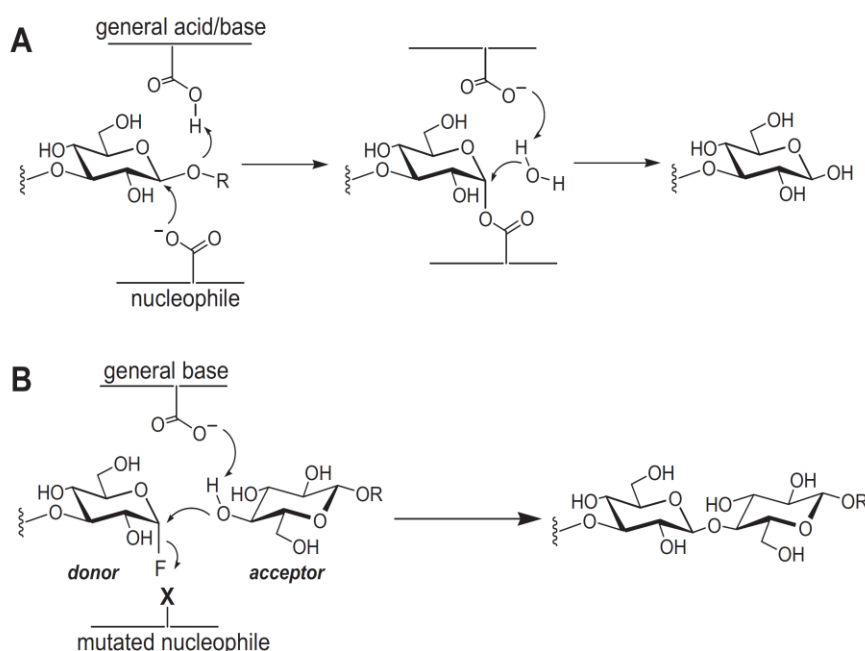


Figure 1 Enzymatic mechanisms: hydrolase vs glycosynthase

A) Mechanism of a retaining glycosidase involving the participation of a general acid/base residue and a catalytic nucleophile residue. B) Mechanism of a glycosynthase mutant, where X is a non-nucleophilic substitution for the original nucleophile in the wt enzyme.

Glycosynthases are engineered retaining glycoside hydrolases in which the catalytic nucleophile has been replaced by a non-nucleophilic residue. They are inactive hydrolases but efficiently catalyze glycosyl transfer to an acceptor when using activated glycosyl fluoride donors with the opposite anomeric configuration than the original substrate of the parental wt hydrolase reaction (Figure 1B). Enzymes from more than 16 different GH families (according to the CAZY database classification⁷) have been converted into glycosynthases. They cover different specificities and relevant applications have been developed (for reviews see ⁸⁻¹¹).

Bacillus licheniformis 1,3-1,4- β -glucanase is a retaining *endo*-glycosidase belonging to CAZY family GH16, which hydrolases mixed-linked 1,3-1,4- β -glucans¹². The catalytic machinery involves a catalytic triad formed by Glu138 and Glu134 as general acid/base and catalytic nucleophile, respectively, and Asp136 as assisting residue that participates in the modulation of the pK_a s of the catalytic residues^{13,14}. Nucleophile mutants E134A and E134S are efficient glycosynthases catalyzing condensation reactions between glycosyl fluoride donors of general structure (Glc β 4)_nGlc β 3Glc α F and gluco-oligosaccharide acceptors with regioselective formation of β -1,4

glycosidic bonds^{6,15-18}. More recently, they have shown to be efficient catalysts for the preparation of artificial polysaccharides with regular structures through glycosynthase-catalyzed donor self-condensation¹⁹.

During the development of a screening assay for the analysis of mutant glycosynthase libraries (HTS based on a fluoride chemosensor assay)²⁰, we analyzed a nucleophile saturation library (E134X) of the *Bacillus licheniformis* 1,3-1,4- β glucanase. In addition to the expected and well known glycosynthase variants (Ala, Ser, and Gly mutations), a surprising result was the finding that E134D showed high glycosynthase activity while keeping residual hydrolase activity. Shortening the side chain of the nucleophile residue (Glu to Asp) was already known to decrease significantly the hydrolase activity of β -glycosidases (*e.g.* lacZ β -galactosidase²¹, *Agrobacterium* β -glucosidase²², *B. circulans* xylanase²³), but this conservative substitution has not been previously reported as a glycosynthase. This surprising result may be interpreted as a transitional form between the original hydrolase and its glycosynthase variants. Here we analyze the properties of the E134D mutant 1,3-1,4- β glucanase with the aim of understanding how a conservative mutation (Asp for Glu substitution) still maintaining a carboxylate group behaves as a glycosynthase. pH studies reveal significant aspects about the modulation of the pK_a s of the catalytic residues.

2. Material and methods

2.1. Protein expression and purification

All the proteins (wt, E134A, E134S and E134D) were cloned in a pET16b vector as reported^{20,24}. *E. coli* BL21 DE3 Star cells harboring the corresponding expression plasmid were grown in 500 mL LB medium (100 mg/mL ampicillin, 2% glucose) for 8 h at 37°C and 250 rpm until late exponential phase. The medium was changed to 500 mL LB containing 1 mM IPTG and 100 mg/mL ampicillin for protein expression (16 h at 25°C). Cells were harvested by centrifugation and resuspended in 100 mL phosphate buffer 50 mM, pH 7.0, 0.1 mM CaCl₂. Proteins were purified essentially as reported for the WT enzyme by means of metal affinity chromatography of the His-tagged proteins²⁴. Cells were lysed in a cell-disrupter (Constant Systems, UK) and centrifuged at 12,000 rpm. The supernatant was loaded onto a HiTrap 1 ml column (GE Healthcare) previously equilibrated with loading buffer (50 mM phosphate pH 7.0, 0.1 mM CaCl₂). The column was rinsed to remove unbound proteins and then eluted with a gradient of 0.5 M imidazole in 50 mM phosphate pH 7.0, 0.1 mM CaCl₂. Protein fractions were dialyzed twice against 50 mM phosphate pH 7.0, 0.1 mM CaCl₂, followed by a last dialysis against water. Proteins were lyophilized for storage, and redissolved prior to use. Enzymes were >95% homogeneous as judged by SDS-PAGE. Concentration was determined by absorbance at 280 nm using an extinction coefficient of $3.53 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ²⁵.

2.2. Kinetics of glycosynthase reactions

The glycosyl donor and acceptor, β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -Dglucopyranosyl(1 \rightarrow 3)- α -D-glucopyranosyl fluoride (Glc β 4Glc β 3Glc α F)²⁵ and p-nitrophenyl β -Dglucopyranoside (Glc β pNP) respectively, were dissolved in phosphate-citrate buffer (50 mM citric acid and 50 mM Na₂HPO₄), CaCl₂ (0.1 mM) at the indicated pH, and with a constant ionic strength of I=0.5M adjusted with

KCl. The solution was preincubated at 35 °C for 5 min. Reactions were initiated by addition of the correspondent enzyme and the mixtures kept at 35 °C. Aliquots were taken at different time intervals and diluted 1:10 in 2 % (v/v) formic acid to stop the enzymatic reaction. HPLC analysis was done in an Agilent HPLC 1100 chromatograph using a reverse phase column (NovaPak C18, 4 µm, 3.9 mm x 150 mm, Waters), eluted with 12-14% MeOH in H₂O at a flow of 1 mL/min, UV detector at 310 nm. Initial rates (v_0) were calculated from the linear portion of the progress curves (normalized area vs time) and expressed as $v_0/[E]$ (s⁻¹).

For the reaction progress curve, mutants E134D and E134S were assayed at 2 µM enzyme concentration, 2 mM donor and 20 mM acceptor in phosphate buffer (50 mM pH 7 and CaCl₂ 0.1 mM) at 35°C. The formation/disappearance of glycosynthase- derived products was followed by HPLC as described above.

The pH dependence of the glycosynthase activity was determined on k_{cat} and k_{cat}/K_M in the pH range 5 to 9. At each pH, donor was varied (0.1 to 8 mM, 11 different concentrations) and acceptor kept constant at 20 mM. Initial rates were fitted to the Michaelin-Menten equation to calculate the kinetic parameters by non-linear regression. For E134D, k_{cat}/K_M vs. pH data were fitted to an upward single ionization curve.

$$\frac{k_{cat}}{K_M} = \frac{A}{1+10^{(pK_a-pH)}} \quad \text{Eq. 1}$$

For E134S, k_{cat}/K_M vs. pH data were fitted to a double ionization curve with residual activity at high pH, as reported for the E134A glycosynthase mutant²⁵ (eq. 2).

$$\frac{k_{cat}}{K_M} = \frac{A+B \cdot 10^{(pH-pK_{a2})}}{1+10^{(pK_{a1}-pH)}+10^{(pH-pK_{a2})}} \quad \text{Eq. 2}$$

2.3. Kinetics of hydrolase reactions

The hydrolase activity was determined with 4-methylumbelliferyl 3-O-β-cellobiosylβ-D-glucopyranoside (Glcβ4Glcβ3GlcβMU) as substrate and following changes in UV absorbance due to the release of 4-methylumbelliferone (MU) using matched 1 cm path length cells at 35°C in an Evolution 300 spectrophotometer (Thermo Scientific)¹³. Rates of the enzyme-catalyzed reactions were determined by incubating the enzyme with the substrate in citrate/phosphate buffer (50 mM citric acid and 50 mM Na₂HPO₄) and 0.1 mM CaCl₂ in the pH range of 5 to 7 in the thermostated cell holder. Reactions were initiated by addition of enzyme to the preincubated mixture of substrate and buffer. The absorbance change was monitored at a wavelength of λ = 365 nm. Extinction coefficients for MU at 365 nm were determined at each pH under the same experimental conditions. Initial rates (v_0) were calculated from the linear portion of the progress curves. For wt, the slope of v_0 vs. substrate concentration (0.1 to 0.3 mM) gave the k_{cat}/K_M values at each pH. k_{cat}/K_M vs. pH data were fitted to a bell-shaped double ionization curve (eq.3)

$$\frac{k_{cat}}{K_M} = \frac{A}{1+10^{(pK_{a1}-pH)}+10^{(pH-pK_{a2})}} \quad \text{Eq. 3}$$

For E134D, initial rates were determined at 1 mM substrate concentration at each pH. These rates at low substrate concentration were assumed to reflect k_{cat}/K_M . Hydrolysis rates at lower substrate concentrations (to determine true k_{cat}/K_M values from the linear dependence v_0 vs. [S])

were difficult to measure due to the low hydrolase activity of the mutant. $v_0/[E]$ ($\approx k_{cat}/K_M$) vs. pH data were fitted to a downward single ionization curve (eq. 4)

$$\frac{v_0}{[E]} = \frac{A}{1+10^{(pH-pK_a)}} \quad \text{Eq. 4}$$

All fittings were done with the FigP software. Estimated standard errors in pK_a determinations were ± 0.1 pH units.

2.4. Chemical rescue

This assay was performed following a modification of the procedure reported in Viladot et al.²⁶. A solution of enzyme (E134A, E134S, or E134D) (1 μM) and sodium azide (1M) was preincubated in a thermostated cell holder at 30°C in phosphate-citrate buffer (87 mM phosphate, 6.5 mM citrate) pH= 7.2. Reactions were initiated by adding 2,4-dinitrophenyl 3-O- β -cellobiosyl- β -D-glucopyranoside (Glc β 4Glc β 3Glc β DNP) substrate (1 mM), and the release of 2,4-dinitrophenol (DNP) was monitored by absorbance changes at 425 nm, using an extinction coefficient of $\Delta\epsilon$ 6134 $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ^{26,27}. Blank reactions without sodium azide were run in parallel to subtract the background enzymatic hydrolysis rate of this reactive substrate. Initial rate were calculated as the slope of DNP concentration (reaction-blank) vs.t.

2.5. Enzymatic polymerization

Reactions were carried out in phosphate buffer (50 mM pH 7, 0.1 mM CaCl_2). The donor substrate Glc β 4Glc β 3Glc α F (150 mM) was incubated with different enzyme concentrations at 35 °C with orbital shaking at 250 rpm for 24 hours. Enzyme concentrations for E134S and E134D were chosen as to have the same activity according to the higher k_{cat} value for E134D: 19 μM (E134D), 25 μM (E134S) for low enzyme concentration, and 47 μM (E134D), 63 μM (E134S) for high enzyme concentration. A precipitate was formed during the reactions. It was recovered by centrifugation at 13,000 rpm for 5 min, washed several times with cold water, and freeze-dried. Product yields are expressed in % (weight polymer/weight initial donor) for the insoluble material. Supernatants were also lyophilized to recover soluble oligomers. Products were analyzed by HPSEC to determine the molecular mass profiles as described in Perez et al.¹⁹. Analyses were performed on an Agilent 1100 HPLC system equipped with a refractive index detector (RID) using a PSS Gram column (8.0 \times 300 mm, 100 Å, 10 μm) and a PSS Gram precolumn (8.0 \times 50 mm, 100 Å, 10 μm) thermostated at 50 °C, and DMSO with lithium bromide (5 g/L) as eluent at a flow rate of 0.5 mL/min. The calibration curve was obtained with dextrans as standards in the range 1 to 55 kDa (American Polymer Standards Corporation DXT1-DXT55 kDa). Freeze-dried polymers from the enzymatic reactions and standards were dissolved in DMSO and filtered. From the chromatograms, M_p (molecular mass of the peak maximum), M_w (weight average molecular mass), M_n (number average molecular mass), DP (degree of polymerization), and PDI (polydispersity index) were calculated²⁸.

2.6. Modeling of the enzyme substrate complexes

The three dimensional structures of different enzyme-substrate complexes of *Bacillus licheniformis* 1,3-1,4- β -glucanase were modeled *in-silico* by means of homology modeling²⁹. The structure of the wt-substrate complex was previously modeled³⁰. E134S and E134D variants were modeled based on the 3D structure of the free enzyme (PDB accession code: 1GBG). The substrate was extracted from the structure of the orthologous *Bacillus macerans* 1,3-1,4- β -glucanase in complex with the tetrasaccharide product (Glc β 4Glc β 4Glc β 3Glc) (PDB accession code: 1U0A), which was manually converted to an α -fluoride glycosyl donor (Glc β 3Glc α F), and its position in the structure was kept fixed during the modeling. 100 replicas of the models were generated for each variant, in which different orientations of the side-chains were sampled during a brief simulated annealing and geometry optimization process.

3. Results

The ability of the E134D 1,3-1,4- β -glucanase to behave as a glycosynthase poses a number of questions about the mechanism: how large is the cavity created by shortening the Glu to Asp side chain to accommodate the α -fluoride of the donor substrate?; does the mutant enzyme operate by general base catalysis thus implying a large downward shift of the pK_a of E138 (general acid in the wt hydrolase mechanism) to behave as a base in the glycosynthase mechanism?; which is the extend and pH dependence of the residual hydrolase activity?; is it a practical mutant for the enzymatic synthesis of polysaccharides by donor self-condensation?.

3.1. Glycosynthase activity of the mutant E134D

The time course of the glycosynthase reaction of E134D at pH 7, 35°C, is compared to that of the well characterized E134S glycosynthase using Glc β 4Glc β 3Glc α F (2 mM) as donor and Glc β pNP (20 mM) as acceptor substrates, where the acceptor is in large excess to minimize donor self-condensation. As shown in Figure 2, E134S rapidly forms the condensation product (Glc β 4Glc β 3Glc β 4Glc β pNP) up to 90% yield, and the product remains stable upon long incubation time. E134D has the same initial reaction rate, reaching a maximum of 90% yield, but the product is then slowly hydrolyzed due to the still significant hydrolase activity. Kinetic parameters had been previously determined²⁰ and are summarized in Table 1. Under initial rate conditions (<10% conversion), E134D has a 25% higher k_{cat} than E134S and E134A, but K_M (donor) is in between both Ser and Ala glycosynthase mutants.

The pH dependence of the glycosynthase activity for E134D, compared to that of E134S, is presented in Figure 3. The E134D mutant shows a pH dependence corresponding to general base catalysis, with a kinetic pK_a (on k_{cat}/K_M) of 5.8 and maximum activity at pH 7. At pH values higher than 7.5 the protein is less stable and precipitates, precluding kinetic measurements. The profile up to pH 7 is similar to that of E134S (and the previously reported E134A mutant¹⁷, with the same kinetic pK_a than E134S (5.8) and slightly higher than E134A (5.2). It corresponds to Glu138 acting as general base as it was previously assigned in the E134A mutant by titration with a water-soluble carbodiimide²⁵.

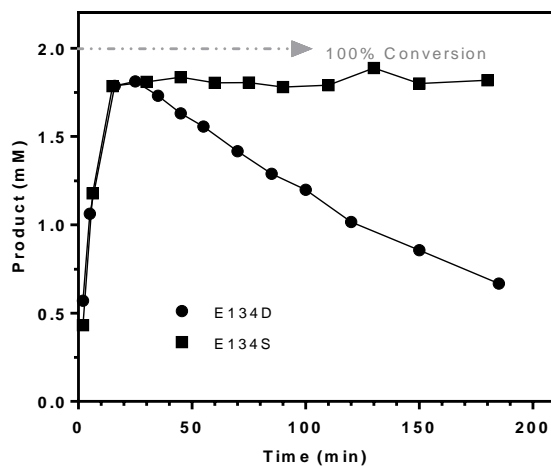


Figure 2 Time-course monitoring of glycosynthase reaction

Time-course monitoring of the glycosynthase reactions catalyzed by the E134D and E134S mutants. Conditions: 2 mM Glc β 4Glc β 3Glc α F donor, 20 mM Glc β pNP acceptor, 2 μ M enzyme, pH 7.0, 35°C.

	k_{cat} (s^{-1})	$K_{M,donor}$ (mM)	$(k_{cat}/K_M)_{donor}$ ($M^{-1}s^{-1}$)	% k_{cat}	% k_{cat}/K_M
E134D	1.44 ± 0.05	0.49 ± 0.05	$2.95 \cdot 10^3$	100	27
E134S	1.08 ± 0.04	0.10 ± 0.02	$1.08 \cdot 10^4$	75	100
E134A	1.04 ± 0.04	1.12 ± 0.12	$9.27 \cdot 10^2$	72	9

Table 1 Kinetic parameters of glycosynthase activity

Kinetic parameters for the glycosynthase activity of E134D, S and A mutants. Conditions: 0-8 mM donor (Glc β 4Glc β 3Glc α F), 20 mM acceptor (Glc-pNP), 0.5 μ M enzyme, 50 mM phosphate pH 7.0, 0.1 mM CaCl $_2$, 35°C.

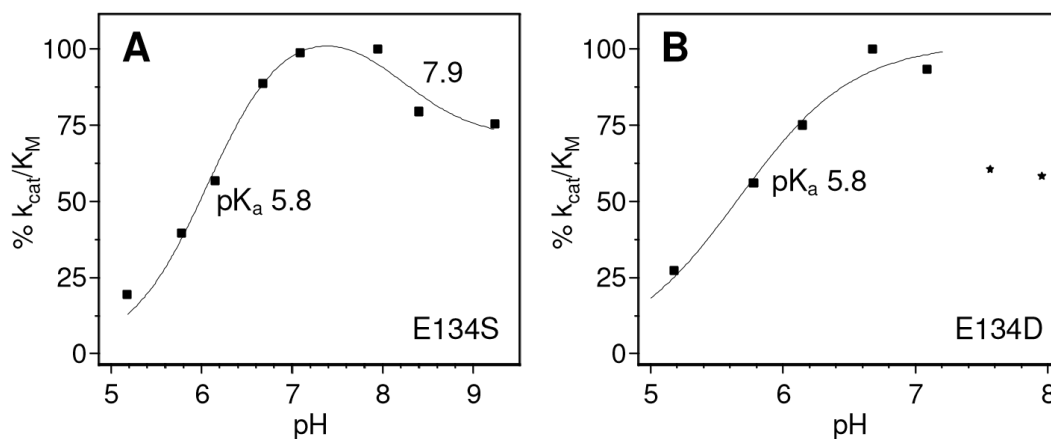


Figure 3 Glycosynthase activity pH dependence

pH dependence of k_{cat}/K_M for the glycosynthase activity of E134S (A) and E134D (B) mutant enzymes. At pH > 7.5, E134D activity decreases due to protein precipitation (* in the graph).

3.2. Hydrolase activity of E134D

The hydrolase activity of E134D was determined with Glc β 4Glc β 3Glc β MU (MU: 4-methylumbelliferyl), a common β -aryl glycoside substrate of the wt enzyme, by monitoring MU release. At pH 7, 35°C, the specific activity of E134D is about 2% of the wt enzyme. To evaluate the kinetic pK_a of the general acid residue E138 in the mutant, the pH dependence of the hydrolytic reaction was determined and compared to that of the wt enzyme. For the wt enzyme, the pH profile of k_{cat}/K_M (Figure 4A) follows a double ionization curve, with a high pK_a of 7.0 corresponding to the general acid E138, and a low pK_a of 5.4 for the nucleophile E134. These values are close to those previously reported at 53°C (pK_a s of 7.0 and 5.5, respectively), temperature of maximum activity for the wt enzyme¹³. For E134D, rates at 1 mM substrate were assumed to reflect k_{cat}/K_M values (hydrolysis rates at lower substrate concentration were difficult to measure due to the low activity of the mutant). As shown in Figure 4B, the hydrolase activity decreases from pH 5 to 7, with a kinetic pK_a of 5.9 assignable to the general acid E138 in the hydrolase mechanism. Thus the E134D mutation results in a pK_a decrease of one pH unit. It is also consistent with the pK_a (5.8) determined for the glycosynthase activity and assigned to Glu138, but acting as general base (see Discussion).

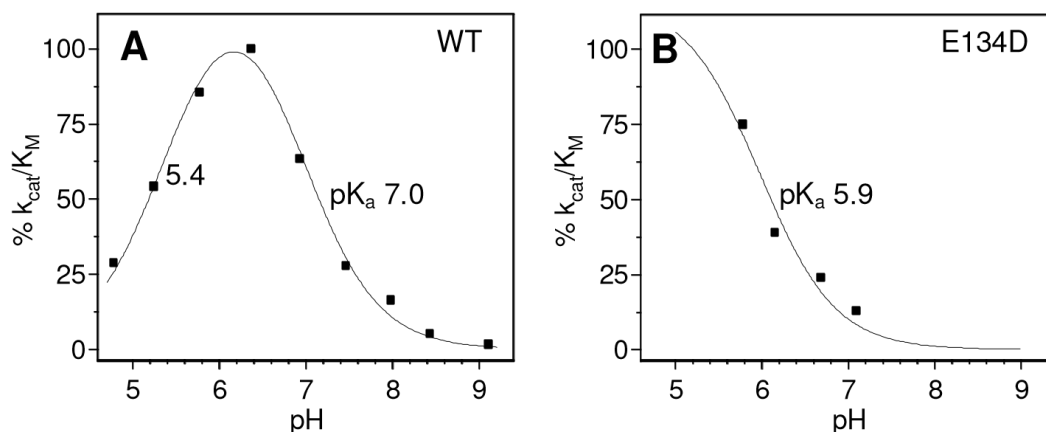


Figura 4 k_{cat}/K_M vs pH
pH dependence of k_{cat}/K_M for the hydrolytic activity of the WT (A) and E134D mutant (B) enzymes

3.3. Chemical rescue with an exogenous nucleophile

Alanine mutants at the catalytic nucleophile can be reactivated using an exogenous nucleophile that can bind into the cavity left by removal of the catalytic carboxylate (Ala for Glu mutation). The E134A 1,3-1,4- β -glucanase is reactivated by addition of azide in a concentration dependent manner using an activated 2,4-dinitrophenyl β glycoside substrate, to give the α -glycosyl azide product^{26,31,32}. The experiment was applied to the E134S and E134D mutants by incubating the enzymes with 1 mM Glc β 4Glc β 3Glc β DNP (DNP: 2,4-dinitrophenyl) and 1 M sodium azide at pH 7.2 and 30°C. The release of DNP (after subtracting the blank rate in the absence of sodium azide) is plotted in Figure 5. E134S shows reactivation (*chemical rescue*) but to a lesser extent than the E134A mutant, whereas the E134D mutant is not reactivated but instead, azide inhibits the residual hydrolase activity of the mutant.

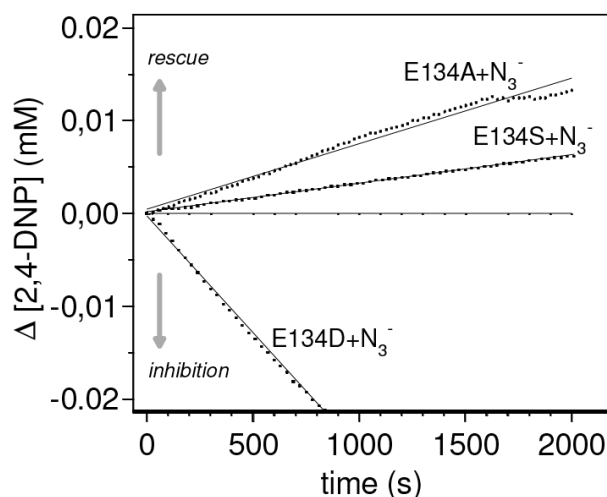


Figure 5 Chemical rescue in E134D, E134A and E134S

Chemical rescue by exogenous azide of mutants E134A, E134S and E134D. Conditions: 1mM Glc β 4Glc β 3Glc β DNP, 1 M NaN₃, 1 μ M enzyme, citrate-phosphate buffer pH 7.2, 0.1 mM CaCl₂, 30°C.

3.4. Glycosynthase-catalyzed Polymerization

The glycosynthase mutants E134A and E134S of 1,3-1,4- β -glucanase are able to produce artificial polysaccharides by donor self-condensation in the absence of an acceptor^{19,33}. The E134S-catalyzed polymerization of the tetrasaccharide donor Glc β 4Glc β 4Glc β 3Glc α F led to high molecular mass polysaccharides (up to Mw of 30 kDa), where the degree of polymerization (DP) was linearly dependent on enzyme activity. Since the polymers are water-insoluble at rather low Mw, it was hypothesized that the balance between enzymatic polymerization rate and polymer precipitation rate dictates the molecular mass of the products¹⁹. In keeping with that, a more active glycosynthase would in principle achieve polysaccharides with higher DP. Although the new E134D mutant is not a practical glycosynthase for soluble oligosaccharide synthesis due to the residual hydrolase activity, it might be efficient for polysaccharide synthesis: insoluble polysaccharides might be formed fast (E134D has a 25% higher k_{cat} than E134S (Table 1)) and their precipitation protect them from hydrolysis.

Mutant	[E] (μ M)	Sample	Yield (%)	M _w (kDa)	DP ^a	M _n (kDa)	PDI	M _p ^b (kDa)
E134D	19	Precipitate	10	5.5	34	2.8	1.9	4.8, 0.6
		Supernatant	90	1.0	6	0.7	1.4	0.6, 1.2
	47	Precipitate	20	14.0	86	3.5	4.0	37.6, 4.4, 0.6
		Supernatant	80	1.7	10	0.8	2.3	0.6
E134S	25	Precipitate	80	12.3	76	4.2	2.9	15.8
		Supernatant	20	7.6	47	1.8	4.2	-
	63	Precipitate	90	12.4	76	4.4	2.8	15.4
		Supernatant	10	4.9	30	1.3	3.7	-

Table 2 Enzymatic polymerization by E134D and E134S glycosynthase mutants

Reaction conditions were 50 mM phosphate buffer pH 7, 0.1 mM CaCl₂, and 150 mM Glc β 4Glc β 3Glc α F donor at 35°C for 24h. ^a Degree of polymerization (DP) expressed as the number of glucosyl units for the weight average molecular mass polysaccharide (M_w). ^b M_p, molecular mass of the peak maximum.

Polymerization reactions catalyzed by E134S and E134D were performed with the trisaccharide donor Glc β 4Glc β 3Glc α F (150 mM) in phosphate buffer pH 7 at 35°C. Precipitated polysaccharides

and the soluble fractions were analyzed by HPSEC (Figure 6). Results are summarized in Table 2. For E134S (at low and high concentrations) the insoluble polymers show a monomodal distribution of molecular masses with Mw of 13 kDa, (DP 78), corresponding to 26 condensations, whereas the soluble fraction only contains traces of oligosaccharides. For E134D the size distribution of the precipitated polymers is multimodal and dependent of enzyme concentration. At low (19 μ M) concentration, an insoluble polymer with Mw 5.5 kDa is obtained, with a main peak (Mp) at 5.3 kDa (DP 33), and a minor peak at Mp 0.6 kDa for a trisaccharide, either unreacted donor or hydrolysis product. At higher enzyme concentration (47 μ M) Mw increases up to 14 kDa, and the molecular mass distribution becomes trimodal with Mp 32.7, 4.7, and 0.6 kDa, corresponding to DP 201, 30, and 3, respectively. A significant fraction of a larger polymer is obtained, but some trisaccharide (Mp 0.6 kDa) is still present. As opposed to the case of E134S, the soluble fractions in the E134D reactions contain a significant amount of trisaccharide (Mp 0.6 kDa) and hexasaccharide (Mp 1.2 kDa) at low enzyme concentration and mainly trisaccharide at high enzyme concentration. The nature of these small molecules may be explained by two nonexcluding hypotheses: unreacted donor or hydrolysis of the longer polymers formed. In agreement with the progress curve of the glycosynthase reaction shown in Figure 2 (high synthase activity but then product hydrolysis), it is more likely that they are hydrolysis products. Moreover, the yield of insoluble polymers were low (10-20%) for the E134D reactions (about 90% for E134S), and only a trisaccharide product was observed in the soluble fraction at high enzyme concentration, all supportive of hydrolysis of the products formed.

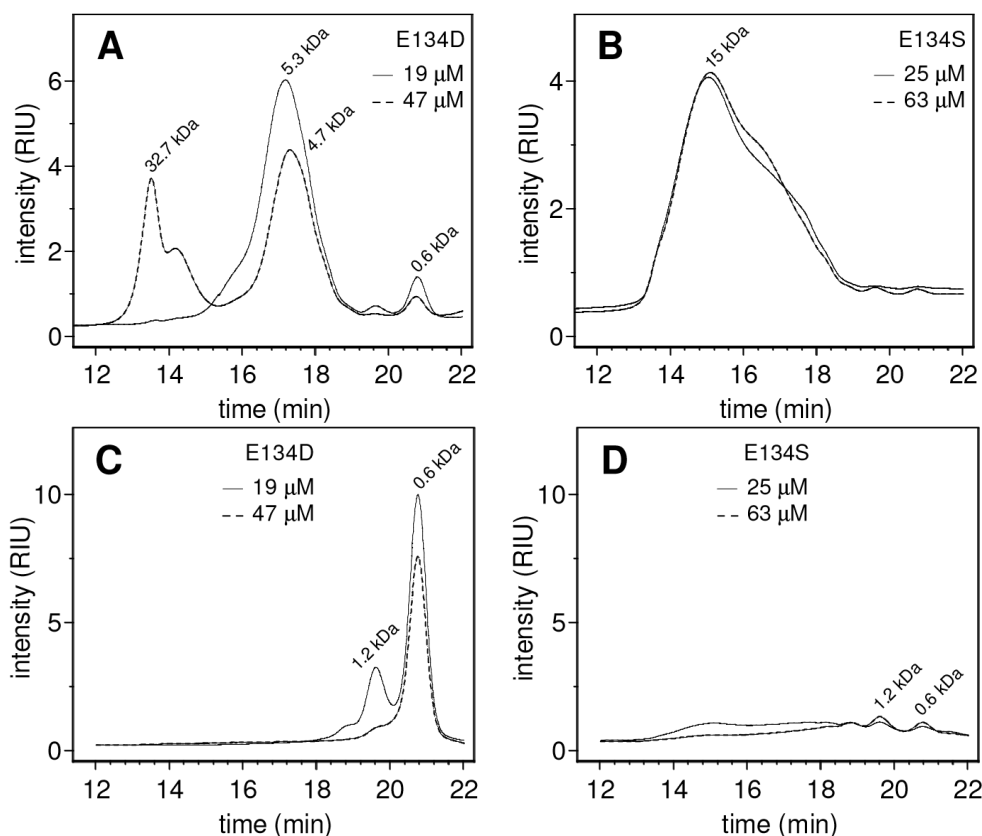


Figure 6 Size exclusion chromatography of insoluble products of glycosynthase reaction
 Size exclusion chromatograms (HPSEC) of the insoluble polysaccharides by glycosynthase-catalyzed polymerization, A) with E134D, B) with E134S, and of the soluble fractions, C) with E134D, D) with E134S, at two different enzyme concentrations. Mp values (maximum of the peaks) are indicated in kDa.

3.5. Modeling the enzyme-substrate complex in the glycosynthase mutants

Mutants E134D and E134S with bound α -glycosyl fluoride substrate were modeled *in silico* and compared to the modeled Michaelis complex of the wt 1,3-1,4- β -glucanase previously reported^{30,34} (Figure 7). A β -glycoside substrate binds with a 1S_3 distorted conformation in the Michaelis complex of the wt enzyme (preactivated conformation for catalysis in the hydrolase mechanism^{30,35}), whereas the α -glycosyl fluoride donor in the glycosynthase mutants remains in a chair (4C_1) conformation (as recently observed³⁶). The shorter side chain in the X-ray 3D structures of glycosynthase mutants of rice BGluc¹³⁶). The shorter side chain of the mutants at position 134 relative to the wild-type creates a cavity that accommodates the fluoride aglycon with α -configuration. The distance between the carboxylates in position 138 and 134 are 5.6 Å in the wt, and 7.0 in the E134D mutant. For the Ser mutant (Figure 7C), the hydroxyl oxygen is at approximately 4.3 Å of the fluoride atom, with an orientation that may allow for a weak hydrogen bonding interaction to assist the departure of the fluoride aglycon in the S_N2 displacement reaction by the acceptor. For the Asp mutant (Figure 7B), the distance between the fluoride and the carboxylate is shorter, and may involve a halogen bonding interaction (distance F \cdots O of 3.3 Å and a C1-F \cdots O angle of $\approx 160^\circ$, a geometry that perfectly fits that of halogen bonding interactions found in protein-ligand complexes)³⁷. Preliminary computational results by *ab initio* methods indicate that this type of electrostatic interaction, although present in α -halogen-glycosyl systems, is very weak for fluoride (data not shown).

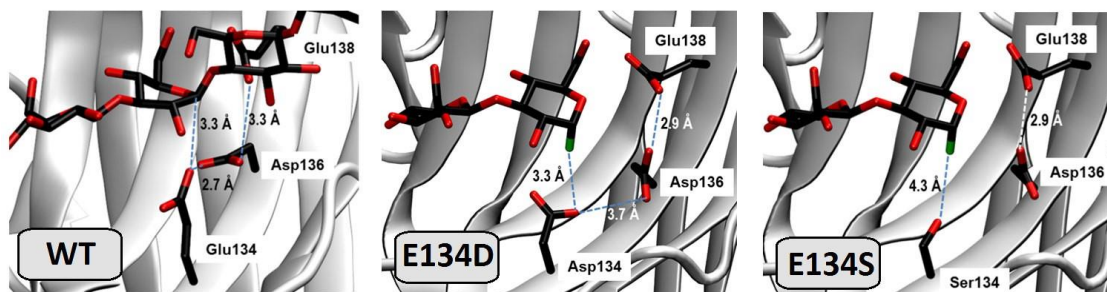


Figure 7 Modeled enzyme substrate complexes

Modeled enzyme-substrate complexes, WT with Glc β 4Glc β 3Glc β 4Glc, E134D and E134S with Glc β 3Glc α F. Dashed lines are distances between heteroatoms expressed in Å.

It is relevant, as it will be discussed below, that Asp136, a third carboxylate of the catalytic triad in the wt enzyme, is hydrogen bonding to the nucleophile Glu134 (O \cdots O distance of 2.7 Å, Figure 7A) but the same residue is predicted by the modeling to hydrogen bond with Glu138 in the E134D and E134S mutants (Figure 7B,C).

4. Discussion

Typical glycosynthases arise from replacement of the catalytic nucleophile of a retaining glycosidase by a non-nucleophilic residue. Surprisingly, the conservative Glu to Asp substitution (E134D mutant) in 1,3-1,4- β -glucanase results in an active glycosynthase. It was an unexpected result because the carboxylate group is still present although in a different position due to the shorter side chain. Two essential aspects of the glycosynthase mechanism are that the nucleophile

mutation has to create room to allow binding of the donor with the fluoride aglycon in α , and that general base catalysis is required to activate the acceptor substrate.

Replacement of the catalytic nucleophile by Ala, Gly, or Ser in typical glycosynthases, results in a shorter side chain that creates a cavity for the accommodation of the α -fluoride of the donor. It can be tested by chemical rescue of the hydrolytically inactive mutant by addition of an exogenous nucleophile as sodium azide or formate. For the E134A mutant, addition of azide restores the activity with an activated β -glycoside substrate (such as 2,4-dinitrophenyl β -glycoside). Azide is able to bind into the cavity left by removal of the nucleophile side chain and displace the β -aglycone by an S_N2 mechanism to give the α -glycosyl azide product²⁶. Whereas activity is restored in the E134A and E134S mutants, azide inhibits the hydrolase activity of the E134D mutant (Figure 5). This behavior is similar to that observed with the wt enzyme²⁶. It indicates that the Glu to Asp mutation does not leave enough room for azide to bind and act as a nucleophile, or that the negative charge of the Asp residue prevents proper binding of azide by electrostatic repulsion, resulting in any case in the absence of chemical rescue. Although this experiment does not prove or disprove that a cavity has been created, the fact that the mutant has glycosynthase activity confirms that the α -fluoride is bound. As shown in the modeled structure (Figure 7B), the α -glycosyl fluoride is properly bound and oriented for catalysis.

According to the general mechanisms depicted in Figure 1, the residue acting as general acid in the first step of the hydrolase mechanism behaves as a base to activate the acceptor in the glycosynthase mechanism. This change of the pK_a of the same residue is the result of different environments in the wt and glycosynthase mutant due to the presence or absence of the catalytic nucleophile. In the wt 1,3-1,4- β -glucanase, Glu138 is the general acid with a pK_a of 7.0 (Figure 4A) in the first step leading to the covalent glycosyl-enzyme intermediate in the hydrolase mechanism⁶. This high pK_a is in part due to the presence of the negatively charged catalytic nucleophile Glu134 which destabilizes the conjugate base of Glu138. It drops in the glycosyl-enzyme intermediate due to neutralization of the negative charge in the covalent complex allowing Glu138 to act as general base in the deglycosylation step leading to the hydrolysis product. This pK_a cycling of the general acid/base residue in retaining glycosidases has been nicely demonstrated in a *B.circulans* xylanase by ¹³C-NMR titration³⁸. In the glycosynthase mechanism catalyzed by the original E134A mutant, Glu138 has a lower pK_a of 5.2²⁵ because of the Ala for Glu134 replacement, where removal of the carboxylate group deletes the negative charge that destabilized the conjugate base of Glu138. The active site charge is equivalent to that in the covalent glycosyl-enzyme intermediate of the wt enzyme, thus Glu138 having a low pK_a . The same concept applies to the other glycosynthase variants having a neutral residue in the position of the original nucleophile, as it is the case of the E134S mutant (with a pK_a of 5.8, Figure 3A). But what about the E134D mutation?

Glu138 should be able to act as a base to explain that the E134D mutant behaves as a glycosynthase. Certainly, the E134D mutant shows a pH dependence corresponding to general base catalysis, with a kinetic pK_a of 5.8 and maximum activity at pH 7 (Figure 3B). This pK_a value is the same as that for E134S (5.8) and slightly higher than that for E134A (5.2). It is also consistent with the pH profile of the residual hydrolase activity of the mutant, with a calculated pK_a of 5.9 in the downward profile for general acid catalysis. Therefore, E134D can be seen as a transitional hydrolase to glycosynthase mutant depending on pH, with hydrolase activity at low pH and glycosynthase activity at high pH.

Possible reasons for the low pK_a of Glu138 in the E134D mutant are as follows: a) The distance between the carboxylates in positions 138 and 134 is longer in the mutant than in the wt (Figure 7), thus reducing the electrostatic effect of the carboxylate of Asp134 and resulting in a lower destabilization of the conjugate base of Glu138. As a consequence its pK_a becomes similar to that in the E134S and E134A neutral nucleophile mutations. b) The carboxylate of Glu138 is stabilized by a H-bonding interaction with Asp136, the third auxiliary residue of the catalytic triad in family GH16 which participates in modulating the pK_a s of the catalytic residues¹⁴. As observed in the X-ray structures of the wt enzyme, Asp136 is hydrogen bonding with Glu134 in the free enzyme^{39,40}, but it is rearranged in a covalent enzyme-ligand complex to hydrogen bond with Glu138, and occupies an intermediate position in the enzyme-product complex^{41,42}. Given the flexibility of the side chain of Asp136 (as observed in the crystal structures of the wt enzyme), the modeled structure of the E134D-substrate complex (Figure 7B) proposes an orientation of the Asp136 side chain that can establish a H-bond with Glu138. Therefore, it is reasonable that, even with Asp134 being deprotonated, the carboxylate of Glu138 might be stabilized by Asp136, thus lowering its pK_a and being able to act as a base in the glycosynthase reaction.

Because E134D has a higher k_{cat} than E134S in the glycosynthase reaction (Table 1), it was tested in polymerization reactions. The question was whether the fast donor condensation leads to polymeric products that precipitate and become inaccessible to the enzyme before they are hydrolyzed by the residual hydrolase activity of the mutant. It is shown not to be the case since low yields in polymeric products were obtained as compared to the E134S mutant (Table 2). The polymers obtained (although in low amount) had a different distribution but were not significantly larger than those produced by the E134S glycosynthase. Although this new mutant is a more active glycosynthase in terms of initial rates, it is not practical as biocatalyst.

5. Conclusions

The screening of a nucleophile saturation library revealed that the E134D mutant is a novel glycosynthase. Characterization of the glycosynthase and residual hydrolase activities of this mutant allows to conclude that shortening the side chain of the residue at position 134 creates enough room for binding the α -fluoride donor, and that Glu138 has a low pK_a to act as a general base in the glycosynthase mechanism similar to other neutral substitutions in position 134. E134D represents a transition between a glycosidase and a glycosynthase, with hydrolase activity at low pH and synthase activity at high pH.

Acknowledgments

This work was supported in part by Grant BFU2010-22209-C02-02 from Ministry of Economy and Competitiveness, Spain. H.A. acknowledges a pre-doctoral contract (FIDGR 2013) from the Generalitat de Catalunya.

References

1. Zechel, D. L.; Withers, S. G. *Acc. Chem. Res.*, **2000**, *33*, 11-18.
2. Wang, Q.; Withers, S. G. *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, *117*, 10137-10138.
3. Tews, I.; Vanschellinga, A. C.; Perrakis, A.; Wilson, K. S.; Dijkstra, B. W. *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, *119*, 7954-7959.
4. Wang, L.; Huang, W. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2009**, *13*, 592-600.
5. Mackenzie, L. F.; Wang, Q.; Warren, R. A. J.; Withers, S. G. *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, *120*, 5583-5584.
6. Malet, C.; Planas, A. *FEBS Lett.*, **1998**, *440*, 208-212.
7. Coutinho, P. M.; Henrissat, B. In *Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering*, Gilbert, H. J., Davies, G. J., Henrissat, B., Svensson, B., Eds.; The Royal Society of Chemistry: Cambridge, 1999; pp 3-12.
8. Perugino, G.; Trincone, A.; Rossi, M.; Moracci, M. *Trends Biotechnol.*, **2004**, *22*, 31-37.
9. Faijes, M.; Planas, A. *Carbohydr. Res.*, **2007**, *342*, 1581-1594.
10. Cobucci-Ponzano, B.; Perugino, G.; Strazzulli, A.; Rossi, M.; Moracci, M. *Methods Enzymol.*, **2012**, *510*:273-300.
11. Armstrong, Z.; Withers, S. G. *Biopolymers.*, **2013**, *99*, 666-674.
12. Planas, A. *Biochim. Biophys. Acta*, **2000**, *1543*, 361-382.
13. Malet, C.; Planas, A. *Biochemistry*, **1997**, *36*, 13838-13848.
14. Planas, A.; Faijes, M.; Abel, M. *J. Appl. Glycosci.*, **2003**, *50*, 245-251.
15. Faijes, M.; Fairweather, J. K.; Driguez, H.; Planas, A. *Chem. Eur. J.*, **2001**, *7*, 4651-4655.
16. Fairweather, J. K.; Faijes, M.; Driguez, H.; Planas, A. *Chem. BioChem.*, **2002**, *3*, 866-873.
17. Faijes, M.; Pérez, X.; Pérez, O.; Planas, A. *Biochemistry*, **2003**, *42* (45), 1330413318.
18. Faure, R.; Saura-Valls, M.; Brumer, H., III; Planas, A.; Cottaz, S.; Driguez, H. *J. Org. Chem.*, **2006**, *71*, 5151-5161.
19. Perez, X.; Faijes, M.; Planas, A. *Biomacromolecules.*, **2011**, *12*, 494-501.
20. Aragunde, H.; Castilla, E.; Faijes, M.; Planas, A. *Biochem. J.*, **2014**, *in press*, DOI: 10.1042/BJ20131057.
21. Cupples, C. G.; Miller, J. H.; Huber, R. E. *J. Biol. Chem.*, **1990**, *265*, 5512-5518.
22. Withers, S. G.; Rupitz, K.; Trimbur, D. E.; Warren, R. A. J. *Biochemistry*, **1992**, *31*, 9979-9985.
23. Wakarchuk, W. W.; Campbell, R. L. *Prot. Sci.*, **1994**, *3*, 467-475.

24. Addington, T.; Calisto, B.; Alfonso-Prieto, M.; Rovira, C.; Fita, I.; Planas, A. *Proteins*, **2011**, *79*, 365-375.
25. Fajjes, M.; Perez, X.; Perez, O.; Planas, A. *Biochemistry*, **2003**, *42*, 13304-13318.
26. Viladot, J. L.; de Ramon, E.; Durany, O.; Planas, A. *Biochemistry*, **1998**, *37*, 11332-11342.
27. Planas, A.; Millet, O.; Palasí, J.; Pallarés, C.; Abel, M.; Viladot, J. L. *Carbohydr. Res.*, **1998**, *310*, 53-64.
28. Carraher, C. E. *Seymour/Carraher's Polymer Chemistry*; CRC Press 2007.
29. Sali, A.; Blundell, T. L. *J. Mol. Biol.*, **1993**, *234*, 779-815.
30. Biarnes, X.; Nieto, J.; Planas, A.; Rovira, C. *J. Biol. Chem.*, **2006**; *281*, 1432-1441.
31. Planas, A.; Viladot, J. L.; Fajjes, M. In *Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering*, Gilbert, H. J., Davies, G. J., Henrissat, B., Svensson, B., Eds.; The Royal Society of Chemistry: Cambridge, 1999; pp 292-301.
32. Viladot, J. L.; Canals, F.; Batllori, X.; Planas, A. *Biochem. J.*, **2001**, *355*, 79-86.
33. Fajjes, M.; Imai, T.; Bulone, V.; Planas, A. *Biochem. J.*, **2004**, *380*, 635-641.
34. Biarnes, X.; Ardevol, A.; Iglesias-Fernandez, J.; Planas, A.; Rovira, C. *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, *133*, 20301-20309.
35. Davies, G. J.; Planas, A.; Rovira, C. *Acc. Chem. Res.*, **2012**, *45*, 308-316.
36. Wang, J.; Pengthaisong, S.; Cairns, J. R.; Liu, Y. *Biochim. Biophys. Acta*, **2013**, *1834*, 536-545.
37. Wilcken, R.; Zimmermann, M. O.; Lange, A.; Joerger, A. C.; Boeckler, F. M. *J. Med. Chem.*, **2012**.
38. McIntosh, L. P.; Hand, G.; Johnson, P. E.; Joshi, M. D.; Korner, M.; Plesniak, L. A.; Ziser, L.; Wakarchuk, W. W.; Withers, S. G. *Biochemistry*, **1996**, *35*, 99589966.
39. Keitel, T.; Simon, O.; Borriss, R.; Heinemann, U. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1993**, *90*, 5287-5291.
40. Hahn, M.; Pons, J.; Planas, A.; Querol, E.; Heinemann, U. *FEBS Lett.*, **1995**, *374*, 221-224.
41. Gaiser, O.; Piotukh, K.; Ponnuswamy, M. N.; Planas, A.; Borriss, R.; Heinemann, U. Structural basis for the substrate specificity of a *Bacillus* 1,3-1,4- β -glucanase. *J. Mol. Biol.*, 2006, *357*, 1211-1225.
42. Heinemann, U.; Aÿ, J.; Gaiser, O.; Müller, J. J.; Ponnuswamy, M. N. *Biol. Chem.*, **1996**, *377*, 447-454.

11.3. Discusión glicosintasas

A pesar de la gran relevancia industrial, biomédica, entre otras, de aplicaciones basadas en formulaciones incluyendo carbohidratos y sus derivados, en la actualidad siguen existiendo ciertas necesidades dentro del área de la síntesis de carbohidratos naturales y no naturales que no están cubiertas. Las aproximaciones de síntesis química tradicional se basan en complejos protocolos en los que son necesarios múltiples pasos de protección y desprotección de grupos funcionales los cuales implican, por lo general, bajos rendimientos de producción y altos costes (Demchenko, 2008). En las últimas décadas ha surgido la síntesis enzimática como una alternativa eficiente a los procesos clásicos. Mediante la aplicación de biocatalizadores se pueden conseguir producciones con un alto control del producto final.

Como se recoge en el capítulo de libro *“When enzymes do it better: Enzymatic glycosylation methods”* (Planas et al., 2015) dentro del repertorio natural de enzimas involucrados en la síntesis y rotura de enlaces glicosídicos se incluyen glicosiltransferasas (GTs) que son capaces de transferir una unidad de azúcar utilizando carbohidratos activados como dadores y las glicosidasas (GHs) que son las encargadas de hidrolizar los enlaces glicosídicos. Estas últimas también pueden formar enlaces glicosídicos mediante reacciones de transglicosilación. La aplicación de GTs en la producción de carbohidratos está limitada por su baja estabilidad y su reducida variedad de sustratos útiles (Härle & Bechthold, 2009; Luzhetskyy, Méndez, Salas, & Bechthold, 2008). Esto hace que la síntesis de enlaces glicosídicos mediante GHs se haya establecido como la opción de preferencia.

A partir de las GHs versión salvaje se han conseguido desarrollar mediante ingeniería enzimática biocatalizadores en los que su capacidad transglicosiladora está altamente potenciada: las glicosintasas (Mackenzie et al., 1998; Malet & Planas, 1998). En estas enzimas se ha mutado el residuo nucleófilo por uno inerte, así utilizan como sustrato dadores activados (generalmente por fluoruro) que imitan la configuración anomérica del intermediario glicosil-enzima los cuales son transferidos a la molécula aceptora. A diferencia de las GTs, estas enzimas son mucho más promiscuas en sus sustratos especialmente en cuanto a aceptores se refiere. Estas características definitorias de las glicosintasas hacen que sean capaces de generar una gran variedad de productos mediante la combinación de dadores y aceptores (glicosídicos o no).

En la actualidad se ha conseguido desarrollar un amplio repertorio de glicosintasas incluyendo ejemplos en 16 de las familias de las GHs con retención de configuración del carbono anomérico (Armstrong & Withers, 2013; Cobucci-Ponzano & Moracci, 2012; Perugino, Trincone, Rossi, & Moracci, 2004; Shaikh & Withers, 2008; L.-X. Wang & Huang, 2009).

El primero de los artículos presentados supone el establecimiento de una técnica para el cribado de bibliotecas de glicosintasas independientemente de la naturaleza de las mismas y de sus productos. La capacidad de aplicar protocolos de evolución dirigida a un enzima depende en gran medida en la capacidad de disponer de un método de cribado lo suficientemente simple, robusto y sensible como para detectar los mutantes mejorados. Así, el poder mejorar enzimas a través de protocolos de evolución dirigida dispara significativamente las posibilidades de éxito. Gracias a la aplicación de este método se llegaron a descubrir mutantes puntuales que convertían al enzima en glicosintasa pero que no habían sido descritos previamente. El método descrito no solo ha

demostrado ser útil, sino que la comunidad científica se ha hecho eco de su potencial. Este es el caso de la mención que Danby y Withers hacen en su revisión “*Advances in Enzymatic Glycoside Synthesis*” (Danby & Withers, 2016):

“Planas and coworkers recently developed a fluoride chemo-sensor assay for the express purpose of evaluating putative synthase mutants (Andrés, Aragunde, & Planas, 2014). In this assay chemical detection of fluoride is effected indirectly using a protected fluorophore: tert-butylsilyl protected methylumbelliferone (MU-TBS). Fluoride catalyzed cleavage of MU-TBS generates fluorescent MU, allowing detection of fluorescence in a high-throughput manner. As proof of concept multiple nucleophile mutants of 1,3-1,4-β-glucanase from Bacillus licheniformis were prepared and reacted with α-laminaribiosyl fluoride. Subsequent reaction with MU-TBS monitored by fluorescence identified six mutants with synthase activity: of these three, E134T, E134D and E134C, had not been previously reported. Expanding this assay to larger more diverse libraries would represent an exciting step in acquiring new, useful synthase enzymes. Combining these approaches with emerging technologies, such as microfluidic droplet based platforms (Romero, Tran, & Abate, 2015), may provide a way forward to rapidly generate glycosynthases from diverse GH families”

Tras la publicación de este primer método para la determinación de la actividad glicosintasa basado en un quemosensor de fluoruro otros han seguido utilizando la misma base funcional (Hayes, Bochinsky, Seibt, Elling, & Pietruszka, 2017).

Además en el cribado realizado se encontró el mutante E134D, que se interpretó como el “eslabón perdido” entre las hidrolasas y las glicosintasas, ya que es capaz de llevar a cabo las dos actividades. Esta dualidad se asigna a varios factores: en primer lugar la reducción del tamaño de la cadena lateral de un Glu a Asp permite que se acomode el sustrato activado con un α-fluoruro. El segundo factor se justifica mediante la caída del pKa del residuo E138. En el enzima WT su pKa es anormalmente alto (7,2) debido a que la proximidad de la carga del E134 desestabiliza su base conjugada, con la formación del intermediario glicosil-enzima mediante el E134 el residuo E138 recupera un valor de pKa más próximo al esperado y se comporta como una base catalítica. En su comportamiento como glicosintasas la mayor distancia entre el E134D y el E138 permite que este muestre un pKa más bajo (5,9) lo que permite que se comporte como una base, algo necesario para que se lleve a cabo el mecanismo de formación de enlace glicosídico en las glicosintasas.

Así en función del pH en el que se encuentra el enzima el comportamiento del mismo puede modularse hacia la potenciación del mecanismo hidrolasa o glicosintasa. A pHs bajos el E138 se encuentra protonado y se comporta como un ácido, mientras que a pHs por encima del pKa prevalece el comportamiento como glicosintasa del enzima.

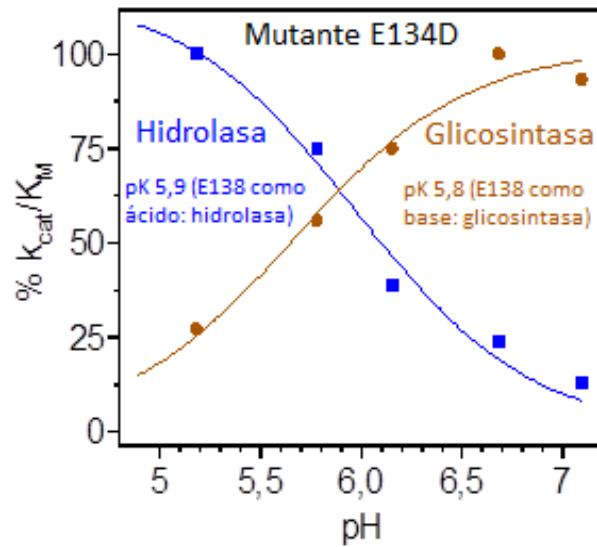


Figura 11.3-1 Dualidad hidrolasa/glicosintasas del mutante E134D

Representación del perfil de actividad hidrolasa y glicosintasa del mutante E134D en función del pH. Con un pKa 5,8-5,9 se observa que por debajo del mismo prevalece la actividad hidrolasa y por encima la glicosintasa.

Este fenómeno no había sido descrito previamente de ahí la relevancia de llegar a elucidar el mecanismo por el cual este enzima mostraba esta dualidad catalítica. En el marco de las glicosilhidrolasas, glicosintasas y en general cualquier otro enzima, las aportaciones que lleven a una mayor comprensión del mecanismo catalítico y de los residuos que interactúan con el sustrato en el centro activo sirven de punto de apoyo para las palancas que serán necesarias en la optimización del enzima para su mejora o para cualquier otro fin como podría ser la inactivación, modulación, etc.

Conclusiones

12. Conclusiones

A continuación se detallarán las conclusiones extraídas del trabajo realizado en esta tesis en las dos familias de enzimas estudiadas: las desacetilasas de quitinas y las glicosintasas.

12.1. Conclusiones capítulo 1: quitina desacetilasas

1. Se ha desarrollado y validado una metodología completa de análisis de la actividad desacetilasas basada en una plataforma robótica y una cuantificación de los productos por HPLC-MS en modo desatendido gracias al desarrollo de un tampón de parada de la reacción. Este procedimiento tiene una repetibilidad definida por un CV inferior al 11% y un rango lineal hasta, al menos, 225 μM .
2. Se comprobó que la desacetilasa de quitooligosacáridos de *Vibrio cholerae* reduce su actividad a medida que se incrementa el DP del sustrato. Paralelamente se identificó que el metal catalítico que permite a este enzima desarrollar una mayor actividad catalítica es el Zn^{+2} .
3. Se construyó una versión truncada del enzima en la que solo está presente el dominio catalítico eliminando los dos CBMs que presenta el enzima original. Este constructo mostró niveles similares de expresión y actividad del enzima WT manteniendo la especificidad por sustratos y el patrón de desacetilación. Este apoya la hipótesis de que los CBMs tienen la función biológica de concentrar el enzima próximo a fuentes de quitina pero no un papel en la función catalítica.
4. Se generaron dos estrategias para la demostración del *Subsite Capping Model*:
 - 4.1. Bloqueo del *loop* 5: se creó un puente disulfuro con el fin de bloquear los subsitios positivos. El mutante P193C/N273C demostró una actividad reducida con DP4 y DP5 mientras que los sustratos de menor tamaño no se veían afectados.
 - 4.2. Eliminación del *loop* 5: Se creó una quimera VcCDA L5-BsPdaA en la que se realizó la sustitución del *loop* 5 por uno de tamaño mínimo. Este constructo invirtió por completo la especificidad por sustrato del enzima mostrándose más activo con DP4 que con DP2. Este mutante mostraba una baja actividad en general y un reducido rendimiento de expresión.

Estos dos resultados demuestran que el *Subsite Capping Model* es capaz de explicar la especificidad por sustratos de la VcCDA y que por lo tanto, los *loops* que decoran el surco catalítico definen los subsitios accesibles y son responsables de definir el patrón de desacetilación.

5. Se desarrollaron tres estrategias de diseño racional del *loop* 5 del VcCDA que permitieron la creación de cuatro mutantes de segunda generación con el fin de incrementar la

actividad con sustratos largos sin afectar negativamente otros parámetros. Todos los mutantes conseguían este fin. De entre ellos el mutante P-G (P266G, P271G y P280G) demostró ser un candidato ideal para su aplicación en la producción biotecnológica de oligómeros de quitosano con un patrón de acetilación definido.

12.2. Conclusiones capítulo 2: glicosintasas

1. Se ha desarrollado y aplicado una metodología de cribado de bibliotecas de glicosintasas basadas en un sensor químico fluorescente de fluoruro, 4-MUTBS (4-methylumbelliferyl *tert*-butyldimethylsilyl ether). Esta metodología presenta un Z-Factor de 0,62 lo que denota una buena discriminación.
2. Al aplicar esta metodología de cribado a una biblioteca de saturación del residuo nucleófilo de la 1,3-1,4- β -Glucanasa de *Bacillus licheniformis* se detectaron 6 mutantes diferentes con actividad glicosintasa. Tres de estos mutantes no habían sido descritos previamente E134C, E134T y E134D.
3. El mutante E134D ha demostrado ser un mutante con un comportamiento dual hidrolasa y glicosintasa siendo capaz de desarrollar las dos actividades. Este mutante fue caracterizado en detalle bioquímicamente y mediante modelado de su estructura. Este análisis ha revelado como el pK_a de los residuos catalíticos se ve alterado por los residuos adyacentes, especialmente el E138 que en función del pH puede actuar como ácido o base general dando lugar a un mecanismo hidrolítico o glicosintasa a pH por debajo o por encima de su pK_a respectivamente.

Materiales y Métodos

13. Materiales y métodos

13.	Materiales y métodos.....	249
13.1.	Creación de mutantes y constructos	251
13.1.1.	Aislamiento y clonaje del Domino catalítico	251
13.1.2.	Creación del puente disulfuro: VcCDA P193C/N273C.....	252
13.1.3.	Quimera VcCDA L5-BsPdaA.....	253
13.1.4.	VcCDA mutantes de segunda generación	255
13.1.5.	Creación de mutantes inactivos D39S.....	259
13.2.	Expresión y purificación de proteínas	260
13.2.1.	Expresión de proteínas	260
13.2.2.	Purificación de proteínas	263
13.3.	Cinéticas enzimáticas.....	267
13.3.1.	Estimación de actividad de las fracciones de GFC mediante AcOMU	267
13.3.2.	Actividad específica	268
13.3.3.	Cálculo de parámetros cinéticos Michaelis-Menten	270
13.4.	Caracterización de la dependencia de metales en el mecanismo catalítico	272
13.5.	Metodología HPLC-MS para la estimación de productos monodesacetilados.....	272
13.5.1.	Preparación de patrones.....	272
13.5.2.	Metodología HPLC-MS.....	274
13.5.2.1.	Descripción del equipo	274
13.5.2.2.	Método de parada de reacción enzimática.....	274
13.5.2.3.	Condiciones cromatográficas	274
13.5.2.4.	Condiciones detector MS.....	275
13.6.	Identificación de los patrones de desacetilación	275
13.6.1.	Preparación de los productos de desacetilación.....	276
13.6.2.	Descripción del equipo y columna	276
13.6.3.	Parámetros de la sección de cromatografía líquida	277
13.6.4.	Parámetros del ELSD.....	278
13.6.5.	Parámetros trampa iónica	278
13.6.6.	Comprobación MS1 de los productos de partida.....	279
13.6.7.	[² H ₃] N-acetilación.....	279
13.6.8.	Marcaje del extremo reductor con ¹⁸ O	280
13.6.9.	Scripts de análisis de datos	280
13.7.	<i>Differential Scanning Fluorimetry</i> DSF– Estimación de estabilidad.....	281

13.8.	Titulación de cisteínas libres, Método de Ellman	281
13.9.	Protocolos de biología molecular básicos	282
13.9.1.	Preparación de medios.....	282
13.9.2.	Medida de la densidad óptica de un cultivo.....	284
13.9.3.	Creación de un glicerinado <i>stock</i> a -80°C.....	285
13.9.4.	Obtención de células competentes y transformación	285
13.9.5.	Obtención y purificación de ADN	287
13.9.6.	Estimación de la concentración de ADN.....	289
13.9.7.	Electroforesis de ADN en gel de agarosa.....	290
13.9.8.	Secuenciación de ADN plasmídico.....	291
13.9.9.	Digestión de ADN mediante enzimas de restricción.....	292
13.9.10.	Ligación de fragmentos de restricción para su clonación en vector	292
13.10.	Protocolos bioquímicos básicos	293
13.10.1.	Electroforesis en gel desnaturizante SDS-PAGE.....	293
13.10.2.	Estimación de la concentración de proteína por BCA en microplaca	295
13.10.3.	Estimación de MW de una proteína pura por MALDI-TOF	295
13.10.4.	Concentrado de proteína / cambio de tampón por Amicon™	296

13.1. Creación de mutantes y constructos

13.1.1. Aislamiento y clonaje del Domino catalítico

Se creó un nuevo constructo en el que se eliminaron los dos CBMs presentes en VcCDA WT FL y además se desplazó el *Strep-Tag II* al extremo N terminal mediante el uso de un vector de expresión diferente al original, pPR-IBA2.

- Se realiza un estudio bioinformático (PFAM) y estructural para la definición del lugar de truncado de la proteína. Se decidió que el lugar idóneo de corte era la T336.
- Se diseñan los cebadores de tal modo que incluyan las dianas de restricción que se utilizarán para el clonaje (5' KasI y PstI en 3').

Nombre cebador	Dirección	Secuencia	n	T _m (°C)
CD_pPR_KasI_F	Forward	5'-GAAAAAGGCGCCATGAACAGCACGCCGAAAG-3'	31	66
CD_pPR_PstI_R	Reverse	5'-GTCCCCCTGCAGCTACGTATAATTGTCCATGGTATC-3'	36	64

Tabla 13.1- 1 Cebadores aislamiento CD de VcCDA

Cebadores utilizados para el aislamiento y clonación del dominio catalítico de VcCDA en el vector pPR-IBA2.

- Se obtiene ADN plasmídico del vector original (pET22b-VcCDA WT FL) mediante miniprep así como del vector de destino pPR-IBA2.
- Se extrae la secuencia del dominio catalítico mediante la técnica de PCR. Se utilizan los cebadores previamente mencionados y el kit *Iproof High Fidelity Master Mix* (Bio-Rad). Las condiciones son las siguientes: 25 ng de ADN, 0,2 µM de concentración de cada cebador en un volumen total de 50 µL.
- Las etapas de programa de PCR son las que se muestran en la tabla que sigue:

# Etapa	Etapa	Temperatura	Tiempo
1	Desnaturalización inicial	95°C	2 min
2	Desnaturalización	95°C	30 seg
3	Hibridación	60°C	30 seg
4	Extensión	72°C	1 min 30 seg
5	Repetir desde #2 25 veces	-	-
6	Extensión final	72°C	2 min
7	Conservación	4°C	∞

Tabla 13.1- 2 Programa PCR aislamiento CD de VcCDA

Etapas del programa utilizado para la obtención de del dominio catalítico de VcCDA.

- El amplicón es purificado mediante el kit *GenElute™ PCR Clean-Up* (Sigma-Aldrich).
- 1 µg tanto del vector de destino como del amplicón son digeridos preparativamente utilizando los enzimas KasI y PstI (NEB).
- El cóctel de digestión se carga directamente en un gel de agarosa preparativo (1% de concentración).
- Se realiza una extracción de ADN desde banda en gel de agarosa.

- La ligación se realiza a diferentes ratios vector-inserto durante 30 minutos a temperatura ambiente
- Se transforma el producto de ligación en *E. coli* DH5 α químicamente competentes por CaCl₂ y se extiende en placa de LB con ampicilina (100 mg/L).
- Se comprobó la identidad del nuevo constructo mediante PCR y secuenciación.

13.1.2. Creación del puente disulfuro: VcCDA P193C/N273C

Para la obtención de este doble mutante lo que se ha realizado han sido dos rondas mutagénesis de Quick Change PCR (QC-PCR). Se parte del constructo original pET22b VcCDA WT FL.

- Mediante estudio de la estructura de la proteína se identifica el residuo del *loop* 5 más próximo al *loop* 3 que podría crear un puente disulfuro que bloquee su movimiento. Estas posiciones son P193C (L3) y N273C (L5).
- Se diseñan los cebadores siguiendo las recomendaciones de Zheng et al. (Zheng, Baumann, & Reymond, 2004).

Nombre cebador	Dirección	Secuencia	n	T _m (°C)
P193C_F	Forward	5'-TCTGAAATGCTGGGAACCGGTTATG-3'	26	61
P193C_R	Reverse	5'-GGTCCCAGCATTCAGATTATCTGAGG-3'	28	59
N273C_F	Forward	5'-GAACCGATCTGCTCTAAAACCCAGGAATTCC-3'	31	62
N273C_R	Reverse	5'-GTTTAGAGCAGATCGGTTCAATCGTGGTCG-3'	31	62

Tabla 13.1- 3 Cebadores doble mutación P193C/N273C en VcCDA FL

Cebadores utilizados para la introducción de una doble mutación en VcCDA *full-length* para el establecimiento de un puente disulfuro.

- Se obtiene ADN plasmídico del vector original (pET22b-VcCDA WT FL).
- Para la incorporación de la primera mutación (P193C). Se realiza un protocolo de QC-PCR. Se utilizan los cebadores previamente mencionados y el kit *Iproof High Fidelity Master Mix* (Bio-Rad). Las condiciones son las siguientes: 7 ng de ADN, 0,375 μ M de concentración de cada cebador en un volumen total de 40 μ L.
- Las etapas de programa de PCR son las que se muestran en la tabla que sigue:

# Etapa	Etapa	Temperatura	Tiempo
1	Desnaturalización inicial	98°C	3 min
2	Desnaturalización	98°C	30s eg
3	Hibridación	55°C	30 seg
4	Extensión	72°C	3 min 30 seg
5	Repetir desde #2 30 veces	-	-
6	Extensión final	72°C	4 min
7	Conservación	4°C	∞

Tabla 13.1- 4 Programa PCR Quick-Change para la mutación P193C/N273C

Etapas del programa utilizado en las PCR de mutagénesis utilizando VcCDA FL como molde para la creación de un puente disulfuro en P193C/N273C.

- El amplicón es purificado mediante el kit *GenElute™ PCR Clean-Up* (Sigma-Aldrich) y eluido en 40 μ L H₂O MilliQ autoclavada.
- Se realiza una digestión con DpnI con su correspondiente tampón a 37°C durante 3h.

- Después de la digestión se realiza la transformación del producto resultante (2 alícuotas de 10 μ L de digerido) en *E. coli* DH5 α químicamente competentes por CaCl₂.
- Se comprueba la correcta inserción de la mutación mediante secuenciación del ADN plasmídico de alguna de las colonias obtenidas tras la transformación.
- Una vez obtenido el primer mutante se realizó el mismo proceso para incorporar la segunda mutación (N273C) del par que crearán el puente disulfuro.

13.1.3. Quimera L5-BsPdaA

Para la obtención de este mutante eliminando el *loop* 5 de la versión original del enzima VcCDA y la inserción del mismo *loop* de *Bacillus subtilis* PdaA (PDB: 1NY1) en un único paso se utilizó una versión adaptada del protocolo publicado por Lee et al. (J. Lee et al., 2010). Se utilizó la proteína completa clonada en el plásmido pET22b como molde para todo el proceso de biología molecular. En el diseño de la figura siguiente se ejemplifica el diseño del experimento (válido también para el constructo dentro de pPR iBA2).

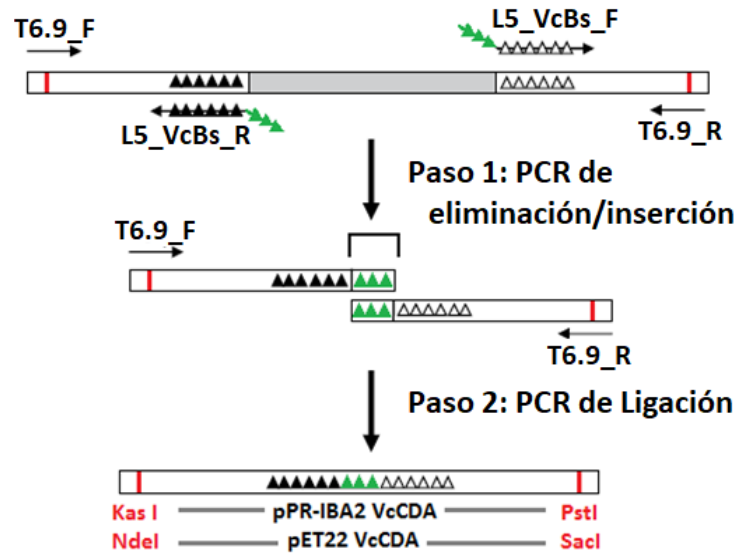


Figura 13.1-1 Esquema protocolo intercambio de *loop* 5 VcCDA-BsPdaA

Esquema del protocolo de biología molecular utilizado para la sustitución del *loop* 5 de VcCDA por el de BsPdaA aplicable tanto en la proteína FL como para el dominio catalítico.

- Mediante estudio de la estructura de las dos proteínas se identifica la zona que será sustituida. Se eliminará desde Y256 hasta V290 en VcCDA (ambos residuos incluidos) y se introducirá desde Q212 hasta A217 provenientes de BsPdaA (ambos aminoácidos incluidos).
- Se diseñan los cebadores mutagénicos de tal forma que hibriden con VcCDA y existan unas zonas de secuencia extra en 5' que codifiquen para la secuencia del *loop* 5 de BsPdaA.

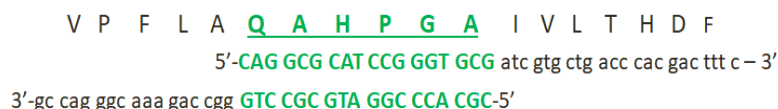


Figura 13.1-2 Solapamiento cebadores loop 5 VcCDA-BsPdaA

Esquema de hibridación de los cebadores utilizados para la introducción del loop 5 de BsPdaA en VcCDA y su traducción en aminoácidos.

- Los cebadores utilizados son los siguientes:

Nombre cebador	Dirección	Secuencia	n	T _m (°C)
T6.9_F	Forward	5'-GATCTCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGG-3'	39	63
T6.9_R	Reverse	5'-GGCCCAAGGGGTTATGCTAGTTATTGCTCAGCGGTGGC-3'	39	70
L5_VcBs_F	Forward	5'- <u>CAGGCGCATCCGGGTGCG</u> ATCGTGCTGACCCACGACTTTC-3'	40	73
L5_VcBs_R	Reverse	5'- <u>CGCACCCGGATGCGCCTG</u> GGCCAGAAACGGGACC-3'	34	76

Tabla 13.1- 5 Cebadores intercambio de loop 5 BsPdaA-VcCDA

Cebadores utilizados durante toda la metodología de eliminación del loop 5 de VcCDA y la introducción del equivalente loop de BsPdaA.

- Se realizan las dos PCRs primarias para obtener las dos mitades del nuevo constructo, es decir N terminal de VcCDA con el loop 5 de BsPdaA y C terminal de VcCDA con el loop 5 de BsPdaA. Para la mezcla de reacción se utiliza el kit *Iproof High Fidelity Master Mix* (Bio-Rad) y los siguientes pares de cebadores T6.9_F/L5_VcBs_R y L5_VcBs_F/T6.9_R. Las condiciones son las siguientes: 25 ng de ADN, 0,5 µM de concentración de cada cebador en un volumen total de 50 µL.
- Las etapas de programa de PCR son las que se muestran en la tabla que sigue:

# Etapa	Etapa	Temperatura	Tiempo
1	Desnaturalización inicial	95°C	2 min
2	Desnaturalización	95°C	30 seg
3	Hibridación	57,5°C (extremo N) 70°C (extremo C)	30 seg
4	Extensión	72°C	30 seg
5	Repetir desde #2 30 veces	-	-
6	Extensión final	72°C	2 min
7	Conservación	4°C	∞

Tabla 13.1- 6 Programa 1ª PCR eliminación/inserción loop 5 BsPdaA-VcCDA

Etapas del programa utilizado para eliminación del loop 5 de VcCDA, división del gen en dos mitades y la inserción de la secuencia del loop 5 de BsPdaA.

- El cóctel de reacción se carga directamente en un gel de agarosa preparativo (1% de concentración).
- Se realiza una extracción de ADN desde banda en gel de agarosa utilizando el kit *GenElute™ Gel Extracción Kit* (Sigma-Aldrich).
- Se realiza la PCR de ligación utilizando 1 µL del producto purificado de cada extremo, los cebadores flanqueantes (T6.9_F y T6.9_R) a una concentración de 0,5 µM cada uno y el mismo kit de PCR en un volumen final de 50 µL.
- Las etapas de programa de PCR de ligación son las que se muestran en la tabla que sigue:

# Etapa	Etapa	Temperatura	Tiempo
1	Desnaturalización inicial	95°C	2 min
2	Desnaturalización	95°C	30 seg
3	Hibridación	60,2°C	30 seg
4	Extensión	72°C	50 seg
5	Repetir desde #2 30 veces	-	-
6	Extensión final	72°C	2 min
7	Conservación	4°C	∞

Tabla 13.1- 7 Programa 2ª PCR de ligación loop 5 BsPdaA-VcCDA

Etapas del programa utilizado para la fusión de las dos mitades del gen obtenido en la etapa previa incluyendo la inserción de la secuencia del loop 5 de BsPdaA.

- El amplicón es purificado mediante el kit *GenElute™ PCR Clean-Up* (Sigma-Aldrich) y eluído en 40 µL H₂O MilliQ autoclavada.
- 1 µg tanto del vector de destino (pET22b) como del amplicón son digeridos preparativamente utilizando los enzimas NdeI y SacI-HF (NEB).
- El cóctel de digestión se carga directamente en un gel de agarosa preparativo (1% de concentración).
- Se realiza una extracción de ADN desde banda en gel de agarosa.
- La ligación se realiza a diferentes ratios vector-inserto durante 30 minutos a temperatura ambiente
- Se transforma el producto de ligación en *E. coli* DH5α químicamente competentes por CaCl₂ y se extiende en placa de LB con ampicilina (100 mg/L).
- Se comprobó la identidad del nuevo constructo mediante PCR y secuenciación.

13.1.4. VcCDA mutantes de segunda generación

Para la creación de esta segunda generación de mutantes se utilizó una modificación del protocolo de por Lee et al. (J. Lee et al., 2010). En este caso se utilizó como molde el dominio catalítico clonado en el plásmido pPR-IBA2. En el diseño de la figura siguiente se ejemplifica el diseño del experimento.

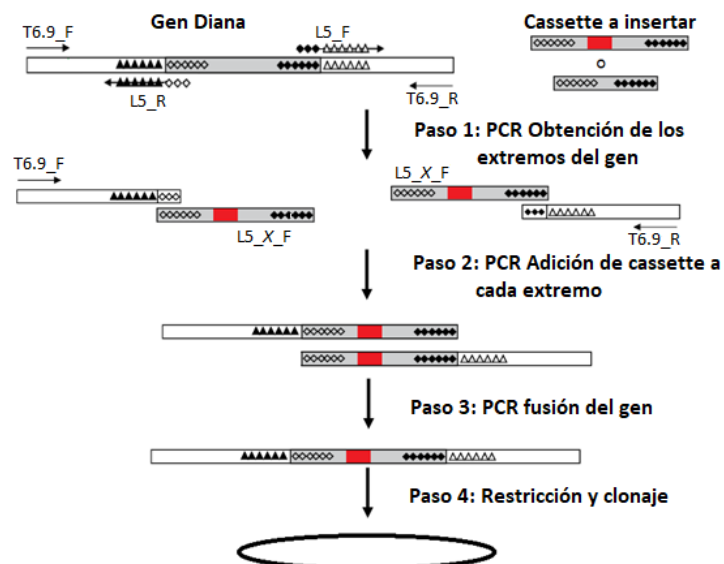


Figura 13.1-3 Esquema protocolo de introducción de cassette para la creación de los mutantes de segunda generación

Esquema del protocolo de biología molecular utilizado para la eliminación de parte del *loop 5* de VcCDA y las etapas posteriores para la inclusión de cassetes modificados en los que se incluyen diferentes mutaciones/estrategias.

- Mediante estudio de la estructura de la proteína se diseñan las estrategias de mutación, como límite se toma el puente disulfuro que existe dentro del *loop* entre C264 y C281:
 - VcCDA CD Δ L5: Eliminación del *loop 5* (Δ S265-P280)
 - VcCDA CD P-G: Mutación de las 3 Prolinas a Glicinas (P266G, P271G, P280G)
 - VcCDA CD Δ Hélice 1: Reducción parcial de *loop 5* eliminando una hélice del extremo N terminal del *loop* (Δ S265-T268)
 - VcCDA CD Δ Hélice 2: Reducción parcial de *loop 5* eliminando una hélice del extremo C terminal del *loop* (Δ P271-T276)
- Se diseñan cebadores para eliminar una parte central del *loop* que se definirá como cassette de inserción sobre el que se realizarán los cambios en la secuencia para introducir las correspondientes mutaciones.
- Los cebadores utilizados son los indicados en la Tabla 13.1- 8.
- Se realizan las dos PCRs primarias para obtener las dos mitades de la secuencia del dominio catalítico de VcCDA en las que se elimina el cassette del *loop 5*. Para la mezcla de reacción se utiliza el kit *Iproof High Fidelity Master Mix* (Bio-Rad) y los siguientes pares de cebadores T6.9_F/L5_R y L5_F/T6.9_R. Las condiciones son las siguientes: 25 ng de ADN, 0,5 μ M de concentración de cada cebador en un volumen total de 50 μ L.

Nombre cebador	Dirección	Secuencia	n	T _m (°C)
T6.9_F	Forward	5'-GATCTCGATCCCAGCAAATTAATACGACTCACTATAGGG-3'	39	63
T6.9_R	Reverse	5'-GGCCCAAGGGGTTATGCTAGTTATTGCTCAGCGGTGGC-3'	39	70
L5_F	Forward	5'-CAGTGCTTTGTCCACATAGGCCAGAAAC-3'	28	62
L5_R	Reverse	5'-CCGCTGCATGCGGATAAAGTCATCGTG-3'	27	64
L5_AGA_F	Forward	5'-TATGTGGACAAAGCACTGAACAGC CGGGGCGCG GGTACGCCGCTGCATG CGGATAAA-3'	57	75
L5_AGA_R	Reverse	5'-TTTATCCGCATGCAGCGGCTACCC CGCGCCCGC GCTGTTCAAGTCTTTGTC CACATA-3'	57	75
L5_PG_F	Forward	5'-TATGTGGACAAAGCACTGAACAGCTGCTCT GGC ACCACGATTGA GGC AT CAATTCTAAAACCCAGGAATTC GGC TGTGGTACGCCGCTGCATGCGGATAAA -3'	10 2	73
L5_PG_R	Reverse	5'-TATCCGCATGCAGCGGCTACCACAG CC GAATTCCTGGGTTTTAGAATTG AT GC TTCAATCGTGGT GCC AGAGCAGCTGTTCAAGTCTTTGTCCACATA-3'	10 2	73
L5_ΔH1_F	Forward	5'-TATGTGGACAAAGCACTGAACAGCTGCATTGAACCGATCAATTCTAAAAC CCAGGAATTCCTGTTGGTACGCCGCTGCATGCGGATAAA-3'	90	73
L5_ΔH1_R	Reverse	5'-TTTATCCGCATGCAGCGGCTACCACAGGGAATTCCTGGGTTTTAGAATT GATCGGTTCAATGCAGCTGTTCAAGTCTTTGTCCACATA-3'	90	73
L5_ΔH2_F	Forward	5'-TATGTGGACAAAGCACTGAACAGCTGCTCCGACCACGATTGAACAGGA ATCCCCTGTGGTACGCCGCTGCATGCGGATAAA-3'	84	73
L5_ΔH2_R	Reverse	5'-TTTATCCGCATGCAGCGGCTACCACAGGGAATTCCTGTTCAATCGTGGT CGGAGAGCAGCTGTTCAAGTCTTTGTCCACATA-3'	84	73

Tabla 13.1- 8 Cebadores para la creación de los mutantes de segunda generación

Cebadores utilizados durante toda la metodología de eliminación del *loop 5* de *VcCDA* y la introducción de los diferentes casetes mutagénicos.

- Las etapas de programa de PCR son las que se muestran en la Tabla 13.1- 9:

# Etapa	Etapa	Temperatura	Tiempo
1	Desnaturalización inicial	95°C	2 min
2	Desnaturalización	95°C	30 seg
3	Hibridación	60,2°C	30 seg
4	Extensión	72°C	30 seg
5	Repetir desde #2 30 veces	-	-
6	Extensión final	72°C	2 min
7	Conservación	4°C	∞

Tabla 13.1- 9 Programa 1ª PCR eliminación *loop 5* *VcCDA*

Etapas del programa utilizado para eliminación de parte del *loop 5* de *VcCDA* produciendo la división del gen en dos mitades.

- El cóctel de reacción se carga directamente en un gel de agarosa preparativo (1% de concentración).
- Se realiza una extracción de ADN desde banda en gel de agarosa utilizando el kit *GenElute™ Gel Extraction Kit* (Sigma-Aldrich).
- Se realiza la PCR de adición de cada casete, para ello se realizan dos PCRs por estrategia para fusionar el casete a cada mitad del gen previamente obtenida. Así se utilizan los pares de cebadores T6.9_F/L5_X_R y L5_X_F/T6.9_R para los extremos correspondientes a los extremos N and C terminal, donde X es el indicativo de los diferentes mutantes. La concentración de cada cebadores es 0,5 μM, la cantidad de ADN usada fue 25 ng y usando el mismo kit de PCR en un volumen final de 50 μL.

- Las etapas de programa de PCR de ligación son las que se muestran en la Tabla 13.1- 10:

# Etapa	Etapa	Temperatura	Tiempo
1	Desnaturalización inicial	95°C	2 min
2	Desnaturalización	95°C	30 seg
3	Hibridación	40°C	30 seg
4	Extensión	72°C	50 seg
5	Repetir desde #2 30 veces	-	-
6	Extensión final	72°C	2 min
7	Conservación	4°C	∞

Tabla 13.1- 10 Programa 2ª PCR adición de casete loop 5

Etapas del programa utilizado para la inserción de la secuencia del casete mutagénico en cada una de las dos mitades obtenidas en la etapa previa de eliminación del loop 5.

- Los fragmentos amplificados son nuevamente cargados en un gel de agarosa y purificados desde ahí.
- Se realiza una tercera reacción de PCR (Tabla 13.1- 11) para fusionar las dos mitades en las que se ha unido el casete. Para eso se utilizan cantidades equimolares de cada uno de los extremos sin la adición de ningún cebador adicional. Se utiliza el mismo kit y un volumen final de 50 µL.

# Etapa	Etapa	Temperatura	Tiempo
1	Desnaturalización inicial	95°C	2 min
2	Desnaturalización	95°C	30 seg
3	Hibridación	45°C	30 seg
4	Extensión	72°C	1 min
5	Repetir desde #2 30 veces	-	-
6	Extensión final	72°C	2 min
7	Conservación	4°C	∞

Tabla 13.1- 11 Programa 3ª PCR fusión de gen en mutantes de segunda generación

Etapas del programa utilizado para fusión de las dos mitades del gen en los que se ha incluido casete mutagénico del loop 5.

- El producto de PCR es cargado en un gel de agarosa al 1% y la banda del tamaño correspondiente a la fusión de las dos mitades purificada.
- Esta banda es amplificada mediante el uso de los cebadores flanqueantes T7 *promoter* y T7 *terminator* (Tabla 13.1- 12). La concentración de cada cebadores es 0,5 µM, la cantidad de ADN usada fue 10 ng y usando como kit de PCR la *RedTaq* (Sigma-Aldrich) en un volumen final de 50 µL.

Cebador	Secuencia	T _m	n	%G/C
T7 <i>promoter</i>	5' - TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG - 3'	48°C	20	40%
T7 <i>terminator</i>	5' - GCT AGT TAT TGC TCA GCG G - 3'	54°C	19	53%

Tabla 13.1- 12 Cebadores T7

Secuencia de los cebadores T7 universales.

- El programa de PCR utilizado en la última etapa de amplificación es el que se indica en la Tabla 13.1- 13:

# Etapa	Etapa	Temperatura	Tiempo
1	Desnaturalización inicial	95°C	2 min
2	Desnaturalización	95°C	35 seg
3	Hibridación	40°C	30 seg
4	Extensión	72°C	1 min
5	Repetir desde #2 35 veces	-	-
6	Extensión final	72°C	2 min
7	Conservación	4°C	∞

Tabla 13.1- 13 Programa 4ª PCR amplificación de producto de unión de mutantes de segunda generación
Etapas del programa utilizado para la amplificación del producto de fusión del gen en el proceso de generación de los mutantes de segunda generación.

- El amplicón es purificado mediante el kit *GenElute™ PCR Clean-Up* (Sigma-Aldrich) y eluido en 40 µL H₂O MilliQ autoclavada.
- 1 µg tanto del vector de destino (pPR-IBA2) como del amplicón son digeridos preparativamente utilizando los enzimas *KasI* y *PstI-HF* (NEB).
- El cóctel de digestión se carga directamente en un gel de agarosa preparativo (1% de concentración).
- Se realiza una extracción de ADN desde banda en gel de agarosa.
- La ligación se realiza a diferentes ratios vector-inserto durante 30 minutos a temperatura ambiente
- Se transforma el producto de ligación en *E. coli* DH5α químicamente competentes por CaCl₂ y se extiende en placa de LB con ampicilina (100 mg/L).
- Se comprobó la identidad del nuevo constructo mediante PCR y secuenciación.

13.1.5. Creación de mutantes inactivos D39S

Para los estudios de cristalografía en un intento de resolver la estructura de los nuevos constructos era necesaria la obtención de mutantes inactivos, para ello se decidió realizar la inactivación de la base general (D39) mediante su modificación a serina. Para este proceso se sigue un protocolo de mutagénesis de *Quick Change PCR* (QC-PCR).

- Se diseñan los cebadores siguiendo las recomendaciones de Zheng et al (Zheng et al., 2004) (Tabla 13.1- 14).

Nombre cebador	Dirección	Secuencia	n	T _m (°C)
D39S_F	Forward	5'-TGACGTTTTCTGATGGCCCGTGAAC-3'	26	65
D39S_R	Reverse	5'-GGGCCATCAGAAAACGTCAGATAGATCG-3'	27	63

Tabla 13.1- 14 Cebadores mutagénicos D39S para la inactivación de VcCDA

Cebadores utilizados para la introducción de la mutación D39S para la inactivación de la base general.

- Se obtiene ADN plasmídico de cada uno de los constructos clonados en el vector pPR-IBA2.

- Se realiza un protocolo de QC-PCR. Se utilizan los cebadores previamente mencionados y el kit *Iproof High Fidelity Master Mix* (Bio-Rad). Las condiciones son las siguientes: 7 ng de ADN, 0,375 μ M de concentración de cada cebador en un volumen total de 40 μ L.
- Las etapas de programa de PCR son las que se muestran en la Tabla 13.1- 15:

# Etapa	Etapa	Temperatura	Tiempo
1	Desnaturalización inicial	98°C	3 min
2	Desnaturalización	98°C	30 seg
3	Hibridación	57°C	30 seg
4	Extensión	72°C	3 min 30 seg
5	Repetir desde #2 30 veces	-	-
6	Extensión final	72°C	4 min
7	Conservación	4°C	∞

Tabla 13.1- 15 Programa PCR Quick-Change para la mutación D39S

Etapas del programa utilizado en las PCR de mutagénesis para la inactivación de los diferentes mutantes mediante el cambio D39S para la inactivación de la base general.

- El amplicón es purificado mediante el kit *GenElute™ PCR Clean-Up* (Sigma-Aldrich) y eluído en 40 μ L H₂O MilliQ autoclavada.
- Se realiza una digestión con DpnI con su correspondiente tampón a 37°C durante 3h.
- Después de la digestión se realiza la transformación del producto resultante (2 alícuotas de 10 μ L de digerido) en *E. coli* DH5 α químicamente competentes por CaCl₂.
- Se comprueba la correcta inserción de la mutación mediante secuenciación del ADN plasmídico de alguna de las colonias obtenidas tras la transformación.

13.2. Expresión y purificación de proteínas

13.2.1. Expresión de proteínas

13.2.1.1. Optimización/estudio de la expresión de proteínas

Durante la realización de este trabajo se ha tomado siempre como referencia el medio de autoinducción para la sobreexpresión de proteínas recombinantes en *E. coli*. Este es debido a que esta ha sido la metodología reportada desde un principio como óptima para la expresión de VcCDA WT. Por consiguiente, en muchos casos se ha analizado únicamente la expresión de proteínas a pequeña escala en este medio. Solo en el caso de VcCDA- Δ L5 fue necesario un estudio más extenso debido a la poca expresión de esta quimera.

- Se transforma una alícuota de *E. coli* B121 con el plásmido en el cual se encuentra clonado la proteína recombinante a expresar. Se sigue el protocolo estándar de transformación y se extiende en placas de LB-Ampicilina y se incuban ON a 37°C.
- A partir de una colonia única se realiza un preinóculo de 10 mL de medio LB con ampicilina (100 mg/L). Este cultivo se realiza en un tubo Falcon de 50 mL estéril.
- Se incuba ON a 37°C y 250 rpm.

- Para la prueba de expresión en medio de autoinducción:
 - Se preparan 30 mL de medio de autoinducción para cada uno de los mutantes/controles/condiciones a estudiar.
 - Se reparten en erlenmeyers estériles de 100 mL.
 - Se inocula 1 mL de preinóculo.
 - Se incuban durante 48h a la temperatura o temperaturas escogidas.
 - Se toman entre 5 y 8 mL de cultivo y se centrifugan a 5000 rpm durante 5 minutos.
 - Se resuspende en 1 mL de tampón fosfato 50 mM pH 8.5 300 mM de NaCl.
 - Se lisa durante 1 minuto (en total) utilizando un sonicador utilizando los siguientes parámetros: 50% de amplitud, ciclos de 5 segundos activo/15 segundos inactivo mediante el uso de una sonda de 2 mm de diámetro.
 - Se centrifuga a 12000 rpm durante 30 minutos a 4°C.
 - Se recupera el sobrenadante y se guarda el precipitado de restos celulares.
 - Se resuspende el *pellet* en un volumen equivalente al sobrenadante de tampón fosfato.
 - Se toma una alícuota de cada una de las muestras si analizan por SDS-PAGE.

- Para la prueba de expresión utilizando IPTG con/sin choque térmico como inductor en el caso del mutante VcCDA-ΔL5:
 - Se preparan 30 mL de medio de autoinducción para cada uno de los mutantes/controles/condiciones a estudiar.
 - Se reparten en erlenmeyers estériles de 100 mL.
 - Se incuban a 37°C hasta que la OD₆₀₀ alcanza un valor próximo al 0,3.
 - Una réplica de cada cultivo se somete a choque térmico y la otra no: Se mantienen en baño a 42°C durante 30 minutos.
 - Se añade IPTG hasta una concentración final de 1 mM y se incuban a 25°C durante 20 horas como máximo.
 - A las 2, 4, 6 y 20 horas se toman 5 mL de cultivo se centrifugan a 5000 rpm durante 5 minutos y se congela el *pellet*. Adicionalmente a cada uno de estos tiempos se comprueba la OD₆₀₀ de cada cultivo.
 - Cada uno de estas muestras, se resuspende en 1 ml de tampón fosfato 50 mM pH 8.5 300 mM de NaCl.
 - Se lisa durante 1 minuto (en total) utilizando un sonicador utilizando los siguientes parámetros: 50% de amplitud, ciclos de 5 segundos activo/15 segundos inactivo mediante el uso de una sonda de 2 mm de diámetro.
 - Se centrifuga a 12000 rpm durante 30 minutos a 4°C.
 - Se recupera el sobrenadante y se guarda el precipitado de restos celulares.
 - Se resuspende el *pellet* en un volumen equivalente al sobrenadante de tampón fosfato.
 - Se toma una alícuota de cada una de las muestras si analizan por SDS-PAGE.

13.2.1.2. Expresión mediante medio de autoinducción

La gran mayoría de las proteínas reportadas en este trabajo se expresan mediante el uso de protocolo de autoinducción similar al aplicado por Studier en su publicación (Studier, 2005). A continuación se detallan las proteínas para las cuales se determinó que este era el método óptimo de sobreexpresión.

Durante el desarrollo de este estudio se han producido lotes de proteína provenientes de diferentes volúmenes de cultivo. En este procedimiento se describe el procedimiento seguido para el volumen de cultivo más frecuente, 600 mL.

- Se transforma una alícuota de *E. coli* B121 con el plásmido en el cual se encuentra clonado la proteína recombinante a expresar. Se sigue el protocolo estándar de transformación y se extiende en placas de LB-Ampicilina y se incuban ON a 37°C.
- A partir de una colonia única se realiza un preinóculo de 10 mL de medio LB con ampicilina (100 mg/L). Este cultivo se realiza en un tubo Falcon de 50 mL estéril.
- Se incuba ON a 37°C y 250 rpm.
- En un Erlenmeyer de 2L se prepara medio de autoinducción para un volumen de 600 mL de medio LB líquido suplementado con ampicilina (100 mg/L).
- Se adicionan 5 mL de inóculo en el Erlenmeyer.
- Se incuba durante 48 horas a 25°C y 180 rpm.
- Una vez ha transcurrido el tiempo indicado se centrifuga la totalidad del cultivo a 4000 rpm durante 10 minutos y 4°C.
- Se descarta el sobrenadante y se resuspenden los *pellets* en un volumen máximo de 50 mL de una disolución al 0,9% de NaCl.
- Se transfiere el cultivo a un tubo Falcon de 50 mL.
- Se centrifuga a 4000 rpm durante 10 minutos a 4°C.
- Se elimina el sobrenadante y el *pellet* puede ser conservado a -20°C o usado directamente para su lisis y purificación.

13.2.1.3. Expresión mediante inducción por IPTG

Esta metodología fue aplicada para el mutante de primera generación VcCDA L5-BsPdaA.

- Se transforma una alícuota de *E. coli* B121 con el plásmido en el cual se encuentra clonado la proteína recombinante a expresar. Se sigue el protocolo estándar de transformación y se extiende en placas de LB-Ampicilina y se incuban ON a 37°C.
- A partir de una colonia única se realiza un preinóculo de 10 mL de medio LB con ampicilina (100 mg/L). Este cultivo se realiza en un tubo Falcon de 50 mL estéril.
- Se incuba ON a 37°C y 250 rpm.

- En un Erlenmeyer de 2L se preparan 600 mL de medio LB líquido suplementado con ampicilina (100 mg/L).
- Se adicionan los 10 mL de inóculo en el Erlenmeyer.
- Se incuba a 37°C y 250 rpm hasta que la OD₆₀₀ está a 0,3.
- Se induce la expresión de proteína añadiendo una disolución estéril de IPTG hasta una concentración final en el Erlenmeyer de 1 mM.
- Se incuba a 20°C durante 6h para que se produzca la expresión de la proteína.
- Una vez ha transcurrido el tiempo indicado se centrifuga la totalidad del cultivo a 4000 rpm durante 10 minutos y 4°C.
- Se descarta el sobrenadante y se resuspenden los *pellets* en un volumen máximo de 50 ml de una disolución al 0,9% de NaCl.
- Se transfiere el cultivo a un tubo Falcon de 50 ml.
- Se centrifuga a 4000 rpm durante 10 minutos a 4°C.
- Se elimina el sobrenadante y el *pellet* puede ser conservado a -20°C o usado directamente para su lisis y purificación.

13.2.2. Purificación de proteínas

13.2.2.1. Cromatografía de afinidad – StrepTrap

En todos los plásmidos descritos en este trabajo se encuentra presente una *Strep-Tag II*, ya bien sea en el extremo C terminal (pET-22b) o en el extremo N terminal (pPR-IBA 2) utilizada para la purificación por cromatografía de afinidad.

- Se resuspende el *pellet* en 40 ml de PBS 50 mM pH 8,5 300 mM NaCl 1 mM PMSF.
- La lisis se realiza con un sonicador en el que se definen los siguientes parámetros: 50% de amplitud, ciclos de 5 segundos activo/15 segundos inactivo para un total de 8 minutos activo utilizando la sonda de 6 mm de diámetro.
- El lisado se reparte en tubos de centrifuga de 40 mL y se centrifugan a 12000 rpm durante 1 hora y 4°C.
- Mientras, se acondiciona la columna *Strep-Trap 1 ml (GE, Healthcare)*. Este procedimiento es para una columna que ha sido usada previamente. Utiliza un flujo entre 2 y 3 mL/min:
 - Se pasan 5 volúmenes de columna de H₂O.
 - Se pasan 5 volúmenes de una disolución de 0,5 M de NaOH
 - Se pasan 5 volúmenes de H₂O para retirar completamente el NaOH. Es recomendable comprobar el pH para asegurar el lavado completo.
 - Se pasan 5 volúmenes del tampón en el que se ha disuelto la proteína. Por lo general este tampón es fosfato 50 mM pH 8,5 y NaCl 300 mM
 - Se pasan 2 volúmenes del mismo tampón PBS con HABA en una concentración 1 mM. O hasta que la columna cambia por completo a un color rojo.

- Se elimina el HABA mediante un lavado con PBS.

Para una columna nueva, se procede directamente al lavado con H₂O milliQ para eliminar la solución de conservación y a continuación se acondiciona con el tampón correspondiente. Todas las soluciones que atraviesan la columna están filtradas previamente a 0,45 µm.

- La columna es conectada al equipo recolector de fracciones Äkta (Äkta FPLC –Abersham Biosciences).
- Una vez terminada la centrifugación, se separa sobrenadante del *pellet*. Este último se conserva para el análisis por electroforesis de la fracción insoluble.
- Se filtran el sobrenadante con filtros con un poro de 0,45 µm de diámetro.
- Se cargan en la columna en fracciones de 10 mL a un flujo similar al de acondicionado y monitorizando mediante un detector en línea de absorbancia en UV
- Se lava la columna haciendo pasar tampón PBS hasta que se recupera la línea de base de absorbancia.
- Cada carga se eluye en un único paso con PBS destiobiotina 2,5 mM. Se recupera solo la proteína mediante la recogida simultánea a la aparición del pico en pantalla.
- Tras cada elución se lava con 2 volúmenes de PBS, y regenera la columna con 5 volúmenes de columna de la solución de HABA 1 mM (hasta que se ve completamente roja). Luego, se elimina el HABA con PBS hasta eliminar el color. Una vez realizado este proceso la columna está lista para sufrir el siguiente ciclo de carga y descarga.
- Una purificación estándar implica de 3 a 5 ciclos de carga y descarga en función de la cantidad de proteína que se vea en la eluciones.
- Una vez terminada la purificación se lava la columna con agua y se conserva en una solución de etanol al 20%.

13.2.2.2. Cromatografía de filtración en gel GFC

Cromatografía preparativa

Para la separación preparativa de las diferentes fracciones oligoméricas de las proteínas estudiadas en este trabajo se utiliza una columna 16/600 Superdex 200 (GE Healthcare).

- Se acondiciona la columna a un flujo igual o inferior a 1 mL/min:
 - Se elimina la solución de etanol de conservación
 - Se realiza un acondicionamiento con el tampón deseado (por lo general tampón fosfato 50 mM pH 8,5 NaCl 300 mM).
 - Se conecta la columna al colector de fracciones monitorizado Äkta.

- Se juntan todas las fracciones purificadas en la fase de cromatografía de afinidad por *strep-tag II* y se concentran en un Amicon con un MWCO de 10 kDa hasta un volumen máximo de 2 mL.
- El volumen de proteína concentrada es filtrada a través de un filtro de 0,45 μm .
- Se realiza la carga de la solución de proteína a través de un *loop* (volumen 2 mL) previamente lavado y acondicionado con el mismo tampón en el que se encuentra disuelta la proteína.
- La elución de la proteína se realiza a un flujo de 1 mL minuto utilizando el mismo tampón.
- La elución de las fracciones oligoméricas de la columna de filtración en gel se monitoriza median la medición online de la absorbancia a 280 nm. Se recolectan fracciones de 1 mL en microplacas *deepwell*.
- Una vez realiza la elución de la última fracción se procede al lavado de la columna:
 - Se lava el tampón presente en la columna con H₂O MilliQ.
 - Se prepara para conservación desplazando toda el agua con una solución de etanol al 20% filtrada a 0,45 μm .

Todas las fracciones son conservadas para su análisis por SDS-PAGE (al igual que algunas referencias provenientes de la lisis y cromatografía de afinidad). Una vez estimada la pureza y entidad (por MW) de la proteína de interés, se unifican las alícuotas de la fracción oligomérica de interés. Esta fracción es primordialmente la fracción monomérica, es decir, la última en ser eluída.

Calibración de la columna 16/600 Superdex 200

La calibración de una columna de filtración en gel nos permite identificar el peso molecular aparente de una proteína (u otro compuesto que pueda ser aplicado en este tipo de columnas) en función del volumen necesario para desplazarlas a través de la columna. Este parámetro es conocido como volumen de elución. Para la calibración de la columna de preparativa se realizan dos procesos: a) una estimación del volumen muerto (V_0); y b) la obtención de una recta de calibrado utilizando unas proteínas patrón de peso conocido. Para esta calibración se utilizó un set de patrones comercializado por Sigma-Aldrich® (*Gel Filtration Markers Kit for Protein Molecular Weights 6,500-66,000 Da*).

- Se acondiciona la columna al igual que en el protocolo descrito en el apartado anterior.
- Para la calibración de la columna se preparan las siguientes disoluciones (Tabla 13.2- 1):

Compuesto/proteína	Mw	Concentración	Inyección
Azul de dextrano	2000 kDa	1,5 mg/mL	#1
Albúmina Citocromo C	66 kDa 12,4 kDa	1 mg/mL 1 mg/mL	#2
Anhidrasa Carbónica Aprotinina	29 kDa 6,5 kDa	1 mg/mL 1 mg/mL	#3

Tabla 13.2- 1 Calibración GFC superdex200

Proteínas y compuestos utilizados en la calibración de GFC preparativa superdex200 con sus respectivas concentraciones y número de inyecciones.

- Se prepara el volumen deseado con el tampón que se vaya a usar en las metodologías preparativas (tampón fosfato 50 mM pH8,5 NaCl 300 mM) y se filtran a través de filtros de 0,45 μ m.
- Se conecta la columna al Äkta y se carga en el *loop* de inyección 1 mL de volumen. Como se indica en la tabla se pueden combinar algunas de las proteínas o se pueden hacer inyecciones individuales. En este trabajo se realizan las inyecciones combinadas que se indican.
- Se realiza la elución de las proteínas al flujo en el que se trabajará en la metodología preparativa (1 mL/min).
- Se monitoriza la elución de las proteínas/compuestos leyendo la absorbancia online a 280nm.
- Se extraen los datos de los cromatogramas y se toma como volumen de elución (V_e) de cada proteína/compuesto aquel punto de máxima señal.

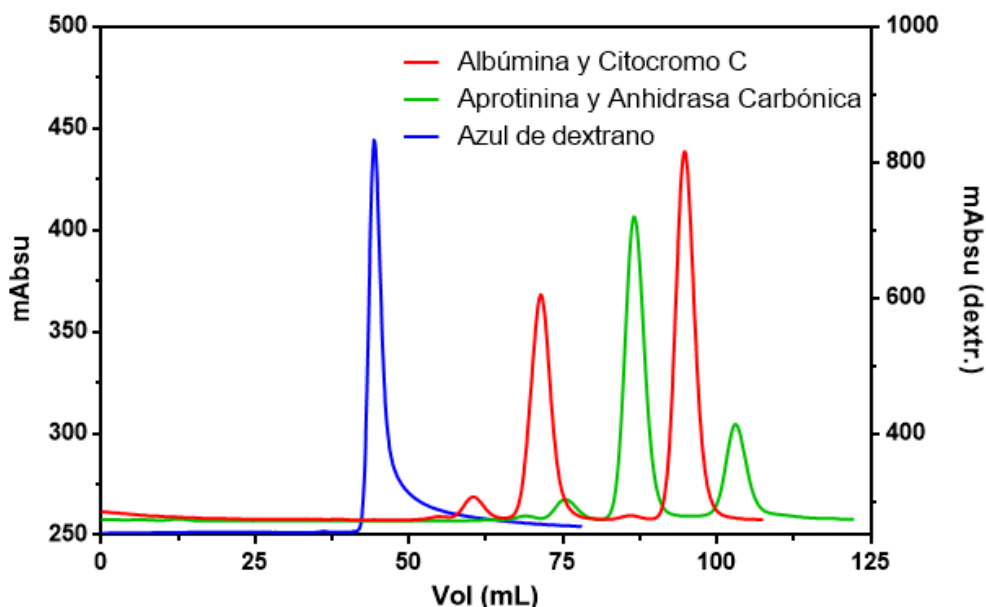


Figura 13.2- 1 Cromatogramas calibración de la columna GFC preparativa Superdex200

Cromatogramas resultantes de la elución de las tres inyecciones con las proteínas de referencia para la calibración de la columna de filtración en gel *Superdex 200*. Las inyecciones realizadas son: 1. Azul de dextrano, 2. Albumina y Citocromo C y 3. Anhidrasa carbónica y aprotinina.

- Se realiza un ajuste lineal utilizando los valores de $\text{Log}(M_w)$ y V_e/V_0 (Tabla 13.2- 2).

	Mw (kDa)	Log(Mw)	V _e (mL)	V _e /V ₀
Aprotinina	6,50	0,81	103,07	2,33
Citocromo C	12,40	1,09	94,80	2,14
Anhidrasa Carbónica	29,00	1,46	86,54	1,95
Albúmina	66,00	1,82	71,40	1,61
Azul de dextrano (V ₀)	2000		44,32	1

Tabla 13.2- 2 Calibración GFC superdex200 volúmenes de elución

Proteínas y compuestos utilizados en la calibración de GFC preparativa superdex200 con sus respectivos tiempos de elución y la transformación de los datos para la construcción de la recta

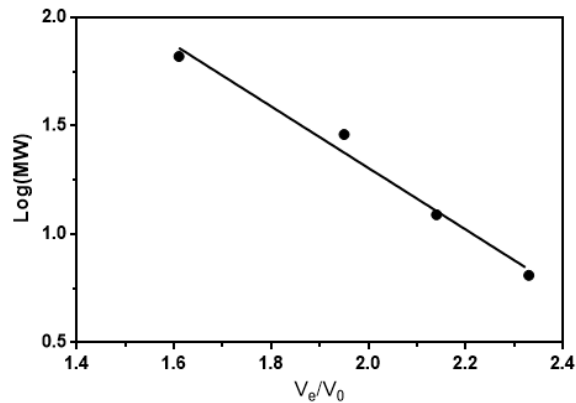


Figura 13.2-2 Recta patrón de calibración de la columna de GFC

Recta de patrón de calibrado de la columna de gel filtración preparativa superdex 200 utilizando como proteínas de referencia aprotinina, citocromo C, anhidrasa carbónica y albúmina. $y = -1,425x + 4,156$ $R^2 = 0,982$

- Se utiliza la recta obtenida (Figura 13.2-2) para calcular el Mw aparente de las proteínas separadas utilizando esta metodología.

$$M_w = 10^{-1,425 \frac{V_e}{V_0} + 4,156}$$

Ecuación 3 Ecuación de la recta de calibración columna GFC preparativa

13.3. Cinéticas enzimáticas

13.3.1. Estimación de actividad de las fracciones de GFC mediante AcOMU

Esta metodología ha sido usada primordialmente para estudiar a “*grosso modo*” la actividad relativa de cada una de las fracciones obtenidas tras la cromatografía de filtración en gel.

- Se prepara una disolución *stock* de AcOMU 50 mM (11 mg/mL) en acetonitrilo y se conserva en oscuridad.
- Se preincuban 50 mL de tampón fosfato 50 mM pH 8,5 300 mM NaCl a 37°C.
- Se prepara una recta patrón de MU en el tampón previamente mencionado utilizando como concentración 0,5 mM.
- Se dispensan 210 µL de cada una de las diluciones patrón en la filas G y H de una microplaca negra (la recta patrón se realiza por duplicado).
- Se diluye la solución madre de AcOMU hasta una concentración final de 0,5 mM.

- Se dispensan 200 μL de la solución de AcOMU y se mantiene 5 minutos en el soporte calefactado de la plataforma robótica Bravo (Agilent).
- Utilizando la plataforma robótica se añaden 10 μL de cada una de las fracciones resultantes de la GFC sobre los 200 μL del tampón con el sustrato.
- Se lee la fluorescencia en modo continuo utilizando 340 nm como λ de excitación y 460 nm como λ de emisión.
- Se calculan concentraciones utilizando la curva patrón (ajuste punto a punto) y las velocidades de reacción teniendo en cuenta el tiempo.
- Superponiendo valores de absorbancia a 280nm de la elución de la proteína y los valores de velocidad relativa, se selecciona para caracterización aquella fracción oligomérica o monomérica que desarrolle una mayor actividad.

13.3.2. Actividad específica

Esta metodología se utilizó de modo exploratorio para poder comprobar la correlación directa entre la concentración de proteína y las velocidades iniciales. A su vez, este carácter de ensayo guía nos permitía identificar aquella concentración que nos permitiría realizar las cinéticas finas para el cálculo de los parámetros k_{cat} y K_M . Esta. Teniendo esto en cuenta por cada ensayo se probaban entre 3 o 4 concentraciones diferentes de proteína en 4 puntos temporales diferentes.

- Se prepara las diferentes disoluciones *stock* del enzima en cuestión. La concentración de cada una de ella está determinada por la concentración final en reacción deseada. Se realiza de este modo porque se busca que la adición de enzima sea sincrónica para las diferentes concentraciones y esto se consigue con una adición única, por las limitaciones de la plataforma, esta adición debe ser del mismo volumen) para todas las condiciones estudiadas (entre 10 y 20 μL ha sido lo más común, de ahí que se prepare un *stock* diferente para cada concentración).
- Se prepara una disolución *stock* del sustrato a 10 mM (DP2, DP3, DP4) o 4 mM (DP5) en H_2O MilliQ (esta disolución puede conservarse a -20°C para varios usos). Por lo general solo se han usado DP2 y DP4, ya que son los sustratos de referencia.
- Se prepara un tampón 5X (Tris 250 mM pH 8,5 1,5 M NaCl).
- Se realizan dos replicas por cada ensayo. En las dos filas superiores se añaden los volúmenes correspondiente para una reacción de 100 μL de volumen final de tampón, sustrato y H_2O MilliQ (Tabla 13.3- 1).

	Concentración inicial	Concentración en reacción	Volumen
Tampón	5x	1x	20 μL
Sustrato	10 mM	2 mM	20 μL
Enzima	x	Y	10-20 μL
H ₂ O MilliQ	-	-	50-40 μL

Tabla 13.3- 1 Preparación de una reacción enzimática de actividad específica

Compuestos utilizados y sus concentraciones para el ensayo de cálculo de la actividad específica en la medida de la actividad de los diferentes mutantes.

- En las dos filas inferiores (G y H) de la microplaca de reacción se añaden 25-50 μL de las soluciones *stock* de enzima.
- Se incuba la placa sellada a 37°C en la plataforma del robot para que se atemperen todas las soluciones.

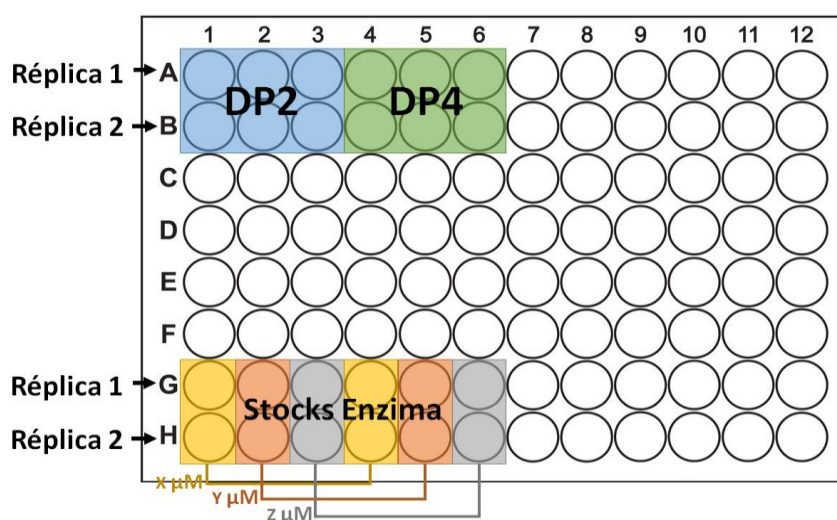


Figura 13.3-1 Esquema de microplaca para el ensayo actividad específica

Distribución de las diferentes soluciones en la microplaca de reacción para el ensayo estándar para DP2 y DP4 incluyendo dos réplicas para cada sustrato y tres concentraciones diferentes de enzima.

- Se añaden 90 μL de una solución 1:1 H₂O MilliQ:1-propanol fría en los pocillos necesarios de una microplaca de polipropileno (Agilent). Esta es la solución de parada de reacción.
- Una vez transcurrida la incubación del cóctel de reacción y el enzima, se inicia la reacción mediante la adición del volumen correspondiente de enzima (tomado de las dos filas inferiores) sobre el resto de componentes (filas superiores).
- Se mezcla por pipeteo y se incuba a 37°C sellando la placa con una membrana troquelada para que permita la toma de muestras automática por el robot.
- Se toman cuatro muestras temporales durante el desarrollo de la cinética: se toman 10 μL de la reacción y se vierten sobre los pocillos correspondientes de la placa de parada. Al ser realizado con el robot todas las muestras son paradas en el mismo punto temporal.
- Una vez tomadas todas las muestras, se sella la placa donde se ha muestreado y parado la reacción con una membrana de silicona (Agilent) apta para los inyectores automáticos en HPLC.

- Las muestras son inyectadas directamente en el HPLC-MS utilizando el método y patrones correspondientes o pueden ser conservadas a 4°C durante 24 horas como máximo para su análisis.
- Las velocidades iniciales (v_0) son calculadas mediante regresión lineal sobre una recta patrón y se comprueba la linealidad entre [enzima] y v_0 .

13.3.3. Cálculo de parámetros cinéticos Michaelis-Menten

- Se prepara las diferentes el *stock* del enzima en cuestión. Se utiliza tampón Tris 50 mM pH 8,5 NaCl 300 mM como tampón de dilución
- Se prepara una disolución *stock* del sustrato a 10 mM (DP2, DP3, DP4) o 4 mM (DP5) en H₂O MilliQ (esta disolución puede conservarse a -20°C para varios usos). A partir de este se crea un segundo *stock* de 500 μM para aquellas condiciones en ensayo de valores más bajos de concentración.
- Se prepara un tampón 5X (Tris 250 mM pH 8,5 1,5 M NaCl).
- Se realizan dos réplicas de cada concentración de sustrato por cada ensayo. En las dos filas superiores se añaden los volúmenes correspondientes para una reacción de 100 μL de volumen final de tampón, sustrato y H₂O MilliQ. El rango de concentraciones utilizado para la determinación de los parámetros cinéticos va desde 4000 μM hasta 25 μM en 12 puntos de concentración en todo el intervalo:

	Concentración inicial	Concentración en reacción	Volumen
Tampón	5x	1x	20 μL
Sustrato	10 mM	4 mM – 25 μM	X μL
Enzima	y	0,1-1 μM	10-20 μL
H ₂ O MilliQ	-	-	Hasta 100 μL

Tabla 13.3- 2 Preparación de una reacción enzimática de caracterización M&M

Compuestos utilizados y sus concentraciones para el ensayo de cálculo de los parámetros cinéticos de la ecuación Michaelis-Menten según actividad la de los diferentes mutantes.

- En las dos filas inferiores (G y H) de la microplaca de reacción se añaden 25-50μL de la solución *stock* de enzima. Durante todo el trabajo las concentraciones de enzima en ensayo utilizadas se encuentran entre 0,1 y 1 μM.
- Se incuba la placa sellada a 37°C en la plataforma del robot para que se atemperen todas las soluciones.

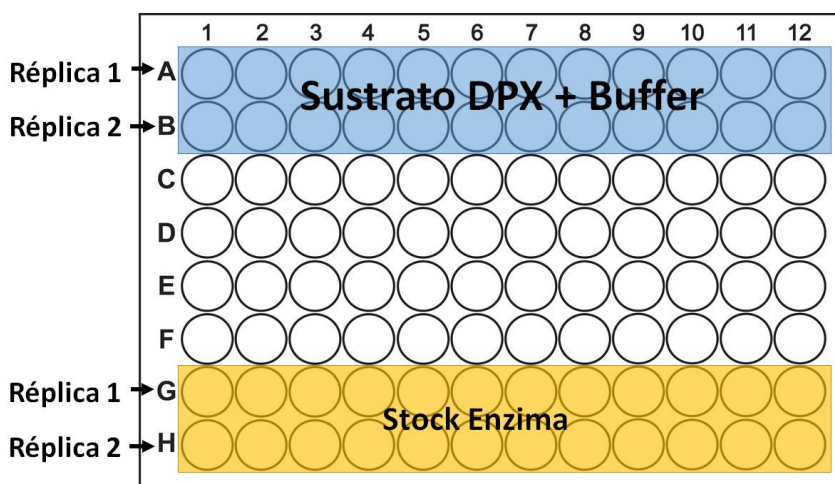


Figura 13.3-2 Esquema de microplaca para el ensayo de caracterización M&M

Distribución de las diferentes soluciones en la microplaca de reacción para el ensayo estándar para un sustrato incluyendo 12 concentraciones diferentes y dos réplicas.

- Se añaden 90 μL de una solución 1:1 H_2O MilliQ:1-propanol fría en cada pocillo de dos microplacas de polipropileno (Agilent). Esta es la solución de parada de reacción.
- Una vez transcurrida la incubación del cóctel de reacción y el enzima, se inicia la reacción mediante la adición del volumen correspondiente de enzima (tomado de las dos filas inferiores) sobre el resto de componentes (filas superiores).
- Se mezcla por pipeteo y se incuba a 37°C sellando la placa con una membrana troquelada para que permita la toma de muestras automática por el robot.
- Se toman ocho muestras temporales (4 puntos de tiempo por cada placa de parada) durante el desarrollo de la cinética: se toman 10 μL de la reacción y se vierten sobre los pocillos correspondientes de la placa de parada. Al ser realizado con el robot todas las muestras son paradas en el mismo punto temporal.
- Una vez tomadas todas las muestras, se sellan las placas donde se ha muestreado y parado las reacciones con una membrana de silicona (Agilent) apta para los inyectores automáticos en HPLC.
- Las muestras son inyectadas directamente en el HPLC-MS utilizando el método y patrones correspondientes o pueden ser conservadas a 4°C durante 24 horas como máximo para su análisis.
- Las velocidades iniciales son calculadas mediante regresión lineal sobre una recta patrón, y los parámetros k_{cat} y K_{M} son obtenidas mediante al regresión no lineal de $v_0/[E]$ frente a la [sustrato] usando la ecuación de Michaelis&Menten mediante el *software* Graphpad.

13.4. Caracterización de la dependencia de metales en el mecanismo catalítico

Este proceso consta de varias etapas: eliminación del metal nativo, incorporación de un nuevo catión y ensayo cinético de caracterización.

- Se dializa un lote de la fracción monomérica pura de VcCDA en 20 mM de EDTA en PBS. Se utiliza una membrana de diálisis de 6-8 kDa de MWCO (Cellu Sep.). La membrana fue tratada para eliminación de trazas de metales.
- Se realizan tres lavados con el quelante. Una muestra control también es dializada pero solo contra PBS.
- Se realizan tres nuevos lavados solo con tampón para eliminar el EDTA. La muestra control también sufre tres lavados adicionales con PBS.
- Se calcula la concentración de proteína de recuperada utilizando la metodología del BCA.
- La fracción tratada con EDTA es separada en alícuotas he incubada con los siguientes cationes divalentes a una concentración de 1 mM: Ca^{+2} , Cd^{+2} , Co^{+2} , Fe^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} , Ni^{+2} y Zn^{+2} . De la muestra control también se preparan unas alícuotas las cuales son tratadas con Cd^{+2} y Zn^{+2} . Todos los metales utilizados fueron disueltos desde su cloruro (Panreac y Sigma-Aldrich). La concentración de enzima en esta etapa es de 3,78 μM
- Las mezclas con metales se dejan incubando a 4°C durante 3-4 horas.
- Su actividad enzimática es calculada usando el protocolo de actividades específicas usando DP2 como sustrato y en presencia del metal a una concentración de 1 mM en el cóctel de reacción. La concentración de enzima en las cinéticas es de 0,05 μM .
- La formación de producto desacetilado se realiza a través del método HPLC-MS correspondiente.

13.5. Metodología HPLC-MS para la estimación de productos monodesacetilados

13.5.1. Preparación de patrones

Se prepararon patrones de productos monodesacetilados por VcCDA utilizando los sustratos DP2, DP3, DP4 y DP5.

- Se diluyen 10 mg de cada uno de los quitoooligosacáridos (DP2 a DP5) en 0,5 mL de tampón PBS (Fosfato 50 mM pH 8,5 300 mM NaCl).
- Se añade un volumen de enzima purificado tal que la concentración final es de 3 μM .
- Se lleva el volumen a un total de 1,5 mL con tampón PBS y se incuba a 37°C durante 48h.
- Durante la incubación se realiza agitación ocasional y la comprobación de la evolución de la reacción de desacetilación mediante HPLC-MS.

- Una vez se confirma el consumo completo de sustrato o la no evolución de la reacción el enzima es eliminado de la solución mediante cromatografía de afinidad utilizando una columna *Strep-Trap*.
- Se extraen los productos puros monodesacetilados utilizando cromatografía de intercambio iónico mediante la aplicación de la muestra a la resina Dowex 50wx8 200 en *batch*:
 - Por cada 5 mg de producto esperado se utilizó 1g de resina previamente lavada (H₂O MilliQ).
 - Se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación en una noria.
 - Se centrifuga cada suspensión a 4000 rpm durante un minuto para separar la fase líquida de la matriz de la resina.
 - Se lava la resina con H₂O milliQ una vez ya cargada la muestra.
 - Se realiza la elución de los productos monodesacetilados utilizando un gradiente de NH₃.
 - En cada paso de lavado/elución se comprueba la presencia de producto en el volumen recuperado mediante HPLC-MS tras dejar evaporar el NH₃ bajo un chorro de aire comprimido.
- Una vez recuperadas todas las fracciones en la que se ha identificado la presencia única del producto monodesacetilado se congelan y liofilizan durante 48h.
- Se comprueba el rendimiento del proceso por pesada utilizando tubos previamente tarados.
- Se disuelve parte de la muestra liofilizada para cada uno de los DPs y se comprueba su pureza mediante HPLC-MS.
- Los sólidos se conservan a 4°C hasta su utilización.
- Para su uso como disoluciones patrón se disuelven los sólidos a una concentración de 1 mM en una solución 1:1 H₂O MilliQ:1-Propanol. Esta solución madre se conserva a -20°C.
- A partir de la solución madre se preparan diluciones en el rango de 225 µM hasta 0,1 µM.
- Estas disoluciones son preparadas en viales de vidrio y se conservan a -20°C hasta su uso.

13.5.2. Metodología HPLC-MS

La metodología escrita a continuación es la utilizada para la monitorización de productos monodesacetilados en las cinéticas enzimáticas y otro tipo de aplicaciones.

13.5.2.1. Descripción del equipo

- HPLC Agilent serie 1260 (Agilent).
- Desgasificador de vacío (Agilent, 1260)
- Bomba binaria (Agilent, 1260)
- Auto muestreador (Agilent, 1260)
- VWD detector de absorbancia (Agilent, 1260)
- Detector MS de cuadrupolo simple equipado con un ESI (electrospray) para la ionización (Agilent, 1260).
- Columna: HPLC Xbrige BEH Amide 2,5 μ M 2,1 * 100 cm con precolumna de 5 mm (Waters).

13.5.2.2. Método de parada de reacción enzimática

La identificación de una solución que permita detener de modo inmediato el proceso de transformación enzimática del sustrato es esencial para el desarrollo de un método *off-line* de detección de la acumulación de producto de desacetilación.

Para el estudio de este factor se utilizó en todos los casos una dilución 1:9 de la muestra en la solución de parada. Las mezclas estudiadas incluyen: 7:3 acetonitrilo:agua, ácido fórmico al 20%, 1:1 isopropanol:agua, 1:1 n-propanol:agua y 1:1 etanol:agua.

Las condiciones finales incluyen una disolución 1:9 en una solución de parada compuesta por 1:1 n-propanol:agua. Los volúmenes utilizados por lo general son 10 μ L de muestra y 90 μ L de solución de parada.

13.5.2.3. Condiciones cromatográficas

Para el establecimiento de un método de elución isocrático, varios ratios de acetonitrilo/agua y flujos fueron probados.

El rango de mezcla de solvente probado incluye 65:35, 67:33 y 70:30 siendo acetonitrilo:agua respectivamente. El rango de flujo estudiado abarca: 0,2 mL/min, 0,4 mL/min, 0,6 mL/min y 0,8 mL/min. En todos los casos se ha añadido ácido fórmico en una concentración final del 1% para asegurar la protonación de los productos de la desacetilación enzimática.

Las condiciones finales de separación cromatográfica definidas son las que constan a continuación:

- Eluyente: Acetonitrilo:H₂O 65:35
- Aditivo en eluyente: ácido fórmico al 1%
- Flujo: 0,4 mL/min
- Volumen de inyección: 5 µL
- Temperatura de columna: 60°C
- Duración de cromatograma: 2,5-3,5 min

13.5.2.4. Condiciones detector MS

Para la cuantificación de los productos monodesacetilados se utiliza la M+H⁺. Se analizó la conveniencia de realizar el seguimiento de otros aductos, sin embargo el producto monoprotonado se identificó como el que aportaba mayor sensibilidad.

- Fuente de ionización: Electrospray
- Modo: positivo
- Voltaje de capilar: 4 kV
- Gas de desolvatación: Nitrógeno
- Flujo de gas de desolvatación: 12 L/min
- Temperatura: 300°C
- *Dwelling time*: 20% para DPX y 80% para DPX(N)
- Método de detección: SIM M+H⁺:
 - DP2(N): 383 // DP2: 425
 - DP3(N): 586 // DP3: 628
 - DP4(N): 789 // DP4: 831
 - DP5(N): 993 // DP5: 1035

Para la transformación de las abundancias iónicas en concentración de producto de la reacción enzimática, el área de cada pico fue interpolada en una recta patrón del correspondiente producto de referencia con el mismo DP y PA.

13.6. Identificación de los patrones de desacetilación

Toda la metodología indicada en este apartado fue desarrollada por el grupo del Dr. Bruno M. Moerschbacher en el “*Institute of Plant Biotechnology and Biology*” en Münster (Alemania). Los detalles de todo el proceso así como su validación pueden comprobarse en la publicación del método (Cord-Landwehr et al., 2017). La aplicación del mismo se realizó durante una estancia de investigación del autor de este trabajo durante junio del 2016.

13.6.1. Preparación de los productos de desacetilación

Para el análisis de los patrones de desacetilación de los mutantes creados durante el desarrollo de este trabajo se utilizaron diferentes sustratos: DP2, DP4 y DP5. Los dos primeros por ser los referentes de VcCDA y DP5 en mutantes de especial interés, ya sea por relevantes y prometedoras las evidencias previas (mutante P→G) o por ser usados como referencia (CD).

- Se purifican los enzimas según el protocolo de autoinducción para todos ellos. Los mutantes estudiados son los siguientes:
 - CD
 - CD AGA
 - CD P-G
 - CD ΔHélice1
 - CD ΔHélice2
 - FL P193C/N273C
- Se preparan los cócteles de reacción en las siguientes condiciones:
 - Tampón: Tris 50 mM pH 8,5 NaCl 300 mM
 - Concentración de enzima: 1-2 μM
 - Cantidad de sustrato: 10 mg
 - Volumen: 1250 μL a 1750 μL
- Se incuban con agitación ocasional a 37°C.
- Se realizan comprobaciones periódicas del estado de reacción mediante el método descrito de HPLC-MS. Se extraen 5 μL de muestra y se para la reacción en 45 μL de 1-Propanol:H₂O 1:1.
- Transcurridas 48 horas se congelan los tubos de reacción a -80°C.
- Se liofilizan las muestras durante 48 horas.
- Se comprueba el rendimiento de reacción y se conserva el sólido a -20°C hasta su utilización.

13.6.2. Descripción del equipo y columna

- UHPLC Dionex Ultimate 3000RS UHPLC system (Thermo Scientific).
- UV-Detector (Dionex).
- ELSD Model Sedex 90LT (Sedere - Cedex).
- MSⁿ detector ion trap AmaZon speed (Bruker).
- Columna: Acquity UPLC BEH Amide 1,7 μM 2,1 * 150 cm con precolumna de 5 mm (Waters).

13.6.3. Parámetros de la sección de cromatografía líquida.

En este apartado se utilizaron dos métodos básicos cromatográficos: a) uno más de duración más extensa y a un flujo reducido y b) otro método más breve y a un flujo más elevado. Por lo general los parámetros descritos para la sección de cromatografía líquida son independientes de la trampa iónica.

- Eluyente A: 80:20 AcN: H₂O con 10 mM formato amónico y 0,1% de ácido fórmico
- Eluyente B: 20:80 AcN: H₂O con 10 mM formato amónico y 0,1% de ácido fórmico
- Gradiente de 100%A al 25%A
- Columna Acquity UPLC BEH Amide 1,7 μM 2,1 * 150 cm
- Flujo:
 - Método A 0,4 mL/min
 - Método B 0,8 mL/min
- Temperatura de columna:
 - Método A 35°C
 - Método B 75°C
- Volumen de inyección: 2 μL
- Detector UV: 210nm
- Tras el detector VWD el flujo se divide en dos líneas 50%-50% para el ELSD y el detector de masas.
- Duración de los cromatogramas y etapas del gradiente:
 - Método A: 16 min

Tiempos	Eluyente
0-0,8 min	100% A
0,8-3,3 min	0%B→70%B
3,3-4,3 min	70%B
4,3-4,5 min	70%B → 0%B
4,5-5,5 min	0%B

- Método B: 5,5 min

Tiempos	Eluyente
0-2,5 min	100% A
2,5-12,5 min	0%B→75%B
12,5-13,5 min	75%B
13,5-15 min	75% → 0%B
15-16 min	0%B

13.6.4. Parámetros del ELSD

Durante todo los estudios descritos en este trabajo, los parámetros del ELSD se mantuvieron invariables independiente de las condiciones cromatográficas.

- Temperatura: 50°C
- Modelo de nebulizador: *HPLC Nebulizer*
- *Gain*: 12
- Presión del nebulizador: 3,4 bar (nitrógeno)

13.6.5. Parámetros trampa iónica

Independientemente del DP de cada muestra, los parámetros de la trampa iónica siempre se mantienen en las mismas condiciones generales aquí descritas. Los únicos parámetros que pueden sufrir ligeras variaciones son el *tune*, y en el MS² la selección de los iones a fragmentar y en que segmentos del cromatograma se harán estas fragmentaciones.

- **Modo:**
 - *Enhanced resolution scan*
- **Source:**
 - *Nebulizer*: 15 psi
 - *Dry gas*: 8 L/min
 - *Dry temperature*: 200°C
 - *Capillary voltage*: 4kV
 - *End plate Offset voltage* : 500 V
- **Tune:**
 - *Target mass* 500 m/z. Se utiliza un valor de 500 por encontrarse en un punto medio de todas las muestras usadas, pero este parámetro se adapta a la muestra que se analice aproximándolo a la masa del producto mayoritario presente en la muestra.
- **Polaridad:**
 - Modo positivo
- **Trap:**
 - *Scan* 50-2000 m/z
- **MS²:**
 - Modo MRM – *multiple reaction monitoring*
 - *Enhanced fragmentation*

- CID activado (ajuste de intensidad en la fragmentación) desde el 60% para a DP2 hasta el 100% usado en DP4 o DP5.
- Se seleccionan los iones que se desean fragmentar con un margen de $\pm 1,5$ unidades de masa.
- Es necesario, cuando se utiliza el MS², realizar el ajuste del *target mass* a un valor próximo a la masa de los compuestos a fragmentar.
- Segmentos:

Este aspecto solo se utilizó en muestras en las que se conocía la presencia de productos con diferente DP. Este es el caso de las muestras que provienen de utilizar DP5 como sustrato ya que contienen una cantidad próxima al 4% de DP4. En caso contrario esta opción es innecesaria.

Método A

Tiempos	Eluyente
3,4-5,6 min	DP2
5,6-6,9 min	DP3
6,9-7,6 min	DP4
7,6-15 min	DP5

13.6.6. Comprobación MS1 de los productos de partida

- Se diluyen las muestras para que la concentración final sea de 1 mg/mL. Con 0,5 mL con estas características es más que suficiente. Hay que considerar que tras la liofilización de las muestras todavía están presentes sales y enzima, por lo que es necesario estimar la pureza de los COS para asegurar esta concentración.
- Las muestras se filtran con los filtros de 3 kDa para microcentrífuga para eliminar partículas y el enzima.

13.6.7. [²H₃] N-acetilación

Son necesario de 10-20 μ g de muestra. 10 μ g son equivalentes a 10 μ L de la muestra previamente disuelta, si se utilizan 20 μ L es necesario secar la muestra y volverla a resuspender en 10 μ L de H₂O.

- Se añade en un tubo Eppendorf *safe lock*:
 - 10 μ L de H₂O (lo lleva ya la muestra)
 - 10 μ L de NaHCO₃ (100 mM; pH ~8,45)
 - 20 μ L metanol
 - 1 μ L de [²H₆] anhídrido acético (Sigma-Aldrich®)
- Se incuba 30 minutos a 30°C y 1200 rpm.
- Se añade 1 μ L de [²H₆] anhídrido acético.

- Se incuba de nuevo 30 min a 30°C y 1200 rpm.
- Se seca la muestra en *speed vac* durante 1 hora a 30°C y 1300 rpm.
- Se resuspende en 70 µL de H₂O.
- Se congela durante 30 min a -80°C.
- Se liofiliza la muestra ON.
- Una vez liofilizada la muestra se resuspende de nuevo en 20 µL de H₂O.
- Se introducen 3 µL en un vial para análisis por MS¹ para comprobar la acetilación.

13.6.8. Marcaje del extremo reductor con ¹⁸O

Son necesarios entre 5 y 10 µg pero en este caso se continúa con toda la muestra restante de la reacetilación.

- Se elimina todo el disolvente mediante *speed vac* (45 min 30°C 1300 rpm).
- Se resuspende el precipitado en 5 µL de H₂¹⁸O (Eurisotop).
- Se incuba durante 6h a 70°C.
- Se elimina de nuevo el disolvente en *speed vac* (25min 30°C 1300 rpm).
- Se resuspende el precipitado en 10 µL de H₂¹⁸O.
- Se incuba ON a 70°C.
- Se deja recuperar la temperatura ambiente.
- Se centrifuga a para bajar todo el disolvente al fondo.
- Se recupera todo el volumen y se introduce en un vial con inserto para HPLC.

Así la muestra ya está lista para ser analizada por MS¹ (Comprobar el correcto marcaje) y MS² (fragmentación y análisis de PA).

13.6.9. Scripts de análisis de datos

Para la transformación de los resultados de MS¹ y MS² en datos interpretables como patrones de acetilación de los oligosacáridos y sus frecuencias, es necesaria la aplicación de una serie de programas. Estos han sido creados en laboratorio del Dr. Bruno M. Moerschbacher en el “*Institute of Plant Biotechnology and Biology*” en Münster, Alemania.

A continuación se detallan los scripts de Python proporcionados para esta tarea:

- *candidates.py*
- *msanalysis.py*
- *filevscos.py*
- *cuantseq.py*

13.7. Differential Scanning Fluorimetry DSF– Estimación de estabilidad

Para esta metodología se utilizó el colorante comercial *Sypro Orange* (Thermo Fisher), que es capaz de unirse a las zonas hidrofóbicas de la proteína que se exponen al ser esta desnaturaliza. Al producirse este fenómeno la eficiencia de fluorescencia del compuesto aumenta.

- Se crea una dilución *stock* a partir de la solución comercial de *Sypro Orange* (5000x) hasta una concentración final de 10x utilizando el mismo tampón en el que está disuelto la proteína. En este estudio se ha usado tampón fosfato 50 mM pH 8,5 300 mM NaCl.
- Se prepara la solución *stock* de proteína tal que en un volumen de reacción final de 25 μ L, la concentración de ensayo de *Sypro Orange* sea 2x (5 μ L) y con los 20 μ L restantes del *stock* de proteína se obtenga una concentración entre 1 y 5 μ M.
- Se realiza la mezcla de reacción y se mezcla en los propios eppendorfs de pared fina de 0,2 mL para PCR. Se mantienen en hielo.
- Se realizan controles en los que solo existe tampón y no proteína.
- Se utiliza el equipo de PCR a tiempo real Rotogene 3000 (Corbett Research). El programa de rampa de desnaturalización es el siguiente: 1 minuto a 25°C, incremento de 1°C en 1°C deteniéndose 30 segundos en cada etapa de temperatura hasta los 95°C. La longitud de onda de excitación es 483nm y 560nm la longitud de onda de emisión. La ganancia se sitúa entre 5 y 6.
- Una vez obtenidos los datos se normalizan mediante su tratamiento en Excel (Microsoft) y su ajuste no lineal se realiza mediante el *software* GraphPad (Prism) utilizando la Ecuación 4.

$$Fluor. = Fluor. Base + \frac{Fluor. Superior - Fluor. Base}{1 + e^{\left(\frac{T_m - T}{dT}\right)}}$$

Ecuación 4 Ecuación Sigmoideal de Boltzmann para el cálculo de la T_m

Esta experiencia se realizó también en presencia de Zn^{+2} . Para esto se añadió $ZnCl_2$ en una concentración final en el ensayo de 0,1 mM.

13.8. Titulación de cisteínas libres, Método de Ellman

Para la comprobación de la correcta formación del puente disulfuro creado por mutación es necesario el poder comprobar la no existencia de cisteínas libres, esto se realiza mediante la reactividad diferencial de su cadena lateral.

- Se prepara la solución *stock* del reactivo de Ellman: 2 mM ácido 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoico), DTNB y 50 mM de acetato sódico.
- Se crea una serie de diluciones patrón de hidrocloreuro de L-cisteína en el rango de concentraciones de 1-75 μ M.
- En un eppendorf de 1,5 mL, 750 μ L de agua son mezclados con 100 μ L de tampón tris (1M pH 8) y 100 μ L de muestra.

- La mezcla es agitada vigorosamente e incubada durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- Las muestras son transferidas a una cubeta de cuarzo y su absorbancia leída a 412nm.
- La concentración se obtiene mediante la interpolación de los valores de absorbancia en la recta patrón obtenida.

13.9. Protocolos de biología molecular básicos

13.9.1. Preparación de medios

- Medio Luria Bertani (LB) líquido

Se ha utilizado el preparado en polvo *LB Broth (Lennox)* comercializado por Sigma-Aldrich®. Para un 1 L de medio se realiza el siguiente proceso:

- Se pesan 20g del sólido. Esta cantidad proporciona las siguientes cantidad de los componentes básicos del medio LB.
 - Extracto de levadura: 10 g (concentración final 10 g/L)
 - Triptona: 5 g (concentración final 5 g/L)
 - NaCl: 5 g (concentración final 5 g/L)
- Se disuelve en 1 L de agua destilada y se autoclava.
- El medio puede ser conservado a temperatura ambiente.
- En el caso de que sea necesaria la presencia de antibiótico, una vez el medio haya alcanzado una temperatura próxima a la ambiental se le añade el volumen correspondiente de una solución estéril de antibiótico *stock*. En el presente trabajo solo ampicilina (Sigma-Aldrich®) ha sido usada como elemento de selección. Se prepara una disolución 100x equivalente a 100 mg/mL con agua MilliQ. El volumen preparado es esterilizado por filtración a 0,22 µm (filtros Merck-Millipore). Esta solución puede ser conservada a -20°C. La concentración final deseada en el medio de cultivo ha sido constante con un valor de 100 mg/L. Una vez añadido el antibiótico el medio se conserva a 4°C.

- Medio Luria Bertani (LB) sólido en placa

Se ha utilizado el preparado en polvo *LB Broth with agar (Lennox)* comercializado por Sigma-Aldrich®. Para un 1L de medio se realiza el siguiente proceso:

- Se pesan 35 g del sólido. Esta cantidad proporciona las siguientes cantidad de los componentes básicos del medio LB.
 - Extracto de levadura: 10 g (concentración final 10 g/L)
 - Triptona: 5 g (concentración final 5 g/L)

- NaCl: 5 g (concentración final 5 g/L)
- Agar: 15 g (concentración final 15 g/L)
- Se disuelve en 1 L de agua destilada y se esteriliza por autoclavado.
- Una vez el medio ha enfriado lo suficiente para ser manipulado, se vierte un volumen próximo a los 25 mL en placas de Petri (90 mm) estériles en condiciones asépticas en una cabina de flujo laminar y próximo a la llama de un mechero Bunsen.
- Las placas se mantienen abiertas durante 30 minutos aproximadamente para permitir la solidificación del medio evitando condensación.
- Las placas se conservan a 4°C.
- En el caso de que sea necesaria la presencia de antibiótico, una vez el medio haya alcanzado una temperatura próxima a la ambiental se le añade el volumen correspondiente de una solución estéril de antibiótico *stock* (idéntica a la mencionada en la preparación del medio líquido). La concentración final deseada en el medio de cultivo ha sido constante con un valor de 100 mg/l. Estas placas también deben ser conservada a 4°C.

- Medio Luria Bertani (LB) líquido suplementado para autoinducción

Para la preparación de este medio de expresión proteica se utilizan las directrices de la publicación de Studier et al.(Studier, 2005). El protocolo indicado a continuación se utiliza para suplementar medio LB líquido preparado utilizando el protocolo correspondiente.

- Se preparan las siguientes soluciones *stock* estériles utilizando agua MilliQ como disolvente:
 - Solución M *stock* 50x esterilizada por autoclavado (Tabla 13.9-1):

Solución	M	x				
Concentración	50					
Volumen	1000	mL				
Compuesto	Casa comercial	MW	Concentración final (M)	Concentración <i>Stock</i> (M)	g/L	
Na ₂ HPO ₄	Panreac	141,96	0,025	1,25	177,45	
KH ₂ PO ₄	Panreac	136,09	0,025	1,25	170,11	
NH ₄ Cl	Panreac	53,49	0,05	2,5	133,73	
Na ₂ SO ₄	Panreac	142,04	0,005	0,25	35,51	

Tabla 13.9-1 Solución M medio autoinducción

Reactivos y concentraciones para la preparación de la solución M (50x) del medio de autoinducción.

- Solución 5052 *stock* 50x esterilizada por autoclavado (Tabla 13.9-2):

Solución 5052					
Concentración	50	x			
Volumen	1000	mL			
Compuesto	Casa comercial	MW	Concentración final (%)	Concentración <i>Stock</i> (%)	g/L
Glicerol	Merck	92,09	0,5	25	250,00
D-Glucosa	Sigma-Aldrich	180,16	0,05	2,5	25,00
Lactosa	Sigma-Aldrich	342,3	0,2	10	100,00

Tabla 13.9-2 Solución 5052 medio autoinducción

Reactivos y concentraciones para la preparación de la solución 5052 (50x) del medio de autoinducción.

- Solución de $MgSO_4$ *stock* 100x esterilizada por filtración a 0,22 μm :

Solución $MgSO_4$					
Concentración	100	x			
Volumen	1000	mL			
Compuesto	Casa comercial	MW	Concentración final (M)	Concentración <i>Stock</i> (M)	g/L
$MgSO_4$	Sigma-Aldrich	120,37	0,002	0,2	24,07

Tabla 13.9-3 Solución $MgSO_4$ medio autoinducción

Reactivos y concentraciones para la preparación de la solución de $MgSO_4$ (100x) del medio de autoinducción.

- Se prepara en un matraz Erlenmeyer del volumen apropiado, 1 L de medio LB líquido.
- Se suplementa este medio, una vez alcanza la temperatura ambiental, con las siguientes cantidades de las soluciones *stock* M, 5052 y $MgSO_4$:

Componente	Erlenmeyer
Medio LB	1000 mL
5052 (50x)	20 mL
M (50x)	20 mL
$MgSO_4$ (100x)	10 mL

- Todos los plásmidos de expresión utilizados utilizan un gen de resistencia a ampicilina como agente de selección de ahí la necesidad de añadir este antibiótico en todos los medios de expresión. Se añade el volumen correspondiente de una solución estéril de antibiótico *stock* (idéntica a la mencionada en la preparación del medio líquido). La concentración final deseada en el medio de cultivo ha sido constante con un valor de 100 mg/L.
- Este medio se prepara inmediatamente previo a su utilización.

13.9.2. Medida de la densidad óptica de un cultivo

- Se toma una muestra 1 mL del medio en el que se esté creciendo y se añade en una cubeta de poliestireno con un paso de luz de 1cm.
- Se mide su absorbancia a $\lambda=600nm$ habiendo realizado un blanco con el disolvente en el que está preparado el medio (H_2O destilada).

- Se toma una muestra de 1 ml del cultivo en condiciones estériles y se añade en una cubeta equivalente a las utilizadas en la medida de las referencias y se mide su absorbancia.
- La sustracción del valor de referencia del medio con la del cultivo en un estado determinado es la OD₆₀₀.

13.9.3. Creación de un glicerinado *stock* a -80°C.

- A partir de una colonia única de *E.coli* obtenida por una siembra u otra metodología, se realiza un inóculo en 3 mL de medio LB líquido suplementado con el antibiótico correspondiente (ampicilina 100 mg/L en este trabajo), en el caso de necesitarlo.
- Se incuba ON a 37°C y 250 rpm.
- Sobre el cultivo se añade glicerol estéril hasta una concentración final entre el 15% y el 20%.
- Se mezcla vigorosamente mediante el uso de un vórtex.
- Se reparten alícuotas de esta suspensión celular en tubos estériles resistentes a bajas temperaturas.
- Se conserva en congelador a un temperatura de -80°C.

13.9.4. Obtención de células competentes y transformación

- Células competentes por CaCl₂

Este protocolo ha sido aplicado tanto a células destinadas a la clonación de ADN para los trabajos de biología molecular (*E. coli* DH5α - Invitrogen) como para la expresión proteínas clonadas en plásmidos de expresión (*E. coli* BL21 (DE3) star - Invitrogen).

- A partir de un glicerinado *stock* de la cepa de *E. coli* correspondiente se realiza una siembra en estría para la obtención de cultivos puros en una placa de medio LB sólido. Esta placa se incuba ON a 37°C.
- Se selecciona una colonia única y se inocula en 3 mL de medio LB líquido. Se incuba ON a 37°C y 250 rpm.
- Se inoculan 500 µL del cultivo anterior en 50 mL de LB. Se mantiene en incubación a 37°C y 250 rpm
- Periódicamente se comprueba la OD₆₀₀ hasta que alcanza un valor de 0,3. El cultivo en este estado se transfiere a tubos de centrifuga estériles y se enfría en hielo durante 30 minutos.
- Se centrifuga a 3000 rpm durante 10 minutos a 4°C.

- Se elimina el sobrenadante y se resuspende en 1/2 del volumen de cultivo inicial (25 mL) en una disolución de CaCl₂ 50 mM (Sigma-Aldrich®) estéril y a 4°C. Esta suspensión se mantiene en hielo durante 15 minutos.
- Se vuelve a centrifugar en las mismas condiciones y se elimina el sobrenadante.
- Se resuspende en 1/10 del volumen inicial (5 mL) utilizando una solución de CaCl₂ 50 mM y glicerol al 15% a 4°C.
- El total del volumen se reparte en tubos eppendorf estériles en alícuotas de 150 µL.
- Se conservan a -80°C. Podrían ser utilizadas al instante.

- Transformación de células competentes por CaCl₂

Este protocolo ha sido aplicado para la transformación de plásmidos dentro de células químicamente competentes por CaCl₂.

- Se descongelan en hielo las alícuotas de células competentes que habían sido conservadas a -80°C.
- Se añade un volumen determinado de ADN en función del fin del mismo (por lo general entre 5 y 10 µL) sobre los 150 µL de la alícuota de células competentes. Se asegura la perfecta homogenización de la suspensión. Es necesaria la consideración de controles negativos y positivos:
 - Control de contaminación de reactivos, se añade H₂O, se sembrará en medio con antibiótico.
 - Control de supervivencia de las células, se sembrarán en medio sin antibiótico.
 - Control de contaminación, se sembrarán en medio con antibiótico.
 - Control positivo, transformación con un plásmido cuya eficiencia de transformación esté demostrada.
- La mezcla de células competentes y ADN plasmídico se mantiene en hielo durante 30 minutos.
- Se transfiere la mezcla a un baño a 42°C durante 2 minutos.
- Se vuelven a incubar en hielo durante 5 minutos.
- A la mezcla se le añaden 300 µL de medio LB líquido estéril en el propio vial eppendorf. Se incuba este pre-inóculo durante 45 minutos a 37°C y 250 rpm.
- Transcurrido el tiempo necesario, se extiende el preinóculo en placas de LB sólido con el antibiótico correspondiente (ampicilina en la totalidad de este trabajo), por lo general el volumen producido se extiende en dos placas de tamaño estándar (90 mm de diámetro).

13.9.5. Obtención y purificación de ADN

- Extracción de ADN plasmídico: miniprep

Para la extracción de ADN plasmídico se utilizó el kit comercializado por Sigma-Aldrich®: *GenElute™ Plasmid Miniprep Kit*.

- A partir de un cultivo puro de una cepa transformada con un plásmido (desde glicerinado o colonia única proveniente de una estría en medio sólido) se realiza un inóculo en 5 mL de LB líquido suplementado con el antibiótico correspondiente (ampicilina 100 mg/L) en un tubo de 15 mL apto para centrifuga.
- Se incuba a 37°C y 250 rpm ON.
- Se centrifugan los tubos de cultivo a 3500 rpm durante 15 minutos (centrifuga sobremesa Sigma).
- Se elimina el sobrenadante y el *pellet* es resuspendido por pipeteo en 200 µL de la solución de resuspensión (*Resuspension solution*). Esta suspensión es transferida a tubos eppendorfs previamente autoclavados para la eliminación de nucleasas.
- Se adicionan 200 µL de la solución de lisis (*Lysis solution*). Se homogeniza la mezcla mediante inversión suave del tubo con la muestra entre 8 y 10 veces.
- El cultivo lisado se neutraliza añadiendo 350 µL de la solución de neutralización. El mezclado en este paso también se realiza mediante la inversión cuidadosa del tubo.
- El volumen total resultante es centrifugada a 12000 rpm durante 15 minutos en una microcentrifuga de sobremesa (Eppendorf).
- Las microcolumnas de purificación se preparan colocándolas sobre un tubo de recolección (ambos elementos proporcionados en el kit) y añadiendo 500 µL de solución de preparación de columna (*Column preparation solution*). Este sistema es centrifugado durante 1 minuto 12000 rpm. Se elimina el filtrado y se devuelve la columna al mismo tubo de recolección.
- Una vez separadas las fases de la muestra, se recupera la fase líquida y se transfiere a la columna previamente preparada. Se centrifuga durante 1 minuto a 12000rpm y se elimina el volumen filtrado. Se mantiene la columna en el mismo tubo de recolección
- Se realiza un lavado del ADN retenido en la matriz de la columna mediante la adición de 750 µL de la solución de lavado proporcionada (*Wash solution*). De nuevo, se centrifuga durante 1 minuto a 12000 rpm y se elimina el flujo que ha atravesado la columna.
- Sin la adición de ningún tipo de solución o eluyente, se realiza un nuevo centrifugado del sistema para eliminar soluciones retenidas en la matriz de la columna. Esta dura 2 minutos y a una velocidad de 12000 rpm.
- Se trasfiere la columna a un tubo eppendorf de 1,5 ml autoclavado y se añade el volumen de H₂O MilliQ autoclavada deseado (por lo general, 50 µL) para la elución del ADN.
- Se centrifuga durante 1 minuto a 12000 rpm.
- El ADN es recuperado en el flujo retenido en el vial.

- Su conservación se realiza en congelador a -20°C.

- Purificación de fragmentos de ADN provenientes de PCR

Para la purificación de productos de PCR se utilizó el siguiente kit comercial: *QIAquick spin – PCR purification Kit* de Qiagen.

- Una vez obtenido el producto de PCR se le añade 1 volumen equivalente al de reacción de solución PB.
- Esta muestra es añadida directamente en la columna (previamente introducida en un tubo de recolección de 2 ml).
- Se centrifuga a 12000 rpm durante 1 minuto y se elimina el flujo.
- Se lava el ADN unido a la columna mediante la adición de 750µl del tampón PE.
- De nuevo se centrifuga durante 1 minutos a 12000 rpm y se elimina el flujo que ha atravesado la columna.
- Sin añadir nada la columna se vuelve a centrifugar durante 2 minutos en las mismas condiciones para eliminar toda la solución de lavado restante.
- Se transfiere la columna a un tubo eppendorf autoclavado y se le añade el volumen deseado de H₂O MilliQ autoclavada para la elución del ADN. Se deja reposar durante un minuto para aumentar la efectividad de la recuperación del ADN.
- Tras esto se centrifuga durante 1 minuto a 12000 rpm.
- El ADN obtenido de este modo se conserva a -20°C.

- Extracción de ADN desde banda de gel de agarosa

Para la purificación de productos de PCR se utilizó el siguiente kit comercial: *QIAquick – Gel extraction Kit* de Qiagen.

- Una vez migrado realizada la electroforesis en gel de agarosa con las muestras de interés. Se recortan las bandas, y se introducen en un tubo de 2 mL previamente tarado.
- Se pesan las bandas y se estima que peso=volumen. Se añaden 3 volúmenes del tampón QG.
- Se incuba a 50°C con agitación ocasional hasta que los fragmentos de agarosa están completamente disueltos.
- Se añade un volumen de isopropanol de calidad “Biología molecular” (Sigma-Aldrich®).
- Esta muestra es añadida directamente en la columna (previamente introducida en un tubo de recolección de 2 ml).
- Se centrifuga a 12000 rpm durante 1 minuto y se elimina el flujo.

- Se añaden 500 µL de tampón QG a la columna y se centrifuga en las mismas condiciones. Se elimina el volumen que ha atravesado la columna.
- Se realiza un lavado del ADN retenido en la columna mediante la adición de 750 µL de tampón PE y centrifugando en las mismas condiciones. Tras el paso de centrifugación se elimina el sobrenadante.
- Sin añadir nada la columna se vuelve a centrifugar durante 2 minutos en las mismas condiciones para eliminar toda la solución de lavado restante.
- Se transfiere la columna a un tubo eppendorf autoclavado y se le añade el volumen deseado de H₂O MilliQ autoclavada para la elución del ADN. Se deja reposar durante un minuto para aumentar la efectividad de la recuperación del ADN.
- Tras esto se centrifuga durante 1 minuto a 12000 rpm.
- El ADN obtenido de este modo se conserva a -20°C.

13.9.6. Estimación de la concentración de ADN

- Estimación de la concentración de ADN usando Qubit®.

Para la cuantificación de ADN utilizando el sistema de Qubit® de Thermo Fisher Scientific existen dos metodologías: *Broad Range (BR)* y *High Sensitivity (HS)*. En todo este trabajo el protocolo utilizado es el *Broad Range*.

- Se prepara el tampón de reacción diluyendo el reactivo 1:200 en el tampón proporcionado. Se mezcla vigorosamente con un vórtex.
- En tubos transparentes de plástico proporcionados se añade el volumen de muestra de ADN entre 1 y 20 µL y se lleva a un volumen total de 200 µL.
- En dos tubos se añaden 190 µL del tampón de reacción y 10 µL de cada uno de los patrones proporcionados en el kit.
- Se agitan muestras y patrones de 2 a 3 segundos en el vórtex y se incuban 2 minutos a temperatura ambiente.
- Se calibra el lector Qubit® y se realiza la medida de cada una de las muestras.
- La concentración es directamente proporcionada por el equipo.

- Estimación aproximada de la concentración de ADN usando electroforesis en gel de agarosa.

En esta metodología se aprovecha la propiedad del bromuro de etidio por la cual la intensidad de fluorescencia al intercalarse en el ADN es proporcional a su cantidad.

- Se realiza un gel de agarosa analítico tal como se indica en el protocolo mencionado anteriormente.

- En el gel se cargan 12 μL el marcador de tamaño molecular. Se prepara según las indicaciones del fabricante (Marcador:H₂O:Tampón de Carga 4:6:2), de tal modo que la cantidad cargada de cada fragmento es conocida.

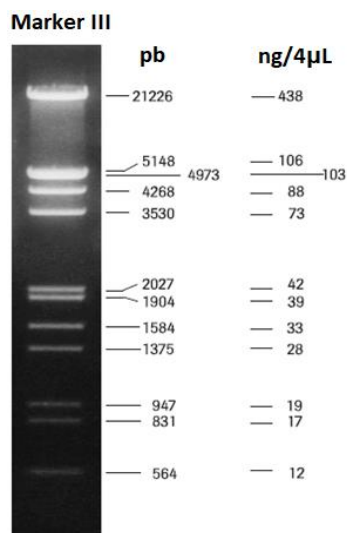


Figura 13.9-1 Marker III ADN

Separación de 1 μg de ADN del marcador de peso molecular *Marker III* en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. (Editado del manual del fabricante. Roche).

- Se captura una imagen en el transiluminador UV.
- Se realiza un análisis de imagen utilizando el software ImageJ para transformar la intensidad de cada banda en un valor numérico
- Con los valores del marcador se crea una recta de calibración y se interpolan los valores de la muestra problema en esa recta obteniendo la cantidad de ADN cargado en la muestra.

13.9.7. Electroforesis de ADN en gel de agarosa

- Preparación de las muestras y patrones

- Se prepara el tampón de carga 6x: Sacarosa 0,4 g/mL (Sigma-Aldrich®) en H₂O MilliQ y una pequeña cantidad de azul de bromofenol (Riedel-de Haën).
- Se toman alícuotas de las muestras de ADN a analizar y, para un procedimiento analítico, se llevan a un volumen final de 10 μL con H₂O MilliQ autoclavada. En un gel de electroforesis preparativa no es necesaria esta limitación.
- Sobre estos 10 μL se añaden 2 μL de tampón de carga de ADN 6x. En el caso de una electroforesis preparativa se añaden el volumen de tampón de carga correspondiente.
- El patrón utilizado en este trabajo fue el *Marker III* en nuestro caso de Roche. Se preparó un *stock* con las siguientes proporciones Marcador : H₂O : Tampón de Carga 4:6:2. Se separaron alícuotas de 12 μL y se conservaron hasta su uso a -20°C.

Preparación del gel y electroforesis

- Se prepara una disolución de agarosa (Sigma-Aldrich®) en tampón TAE con el porcentaje deseado. Para la totalidad de aplicaciones en este trabajo se utilizó un 1% de agarosa. Para un gel pequeño (12 carriles) se preparaban 30 ml y para un gel grande (24 carriles) se preparaban 120 ml.
- Esta mezcla se lleva a ebullición en un horno microondas hasta que no se observen los cristales de agarosa.
- Una vez se ha reducido la temperatura, se añaden 2 μL de bromuro de etidio 10 mg/mL en el caso de un gel pequeño y 5 en el caso de un gel grande. Se homogeniza la solución
- Se vierte en un molde de geles de agarosa donde previamente se introdujo el peine que crea los pocillos.
- Se deja enfriar a temperatura ambiente.
- Una vez solidificado se retira el peine y se sumerge en una cubeta de electroforesis llena de tampón TAE.
- Se cargan 12 μL del marcador y de las muestras y se inicia el campo eléctrico de 90V constantes.
- Una vez el frente de migración (indicado por el azul de bromofenol del tampón de carga) ha corrido lo suficiente, se retira el gel de la cubeta y se adquiere la imagen en un transiluminador de luz UV con cámara acoplada. Este gel puede ser utilizado también para la extracción de ADN.

13.9.8. Secuenciación de ADN plasmídico

La secuenciación de los diferentes constructos y mutantes creados en el presente trabajo se realizaron mediante un servicio externo proporcionado por la empresa StabVida. A continuación se detallan los aspectos clave en la preparación de la muestra así como parámetros facilitados.

- Se preparan 20 μL de ADN plasmídico proveniente de una miniprep común. Esta muestra debe contener al menos 20 ng/ μL de concentración de ADN y es suficiente para dos secuenciaciones.
- La muestra se envía en un vial eppendorf sellado y a temperatura ambiente.
- Los cebadores utilizados para la secuenciación son los T7 en todo el trabajo aquí presentado.

Cebador	Secuencia	T_m	n	%G/C
T7 promoter	5' - TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG - 3'	48°C	20	40%
T7 terminator	5' - GCT AGT TAT TGC TCA GCG G - 3'	54°C	19	53%

Tabla 13.9- 4 Cebadores T7

Secuencia de los cebadores T7 universales.

- Las reacciones de secuenciación y extracción de datos es realizada por el proveedor de servicios.

- Las secuencias son analizadas comparadas frente a las teóricas mediante el software *ApE* (*A plasmid Editor*).

13.9.9. Digestión de ADN mediante enzimas de restricción

La aplicación de esta metodología durante el desarrollo de este trabajo se realizó de modo preparativo. Esta modalidad permite obtener grandes cantidades de ADN para la clonación de los mutantes y constructos en sus respectivos plásmidos. Por lo general se aplican digestiones dobles para la clonación direccional del ADN.

- Se identifican los enzimas de restricción a utilizar y el tampón de reacción en el que ambos desarrollan su máximo de actividad. El proveedor de enzimas de restricción utilizado es *New England Biolabs (NEB)*.
- Se parte de una muestra de ADN cuyo origen puede ser PCR, miniprep o cualquier otro tipo de método de purificación de ADN.
- Se crea el cóctel de reacción que se indica en la siguiente tabla. Se tiene en cuenta la actividad específica de cada enzima de restricción.

Componente	Concentración Stock	Concentración final	Vol
Tampón de reacción stock	10x	1x	2 µL
ADN	a	0,5-1 µg total	x µL
Enzimas de restricción	-	-	1-2 µL
H ₂ O MilliQ autoclavada	-	-	Hasta µL
Volumen total			20 µL

Tabla 13.9- 5 Preparación reacción de digestión de ADN

Reactivos, concentraciones y sus volúmenes para la realización de una digestión preparativa de ADN con enzimas de restricción.

- Se incuba a 37°C durante 4 horas.
- Se realiza una electroforesis de gel preparativa.
- Se extrae la banda, se purifica y se estima su concentración.

13.9.10. Ligación de fragmentos de restricción para su clonación en vector

En este trabajo se realizó la clonación de constructos provenientes de diferentes metodologías de manipulación de ADN, tanto de simple amplificación por PCR como complejas estrategias de eliminación e inserción de secuencias.

- Se realizan las digestiones preparativas tanto del plásmido como del inserto con los mismos enzimas. Se cuantifica el ADN resultante.
- Se realiza el siguiente cóctel de reacción asegurando diferentes ratios estequiométricos de inserto: vector (1:1,3:1, 6:1 son los recomendados). Se utiliza la T4 ADN ligasa de *New England Biolabs*. Se intenta asegurar una cantidad próxima a los 100 ng de ADN en la reacción.

Componente	Concentración Stock	Concentración final	Vol
T4 ADN ligasa buffer	10x	1x	2 µL
Vector	a	Según ratio	x µL
Inserto	b	Según ratio	y µL
Ligasa T4	-	-	1 µL
H ₂ O MilliQ autoclavada	-	-	Hasta 20 µL
Volumen total			20 µL

Tabla 13.9- 6 Preparación reacción de ligación de ADN con extremos cohesivos

Reactivos, concentraciones y sus volúmenes para la realización de una ligación de fragmentos de ADN previamente digeridos con enzimas de restricción que generen extremos cohesivos.

- Es necesario la consideración de controles negativos:
 - Solo vector con ligasa: control de religación.
 - Solo inserto con ligasa: control de contaminación de la procedencia del inserto.
 - Solo ligasa: control de presencia de contaminación de algún plásmido de origen desconocida.
- Se mezcla ligeramente por pipeteo y se realiza un pulso de centrifuga para llevar todo el volumen al fondo del tubo (ependorf, 200 µL).
- Se mantiene a temperatura ambiente durante 15 minutos.
- Se transforman en las células competentes *E. coli* DH5α.
- Se extrae el ADN por miniprep.
- Se comprueba la identidad por PCR y secuenciación.

13.10. Protocolos bioquímicos básicos

13.10.1. Electroforesis en gel desnaturizante SDS-PAGE

- Soluciones y compuestos necesarios:

- Solución A: 30% acrilamida, 2.7% bisacrilamida (Thermo-Fisher Scientific).
- Solución B: 1,5M Tris-HCl pH 5,8 (Sigma-Aldrich®).
- Solución C: 0,5M Tris-HCl pH 5,8 (Sigma-Aldrich®).
- Solución D: 10% SDS (w / V) (Sigma-Aldrich®).
- TEMED (Sigma-Aldrich®).
- Persulfato de amonio (Sigma-Aldrich®).
- Tampón electroforesis 10x: 30 g/L Tris-Base, 144 g/L glicina 10 g/L SDS pH 8,3.
- Tampón de carga 5x: 62,5 mM Tris-HCl, 25% glicerol, 2% SDS, 5% β-mercaptoetanol, un pequeña cantidad de azul de bromofenol.
- Marcador de peso molecular: 2:4:14 Marcador stock: Tampón de carga 5X: H₂O MilliQ (*Low Range Standard marker*, Bio-Rad).

- Preparación del gel SDS Page:

- En este trabajo los geles SDS-PAGE realizados son siempre al 14% de acrilamida. Los volúmenes de cada solución se indican en la tabla siguiente.

Componente	Gel separador	Gel apilador
H ₂ O MilliQ (mL)	2,7	6,1
Solución A (mL)	4,7	1,3
Solución B (mL)	2,5	-
Solución C (mL)	-	2,5
Solución D (μL)	100	100
TEMED (μL)	5	10

Tabla 13.10- 1 Preparación gel SDS-PAGE

Volúmenes de las soluciones *stock* necesarios para obtener un gel de electroforesis SDS-PAGE al 14% de acrilamida

- Se realiza el montaje del soporte del gel (*Mini-Protean*, Bio-Rad).
- Se realiza la solución del gel separador y justo antes de verterlo en el molde se le añade una punta de espátula de persulfato de amonio y se vierte en el molde dejando espacio para el gel apilador.
- Se añade un pequeño volumen de agua por encima del gel para nivelar y se deja gelificar.
- Una vez gelificado se elimina el agua y se añade el gel apilador sobre el separador preparándolo de forma idéntica al separador con las proporciones indicadas en la tabla.
- Se introduce el molde de los pocillos y se deja gelificar.
- Una vez gelificado se retira el molde, y se introduce el montaje en la cubeta. Se cubren los geles con tampón de electroforesis 1x.

- Preparación de las muestras

- Se mezclan 24 μL de muestra con 6 μL del tampón de carga 5x.
- Se incuban en un baño a 95°C durante 10 minutos (el marcador también sufre este procesamiento).
- Transcurrido este tiempo se dejan enfriar.

- Carga y migración del gel

- Se carga el gel con 12 μL tanto de los marcadores como de la muestra.
- Se aplica un voltaje constante de 180 V hasta observar la salida del frente de migración correspondiente al azul de bromofenol.
- Se retira el gel del montaje y se procede a su tinción.

- Tinción

- Se deposita el gel en una bandeja y se realizan tres lavados con agua destilada durante 5 minutos cada uno.

- Posteriormente se añade un volumen suficiente de *Bio-Safe Coomassie Stain* (Bio-Rad) para cubrir el gel. Se incuba durante al menos 1 hora a temperatura ambiente y protegido de la luz.
- Se realiza un último lavado con H₂O destilada y se introduce en bolsa de plástico sellada para su conservación y digitalización.

13.10.2. Estimación de la concentración de proteína por BCA en microplaca

Para la totalidad de proteínas estudiadas en este trabajo se utilizó el método de BCA para la estimación de su concentración usando BSA como proteína de referencia para la construcción de la recta patrón.

- Se realiza la mezcla del reactivo A y el tampón de reacción proporcionado por el fabricante (Thermo-Fisher Scientific) en la relación indicada (50:1). Se mezcla vigorosamente esta solución.
- Se preparan las diluciones del patrón de BSA. 2 mg/mL comercializado por Thermo-Fisher Scientific. Se han utilizado diluciones seriadas 1/2 utilizando el mismo tampón en el que se encuentra disuelta la proteína. Este tampón, por lo general, es PB 50 mM pH 8,5 300 mM NaCl. La recta patrón siempre se ha realizado por duplicado.
- En una microplaca de poliestireno de fondo plano se añaden 160 µL de la solución de BCA para las muestras y patrones.
- Se preparan las diluciones de las muestras incógnita con el tampón correspondiente. Por lo general se han medido la muestra original y las diluciones: 1/2, 1/4 y 1/10 todo por duplicado.
- Se añaden en los pocillos correspondientes 20 µL de patrones y muestras.
- Se sella con una membrana adhesiva y se agita vigorosamente en un agitador de microplacas (Eppendorf) a 900 rpm durante 30 segundos.
- Se incuba a 37°C durante 30 minutos.
- Se agita de nuevo vigorosamente en las mismas condiciones a las indicadas anteriormente.
- Se retira la lámina adhesiva y se realiza a lectura en el lector de microplacas (Bio-Tek Elx) a $\lambda=590\text{nm}$.
- Se obtiene los valores a través del software Gen5 y se realiza una regresión lineal con los valores de la recta patrón de BSA y se calcula la concentración promedio de cada muestra utilizando la ecuación obtenida en Microsoft-Excel.

13.10.3. Estimación de MW de una proteína pura por MALDI-TOF

Este procedimiento es realizado por el personal responsable del equipo a continuación se indica un resumen de la metodología seguida para la preparación de muestra

- Se utiliza una muestra de proteína ya purificada y con una concentración próxima a 1 mg/mL.
- Se prepara una solución de matriz, es una solución saturada de ácido sinapínico en acetonitrilo con 0,1% TFA.
- Se mezclan 1 o 2 μ L de muestra de proteína y/o de la muestra de proteína y patrones con un volumen idéntico de la solución de matriz.
- Se realiza el proceso anterior con la mezcla de proteínas patrón (*Protein Standard Calibration I*)
- Se aplican 0,5 μ L de esta mezcla en la placa de muestreo del espectrómetro MALDI-TOF.
- Se deja evaporar a temperatura ambiente.
- Se añaden 2 μ L de una solución de 0,1% TFA en H₂O ultra pura. Se mantiene durante unos segundos y posteriormente se absorbe con un pedazo de papel absorbente (*KimWipe*).
- Se añaden otros 0,5 μ L de la solución de matriz y se deja evaporar a RT.
- La placa es introducida en el equipo (Microflex – Bruker Daltonics) y analizada según los parámetros escogidos por el operador.

13.10.4. Concentrado de proteína / cambio de tampón por Amicon™

Los filtros Amicon son comercializados por Thermo Fisher Scientific. En este trabajo se han utilizado los Amicon™ Ultra-15 con un MWCO de 10 kDa y para un volumen máximo de 15 mL.

- Se lava el sistema añadiendo 5 mL del tampón en el que procede la muestra en el caso de concentración o del nuevo en el caso de cambio de tampón. Se centrifuga 1 minuto a 4000 rpm y se descarta tanto el retenido como el filtrado.
- Se introduce la muestra con proteína y se centrifuga en periodos de 5-8 minutos a 4000 rpm y 4°C. Tras cada paso se mezcla por inversión y se repite el paso de centrifugación
- En el caso de cambio de tampón, tras cada paso de centrifugación se elimina el filtrado y se añade un volumen equivalente del tampón final.
- Una vez alcanzado el volumen necesario o el intercambio eficiente de tampón, se recupera la muestra y se filtra a 0,45 μ m.

Bibliografía

14. Bibliografía

- A. Odier. (1823). Mémoire sur la composition chimique des parties cornées des insectes. *Mem. Soc. Hist. Nat. Paris*, 1, 29–42.
- Agulló, E., Rodríguez, M. S., Ramos, V., & Albertengo, L. (2003). Present and Future Role of Chitin and Chitosan in Food. *Macromolecular Bioscience*, 3(10), 521–530.
- Ahmed, T. A., & Aljaeid, B. M. (2016). Preparation, characterization, and potential application of chitosan, chitosan derivatives, and chitosan metal nanoparticles in pharmaceutical drug delivery. *Drug Design, Development and Therapy*, 10, 483–507.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. New York: Garland Science.
- Alpert, A. J. (1990). Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. *Journal of Chromatography A*, 499(C), 177–196.
- Andrés, E., Albesa-Jové, D., Biarnés, X., Moerschbacher, B. M., Guerin, M. E., & Planas, A. (2014). Structural Basis of Chitin Oligosaccharide Deacetylation. *Angewandte Chemie International Edition*, 53(27), 6882–6887.
- Andrés, E., Aragunde, H., & Planas, A. (2014). Screening glycosynthase libraries with a fluoride chemosensor assay independently of enzyme specificity: identification of a transitional hydrolase to synthase mutant. *Biochemical Journal*, 363, 355–363.
- Araki, Y., & Ito, E. (1975). A Pathway of Chitosan Formation in *Mucor rouxii*. *European Journal of Biochemistry*, 55, 71–78.
- Araki, Y., & Ito, E. (1975). A pathway of chitosan formation in *Mucor rouxii*. Enzymatic deacetylation of chitin. *European Journal of Biochemistry*, 55(1), 71–78.
- Aranda-Martinez, A., Lenfant, N., Escudero, N., Zavala-Gonzalez, E. A., Henrissat, B., & Lopez-Llorca, L. V. (2016). CAZyme content of *Pochonia chlamydosporia* reflects that chitin and chitosan modification are involved in nematode parasitism. *Environmental Microbiology*, 18(11), 4200–4215.
- Ardourel, M. (1994). *Rhizobium meliloti* Lipooligosaccharide Nodulation Factors: Different Structural Requirements for Bacterial Entry into Target Root Hair Cells and Induction of Plant Symbiotic Developmental Responses. *The Plant Cell Online*, 6(10), 1357–1374.
- Armstrong, Z., & Withers, S. G. (2013). Synthesis of glycans and glycopolymers through engineered enzymes. *Biopolymers*, 99(10), 666–674.
- Atkinson, E. M., Palcic, M. M., Hindsgaul, O., & Long, S. R. (1994). Biosynthesis of *Rhizobium meliloti* lipooligosaccharide Nod factors: NodA is required for an N-acyltransferase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(18), 8418–8422.
- Azuma, K., Ifuku, S., Osaki, T., Okamoto, Y., & Minami, S. (2014). Preparation and biomedical applications of chitin and chitosan nanofibers. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 10(10), 2891–2920.

- Barroso, A. J., Contreras, F., Bagchi, D., & Preuss, H. G. (2001). Efficacy of a novel chitosan formulation on fecal fat excretion: a double-blind, crossover, placebo-controlled study. *Journal of Medicine*, 33(1–4), 209–225.
- Barua, D. (1992). History of cholera. In *Current topics in Infectious Disease* (pp. 1–36). Springer.
- Ben-Shalom, N., Ardi, R., Pinto, R., Aki, C., & Fallik, E. (2003). Controlling gray mould caused by *Botrytis cinerea* in cucumber plants by means of chitosan. *Crop Protection*, 22(2), 285–290.
- Benson, J. R., & Hare, P. E. (1975). O-Phthalaldehyde: Fluorogenic Detection of Primary Amines in the Picomole Range. Comparison with Fluorescamine and Ninhydrin. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 72(2), 619–622.
- Berg, J. M. T., John, L., Stryer, L., Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2002). *Biochemistry*.
- Biely, P. (1985). Microbial xylanolytic systems. *Trends in Biotechnology*, 3(11), 286–290.
- Biely, P. (2012). Microbial carbohydrate esterases deacetylating plant polysaccharides. *Biotechnology Advances*, 30(6), 1575–1588.
- Biely, P., Côté, G. L., Kremnický, L., Greene, R. V., Dupont, C., & Kluepfel, D. (1996). Substrate specificity and mode of action of acetylxylan esterase from *Streptomyces lividans*. *FEBS Letters*, 396(2–3), 257–260.
- Blair, D. E., Schüttelkopf, A. W., MacRae, J. I., & van Aalten, D. M. F. (2005). Structure and metal-dependent mechanism of peptidoglycan deacetylase, a streptococcal virulence factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(43).
- Blair, D. E., & van Aalten, D. M. F. (2004). Structures of *Bacillus subtilis* PdaA, a family 4 carbohydrate esterase, and a complex with N-acetyl-glucosamine. *FEBS Letters*, 570(1–3), 13–9.
- Blair, D., Hekmat, O., & Schüttelkopf, A. (2006). Structure and mechanism of chitin deacetylase from the fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. *Biochemistry*, 45(31), 9416–9426.
- Boraston, A. B., Bolam, D. N., Gilbert, H. J., & Davies, G. J. (2004). Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. *The Biochemical Journal*, 382(Pt 3), 769–81.
- Braconnot, H. (1811). Sur la nature des champignons. *Ann Chim Phys*, 79, 265–304.
- Brock, T. D., & Freeze, H. (1969). *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a Non-sporulating Extreme Thermophile. *Journal of Bacteriology*, 98(1), 289–297.
- Buchner, E. (1897). Alkoholische Gärung ohne Hefezellen. *Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 30(1), 1110–1113.
- Buszewski, B., & Noga, S. (2012). Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)-a powerful separation technique. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 402(1), 231–247.
- Campbell, F. L. (1823). The detection and estimation of insect chitin; and the irrelation of “chitinization” to hardness and pigmentation of the cuticula of the american cockroach *Periplaneta americana* L. *Annals Entomological Society of America*, 22, 401–426.

- Caufrier, F., Martinou, A., Dupont, C., & Bouriotis, V. (2003). Carbohydrate esterase family 4 enzymes: substrate specificity. *Carbohydrate Research*, 338(7), 687–692.
- Chambon, R., Despras, G., Brossay, A., Vauzeilles, B., Urban, D., Beau, J.-M., ... Fort, S. (2015). Efficient chemoenzymatic synthesis of lipo-chitin oligosaccharides as plant growth promoters. *Green Chem.*, 17(7), 3923–3930.
- Chamnanmanoontham, N., Pongprayoon, W., Pichayangkura, R., Roytrakul, S., & Chadchawan, S. (2014). Chitosan enhances rice seedling growth via gene expression network between nucleus and chloroplast. *Plant Growth Regulation*, 75(1), 101–114.
- Chica, R. a, Doucet, N., & Pelletier, J. N. (2005). Semi-rational approaches to engineering enzyme activity: combining the benefits of directed evolution and rational design. *Current Opinion in Biotechnology*, 16(4), 378–84.
- Chien, a, Edgar, D. B., & Trela, J. M. (1976). Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *Journal of Bacteriology*, 127(3), 1550–7.
- Christov, L. P., & Prior, B. A. (1993). Esterases of xylan-degrading microorganisms : Production , properties , and significance. *Enzyme and Microbial Technology*, 15, 460–475.
- Chung, M. J., Park, J. K., & Park, Y. II. (2012). Anti-inflammatory effects of low-molecular weight chitosan oligosaccharides in IgE-antigen complex-stimulated RBL-2H3 cells and asthma model mice. *International Immunopharmacology*, 12(2), 453–459.
- Chung, Y., Su, Y., Chen, C., Jia, G., Wang, H., Wu, J. C. G., & Lin, J. (2004). Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall. *Acta Pharmacologica Sinica*, 25(7), 932–936.
- Cobucci-Ponzano, B., & Moracci, M. (2012). Glycosynthases as tools for the production of glycan analogs of natural products. *Natural Product Reports*, 29, 697–709.
- Codera, V., Gilbert, H. J., Fajjes, M., & Planas, A. (2015). Carbohydrate-binding module assisting glycosynthase-catalysed polymerizations. *Biochemical Journal*, 470(1), 15–22.
- Cohen, S. N., Chang, A. C. Y., Boyer, H. W., & Helling, R. B. (1973). Construction of Biologically Functional Bacterial Plasmids In Vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70(11), 3240–3244.
- Colwell, R. R. (1996). Global Climate and Infectious Disease: The Cholera Paradigm. *Science*, 274(5295), 2025–2031.
- Cord-Landwehr, S., Ihmor, P., Niehues, A., Luftmann, H., Moerschbacher, B. M., & Mormann, M. (2017). Quantitative Mass-Spectrometric Sequencing of Chitosan Oligomers Reveals Cleavage Sites of Chitosan Hydrolases. *Analytical Chemistry*, acs.analchem.6b04183.
- Cord-Landwehr, S., Melcher, R. L. J., Kolkenbrock, S., & Moerschbacher, B. M. (2016). A chitin deacetylase from the endophytic fungus *Pestalotiopsis sp.* efficiently inactivates the elicitor activity of chitin oligomers in rice cells. *Scientific Reports*, (November), 1–11.
- Craik, C. S., Largman, C., Fletcher, T., Rocznik, S., Barr, P. J., Fletterick, R., & Rutter, W. J. (1985). Redesigning trypsin: alteration of substrate specificity. *Science*, 228(July), 291–297.

- Croisier, F., & Jérôme, C. (2013). Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *European Polymer Journal*, 49(4), 780–792.
- Danby, P. M., & Withers, S. G. (2016). Advances in Enzymatic Glycoside Synthesis. *ACS Chemical Biology*, 11(7), 1784–1794.
- Darwin, C. (1859). On the origin of the species by natural selection.
- Davies, G. J., Wilson, K. S., & Henrissat, B. (1997). Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases. *The Biochemical Journal*, 321 (Pt 2), 557–559.
- de Miguel Bouzas, T., Barros-Velázquez, J., & Villa, T. G. (2006). Industrial applications of hyperthermophilic enzymes: a review. *Protein and Peptide Letters*, 13(7), 645–51.
- Delmer, D. P. (1999). CELLULOSE BIOSYNTHESIS: Exciting Times for A Difficult Field of Study. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50, 245–276.
- Demchenko, A. V. (2008). *Handbook of chemical glycosylation: advances in stereoselectivity and therapeutic relevance*. John Wiley & Sons.
- Dhillon, G. S., Kaur, S., Brar, S. K., & Verma, M. (2013). Green synthesis approach: extraction of chitosan from fungus mycelia. *Critical Reviews in Biotechnology*, 33(4), 379–403.
- Dische, Z., & Borenfreund, E. (1950). A spectrophotometric method for the microdetermination of hexosamines. *Journal of Biological Chemistry*, 184(2), 517–522.
- Dupont, C., Daigneault, N., & Shareck, F. (1996). Purification and characterization of an acetyl xylan esterase produced by *Streptomyces lividans*. *Biochem. J*, 886, 881–886.
- Dwyer, J. L. (1984). Scaling up Bio-Product Separation With High Performance Liquid Chromatography. *Bio/Technology*, 957–964.
- Eddine, N., Gueddari, E., Rauchhaus, U., Moerschbacher, B. M., & Holger, B. (2002). Developmentally regulated conversion of surface-exposed chitin to chitosan in cell walls of plant pathogenic fungi. *New Phytologist*, 156(1), 103–112.
- Einbu, A., Grasdalen, H., & Varum, K. M. (2007). Kinetics of hydrolysis of chitin/chitosan oligomers in concentrated hydrochloric acid. *Carbohydrate Research*, 342(8), 1055–1062.
- Eisenthal, R., Danson, M. J., & Hough, D. W. (2007). Catalytic efficiency and kcat/KM: a useful comparator? *Trends in Biotechnology*, 25(6), 247–249.
- El Gueddari, N. E., Schaaf, A., Kohlhoff, M., Gorzelanny, C., & Moerschbacher, B. M. (2007). Substrates and products of chitin and chitosan modifying enzymes. *Advances in Chitin Science*, 10, 119–126.
- Ellman, G. L. (1959). Tissue Sulfhydryl Groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 82, 70–77.
- Faijes, M., Imai, T., Bulone, V., & Planas, A. (2004). In vitro synthesis of a crystalline (1 → 3 , 1 → 4) -β- D -glucan by a mutated (1 → 3 , 1 → 4) -β- D -glucanase from *Bacillus*. *Biochemistry Journal*, 380, 635–641.
- Faijes, M., Pérez, X., Pérez, O., Planas, A., Pe, X., & Pe, O. (2003). Glycosynthase Activity of *Bacillus*

- licheniformis* 1, 3-1, 4- -Glucanase Mutants : *Biochemistry*, 42(45), 13304–13318.
- Faijes, M., & Planas, A. (2007). In vitro synthesis of artificial polysaccharides by glycosidases and glycosynthases. *Carbohydrate Research*, 342(12–13), 1581–94.
- Feng, J., Zhao, L., & Yu, Q. (2004). Receptor-mediated stimulatory effect of oligochitosan in macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 317(2), 414–420.
- Fernandes, A. C., Fontes, C. M., Gilbert, H. J., Hazlewood, G. P., Fernandes, T. H., & Ferreira, L. M. (1999). Homologous xylanases from *Clostridium thermocellum*: evidence for bi-functional activity, synergism between xylanase catalytic modules and the presence of xylan-binding domains in enzyme complexes. *Biochemical Journal*, 342(Pt 1), 105–110.
- Fraser-Reid, B. O., Tatsuta, K., & Thiem, J. (2012). *Glycoscience: Chemistry and chemical biology I–III*. Springer Science & Business Media.
- Fukushima, T., Kitajima, T., & Sekiguchi, J. (2005). A Polysaccharide Deacetylase Homologue, PdaA, in *Bacillus subtilis* Acts as an N-Acetylmuramic Acid Deacetylase In Vitro. *Journal of Bacteriology*, 187(4), 1287–1292.
- Fukushima, T., Yamamoto, H., Atrih, A., Foster, S. J., Sekiguchi, J., Court, F., ... Kingdom, U. (2002). A Polysaccharide Deacetylase Gene (pdaA) Is Required for Germination and for Production of Muramic Lactam Residues in the Spore Cortex of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 184(21), 6007–6015.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2005). Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. *The Proteomics Protocols Handbook*, 571–607.
- Ghormade, V., Kulkarni, S., Doiphode, N., Rajamohanam, P. R., & Deshpande, M. V. (2010). Chitin deacetylase: A comprehensive account on its role in nature and its biotechnological applications. In *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology* (pp. 1054–1066).
- Gilkes, N. R., Warren, R. A., Miller, R. C., & Kilburn, D. G. (1988). Precise excision of the cellulose binding domains from two *Cellulomonas fimi* cellulases by a homologous protease and the effect on catalysis. *Journal of Biological Chemistry*, 263(21), 10401–10407.
- Gilmore, M. E., Bandyopadhyay, D., Dean, A. M., Linnstaedt, S. D., & Popham, D. L. (2004). Production of Muramic -Lactam in *Bacillus subtilis* Spore Peptidoglycan. *Journal of Bacteriology*, 186(1), 80–89.
- Global Market Insights. (2016). *Chitosan Market Size By Application (Water Treatment, Biomedicine & Pharmaceuticals, Industrial, Food & Beverage, Cosmetics, Agrochemical), Industry Analysis Report, Regional Outlook (U.S., Canada, Germany, UK, France, Russia, Poland, China, India, Japan)*. Ocean View Delaware.
- Gohel, V., Vyas, P., Chhatpar, H. S., Zitouni, M., Fortin, M., Thibeault, J.-S., ... Borchert, H. H. (2006). Quantitative determination of chitosans by ninhydrin. *Carbohydrate Polymers*, 38(2), 255–257.
- Gupta, A., & Verma, J. P. (2015). Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 41, 550–567.

- Hadwiger, L. A. (2013). Plant science review: Multiple effects of chitosan on plant systems: Solid science or hype. *Plant Science*, 208, 42–49.
- Hahn, M., Pons, J., Planas, A., Querol, E., & Heinemann, U. (1995). Crystal structure of *Bacillus licheniformis*, 374, 221–224.
- Haki, G. (2003). Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource Technology*, 89(1), 17–34.
- Hamer, S. N., Cord-Landwehr, S., Biarnés, X., Planas, A., Waegeman, H., Moerschbacher, B. M., & Kolkenbrock, S. (2015). Enzymatic production of defined chitosan oligomers with a specific pattern of acetylation using a combination of chitin oligosaccharide deacetylases. *Scientific Reports*, 5, 8716.
- Hamer, S. N., Moerschbacher, B. M., & Kolkenbrock, S. (2014). Enzymatic sequencing of partially acetylated chitosan oligomers. *Carbohydrate Research*, 392, 16–20.
- Hanson, S., Best, M., Bryan, M. C., & Wong, C.-H. (2004). Chemoenzymatic synthesis of oligosaccharides and glycoproteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 29(12), 656–63.
- Härle, J., & Bechthold, A. (2009). Chapter 12 The Power of Glycosyltransferases to Generate Bioactive Natural Compounds. *Methods in Enzymology*, 458(A), 309–333.
- Hattori, T., Anraku, N., & Kato, R. (2010). electrophoresis of chitooligosaccharides in acidic solution: Simple determination using a quaternary-ammonium-modified column and indirect photometric detection. *Journal of Chromatography B*, 878, 477–480.
- Hayes, M. R., Bochinsky, K. A., Seibt, L. S., Elling, L., & Pietruszka, J. (2017). Development of a colourimetric assay for glycosynthases. *Journal of Biotechnology*.
- Hekmat, O., Tokuyasu, K., & Withers, S. G. (2003). Subsite structure of the endo-type chitin deacetylase from a deuteromycete, *Colletotrichum lindemuthianum*: an investigation using steady-state kinetic analysis and MS. *The Biochemical Journal*, 374(Pt 2), 369–80.
- Hernick, M., & Fierke, C. A. (2005). Zinc hydrolases: The mechanisms of zinc-dependent deacetylases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 433(1), 71–84.
- Hirai, A., Odani, H., & Nakajima, A. (1991). Determination of degree of deacetylation of chitosan by H NMR spectroscopy. *Polymer Bulletin*, 26(1), 87–94.
- Hirano, T., Kadokura, K., Ikegami, T., Shigeta, Y., Kumaki, Y., Hakamata, W., ... Nishio, T. (2009). Heterodisaccharide 4-O-(N-acetyl-B-D-glucosaminy)-D-glucosamine is a specific inducer of chitinolytic enzyme production in *Vibrios* harboring chitin oligosaccharide deacetylase genes. *Glycobiology*, 19(9), 1046–1053.
- Hirano, T., Sugiyama, K., Sakaki, Y., Hakamata, W., Park, S.-Y., & Nishio, T. (2015). Structure-based analysis of domain function of chitin oligosaccharide deacetylase from *Vibrio parahaemolyticus*. *FEBS Letters*, 589(1), 145–151.
- Honda, Y., & Kitaoka, M. (2006). The first glycosynthase derived from an inverting glycoside hydrolase. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(3), 1426–31.
- Hoppe-Seyler, F. (1894). Ueber chitin und cellulose. *European Journal of Inorganic Chemistry*,

- 27(3), 3329–3331.
- Horton, D., & Lineback, D. R. N. (1965). Deacetylation Chitosan from Chitin. In; Whistler RL, Wolfson ML. *Methods in Carbohydrate. Chemistry*. New York: Academic Press.
- Hosseinnejad, M., & Jafari, S. M. (2016). Evaluation of different factors affecting antimicrobial properties of chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 85, 467–475.
- Imagawa, T., Iino, H., Kanagawa, M., Ebihara, A., Kuramitsu, S., & Tsuge, H. (2008). Crystal structure of the YdjC-family protein TTHB029 from *Thermus thermophilus* HB8: Structural relationship with peptidoglycan N-acetylglucosamine deacetylase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 367(3), 535–541.
- Jeon, Y.-J., Shahidi, F., & Kim, S.-K. (2000). Preparation of Chitin and Chitosan oligomers and their applications in physiological functional foods. *Food Reviews International*, 16(2), 159–176.
- Jeon, Y. J., Park, P. J., & Kim, S. K. (2001). Antimicrobial effect of chitooligosaccharides produced by bioreactor. *Carbohydrate Polymers*, 44(1), 71–76.
- Jiang, X., Chen, L., & Zhong, W. (2003). A new linear potentiometric titration method for the determination of deacetylation degree of chitosan. *Carbohydrate Polymers*, 54(4), 457–463.
- Juncosa, M., Pons, J., Dot, T., Querol, E., & Planas, A. (1994). Identification of Active Site Carboxylic Residues in *Bacillus licheniformis* 1,3-1,4-B-D-Glucan 4-glucanohydrolase by Site-directed Mutagenesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 269, 14530–14535.
- Jung, W.-J., & Park, R.-D. (2014). Bioproduction of chitooligosaccharides: present and perspectives. *Marine Drugs*, 12(11), 5328–5356.
- Kadokura, K., Rokutani, a, Yamamoto, M., Ikegami, T., Sugita, H., Itoi, S., ... Nishio, T. (2007). Purification and characterization of *Vibrio parahaemolyticus* extracellular chitinase and chitin oligosaccharide deacetylase involved in the production of heterodisaccharide from chitin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75(2), 357–65.
- Kadokura, K., Sakamoto, Y., Saito, K., Ikegami, T., Hirano, T., Hakamata, W., ... Nishio, T. (2007). Production of a recombinant chitin oligosaccharide deacetylase from *Vibrio parahaemolyticus* in the culture medium of *Escherichia coli* cells. *Biotechnology Letters*, 29(8), 1209–15.
- Kafetzopoulos, D., Thireos, G., Vournakis, J. N., & Bouriotis, V. (1993). The primary structure of a fungal chitin deacetylase reveals the function for two bacterial gene products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(17), 8005–8.
- Kapust, R. B., & Waugh, D. S. (1999). *Escherichia coli* maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein Science*, 8(8), 1668–1674.
- Karrer, P., & Hofmann, A. (1929). Über den enzymatischen Abbau von Chitin und Chitosan I. *Helvetica Chimica Acta*, 12(1), 616–637.
- Kashyap, S. R., & Garg, N. (2014). Isolation , Production , Quantitative assay and Optimization of Chitin deacetylase from Yeast, 2(1), 43–47.

- Katiyar, D., Hemantaranjan, A., Singh, B., & Bhanu, A. N. (2014). A Future Perspective in Crop Protection : Chitosan and its Oligosaccharides. *Adv Plants Agric Res*, 1(1), 4–11.
- Kaur, J., & Sharma, R. (2006). Directed Evolution : An Approach to Engineer Enzymes. *Critical Reviews in Biotechnology*, 26, 165–199.
- Kauss, H., & Bauch, B. (1988). Chitin deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum*. *Methods in Enzymology*, 161(C), 518–523.
- Kendra, D. F., & Hadwiger, L. A. (1984). Characterization of the smallest chitosan oligomer that is maximally antifungal to *Fusarium solani* and elicits pisatin formation in *Pisum sativum*. *Experimental Mycology*, 8(3), 276–281.
- Keyhani, N. O., & Roseman, S. (1999). Physiological aspects of chitin catabolism in marine bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1473(1), 108–122.
- Kirk, O., Borchert, T. V., & Fuglsang, C. C. (2002). Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(4), 345–351.
- Kobayashi, K., Sudiarta, I. P., Kodama, T., Fukushima, T., Ara, K., Ozaki, K., & Sekiguchi, J. (2012). Identification and characterization of a novel polysaccharide deacetylase C (PdaC) from *Bacillus subtilis*. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(13), 9765–76.
- Koch, R. (1884). An address on cholera and its bacillus. *British Medical Journal*, 2(1236), 453.
- Kondo, Y., Nakatani, A., Hayashi, K., & Ito, M. (1996). Low molecular weight chitsan prevents the progression of low dose streptozotocin-induced slowly progressive diabetes mellitus in mice. *J. Vet. Med. Science*, 58(5), 481–484.
- Koshland, D. E. (1953). Stereochemistry and the Mechanism of Enzymatic Reactions. *Biol. Rev.*, 28(February), 416–436.
- Kreger, D. R. (1954). Observations on cell walls of yeasts and some other fungi by x-ray diffraction and solubility tests. *Biochimica et Biophysica Acta*, 13(1), 1–9.
- Kühne, W. (1976). Ueber das Verhalten Verschiedener organisirter und sog. ungeformter Fermente. *FEBS Letters*, 62(February), E4–E7.
- Kulikov, S. N., Chirkov, S. N., Il'ina, A. V., Lopatin, S. A., & Varlamov, V. P. (2006). Effect of the molecular weight of chitosan on its antiviral activity in plants. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 42(2), 200–203.
- Kumar, M. (2000). A review of chitin and chitosan applications. *Reactive & Functional Polymers*, 46(1), 1–27.
- Kumar Dutta, P., Dutta, J., & Tripathi, V. S. (2004). Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 63(January), 20–31.
- Kurita, K. (2001). Controlled functionalization of the polysaccharide chitin. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 26(9), 1921–1971.
- Kurita, K., Tomita, K., Ishii, S., Nishimura, S. -, & Shimoda, K. (1993). β -chitin as a convenient starting material for acetolysis for efficient preparation of N-acetylchitooligosaccharides.

- Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 31(9), 2393–2395.
- Kyte, J., & Doolittle, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *Journal of Molecular Biology*, 157(1), 105–132.
- Lamarck, J.-B.-P. (1809). *Philosophie zoologique*.
- Lamed, R., & Bayer, E. A. (1988). Cellulosomes from *Clostridium thermocellum*. *Methods in Enzymology*, 160(C), 472–482.
- Leane, M. M., Nankervis, R., Smith, A., & Illum, L. (2004). Use of the ninhydrin assay to measure the release of chitosan from oral solid dosage forms. *International Journal of Pharmaceutics*, 271(1–2), 241–249.
- Lee, H.-W., Park, Y.-S., Choi, J.-W., Yi, S., & Shin, W.-S. (2003). Antidiabetic effects of chitosan oligosaccharides in neonatal streptozotocin-induced noninsulin-dependent diabetes mellitus in rats. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 26(8), 1100–1103.
- Lee, J., Shin, M. K., Ryu, D. K., Kim, S., & Ryu, W. S. (2010). Insertion and deletion mutagenesis by overlap extension PCR. In J. Braman (Ed.), *Methods in Molecular Biology* (Vol. 634, pp. 137–146). Totowa, NJ: Humana Press.
- Li, X., & Roseman, S. (2004). The chitinolytic cascade in *Vibrios* is regulated by chitin oligosaccharides and a two-component chitin catabolic sensor/kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(2), 627–631.
- Li, X., Wang, L.-X., Wang, X., & Roseman, S. (2007). The chitin catabolic cascade in the marine bacterium *Vibrio cholerae*: characterization of a unique chitin oligosaccharide deacetylase. *Glycobiology*, 17(12), 1377–87.
- Liu, A., Song, W., Cao, D., Liu, X., & Jia, Y. (2008). Growth inhibition and apoptosis of human leukemia K562 cells induced by seleno-short-chain chitosan. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 30(3), 181–186.
- Liu, J., Jia, Z., Li, S., Li, Y., You, Q., Zhang, C., ... Yang, J. (2016). Identification and characterization of a chitin deacetylase from a metagenomic library of deep-sea sediments of the Arctic Ocean. *Gene*, 590(1), 79–84.
- Liu, T., Liu, Z., Song, C., Hu, Y., Han, Z., She, J., ... Chai, J. (2012). Chitin-Induced Dimerization Activates a Plant Immune Receptor. *Science*, 336(6085), 1160–1164.
- Lo, M. C., Aulabaugh, A., Jin, G., Cowling, R., Bard, J., Malamas, M., & Ellestad, G. (2004). Evaluation of fluorescence-based thermal shift assays for hit identification in drug discovery. *Analytical Biochemistry*, 332(1), 153–159.
- Lodhi, G., Kim, Y.-S., Hwang, J.-W., Kim, S.-K., Jeon, Y.-J., Je, J.-Y., ... Park, P.-J. (2014). Chitoooligosaccharide and Its Derivatives: Preparation and Biological Applications. *BioMed Research International*, *BioMed Research International*, 2014, 2014, e654913.
- Lombard, V., Bernard, T., Rancurel, C., Brumer, H., Coutinho, P. M., & Henrissat, B. (2010). A hierarchical classification of polysaccharide lyases for glycogenomics. *Biochem J*, 432(3), 437–444.

- 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), 490–495.
- Lopez-Llorca, L. V., Olivares-Bernabeu, C., Salinas, J., Jansson, H.-B., & Kolattukudy, P. E. (2002). Pre-penetration events in fungal parasitism of nematode eggs. *Mycological Research*, 106(4), 499–506.
- Luzhetskyy, A., Méndez, C., Salas, J. A., & Bechthold, A. (2008). Glycosyltransferases, important tools for drug design. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 8(8), 680–709.
- Mackenzie, L., Wang, Q., Warren, R. A. J., & Withers, S. G. (1998). Glycosynthases: mutant glycosidases for oligosaccharide synthesis. *Journal of the American ...*, 120(22), 5583–5584.
- MacLaughlin, F. C., Mumper, R. J., Wang, J., Tagliaferri, J. M., Gill, I., Hinchcliffe, M., & Rolland, A. P. (1998). Chitosan and depolymerized chitosan oligomers as condensing carriers for in vivo plasmid delivery. *Journal of Controlled Release*, 56(1–3), 259–272.
- Madhavan, P., & Nair, G. R. (1962). Utilization of prawn waste - Isolation of chitin and its conversion to chitosan. *Fishery Technology*, 11(1), 50–53.
- Malet, C., & Planas, A. (1998). From beta-glucanase to beta-glucansynthase: glycosyl transfer to alpha-glycosyl fluorides catalyzed by a mutant endoglucanase lacking its catalytic nucleophile. *FEBS Letters*, 440, 208–12.
- Mansouri, S., Lavigne, P., Corsi, K., Benderdour, M., Beaumont, E., & Fernandes, J. C. (2004). Chitosan-DNA nanoparticles as non-viral vectors in gene therapy: Strategies to improve transfection efficacy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 57(1), 1–8.
- Meibom, K. L., Li, X. B., Nielsen, A. T., Wu, C.-Y., Roseman, S., & Schoolnik, G. K. (2004). The *Vibrio cholerae* chitin utilization program. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(8), 2524–9.
- Mondal, M. M. A. ., Malek, M. A. ., Puteh, A. B. ., Ismail, M. R. ., Ashrafuzzaman, M. ., & Naher, L. (2012). Effect of foliar application of chitosan on growth and yield in okra - Tags: FOLIAR feeding CHITOSAN. *Australian Journal of Crop Science*, 6(5), 918.
- Morley, K. L., & Kazlauskas, R. J. (2005). Improving enzyme properties: when are closer mutations better? *Trends in Biotechnology*, 23(5), 231–7.
- Muanprasat, C., & Chatsudthipong, V. (2016). Chitosan oligosaccharide: Biological activities and potential therapeutic applications. *Pharmacology & Therapeutics*.
- Muraki, E., Yaku, F., & Kojima, H. (1993). Preparation and crystallization of D-glucosamine oligosaccharides with dp 6-8. *Carbohydrate Research*, 239, 227–237.
- Nakamura, A. M., Nascimento, A. S., & Polikarpov, I. (2017). Structural diversity of carbohydrate esterases. *Biotechnology Research and Innovation*, 1–17.
- Naqvi, S., & Moerschbacher, B. M. (2015). Bacterial cell factory approach towards the production of chitosan oligomers and their high value derivatives: an update. *Critical Reviews in Biotechnology*, 8551(November).

- Nelson, D. L., Lehninger, A. L., & Cox, M. M. (2008). *Lehninger principles of biochemistry*. Macmillan.
- Nge, K. L., Nwe, N., Chandkrachang, S., & Stevens, W. F. (2006). Chitosan as a growth stimulator in orchid tissue culture. *Plant Science*, 170(6), 1185–1190.
- Niesen, F. H., Berglund, H., & Vedadi, M. (2007). The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. *Nature Protocols*, 2(9), 2212–21.
- No, H. K., Lee, K. S., & Meyers, S. P. (2000). Correlation Between Physicochemical Characteristics and Binding Capacities of Chitosan Products. *Journal of Food Science*, 65(7), 1134–1137.
- No, H. K., & Meyers, S. P. (1997). Preparation of chitin and chitosan. *Chitin Handbook*, 1, 475–489.
- Nov, Y. (2012). When second best is good enough: another probabilistic look at saturation mutagenesis. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(1), 258–62.
- Ogawa, K., Sonoyama, T., Takeda, T., Ichiki, S. I., Nakamura, S., Kobayashi, Y., ... Sambongi, Y. (2007). Roles of a short connecting disulfide bond in the stability and function of psychrophilic *Shewanella violacea* cytochrome c5. *Extremophiles*, 11(6), 797–807.
- Ohishi, K., Murase, K., Ohta, T., & Etoh, H. (2000). Cloning and sequencing of the deacetylase gene from *Vibrio alginolyticus* H-8. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 90(5), 561–3.
- Ohishi, K., Yamagishi, M., Ohta, T., Motosugi, M., Izumida, H., Sano, H., ... Miwa, T. (1997). Purification and Properties of Two Deacetylases Produced by *Vibrio alginolyticus* H-8. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 61(7), 1113–1117.
- Ohnuma, T., Fukuda, T., Dozen, S., Honda, Y., Kitaoka, M., & Fukamizo, T. (2012). A glycosynthase derived from an inverting GH19 chitinase from the moss *Bryum coronatum*. *Biochemical*.
- Ostermeier, C., Harrenga, A., Ermler, U., & Michel, H. (1997). Structure at 2.7 Å resolution of the *Paracoccus denitrificans* two-subunit cytochrome c oxidase complexed with an antibody FV fragment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(20), 10547–10553.
- Pacheco, N., Trombotto, S., David, L., & Shirai, K. (2013). Activity of chitin deacetylase from *Colletotrichum gloeosporioides* on chitinous substrates. *Carbohydrate Polymers*, 96(1), 227–232.
- Pantaleone, D., Yalpani, M., & Scollar, M. (1992). Susceptibility of Chitosan to Enzymatic Hydrolysis. *Advances in Chitin and Chitosan*, 237, 292–303.
- Pantoliano, M. W., Petrella, E. C., Kwasnoski, J. D., Lobanov, V. S., Myslik, J., Graf, E., ... Lane, P. (2001). High-density miniaturized thermal shift assays as a general strategy for drug discovery. *Journal of Biomolecular Screening*, 6(6), 429–440.
- Park, J. K., Chung, M. J., Choi, H. N., & Park, Y. II. (2011). Effects of the molecular weight and the degree of deacetylation of chitosan oligosaccharides on antitumor activity. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(1), 266–277.
- Patrulea, V., Ostafe, V., Borchard, G., & Jordan, O. (2015). Chitosan as a starting material for wound healing applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 97, 417–426.

- Payen, A. (1838). Mémoire sur la composition du tissu propre des plantes et du ligneux. *Comptes Rendus*, 7, 1052–1056.
- Pérez, X., Faijes, M., & Planas, A. (2011). Artificial mixed-linked β -glucans produced by glycosynthase-catalyzed polymerization: tuning morphology and degree of polymerization. *Biomacromolecules*, 12(2), 494–501.
- Perugino, G., Trincone, A., Rossi, M., & Moracci, M. (2004). Oligosaccharide synthesis by glycosynthases. *Trends in Biotechnology*, 22(1), 31–37.
- Pestov, A., & Bratskaya, S. (2016). Chitosan and Its Derivatives as Highly Efficient Polymer Ligands. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 21(3), 330.
- Philibert, T., Lee, B. H., & Fabien, N. (2016). Current Status and New Perspectives on Chitin and Chitosan as Functional Biopolymers. *Applied Biochemistry and Biotechnology*.
- Planas, A. (2000). Bacterial 1,3-1,4- β -glucanases: structure, function and protein engineering. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1543(2), 361–382.
- Planas, A., Faijes, M., & Codera, V. (2015). When Enzymes Do It Better: Enzymatic Glycosylation Methods. *Carbohydrate Chemistry: State of the Art and Challenges for Drug Development: An Overview on Structure, Biological Roles, Synthetic Methods and Application as Therapeutics*, 215.
- Pokala, N., & Handel, T. M. (2001). Review: Protein Design—Where We Were, Where We Are, Where We're Going. *Journal of Structural Biology*, 134(2–3), 269–281.
- Pokhis, K., Bitterlich, N., Cornelli, U., & Cassano, G. (2015). Efficacy of polyglucosamine for weight loss—confirmed in a randomized double-blind, placebo-controlled clinical investigation. *BMC Obesity*, 2(1), 25.
- Polaina, J., & MacCabe, A. P. (2007). *Industrial enzymes*. Springer.
- Psylinakis, E., Boneca, I. G., Mavromatis, K., Deli, A., Hayhurst, E., Foster, S. J., ... Bouriotis, V. (2005). Peptidoglycan N-acetylglucosamine deacetylases from *Bacillus cereus*, highly conserved proteins in *Bacillus anthracis*. *Journal of Biological Chemistry*, 280(35), 30856–30863.
- Rattray, A. J., & Strathern, J. N. (2003). Error-prone DNA polymerases: when making a mistake is the only way to get ahead. *Annual Review of Genetics*, 37, 31–66.
- Reetz, M. T., Kahakeaw, D., & Lohmer, R. (2008). Addressing the numbers problem in directed evolution. *Chembiochem : A European Journal of Chemical Biology*, 9(11), 1797–804.
- Reidl, J., & Klose, K. E. (2002). *Vibrio cholerae* and cholera: out of the water and into the host. *Microbiology Reviews*, 26, 125–139.
- Riener, C. K., Kada, G., & Gruber, H. J. (2002). Quick measurement of protein sulfhydryls with Ellman's reagent, 266–276.
- Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 31(7), 603–632.

- Roberts, G. a F. (2008). Thirty Years of Progress in Chitin and Chitosan, *XIII*, 7–15.
- Roche, P., Maillet, F., Plazanet, C., Debelle, F., Ferro, M., Truchet, G., ... Dénarié, J. (1996). The common nodABC genes of *Rhizobium meliloti* are host-range determinants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *93*(26), 15305–15310.
- Romero, P. A., Tran, T. M., & Abate, A. R. (2015). Dissecting enzyme function with microfluidic-based deep mutational scanning. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(23), 7159–7164.
- Rouget, C. (1859). Des substances amyliacées dans les tissus des animaux, spécialement des Articulés (chitine). *Compt Rend*, *48*, 792.
- Rubingh, D. N. (1997). Protein engineering from a bioindustrial point of view [review]. *Current Opinion in Biotechnology*, *8*(4), 417–422.
- Rubingh, D. N., & Grayling, R. A. (2010). Protein Engineering. In *Biotechnology* (Vol. III). Encyclopedia of Life Support Systems.
- Sánchez-Vallet, A., Mesters, J. R., & Thomma, B. P. H. J. (2015). The battle for chitin recognition in plant-microbe interactions. *FEMS Microbiology Reviews*, *39*(2), 171–183.
- Sannan, T., Kurita, K., Ogura, K., & Iwakura, Y. (1978). Studies on chitin: 7. I.r. spectroscopic determination of degree of deacetylation. *Polymer*, *19*(4), 458–459.
- Schmidt-Dannert, C., & Arnold, F. H. (1999). Directed evolution of industrial enzymes. *Trends in Biotechnology*, *17*(4), 135–136.
- Schmidt, T. G. M., & Skerra, A. (2007). The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. *Nature Protocols*, *2*(6), 1528–35.
- Semisotnov, G. V., Rodionova, N. A., Razgulyaev, O. I., Uversky, V. N., Gripas', A. F., & Gilmanshin, R. I. (1991). Study of the molten globule intermediate state in protein folding by a hydrophobic fluorescent probe. *Biopolymers*, *31*(1), 119–128.
- Shaikh, F. A., & Withers, S. G. (2008). Teaching old enzymes new tricks: engineering and evolution of glycosidases and glycosyl transferases for improved glycoside synthesis. *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie et Biologie Cellulaire*, *86*(2), 169–77.
- Shao, W., & Wiegel, J. (1995). Purification and characterization of two thermostable acetyl xylan esterases from *Thermoanaerobacterium* sp. strain JW/SL-YS485. *Applied and Environmental Microbiology*, *61*(2), 729–733.
- Shen, K.-T., Chen, M.-H., Chan, H.-Y., Jeng, J.-H., & Wang, Y.-J. (2009). Inhibitory effects of chitoooligosaccharides on tumor growth and metastasis. *Food and Chemical Toxicology*, *47*(8), 1864–1871.
- Shoseyov, O., Shani, Z., & Levy, I. (2006). Carbohydrate Binding Modules: Biochemical Properties and Novel Applications. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *70*(2), 283–295.
- Skerra, A., & Schmidt, T. G. M. (2000). Use of the Strep-Tag and streptavidin for detection and purification of recombinant proteins. *Methods in Enzymology*, *326*(FEBRUARY 2000), 271–304.

- Skjak-Braek, G., Anthonsen, T., & Sandford, P. (1989). *Chitin and Chitosan: Sources, Chemistry, Biochemistry, Physical Properties and Applications: Proceedings from the 4th International Conference on Chitin and Chitosan Held in Trondheim, Norway, August 22-24 1988*. Elsevier applied science.
- Slater, J. C. (1964). Atomic Radii in Crystals. *The Journal of Chemical Physics*, 41(10), 3199–3204.
- Souza, J. M., Plumbridge, J. a, & Calcagno, M. L. (1997). N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase from *Escherichia coli*: purification and molecular and kinetic characterization. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 340(2), 338–46.
- Spaink, H. P., Wijfjes, A. H. M., van der Drift, K. M. G. M., Haverkamp, J., Thomas-Oates, J. E., & Lugtenberg, B. J. J. (1994). Structural identification of metabolites produced by the NodB and NodC proteins of *Rhizobium leguminosarum*. *Molecular Microbiology*, 13(5), 821–831.
- Stockinger, L. W., Eide, K. B., Dybvik, A. I., Sletta, H., Varum, K. M., Eijsink, V. G. H., ... Sorlie, M. (2015). The effect of the carbohydrate binding module on substrate degradation by the human chitotriosidase. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1854(10), 1494–1501.
- Studier, F. W. (2005). Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Expression and Purification*, 41(1), 207–234.
- Sumner, J. B. (1926). Enzyme Urease. *J. Biol. Chem.*, 69, 435–441.
- Tan, S. C., Khor, E., Tan, T. K., & Wong, S. M. (1998). The degree of deacetylation of chitosan: Advocating the first derivative UV-spectrophotometry method of determination. *Talanta*, 45(4), 713–719.
- Tang, M.-C., Nisole, A., Dupont, C., Pelletier, J. N., & Waldron, K. C. (2011). Chemical profiling of the deacetylase activity of acetyl xylan esterase A (AxeA) variants on chitooligosaccharides using hydrophilic interaction chromatography-mass spectrometry. *Journal of Biotechnology*, 155(2), 257–65.
- Tao, H., & Cornish, V. W. (2002). Milestones in directed enzyme evolution. *Current Opinion in Chemical Biology*, 6(6), 858–64.
- Tegl, G., ??hlknecht, C., Vielnascher, R., Rollett, A., Hofinger-Horvath, A., Kosma, P., & Guebitz, G. M. (2016). Cellobiohydrolases Produce Different Oligosaccharides from Chitosan. *Biomacromolecules*, 17(6), 2284–2292.
- Tokuyasu, K., Mitsutomi, M., Yamaguchi, I., Hayashi, K., & Mori, Y. (2000). Recognition of chitooligosaccharides and their N-acetyl groups by putative subsites of chitin deacetylase from a deuteromycete, *Colletotrichum lindemuthianum*. *Biochemistry*, 39, 8837–43.
- Tokuyasu, K., Ohnishi-Kameyama, M., & Hayashi, K. (1996). Purification and characterization of extracellular chitin deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 60(10), 1598–1603.
- Trivedi, V. R., Satia, M. C., Deschamps, A., Maquet, V., Shah, R. B., Zinzuwadia, P. H., & Trivedi, J. V. (2016). Single-blind, placebo controlled randomised clinical study of chitosan for body weight reduction. *Nutrition Journal*, 15(1), 3.

- Trueblood, K. N., Bürgi, H. B., Burzlaff, H., Dunitz, J. D., Gramaccioli, C. M., Schulz, H. H., ... Abrahams, S. C. (1996). Report of a Subcommittee on Atomic Displacement Parameter Nomenclature. *Acta Crystallographica*, (January 1995), 770–781.
- Tsigos, I., & Bouriotis, V. (1995). Purification and Characterization of Chitin Deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum*. *Journal of Biological Chemistry*, 270(44), 26286–26291.
- Tsigos, I., Zydowicz, N., Martinou, A., Domard, A., & Bouriotis, V. (1999). Mode of action of chitin deacetylase from *Mucor rouxii* on N-acetylchitooligosaccharides. *European Journal of Biochemistry*, 261(3), 698–705.
- Ueno, H. (2001). Topical formulations and wound healing applications of chitosan 2 . Topical findings of healing with chitosan at early phase of experimental open skin wound, 52, 105–115.
- Ueno, H., Yamada, H., Tanaka, I., Kaba, N., Matsuura, M., Okumura, M., ... Fujinaga, T. (1999). Accelerating effects of chitosan for healing at early phase of experimental open wound in dogs. *Biomaterials*, 20(15), 1407–1414.
- Van Tilbeurgh, H., Tomme, P., Claeysens, M., Bhikhabhai, R., & Pettersson, G. (1986). Limited proteolysis of the cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. Separation of functional domains. *FEBS Letters*, 204(2), 223–227.
- Varki, A., & Sharon, N. (2009). *Essentials of Glycobiology*. (A. Varki, R. Cummings, J. Esko, H. Freeze, P. Stanley, C. R. Bertozzi, ... M. E. Etzler, Eds.) (2nd ed.). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Wang, L.-X., & Huang, W. (2009). Enzymatic transglycosylation for glycoconjugate synthesis. *Current Opinion in Chemical Biology*, 13(5–6), 592–600.
- Wang, Y., Song, J.-Z., Yang, Q., Liu, Z.-H., Huang, X.-M., & Chen, Y. (2010). Cloning of a heat-stable chitin deacetylase gene from *Aspergillus nidulans* and its functional expression in *Escherichia coli*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162(3), 843–854.
- Xia, W., Liu, P., Zhang, J., & Chen, J. (2011). Biological activities of chitosan and chitooligosaccharides. *Food Hydrocolloids*, 25(2), 170–179.
- Yoon, H. J., Moon, M. E., Park, H. S., Im, S. Y., & Kim, Y. H. (2007). Chitosan oligosaccharide (COS) inhibits LPS-induced inflammatory effects in RAW 264.7 macrophage cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 358(3), 954–959.
- Yousef, M., Pichyangkura, R., Soodvilai, S., Chatsudthipong, V., & Muanprasat, C. (2012). Chitosan oligosaccharide as potential therapy of inflammatory bowel disease: Therapeutic efficacy and possible mechanisms of action. *Pharmacological Research*, 66(1), 66–79.
- Zare, R., & Gams, W. (2001). A revision of *Verticillium* section *Prostrata*. VI. The genus *Pochonia*, with notes on *Rotiferophthora*. *Nova Hedwigia*, 73(3–4), 271–292.
- Zechel, D. L., & Withers, S. G. (2000). Glycosidase mechanisms: anatomy of a finely tuned catalyst. *Accounts of Chemical Research*, 33(1), 11–8.
- Zhang, P., Liu, W., Peng, Y., Han, B., & Yang, Y. (2014). Toll like receptor 4 (TLR4) mediates the stimulating activities of chitosan oligosaccharide on macrophages. *International*

Immunopharmacology, 23(1), 254–261.

Zhao, Y., Park, R.-D., & Muzzarelli, R. a a. (2010). Chitin deacetylases: properties and applications. *Marine Drugs*, 8(1), 24–46.

Zheng, L., Baumann, U., & Reymond, J.-L. (2004). An efficient one-step site-directed and site-saturation mutagenesis protocol. *Nucleic Acids Research*, 32(14), e115.

Zikakis, J. (2012). *Chitin, chitosan, and related enzymes*. Elsevier.

Zobell, C., & Rittenberg, S. (1937). The occurrence and characteristics of chitinoclastic bacteria in the sea. *Journal of Bacteriology*, 35(5), 275–287.

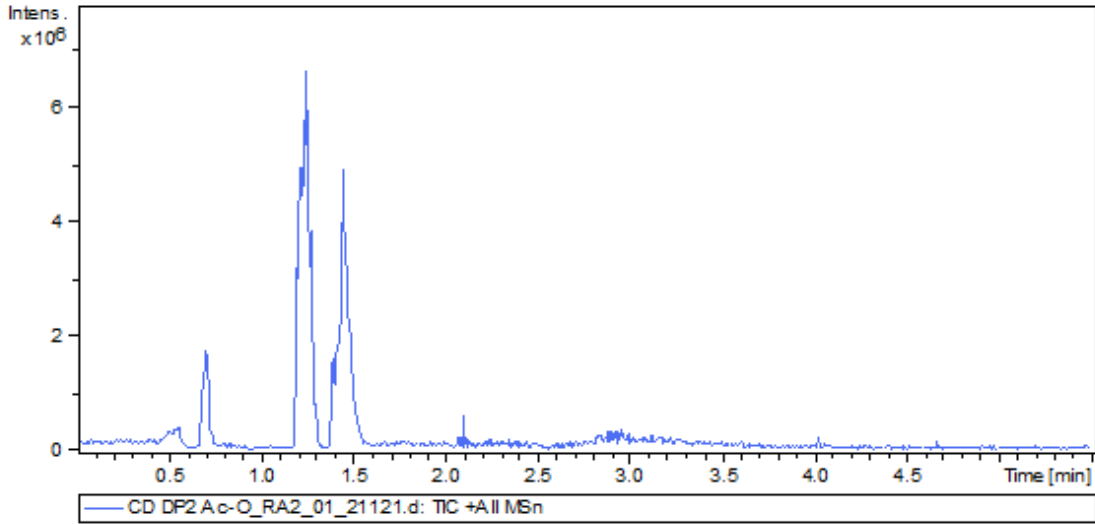
Anexos

15. Anexos

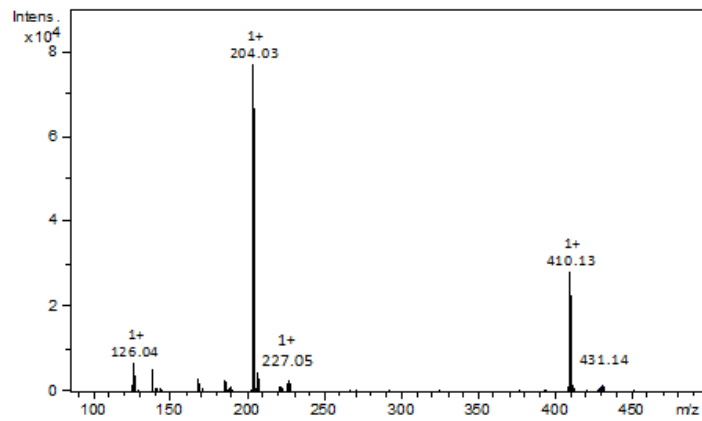
15.1. Secuenciación del patrón de desacetilación de VcCDA CD

Obtención del PA en DP2

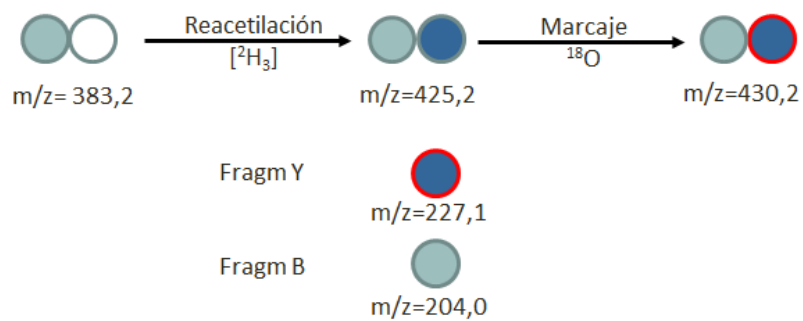
Cromatograma total MS¹



Espectro de fragmentación MS²

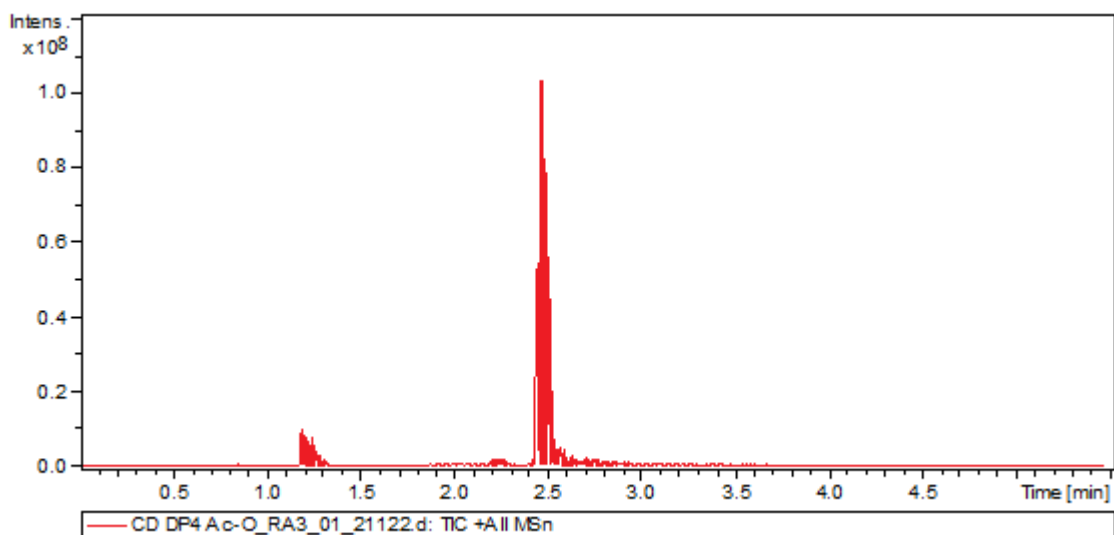


Esquema de secuenciación

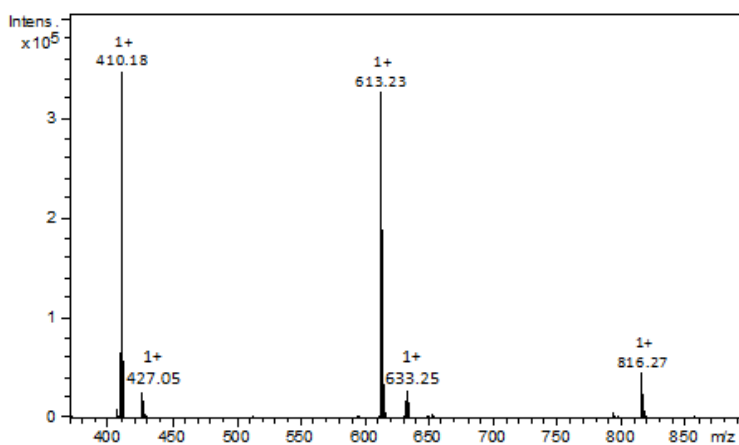


Obtención del PA en DP4

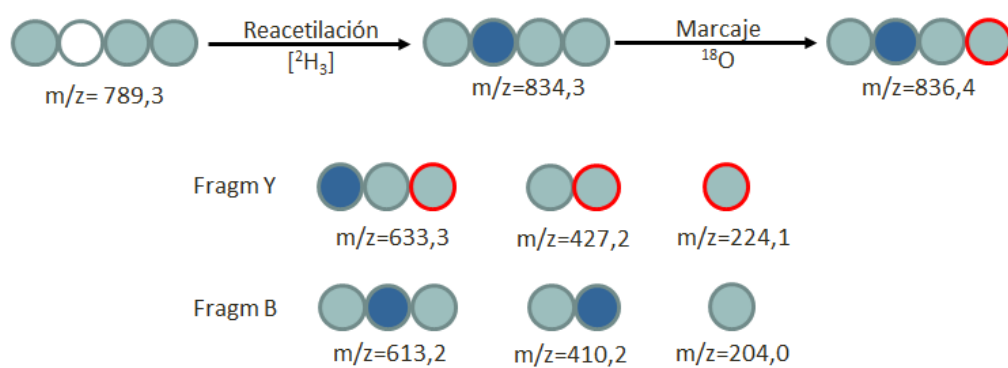
Cromatograma total MS¹



Espectro de fragmentación MS²

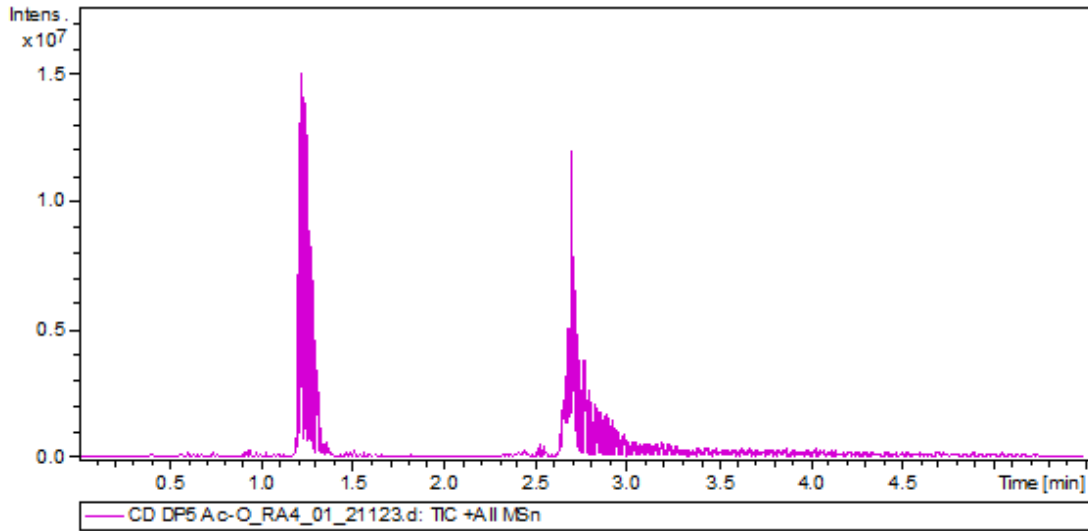


Esquema de secuenciación

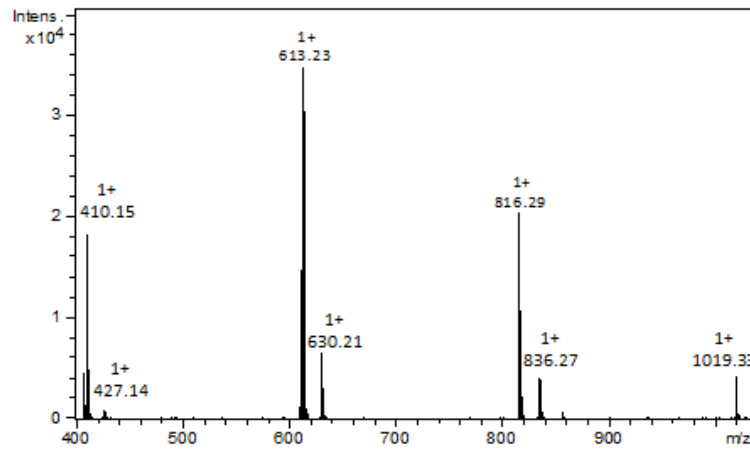


Obtención del PA en DP5

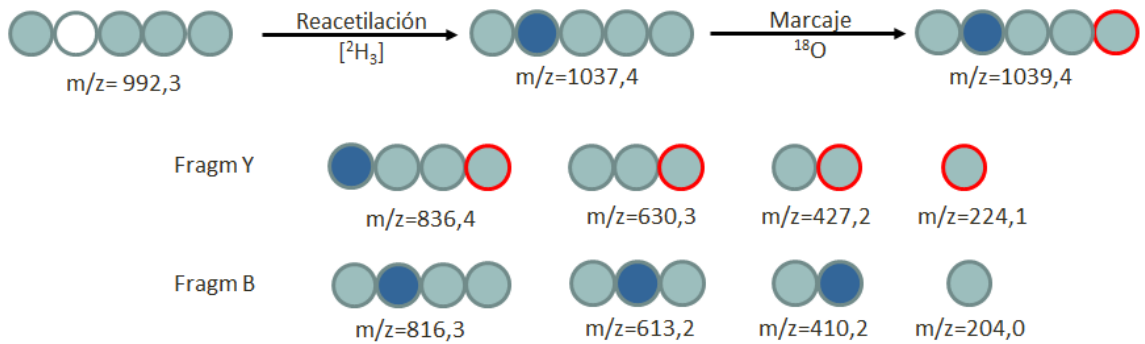
Cromatograma total MS¹



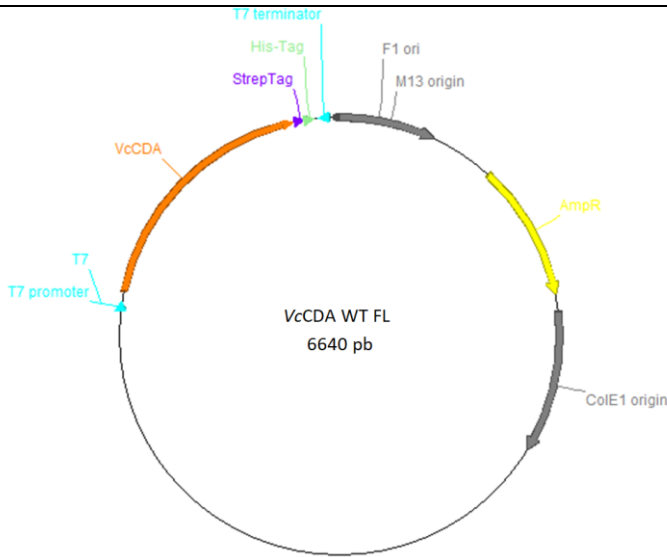
Espectro de fragmentación MS²



Esquema de secuenciación



15.2. Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de los constructos desarrollados de VcCDA

Proteína	VcCDA FL WT
Plásmido	pET22b(+)
Mapa de plásmido	
Secuencia Gen	<p> taatacgactcactataggggaattgtgagcggataacaattcccctctagaaataatTTTgTTTaaacttaagaaggagat atacatatgaacagcagccgaaaggcacgatctatctgacgtttgatgatggcccgtgaacgcctcggtggaagtgatt aaagtcctgaaccaggcggtgttaaagccacctttattcaacgcatggcatctggatggcattggtgacgaaaatgaa gatcgtgactggaagcctgaaactggcactggacagtggccatattgtgggtaaccactcctacgatcacatgatccac aattgctgtaagaatttggcccaccagcggtgaggattgtaacgccacgggtaatcatcagatccactcataccaagac ccggtgctgtagcggcctcgttcaacagaacctgattaccctggaaaaatctgccgacgatccgcagctatccgaac tacaaggctatgaactggcgcctgctgccgtacaccaatggttggcgcgtcacgaaacatttcaggcagacggcctgtgc gtacctcagataatctgaaacctgggaaccgggttatgtgtgtagcggctaaccctgcaaattcggtgaaagcgtcg attcaggttcaaacatcctggccaatcagggtaccaaaccacgggtgggatgttactgggctccggaaaactgggg cattccgatccggcgaatagcctgaccgaagcggtcccgtttctggcctatgtggacaaagcactgaacagctgctctcc gaccagattgaaccgatcaattctaaaaccaggaattcccgtgtgttacccgctgcatcgcgataaagtcatcgtgct gaccacgacttctgttcaagatggcaaacctggcatgggtccacgcaaaacctgcccgaactggcagaatttattcg catcgcaagaagccggttacgtgttcgataaccatggacaattatacggcgttggagtgtgggcaaaacctaccagg ccggtgaatacgttctgatcaaggcgtggttataaagcagtcatttcccacacggctcagcaagactggcgccgagca gcaccagttccctgtggacgaacgcagatccggctaccaactggacgctgaatgttagctatgaacaggcgatcgtc aattacaaaggtaaacgctatctggttctgtcccgatgttccgagcaagactggacgcccggaccccaaaataccctg ttaccgcactggagctcctcgacaaggtcacatcctcaattgaaaaataggcttgcggccgactcagcaccacca ccaccactgagatccggctctaacaaagccgaaaggaagctgagttggctgctgccacgcctgagcaataactag c </p>
Secuencia Proteína	<p> MNSTPKGTIYLTFFDDGPNVASVEVIKVLNQGQVVKATFYFNAWHLDDGIDENEDRALEALKLALD SGHIVGNHNSYDHMIHNCVEEFGPTSGADCNATGNHQIHSYQDPVRDAASFEQNLITLEKYLPTIR SYPNYKGYELARLPYTNWRVTKHFQADGLCATSDNLKPWEPGYVCDPANPSNSVKASIQVQNI LANQGYQTHGWDVDWAPENWGIWMPANSLTEAVPFLAYVDKALNSCSPTTIEPINSKTQEFPC GTPLHADKVIVLTHDFLFEDGKRGMGATQNLPKLAEFIRIAKEAGYVFDTMDNYTPRWSVGKTY QAGEYVLYQGVVYKAVISHTAQDQWAPSSTSSLWTNADPATNWTLNVSYEQGDIVNYKGRYL VSVPHVSQQDWTPDTQNTLFTALELRRQWSHPQFEK* </p>
Leyenda	<p> Subrayado: Secuencia de la VcCDA WT FL Codón Start Codón Stop Strep-Tag II T7 Promotor T7 Terminator </p>
Proteína	VcCDA FL D39S
Plásmido	pET22b(+)

<p>Mapa de plásmido</p>	
<p>Secuencia Gen</p>	<pre> taatacgaactcactataggggaattgtgagcggataacaattcccctctagaataatTTTgttaactttaagaaggagat atacatatgaacagcacgcccgaaggcagcatctatctgacgtttAGCgatggcccggatgaacgcctcggatggaagtga ttaaagtcctgaaccagggcggtgttaaagccacctttatttcaacgcatggcatctggatggcattgggtgacgaaaatg aagatcgtgactggaagctctgaaactggcactggacagtgccatatttgggtaaccactcctacgatcacaatgatcc acaattgcttgaagaatttggcccaccagcgggtgaggattgtaacgccagggtaatcatcagatccactcataccaag acccggtgctgatgaggcctgttcgaacagaacctgattaccctggaaaaatatctgccgacgatccgacgatccga actacaaaggctatgaactggcgcgtctgacctacaccaatggttggcgcgtcacgaaacatttccaggcagacggcctgt gagctacctaagataatctgaaaccgtgggaaccgggttatgtgtgatccggctaaccctcaaattcgggtgaaagcgt cgattcaggttcaaaacatcctggcaatcagggtaccaaaccacgggtgggagttgactgggctcgggaaaactgg ggcattccgatgccggcgaatagcctgaccgaagcgggtcccgtttctggcctatgtggacaaagcactgaaacagctgctc cggaccacgatgaaccgatcaattctaaaaccagggaattcccgtgtggtacgcccgtgcatgcccgataaagtcacgtg ctgaccacgactttctgttcgaagatggcaaacgtggcagtggtgcccagcaaacctgccgaaaactggcagaatttatt cgatcgcgaaagaagccggttacgtgttcgataccatggacaattatacgcgcttggagtggtggcaaacctacca ggccgggtgaatacgttctgtatcaaggcgtggttataaagcagtcattcccacacggctcagcaagactggcggccgag cagcaccagttccctgtggacgaacgcagatccggctaccaactggacgctgaatgttagctatgaacagggcgatatcg tcaattacaaaggtaaacgctatctggtttctgtcccgatgttccgagcaagactggacgcccggacaccaaaaatacc tgttcaccgactggagctccgtcgacaalggtcacatcctcaattgaaaaataggcttgcggccgactcgagcaccac caccaccactgagatccggtgctaacaagcccgaaggaagctgagttggctgctgccaacgctgagcaataact agc </pre>
<p>Secuencia Proteína</p>	<pre> MNSTPKGTIYLTFSIDGPNVNASVEIKVLNQGGVKTATFYFNWHLDDIGDENEDRALEALKLALDS GHIVGNHNSYDHMIHNCVEEFGPTSGADCNATGNHQIHSYQDPVRDAASFEQNLITLEKYLPTIRS YPNYKGYELARLPYTNGWRVTKHFQADGLCATSDNLKPWEPGYVCDPANPSNSVKASIQVQNIL ANQGYQTHGWDVDWAPENWGIWIPANSLTEAVPFLAYVDKALNSCSPTTIEPINSKTQEFPCG TPLHADKVIVLTHDFLFEDGKRGMGATQNLPKLAEFIRIAKEAGYVFDTMDNYTPRWSVGKTYQ AGEVLYQGVVYKAVISHTAQDQWAPSSTSSLWTNADPATNWTNLNVSYEQGDIVNYKGRYLV SVPHVSQQDWTPDTQNTLFTALELRRQWSHPQFEK* </pre>
<p>Leyenda</p>	<p>Subrayado: Secuencia de la VcCDA WT FL Mutación D39S Codón Start Codón Stop Strep-Tag II T7 Promotor T7 Terminator</p>

Proteína	VcCDA FL L5-BsPdaA
Plásmido	pET22b(+)
Mapa de plásmido	
Secuencia Gen	<p> taatacgactcactataggggaattgtgagcggataacaattcccctctagaaataatttgtttaacttaagaaggagat atacatatgaacagcagccgaaaggcacgatctatctgacgtttgatgatggcccggtgaacccctcggtggaagtgatt aaagtcctgaaccagggcgggtgttaaagccaccttttattcaacgcatggcatctggatggcattggtgacgaaaatgaa gatcgtgactggaagctctgaaactggcactggacagtggccatattgtggtaaccactcctacgatcacatgatccac aattgcgtgaaagaatttggccgaccagcgggtgcgattgtaaccgacgggtaatcatcagatccactcataccaagac ccggtgctgatgcccctcgttcgaacagaacctgattaccctggaaaaatctgccgacgatccgacgatccgaac tacaaggctatgaactggcgcgtcgcgttacaccaatggttggcgcgtcacgaaacatttcaggcagacggcctgtgc gctactcagataatctgaaccctgggaaccgggttatgtgtgatccggctaaccctcaaattcggtgaaagcgtcg attcaggtcaaaacatcctggccaatcagggtctaccaaacccacggttgggatgttactggctccggaactgggg cattccgatccggcgaatagcctgaccgaagcggctccgtttctggccCAGGCGCATCCGGGTGCGatcgtgct gaccacgacttctgttcgaagatggcaaacgtggcatgggtccacgcaaaacctgccgaaactggcagaatttattcg catcggaagaagccggttacgtttcgtataccatggacaattatacggcgttggagtgtgggcaaaacctaccagg ccggtgaatcgttctgatcaaggcgtggttataaagcagtcatttcccacagcctcagcaagactgggccccgagca gcaccagttccctgtggacgaacgagatccggctaccaactggacgctgaatgttagctatgaacagggcgatcgtc aattacaaaggtaaacgctatctggttctgtcccgcatgttcgacgaagactggacgccggacacccaaaataccctg ttcaccgactggagctcgtcgacaaaggtcacatcctcaattgaaaaataggcttgcggccgactcgagcaccacc accaccaccactgagatccggctgtaacaaagcccgaaggaagctgagttggctgctgccaccgctgagcaataact gc </p>
Secuencia Proteína	<p> MNSTPKGTIYLTFDDGPVNASVEVIKVLNQGQGVKATFYFNWHLDGIGDENEDRALEALKLALD SGHIVGNHSYDHMIHNCVEEFGPTSGADCNATGNHQIHSYQDPVRDAASFEQNLITLEKYLPTIR SYPNYKGYELARLPYTNGWRVTKHFQADGLCATSDNLKPWEPGYVCDPANPSNSVKASIQVQNI LANQGYQTHGWDVDWAPENWGIPMANSLTEAVPFLAQAHPGAIVLTHDFLFEDGKRGMG ATQNLPKLAEFIRIAKEAGYVFDTMDNYTPRWSVGKTYQAGEYVLYQGVVYKAVISHTAQQDW APSSSSLWTNADPATNWTNLNVSYEQGDIVNYKGRYLVSPHVSQQDWTPTDQNTLFTALEL RQWSPQFEK* </p>
Leyenda	<p> Subrayado: Secuencia de la VcCDA WT Mutación: <i>Loop 5-BsPdaA</i> Codón Start Codón Stop Strep-Tag II T7 Promotor T7 Terminator </p>

Proteína	VcCDA FL P193C-N273C
Plásmido	pET22b(+)
Mapa de plásmido	<p>VcCDA FL P193C-N273C 6640 pb</p>
Secuencia Gen	<p> taatacgactcactataggggaattgtgagcggataacaattccctctagaaataatttgttaacttaagaaggagat atacatatgaacagcacgcccgaaaggcacgatctatctgacgtttgatgatggccggtgaaccctcggtggaagtgatt aaagtcctgaaccagggcgggtgttaaagccaccttttattcaacgcatggcatctggatggcattgtgtgacgaaaatgaa gatcgtgactggaagctctgaaactggcactggacagtggcatattgtggtaaccactcctacgatcacatgatccac aattgcgtgaaaattgtgcccgaccagcgggtgcggattgtaaccgcaaggtaatcatcagatccactcataccaagac cgggtgcgtgatcggcctcgttcgaacagaacctgattaccctggaaaaatctgcccgacgatccgcagctatccgaac taciaaaggctatgaactggcgcgtcgcctacacaatggtggcgcgtcagaaacatttcaggcagacggcctgtgc gctactcagataatctgaaaTGCtgggaaccgggtatgtgtgatccggctaaccctcaaattcggtgaagcgtc gattcaggtcaaaacatcctggccaatcagggctacaaaccacgggtgggatgtgactgggtccggaaaactggg gcattccgatccggcgaatagcctgaccgaagcggctccgttctgcctatgtggaaaagcactgaacagctgcttc cgaccagattgaacgcattGCtctaaaaccaggaattcccgtggtagcccgctcatgcggataaagcatcgtg ctgacccagacttctgttcgaatggaacgtggcatgggtgccacgaaaacctgccaaactggcagaatttatt cgcatcgcgaaaagccggttacgtgttcgataccatggacaattatacccgctggagtgtggcaaaacctacca ggccggtgaatacgttctgtatcaaggcgtggttataaagcagtcatttccacacggctcagcaagactggcgcccag cagcaccagttccctgtggacgaacagatccggctaccaactggacgctgaatgttagctatgaacagggcgatc tcaattacaaaggtaaacgctatctggttctgtccgcatgttcgcagcaagactggacccggacacccaaaataccc tgttcaccgcactggagctccgtcgaaagggtcacatcctcaattgaaaaataggcttgcggccgcactgagcaccac caccacccactgagatccggctgtaacaaagcccgaaaggaagctgagttggctgctgccaccgctgagcaataact agc </p>
Secuencia Proteína	<p> MNSTPKGTIYLTFFDDGPVNASVEVIKVLNQGGVKATFYFNAWHLDGIGDENEDRALEALKLALD SGHIVGNHSYDHMIHNCVEEFGPTSGADCNATGNHQIHSYQDPVRDAASFEQNLITLKYLP TIRSYPNYKGYELARLPYTNGWVRVTKHFQADGLCATSDNLKQWEPGYVCDPANPSNSVKASIQVQNI LANQGYQTHGWDVDWAPENWGWIPMPANSLTEAVPFLAYVDKALNSCSPTTIEPICSKTQEFPC GTP LHADKVIVLTHDFLFEDGKRGMGATQNLPKLAEFIRIAKEAGYVFDTMDNYTPRWSVGKTY QAGEYVLYQG VVYKAVISHTAQD WAPSSTSSLW TNADPATNWT LNVSYEQGDIVNYKGRYL VSPHVSQQDWTPDQTNTLFTALELRRQWSHPQFEK* </p>
Leyenda	<p> Subrayado: Secuencia de la VcCDA WT FL Mutación: P193C-N273C Codón Start Codón Stop Strep-Tag II T7 Promotor T7 Terminator </p>

Proteína	VcCDA WT CD
Plásmido	pPR-IBA2
Mapa de plásmido	<p>VcCDA WT CD 3762 pb</p>
Secuencia Gen	<p>taatacgactcactatagggaggccacaacggttccctctagaataattttgttaacttaagaaggagatatacatat ggctagctggagccaccgcagttcgaaaaaaggcgccatgaacagcacgccgaaaggcacgatctatctgacgtttgatg atggccgggtgaacgcctcgggtggaagtgattaaagtctgaaccagggcgggtgtaaacccacctttattcaacgcat ggcatctggatggcattggtgacgaaaatgaagatcgtgcactggaagctctgaaactggcactggacagtggccatatt gtggtaaccactcctacgatcacatgatccacaattcggtgaagaatttggcccaccagcggtcggattgtaacgcc acgggtaatcatcagatccactcataccaagaccggtcgtgatcggcctcgttcgaacagaacctgattaccctggaa aataatctgccgacatccgagctatccgaactacaaggctatgaactggcgcgtctgccgtacaccaatggttggcgc gtcacgaaacatttcaggcagacggcctgtgcctacctcagataatctgaaccgtgggaaccgggttatgtgtgat ccggctaaccctcaaattcgggtgaaagcgtgattcaggttcaaaacatcctggccaatcagggtctaccaaacccacgg ttgggatgtgactgggctccgaaaactggggcattccgatcggcgaatagcctgaccgaagcggctccgtttctggc ctatgtggacaaagcactgaacagctgctctccgaccagattgaaccgatcaattctaaaaccaggaattccgtgtgg tacgcccgtcatcggataaagtcatcgtgctgaccacgacttctgttcgaagatggcaaacctggcatgggtgccac gcaaaacctgccgaaactggcagaatttattcgatcgcgaaagaagccggttacgtgttcgataccatggacaattatac gtagctgcagggggaccatggtctctgatcttaactaagctgatccggctgtaacaaagcccgaaggagctgagtt ggctgctgccaacgctgagcaataactagc</p>
Secuencia Proteína	<p>MASWSHPQFEKAMNSTPKGTIYLTFDDGPNVASVEVIKVLNQGGVKATFYFNAWHLDGIGDE NEDRALEALKLALDSGHIVGNHSDHMIHNCVEEFGPTSGADCNATGNHQIHSYQDPVRDAASF EQNLITLEKYLPTIRSYPNYKGYELARLPYNGWRVTKHFQADGLCATSDNLKPWEPEGYVCDPAN PSNSVKASIQVQNILANQGYQTHGWDVDWAPENWGIPMPANSLTEAVPFLAYVDKALNSCSP TTIEPINSKTQEFPCGTP LHADKIVILTHDFLFEDGKRGMGATQNLPKLAEFIRIAKEAGYVFDTM DNYT*</p>
Leyenda	<p>Subrayado: Secuencia de la VcCDA WT CD Codón Start Codón Stop Strep-Tag II T7 Promotor T7 Terminator</p>

Proteína	VcCDA WT CD P-G
Plásmido	pPR-IBA2
Mapa de plásmido	
Secuencia Gen	<p> taatacgactcactatagggaggccacaacggttccctctagaataattttgttaacttaagaaggagatatacatat ggctagctggagccaccgagttcgaaaaaggcgccatgaacagcacgccgaaaggcacgatctatctgacgtttgatg atggcccgggtgaacgcctcgggtggaagtgattaaagtctgaaccagggcggtgttaagccacctttattcaacgcat ggcatctggatggcattggtgacgaaaatgaagatcgtgcactggaagctctgaaactggcactggacagtgccatatt gtggtaaccactcctacgatcacatgatccacaattgcgtgaagaatttggcccaccagcggtcggattgtaacgcc acggtaatcatcagatccactcataccaagaccggtgcgtgatcggcctcgtcgaacagaacctgattaccctggaa aataatctgccgacatccgagctatccgaactacaaggctatgaactggcgcgtctgccctacaccaatggttggcgc gtcacgaaacatttcaggcagacggcctgtgcctacctcagataatctgaaccctgggaaccgggttatgtgtgtgat ccggctaaccctcaaattcgggtgaaagcgtgattcaggttcaaacatcctggccaatcagggtaccacaaaccacgg ttgggatgtgactgggctccgaaaactggggcattccgatgccggcgaatagcctgaccgaagcggctccgtttctggc ctatgtggacaaagcactgaacagctgcttGGCaccacgattgaaGGCatcaattctaaaaccaggaattcGGC gtggtacgccgctgcatcggataaagtcatcgtgctgaccacgacttctgttcgaagatggcaaacgtggcatgggtg ccacgcaaacctgccgaaactggcagaatttattcgatcggaagaagccggttacgtgttcgataccatggacaatt atagtagctgcagggggaccatggtctctgatatctaactaagctgatccggctgctaacaaagcccgaaggaagct gagttggctgctgccaccgctgagcaataactagc </p>
Secuencia Proteína	<p> MASWSHPQFEKGAMNSTPKGTIYLTFFDDGPVNASVEVIKVLNQGGVKATFYFNAWHLDGIGDE NEDRALEALKLALDSGHIVGNHSDHMIHNCVEEFGPTSGADCNATGNHQIHSYQDPVRDAASF EQLNLTLEKYLPTIRSYPNYKGYELARLPYNGWRVTKHFQADGLCATSDNLKPWEPGYVCDPAN PSNSVKASIQVQNILANQGYQTHGWDVDWAPENWGIPMPANSLTEAVPFLAYVDKALNSCSG TTIEGINSKTQEFGCGTPLHADKIVLTHDFLFEDGKRGMGATQNLPLKAEFIRIAKEAGYVFDTM DNYT* </p>
Leyenda	<p> Subrayado: Secuencia de la VcCDA WT CD Mutación: Pro to Gly Codón Start Codón Stop Strep-Tag II T7 Promotor T7 Terminator </p>

Proteína	VcCDA WT CD ΔHélice 2
Plásmido	pPR-IBA2
Mapa de plásmido	<p>VcCDA CD ΔHélice 2 3744pb</p>
Secuencia Gen	<p> taatacgactcactataggaggccacaacggttccctctagaaataatttgttaacttaagaaggatatacat ggctagctggagccacccgagtcgaaaaaggcgcctgaaacagcacgccgaaaggcacgatctatctgacgttgat atggcccggtgaacgctcggtggaagtgattaagctctaaccagggcgggttaaagccacctttattcaacgcat ggcatctggatggcattgtgacgaaaatgaagatcgtcactggagctctgaaactggcactggacagtggccatatt gtggtaaccactcctacgatcacatgatccacaattgcttgaagaatttggcccaccagcggtgcggattgtaacccc acggtaatcatcagatccaagacccggtgctgatcggcctcgtcgaacgaacctgattaccctgaa aaatctgccgacgatccgaactaaaggctatgaactggcgctctaccaatgttggcg gtcacgaaacatttcaggcagcggctgtcgctacctcagaatctgaacctgggaaccggttatgtgtgt ccggtaaccctcaaatcggtgaagcgtcgatccggcgaatgcctgaccgaagcggtcccgtttcg ctatgtggacaagctgctccgacccgattgaac * aggaattccgtgtgtacgccgtgcat cggataaagtcatcgtgtgacccacgactttcttcgaagatggcaactggcatgggtgccacgcaaacctgcc aaactggcagaattttcgatcgcgaaaagccggttacgttcgattcgattcgattcggacttacgtgctgcaggg gaccatgtctgattctaacttgatccggtgctacaagcccgaaggagctgagtggtgctgcc gctgacaactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactactacta</p>

15.3. Acquisition Method de los métodos HPLC

15.3.1. Acquisition Method DP2(N)

Acq. Method: DP2+DP2(N)_20-80_0.4ML.M

The Acq. Method's Instrument Parameters for the Run were :

```

=====
                                VWD
=====
VWD (G1314B)
=====
Signal Peakwidth:          > 0.1 min (2 s resp. time) (3.43 Hz)
Analog Output Source Channel:                1
Signal Polarity:                Positive (+)
Lamp on required for aquisition:            Yes
Acquire Signal without Reference:           No
Acquire Reference only:                No

Analog Output
Analog Zero Offset:                5 %
Analog Attenuation:                1000 mAU

Signals

Signal
Use Signal:                Yes
Signal ID:                Signal A
Signal Wavelength:                216 nm

Prepare Mode
Margin for negative Absorbance:            100 mAU

Autobalance
Autobalance Prerun:                Yes
Autobalance Postrun:                No

Scan Variables
Scan Range From:                190 nm
Scan Range To:                400 nm
Scan Range Step:                2 nm

Stoptime
Stoptime Mode:                As pump/injector

Posttime
Posttime Mode:                Off

Timetable

Instrument Curves
Store Board Temperature:                No
Store UV Lamp Anode Voltage:            No
Store Sample Intensity:                No
Store Reference Intensity:            No

=====
                                Column Comp.
=====
Column Comp. (G1316A)
=====

Valve Position:                Port 1 -> 2
Left Temperature Control

```

Temperature Control Mode: Temperature Set
 Temperature: 60.00 °C

Enable Analysis Left Temperature
 Enable Analysis Left Temperature On: Yes
 Enable Analysis Left Temperature Value: 1.50 °C

Right Temperature Control
 Right temperature Control Mode: Temperature Set
 Right temperature: 60.00 °C

Enable Analysis Right Temperature
 Enable Analysis Right Temperature On: Yes
 Enable Analysis Right Temperature Value: 1.50 °C

Stop Time
 Stoptime Mode: As pump/injector

Post Time
 Posttime Mode: Off

Timetable

Instrument Curves
 Store Left Temperature: No
 Store Right Temperature: No

=====

HiP Sampler

=====

HiP Sampler (G1367E)

=====

Stop Time
 Stoptime Mode: As pump/No limit

Post Time
 Posttime Mode: Off

Auxiliary
 Draw Speed: 200.0 µL/min
 Eject Speed: 200.0 µL/min
 Draw Position Offset: 0.0 mm
 Wait Time After Drawing: 2.0 s
 Sample Flush Out Factor: 5.0
 Vial/Well bottom sensing: No

Injection
 Injection Mode: Standard injection
 Injection Volume: 5.00 µL

High throughput
 Automatic Delay Volume Reduction: No

Overlapped Injection
 Enable Overlapped Injection: No

Valve Switching
 Valve Movements: 0

Valve Switch Time 1
 Switch Time 1 Enabled: No

Valve Switch Time 2
 Switch Time 2 Enabled: No

Valve Switch Time 3
 Switch Time 3 Enabled: No

Valve Switch Time 4
 Switch Time 4 Enabled: No

Timetable

=====

Binary Pump

=====

Binary Pump (G1312B)

=====

Flow: 0.400 mL/min
 Use Solvent Types: Yes
 Low Pressure Limit: 0.00 bar
 High Pressure Limit: 500.00 bar
 Maximum Flow Gradient: 0.400 mL/min²

Stroke A
 Automatic Stroke Calculation A: Yes

Stroke B
 Automatic Stroke Calculation B: Yes

Compress A
 Compressibility Mode A: Compressibility Value Set
 Compressibility A: 50 10e-6/bar

Compress B
 Compressibility Mode B: Compressibility Value Set
 Compressibility B: 115 10e-6/bar

Stop Time
 Stoptime Mode: Time set
 Stoptime: 1.90 min

Post Time
 Posttime Mode: Off

Timetable

Solvent Composition

Channel	Solvent 1	Name 1	Used	Percent
A	ACN	ACN 1% Fórmico	Yes	65%
B	H2O	H2O 1% fórmico	Yes	35%

Instrument Curves

Store Pressure: Yes
 Store Flow: Yes
 Store Solvent Ratio A: Yes
 Store Solvent Ratio B: Yes
 Store Direction of Piston A: Yes
 Store Direction of Piston B: Yes

```

=====
                        Mass Spectrometer Detector
=====
General Information
-----
Use MSD                : Enabled
Tune File              : atunes.tun
StopTime              : No Limit
Time Filter           : Enabled
Data Storage          : Condensed
Peakwidth             : 0.05 min
Fast Scan             : Disabled
Fast Scan Data Reconstruction: Disabled
Polarity Switch Delay : 50 ms
Ionization Switch Delay : 50 ms

Signals
-----

[Signal 1]
Ionization Mode      : API-ES
Polarity             : Positive
Fragmentor Ramp     : Not Applicable
Percent Cycle Time  : 20.00 %
Sim On Target Mass  : Disabled
Sim Parameters
  Time |          | SIM | Frag- | Gain | Actual |          |
  (min) | Group Name | Ion | mentor | EMV | Dwell | Compound Name | ISTD
  -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----
0.00   |    DP2    | 425.00 | 80   | 1.0 | 50   |          A2   | 0

[Signal 2]
Ionization Mode      : API-ES
Polarity             : Positive
Fragmentor Ramp     : Not Applicable
Percent Cycle Time  : 80.00 %
Sim On Target Mass  : Disabled
Sim Parameters
  Time |          | SIM | Frag- | Gain | Actual |          |
  (min) | Group Name | Ion | mentor | EMV | Dwell | Compound Name | ISTD
  -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----
0.00   | DP2 (N)  | 383.00 | 80   | 1.0 | 230  |          A2   | 0

[Signal 3]
Not Active

[Signal 4]
Not Active

Spray Chamber
-----
[MSZones]
Gas Temp              : 300 C           maximum 350 C
DryingGas            : 12.0 l/min       maximum 13.0 l/min
Neb Pres             : 30 psig         maximum 60 psig
Quad Temp            : 0 C             maximum 0 C

VCap (Positive)     : 4000 V
VCap (Negative)     : 3000 V

```

[Time Table]

Time Table is empty.

END OF MS ACQUISITION PARAMETERS

=====

FIA Series

=====

FIA Series in this Method : Disabled

Time Setting

Time between Injections : 1.00 min

Injection Loop Flush Time : 0.17 min

15.3.2. Acquisition Method DP3(N)

Acq. Method: DP3+DP3(N)_20-80_0.4ML.M

The Acq. Method's Instrument Parameters for the Run were :

```

=====
                                VWD
=====
VWD (G1314B)
=====
Signal Peakwidth:          > 0.1 min (2 s resp. time) (3.43 Hz)
Analog Output Source Channel:      1
Signal Polarity:              Positive (+)
Lamp on required for aquisition:   Yes
Acquire Signal without Reference:   No
Acquire Reference only:           No

Analog Output
Analog Zero Offset:              5 %
Analog Attenuation:             1000 mAU

Signals

Signal
Use Signal:                     Yes
Signal ID:                      Signal A
Signal Wavelength:              216 nm

Prepare Mode
Margin for negative Absorbance:   100 mAU

Autobalance
Autobalance Prerun:             Yes
Autobalance Postrun:           No

Scan Variables
Scan Range From:                190 nm
Scan Range To:                  400 nm
Scan Range Step:                2 nm

Stoptime
Stoptime Mode:                  As pump/injector

Posttime
Posttime Mode:                  Off

Timetable

Instrument Curves
Store Board Temperature:        No
Store UV Lamp Anode Voltage:    No
Store Sample Intensity:         No
Store Reference Intensity:      No

=====
                                Column Comp.
=====
Column Comp. (G1316A)
=====

Valve Position:                  Port 1 -> 2
Left Temperature Control
Temperature Control Mode:        Temperature Set

```


Temperature: 60.00 °C

Enable Analysis Left Temperature
Enable Analysis Left Temperature On: Yes
Enable Analysis Left Temperature Value: 0.80 °C

Right Temperature Control
Right temperature Control Mode: Temperature Set
Right temperature: 60.00 °C

Enable Analysis Right Temperature
Enable Analysis Right Temperature On: Yes
Enable Analysis Right Temperature Value: 0.80 °C

Stop Time
Stoptime Mode: As pump/injector

Post Time
Posttime Mode: Off

Timetable

Instrument Curves
Store Left Temperature: No
Store Right Temperature: No

=====

HiP Sampler

=====

HiP Sampler (G1367E)

=====

Stop Time
Stoptime Mode: As pump/No limit

Post Time
Posttime Mode: Off

Auxiliary
Draw Speed: 200.0 µL/min
Eject Speed: 200.0 µL/min
Draw Position Offset: 0.0 mm
Wait Time After Drawing: 2.0 s
Sample Flush Out Factor: 5.0
Vial/Well bottom sensing: No

Injection
Injection Mode: Standard injection
Injection Volume: 5.00 µL

High throughput
Automatic Delay Volume Reduction: Yes

Overlapped Injection
Enable Overlapped Injection: No

Valve Switching
Valve Movements: 0

Valve Switch Time 1
Switch Time 1 Enabled: No

Valve Switch Time 2
Switch Time 2 Enabled: No

Valve Switch Time 3
Switch Time 3 Enabled: No

Valve Switch Time 4
Switch Time 4 Enabled: No

Timetable

=====
Binary Pump
=====

Binary Pump (G1312B)
=====

Flow: 0.400 mL/min
Use Solvent Types: Yes
Low Pressure Limit: 0.00 bar
High Pressure Limit: 500.00 bar
Maximum Flow Gradient: 0.200 mL/min²

Stroke A
Automatic Stroke Calculation A: Yes

Stroke B
Automatic Stroke Calculation B: Yes

Compress A
Compressibility Mode A: Compressibility Value Set
Compressibility A: 50 10e-6/bar

Compress B
Compressibility Mode B: Compressibility Value Set
Compressibility B: 115 10e-6/bar

Stop Time
Stoptime Mode: Time set
Stoptime: 2.70 min

Post Time
Posttime Mode: Off

Timetable

Solvent Composition

Channel	Solvent 1	Name 1	Used	Percent
A	ACN	ACN 1% Fórmico	Yes	65%
B	H2O	H2O 1% fórmico	Yes	35%

Instrument Curves

Store Pressure: Yes
Store Flow: Yes
Store Solvent Ratio A: Yes
Store Solvent Ratio B: Yes
Store Direction of Piston A: Yes
Store Direction of Piston B: Yes

=====
 Mass Spectrometer Detector
 =====

General Information

Use MSD : Enabled
 Tune File : atunes.tun
 StopTime : No Limit
 Time Filter : Enabled
 Data Storage : Condensed
 Peakwidth : 0.05 min
 Fast Scan : Disabled
 Fast Scan Data Reconstruction: Disabled
 Polarity Switch Delay : 50 ms
 Ionization Switch Delay : 50 ms

Signals

[Signal 1]

Ionization Mode : API-ES
 Polarity : Positive
 Fragmentor Ramp : Not Applicable
 Percent Cycle Time : 20.00 %
 Sim On Target Mass : Disabled

Sim Parameters

Time (min)	Group Name	SIM Ion	Frag-mentor	Gain EMV	Actual Dwell	Compound Name	ISTD
0.00	DP3	628.30	80	1.0	50	A3	0

[Signal 2]

Ionization Mode : API-ES
 Polarity : Positive
 Fragmentor Ramp : Not Applicable
 Percent Cycle Time : 80.00 %
 Sim On Target Mass : Disabled

Sim Parameters

Time (min)	Group Name	SIM Ion	Frag-mentor	Gain EMV	Actual Dwell	Compound Name	ISTD
0.00	DP3 (N)	586.30	80	1.0	230	A2D	0

[Signal 3]

Not Active

[Signal 4]

Not Active

Spray Chamber

[MSZones]

Gas Temp : 300 C maximum 350 C
 DryingGas : 12.0 l/min maximum 13.0 l/min
 Neb Pres : 30 psig maximum 60 psig
 Quad Temp : 0 C maximum 0 C

VCap (Positive) : 4000 V

VCap (Negative) : 3000 V

[Time Table]

Time Table is empty.

END OF MS ACQUISITION PARAMETERS

=====

FIA Series

=====

FIA Series in this Method : Disabled

Time Setting

Time between Injections : 1.00 min

Injection Loop Flush Time : 0.17 min

15.3.3. Acquisition Method DP4(N)

Acq. Method: DP4+DP4(N)_20-80_0.4ML.M

The Acq. Method's Instrument Parameters for the Run were :

```

=====
                                VWD
=====
VWD (G1314B)
=====
Signal Peakwidth:          > 0.1 min (2 s resp. time) (3.43 Hz)
Analog Output Source Channel:                1
Signal Polarity:                    Positive (+)
Lamp on required for aquisition:           Yes
Acquire Signal without Reference:          No
Acquire Reference only:                   No

Analog Output
Analog Zero Offset:                    5 %
Analog Attenuation:                    1000 mAU

Signals

Signal
Use Signal:                            Yes
Signal ID:                             Signal A
Signal Wavelength:                      216 nm

Prepare Mode
Margin for negative Absorbance:          100 mAU

Autobalance
Autobalance Prerun:                    Yes
Autobalance Postrun:                    No

Scan Variables
Scan Range From:                       190 nm
Scan Range To:                           400 nm
Scan Range Step:                         2 nm

Stoptime
Stoptime Mode:                          As pump/injector

Posttime
Posttime Mode:                           Off

Timetable

Instrument Curves
Store Board Temperature:                 No
Store UV Lamp Anode Voltage:             No
Store Sample Intensity:                  No
Store Reference Intensity:               No

```

```

=====
                                Column Comp.
=====
Column Comp. (G1316A)
=====

Valve Position:                          Port 1 -> 2
Left Temperature Control
Temperature Control Mode:                 Temperature Set
Temperature:                              60.00 °C

```

Enable Analysis Left Temperature
 Enable Analysis Left Temperature On: Yes
 Enable Analysis Left Temperature Value: 0.80 °C

Right Temperature Control
 Right temperature Control Mode: Temperature Set
 Right temperature: 60.00 °C

Enable Analysis Right Temperature
 Enable Analysis Right Temperature On: Yes
 Enable Analysis Right Temperature Value: 0.80 °C

Stop Time
 Stoptime Mode: As pump/injector

Post Time
 Posttime Mode: Off

Timetable

Instrument Curves
 Store Left Temperature: No
 Store Right Temperature: No

=====

HiP Sampler

=====

HiP Sampler (G1367E)

=====

Stop Time
 Stoptime Mode: As pump/No limit

Post Time
 Posttime Mode: Off

Auxiliary
 Draw Speed: 200.0 µL/min
 Eject Speed: 200.0 µL/min
 Draw Position Offset: 0.0 mm
 Wait Time After Drawing: 2.0 s
 Sample Flush Out Factor: 5.0
 Vial/Well bottom sensing: No

Injection
 Injection Mode: Standard injection
 Injection Volume: 5.00 µL

High throughput
 Automatic Delay Volume Reduction: Yes

Overlapped Injection
 Enable Overlapped Injection: No

Valve Switching
 Valve Movements: 0

Valve Switch Time 1
 Switch Time 1 Enabled: No

Valve Switch Time 2
 Switch Time 2 Enabled: No

Valve Switch Time 3
Switch Time 3 Enabled: No

Valve Switch Time 4
Switch Time 4 Enabled: No

Timetable

```
=====
                          Binary Pump
=====
```

Binary Pump (G1312B)
=====

Flow: 0.400 mL/min
Use Solvent Types: Yes
Low Pressure Limit: 0.00 bar
High Pressure Limit: 500.00 bar
Maximum Flow Gradient: 0.400 mL/min²

Stroke A
Automatic Stroke Calculation A: Yes

Stroke B
Automatic Stroke Calculation B: Yes

Compress A
Compressibility Mode A: Compressibility Value Set
Compressibility A: 50 10e-6/bar

Compress B
Compressibility Mode B: Compressibility Value Set
Compressibility B: 115 10e-6/bar

Stop Time
Stoptime Mode: Time set
Stoptime: 2.70 min

Post Time
Posttime Mode: Off

Timetable

Solvent Composition

Channel	Solvent 1	Name 1	Used	Percent
A	ACN	ACN 1% Fórmico	Yes	65%
B	H2O	H2O 1% fórmico	Yes	35%

Instrument Curves

Store Pressure: Yes
Store Flow: Yes
Store Solvent Ratio A: Yes
Store Solvent Ratio B: Yes
Store Direction of Piston A: Yes
Store Direction of Piston B: Yes

```

=====
                        Mass Spectrometer Detector
=====
General Information
-----
Use MSD                : Enabled
Tune File              : atunes.tun
StopTime              : No Limit
Time Filter           : Enabled
Data Storage          : Condensed
Peakwidth             : 0.05 min
Fast Scan             : Disabled
Fast Scan Data Reconstruction: Disabled
Polarity Switch Delay : 50 ms
Ionization Switch Delay : 50 ms

Signals
-----

[Signal 1]
Ionization Mode      : API-ES
Polarity             : Positive
Fragmentor Ramp     : Not Applicable
Percent Cycle Time  : 20.00 %
Sim On Target Mass  : Disabled
Sim Parameters
  Time |          | SIM | Frag- | Gain | Actual |          |
  (min) | Group Name | Ion | mentor | EMV | Dwell | Compound Name | ISTD
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----
0.00   |      DP4   | 831.00 | 80   | 1.0 | 50   |      A4   | 0

[Signal 2]
Ionization Mode      : API-ES
Polarity             : Positive
Fragmentor Ramp     : Not Applicable
Percent Cycle Time  : 80.00 %
Sim On Target Mass  : Disabled
Sim Parameters
  Time |          | SIM | Frag- | Gain | Actual |          |
  (min) | Group Name | Ion | mentor | EMV | Dwell | Compound Name | ISTD
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----
0.00   | DP4 (N)   | 789.00 | 80   | 1.0 | 230  |      A3D  | 0

[Signal 3]
Not Active

[Signal 4]
Not Active

Spray Chamber
-----
[MSZones]
Gas Temp              : 300 C                maximum 350 C
DryingGas            : 12.0 l/min           maximum 13.0 l/min
Neb Pres             : 30 psig             maximum 60 psig
Quad Temp            : 0 C                maximum 0 C

VCap (Positive)     : 4000 V
VCap (Negative)     : 3000 V

[Time Table]

```


Time Table is empty.

END OF MS ACQUISITION PARAMETERS

=====

FIA Series

=====

FIA Series in this Method : Disabled

Time Setting

Time between Injections : 1.00 min

Injection Loop Flush Time : 0.17 min

15.3.4. Acquisition Method DP5(N)

Acq. Method: DP5+DP5(N)_20-80_0.4ML.M

The Acq. Method's Instrument Parameters for the Run were :

```

=====
                                VWD
=====
VWD (G1314B)
=====
Signal Peakwidth:          > 0.1 min (2 s resp. time) (3.43 Hz)
Analog Output Source Channel:                1
Signal Polarity:                    Positive (+)
Lamp on required for aquisition:            Yes
Acquire Signal without Reference:           No
Acquire Reference only:                   No

Analog Output
Analog Zero Offset:                    5 %
Analog Attenuation:                    1000 mAU

Signals

Signal
Use Signal:                            Yes
Signal ID:                              Signal A
Signal Wavelength:                      216 nm

Prepare Mode
Margin for negative Absorbance:          100 mAU

Autobalance
Autobalance Prerun:                    Yes
Autobalance Postrun:                   No

Scan Variables
Scan Range From:                        190 nm
Scan Range To:                          400 nm
Scan Range Step:                         2 nm

Stoptime
Stoptime Mode:                          As pump/injector

Posttime
Posttime Mode:                           Off

Timetable

Instrument Curves
Store Board Temperature:                 No
Store UV Lamp Anode Voltage:             No
Store Sample Intensity:                  No
Store Reference Intensity:               No

```

```

=====
                                Column Comp.
=====
Column Comp. (G1316A)
=====

Valve Position:                          Port 1 -> 2
Left Temperature Control
Temperature Control Mode:                 Temperature Set
Temperature:                              60.00 °C

```

Enable Analysis Left Temperature
Enable Analysis Left Temperature On: Yes
Enable Analysis Left Temperature Value: 0.80 °C

Right Temperature Control
Right temperature Control Mode: Temperature Set
Right temperature: 60.00 °C

Enable Analysis Right Temperature
Enable Analysis Right Temperature On: Yes
Enable Analysis Right Temperature Value: 0.80 °C

Stop Time
Stoptime Mode: As pump/injector

Post Time
Posttime Mode: Off

Timetable

Instrument Curves
Store Left Temperature: No
Store Right Temperature: No

=====

HiP Sampler

=====

HiP Sampler (G1367E)

Stop Time
Stoptime Mode: As pump/No limit

Post Time
Posttime Mode: Off

Auxiliary
Draw Speed: 200.0 µL/min
Eject Speed: 200.0 µL/min
Draw Position Offset: 0.0 mm
Wait Time After Drawing: 2.0 s
Sample Flush Out Factor: 5.0
Vial/Well bottom sensing: No

Injection
Injection Mode: Standard injection
Injection Volume: 5.00 µL

High throughput
Automatic Delay Volume Reduction: Yes

Overlapped Injection
Enable Overlapped Injection: No

Valve Switching
Valve Movements: 0

Valve Switch Time 1
Switch Time 1 Enabled: No

Valve Switch Time 2
Switch Time 2 Enabled: No

Valve Switch Time 3
 Switch Time 3 Enabled: No

Valve Switch Time 4
 Switch Time 4 Enabled: No

Timetable

=====
 Binary Pump
 =====

Binary Pump (G1312B)
 =====

Flow: 0.400 mL/min
 Use Solvent Types: Yes
 Low Pressure Limit: 0.00 bar
 High Pressure Limit: 500.00 bar
 Maximum Flow Gradient: 0.400 mL/min²

Stroke A
 Automatic Stroke Calculation A: Yes

Stroke B
 Automatic Stroke Calculation B: Yes

Compress A
 Compressibility Mode A: Compressibility Value Set
 Compressibility A: 50 10e-6/bar

Compress B
 Compressibility Mode B: Compressibility Value Set
 Compressibility B: 115 10e-6/bar

Stop Time
 Stoptime Mode: Time set
 Stoptime: 2.70 min

Post Time
 Posttime Mode: Off

Timetable

Solvent Composition

Channel	Solvent 1	Name 1	Used	Percent
A	ACN	ACN 1% F6rmico	Yes	65%
B	H2O	H2O 1% f6rmico	Yes	35%

Instrument Curves

Store Pressure: Yes
 Store Flow: Yes
 Store Solvent Ratio A: Yes
 Store Solvent Ratio B: Yes
 Store Direction of Piston A: Yes
 Store Direction of Piston B: Yes

```

=====
                          Mass Spectrometer Detector
=====

```

```

General Information
-----

```

```

Use MSD                : Enabled
Tune File              : atunes.tun
StopTime              : No Limit
Time Filter           : Enabled
Data Storage          : Condensed
Peakwidth             : 0.05 min
Fast Scan             : Disabled
Fast Scan Data Reconstruction: Disabled
Polarity Switch Delay : 50 ms
Ionization Switch Delay : 50 ms

```

```

Signals
-----

```

```

[Signal 1]

```

```

Ionization Mode       : API-ES
Polarity              : Positive
Fragmentor Ramp       : Not Applicable
Percent Cycle Time    : 20.00 %
Sim On Target Mass    : Disabled

```

```

Sim Parameters

```

Time (min)	Group Name	SIM Ion	Frag- mentor	Gain EMV	Actual Dwell	Compound Name	ISTD
0.00	DP5	1035.00	80	1.0	50	A4	0

```

[Signal 2]

```

```

Ionization Mode       : API-ES
Polarity              : Positive
Fragmentor Ramp       : Not Applicable
Percent Cycle Time    : 80.00 %
Sim On Target Mass    : Disabled

```

```

Sim Parameters

```

Time (min)	Group Name	SIM Ion	Frag- mentor	Gain EMV	Actual Dwell	Compound Name	ISTD
0.00	DP5(N)	993.00	80	1.0	230	A4D	0

```

[Signal 3]

```

```

Not Active

```

```

[Signal 4]

```

```

Not Active

```

```

Spray Chamber
-----

```

```

[MSZones]

```

```

Gas Temp              : 300 C                maximum 350 C
DryingGas            : 12.0 l/min            maximum 13.0 l/min
Neb Pres             : 30 psig              maximum 60 psig
Quad Temp            : 0 C                  maximum 0 C

```

```

VCap (Positive)      : 4000 V
VCap (Negative)      : 3000 V

```

```

[Time Table]

```

Time Table is empty.

END OF MS ACQUISITION PARAMETERS

=====

FIA Series

=====

FIA Series in this Method : Disabled

Time Setting

Time between Injections : 1.00 min

Injection Loop Flush Time : 0.17 min