

Enginyeria de glicosintases derivades de quitinases GH18 per a la polimerització de quitooligosacàrids

Cristina Alsina Verdú

<http://hdl.handle.net/10803/667340>

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.

TESI DOCTORAL

Títol	Enginyeria de glicosintases derivades de quitinases GH18 per a la polimerització de quitooligosacàrids
Realitzada per	Cristina Alsina Verdú
en el Centre	IQS School of Engineering
i en el Departament	Bioenginyeria
Dirigida per	Dr. Antoni Planas Sauter

A tots els qui ho han fet possible,
especialment als meus pares i a l'Adri.

*Quan l'objectiu et sembli difícil, no canviïs d'objectiu,
busca un nou camí per arribar-hi.*

AGRAÏMENTS

Agraïments

S'acaba una etapa, llarga i dura, però molt gratificant, en la que he crescut no només com a científica sinó també com a persona. Aquesta etapa no hagués estat possible sense un gran nombre de persones a les quals m'agradaria agrair tot el que han fet per mi.

En primer lloc agrair al Dr. Antoni Planas la oportunitat de formar part del seu grup de recerca i de confiar en mi per a realitzar aquesta tesi doctoral. Gràcies per introduir-me al món de la química i dels carbohidrats, per tots els comentaris i discussions, de tots ells n'he après moltíssim.

Agrair també molt especialment al Dr. Xevi Biarnés. Gràcies per la teva total entrega al projecte, per cadascuna de les teves aportacions, però també per tots els moments viscuts en els diferents *meetings* de Nano3Bio i congressos. Mai no oblidaré córrer per l'aeroport per no perdre un vol a Bèlgica (el meu primer viatge amb Bioquímica...) o fer fotos a totes les tasses, pastissos, etc. per a simular un quitoooligosacàrids (a poder ser activat). Moltes gràcies Xevi.

Gràcies a la Dra. Magda Faijes, pel teu entusiasme i positivisme, per l'energia que transmetes per seguir endavant, per donar gran importància a cada un dels resultats d'aquesta tesi i ensenyar-me a valorar el treball realitzat.

Donar les gràcies a tots els professors, col·laboradors i investigadors de Bioquímica, sense els vostres comentaris i idees aquesta tesi no hagués estat el mateix. Gràcies a la Dra. Teresa Pellicer, al Dr. Pau Leivar, al Dr. Marc Carnicer i a la Patri, per la vostra ajuda i consells, i per interessar-vos i donar-me energia aquest últim any. També agrair a la Dra. Marta Palomo, per confiar en mi per aquest projecte, per facilitar-me l'arribada al laboratori i per la teva entrega en la fase inicial. Gràcies a tots també pels dinars i *pica-pica's* compartits.

També a tot el personal d'IQS que d'alguna manera han facilitat la feina (recepció, compres, personal del bar...), i en especial a magatzem, al Chema i al David, els petits moments de desconnexió per anar a buscar un paquet, que sovint esdevenien en llargues converses, eren realment necessaris.

Agrair també a l'empresa Enantia, especialment a la Dra. Carme Cantos i a l'Antoni Segade per la síntesi de la oxazolina, substrat indispensable en aquesta tesi. Gràcies per la dedicació i disposició per resoldre tots els meus dubtes.

També m'agradaria agrair als membres del tribunal per acceptar formar-hi part, per dedicar temps en llegir la tesi i avaluar-la, espero que la gaudiu.

Al llarg d'aquests 5 anys he pogut conèixer i compartir laboratori amb molta gent, gràcies a tots pels moments viscuts. Gràcies als doctorands veterans (ara ja tots Doctors), per ajudar-me en els moments inicials, pels vostres consells, per la vostra companyia al laboratori.

Gràcies a la Dra. Victoria Codera, per la teva manera de viure la ciència, per cadascuna de les aportacions que has fet en aquesta tesi, pels teus comentaris enèrgics (també en aquest últim any); a la Dra. Cris Val, por tu apoyo y tu energía; al Dr. Sergi Abad i al Dr. Javi Romero. Hugo (perdón, Dr. Aragunde), mi compañero de poyata, auxiliarías y viajes Nano3Bio, muchas gracias por todo lo que he aprendido de ti, pero sobretodo por cuidar de mi, por entender y compartir mis nervios en todos los *meetings* de Nano3Bio, por hacerlo más fácil. Gràcies a tots els estudiants que han passat pel laboratori, que d'alguna manera o una altra ens han ensenyat alguna cosa, en especial al Juan, per la teva dedicació, i a la Xisca, per l'alegria i positivisme que vas aportar quan més ho necessitàvem. Gràcies també al Marc, al Bernat i a l'Álvaro, que tot i no compartir quasi temps de laboratori, heu mostrat interès per mi, per donar-me ànims i per alegrar cada dia que he vingut aquest últim any per IQS, molta energia i sort en aquest camí!

Agrair molt especialment a les doctores Enea Sancho i Almudena Aranda, sense la vostra gran aportació (importantíssima) no hi hauria tesi. Enea, moltes gràcies pel teu entusiasme i dedicació, per fer-me voler saber encara més el per què de les coses, per donar en cada moment el 100%. Almu, gràcies per tot, per cadascun dels experiments compartits, però sobretot per entrar a formar part de bioch, per l'alegria que transmetes, per tots els moments viscuts fora del lab, per obrir-nos les portes de casa teva i ja no tancar-les. Moltes gràcies a les dues per tots els ànims i per transmetre'm l'energia per continuar endavant.

Aquests anys els he compartit amb vosaltres, hem compartit laboratori, alegries i frustracions, heu estat un gran recolzament durant tot el procés però sobretot heu entrat a formar part de mi i ja és per sempre. Encara que escrigui un munt de paraules, es quedaran curtes per expressar tot el que heu significat (signifiqueu i significareu) per mi, perquè sens dubte heu estat el millor de tota aquesta etapa. Sergi, per ser una més del grup, gràcies per fer-me riure sempre, per fer més curtes les esperes (sobretot aquest últim any), per les teves mil idees científiques, per totes les teves "obsessions" sempre divertides, que acaben en nous plans de viatge. Mire, gràcies per tota la dedicació que vas posar-hi durant el màster, però sobretot per quedar-te a bioch i ser-ne l'alegria, pels teus "quina situació escolliries a o b" sempre únics i impossibles, per fer-nos ballar i convertir cada situació en una festa. Nur, gràcies per il·luminar sempre el laboratori cantant alguna cançó i fer que m'enganxi a cantar amb tu, per les tornades en cotxe després de cada sopar (incloses les pèrdues i voltes extremes), per cadascun dels teus comentaris únics. Laia, gràcies per deixar-me conèixer-te, per tots els viatges juntes i habitacions compartides, per les nostres converses eternes quan més son teníem, per la teva preocupació i interès, per tots els moments viscuts i per tots els que vindran. Estela, des del primer dia que vaig trepitjar el laboratori has estat allà per tot el que he necessitat (i sé que hi continuaràs), gràcies per oferir la teva ajuda en tot moment, pels dinars i cafès al sol, per cada una de les abraçades en els moments difícils, per la teva rialla única, per totes les nostres xerrades, pels viatges i riures, gràcies per haver estat el gran pilar durant aquest camí. Moltes gràcies a tots per tots els moments compartits, i que seguirem compartint, allà on estiguem. Ja us trobo a faltar!

No hagués començat aquesta etapa sense l'energia i les ganes per continuar investigant, i d'això en són responsables els ADHs. Xavier i Jaume, els caps de grup, gràcies per deixar-me entrar un dia al laboratori per a fer les pràctiques i ja deixar-m'hi quedar durant 3 anys. Sergio, gràcies per tot el que em vas ensenyar, començava sense experiència i gràcies als teus *podries...* vaig començar a créixer com a científica. Julio, gracias por transmitir constancia y dedicación, por mostrarnos siempre el lado positivo de las cosas. Isidro realment estàs fet per això, ets un súper investigador! Gràcies per tots els teus consells i ajuts bioinformàtics! Joan, el *líder* del costat fosc, gràcies per apagar-nos el llum i fer de cada un dels experiments de laboratori un nou repte a les fosques. Gràcies per tota la xocolata compartida. Raquel, gràcies per fer de cada dia de laboratori un dia especial, per tots els moments compartits amb bata, a classe, a les escales, al bar... pels plors i rialles, perquè amb tu aquells moments van ser més fàcils, perquè tot el que vam viure ens va unir i des de llavors no has deixat d'estar mai al meu costat. Gràcies pels mil moments viscuts dins del lab, però sobretot per tots els que hem compartit fora i per tots els que sé compartirem (i ja no queda tant pel més important!). I amb tu va aparèixer el Víctor, gràcies per entendre cada un dels moments.

Gràcies Marta i Marià per cuidar-me tant durant tots aquests anys, per fer-me sentir una més, per donar-me ànims. Gràcies també a tota la resta de la família, especialment als avis, per l'energia sempre positiva.

Gràcies a tota la meva família, per voler entendre què és el que he estat fent, pels ànims, petons i abraçades. Amb més intensitat gràcies Sandra i Ivette, també Aldo, per les mil preguntes, perquè sense entendre ben bé què és estar fent el doctorat m'heu volgut transmetre la vostra força i energia. I sobretot gràcies als meus pares! Papi i Mami, gràcies per confiar sempre en mi, per donar-me forces per continuar endavant i ensenyar-me a no rendir-me mai. Gràcies per ser el meu exemple a seguir. Perquè sense vosaltres no hagués estat possible arribar fins aquí.

Adri, gràcies per ser-hi sempre. Gràcies per recolzar-me en cadascuna de les decisions que he pres, per donar-me l'energia i confiança per començar i acabar aquesta etapa, per entendre'm en tot moment, per saber fer-me riure quan més ho necessito. Gràcies per la teva força i ajuda per seguir lluitant. Aquest doctorat sens dubte és també teu. Mil gràcies per tots els nostres moments. T'estimo!

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 n° 613931

ÍNDEX

Índex

Índex	I
Sumari	VII
Sumario	IX
Summary	XI
Llistat de figures	XV
Llistat de taules	XXIII
Abreviatures	XXVII
Introducció	1
1.1. Glicosidases com a eina per a la síntesi de glicòsids	1
1.1.1. Glicosil Hidrolases o Glicosidases (GHs).....	2
1.1.2. Glicosintases	5
1.2. Quitina i quitosans	7
1.2.1. Propietats i Estructura	7
1.2.2. Aplicacions.....	8
1.2.3. Producció de quitina i quitosà	10
1.2.4. Projecte Nano3Bio	11
1.3. Quitinases de la família GH18	12
1.3.1. Estructura	14
1.3.2. Mecanisme	15
1.3.3. Quitinases com a eines sintètiques de COS.....	19
1.4. Marc del projecte	20
Objectius	23
Organització de la tesi	27
Capítol 1. Selecció de diferents quitinases de la família GH18 per al disseny d'una glicosintasa	31
1.1. Anàlisi bioinformàtica i bibliogràfica de quitinases.....	31
1.1.1. Quitinases amb activitat de transglicosidació reportada	32
1.1.2. Anàlisi estructural de quitinases procarïotes	43
1.2. Quitinases seleccionades per al desenvolupament d'una glicosintasa.....	44
1.3. Gens sintètics per a l'expressió de proteïnes recombinants.....	57
Capítol 2. Desenvolupament de mètodes analítics, el cas de la quitinasa D de <i>Serratia proteamaculans</i> (<i>SpChiD</i>), enzim <i>wt</i> i mutant <i>D151A</i>	61
2.1. Activitat hidrolítica	61
2.1.1. Assaig fluorimètric per a substrats fluorogènics.....	61
2.1.2. Mètode cromatogràfic (HPLC-MS) per a substrats naturals.....	63
2.2. Activitat glicosintasa	75
2.2.1. Síntesi d'oxazolines.....	75
2.2.1.1. Síntesi d'oxazolines de COS de quitina	76
2.2.1.2. Síntesi d'oxazolines de COS parcialment desacetilats.....	78
2.2.1.3. Estabilitat de les oxazolines.....	85
2.2.2. Intent de desenvolupament d'un mètode de cribratge en placa	85
2.2.3. Reacció de polimerització: anàlisi per MALDI-TOF-MS.....	89

Capítol 3. Primera generació glicosintasa: mutació del residu assistent.....	97
3.1. Estratègia general per al disseny de la primera generació glicosintasa	97
3.2. Clonatge, expressió i purificació de les quitinases seleccionades i dels mutants.....	98
3.3. Caracterització de l'activitat hidrolítica residual	101
3.3.1. Activitat hidrolítica utilitzant substrats fluorogènics	102
3.3.2. Activitat hidrolítica per a substrats naturals.....	106
3.4. Anàlisi de l'activitat de transglicosidació amb (GlcNAc) ₅ com a substrat.....	112
3.5. Anàlisi de l'activitat glicosintasa dels mutants del residu assistent amb (GlcNAc) ₅ -ox com a substrat	116
3.6. Conclusions.....	122
Capítol 4. Disseny d'una glicosintasa a partir de la quitinasa D de <i>Serratia proteamaculans</i> (<i>SpChiD</i>).....	127
4.1. Quitinasa D de <i>Serratia proteamaculans</i> . Antecedents.	127
4.1.1 Estructura d' <i>SpChiD</i>	128
4.1.2. Caracterització bioquímica d' <i>SpChiD</i>	130
4.1.3. Modificació de l'activitat de TG d' <i>SpChiD</i> mitjançant mutagènesi	131
4.2. Primera generació glicosintasa: mutació del residu assistent.....	138
4.2.1. Activitat hidrolítica d' <i>SpChiD</i> D151A.....	138
4.2.2. Activitat glicosintasa d' <i>SpChiD</i> D151A	139
4.2.2.1 Polimerització de (GlcNAc) ₅ -ox.....	139
4.2.2.2 Condensació donador – acceptor	141
4.2.2.3 Polimerització d'ADAAA-ox	142
4.3. Segona generació glicosintasa.....	145
4.3.1. Disseny racional dels dobles mutants d' <i>SpChiD</i>	145
4.3.2. Expressió i purificació dels dobles mutants	148
4.3.3. Activitat hidrolítica dels dobles mutants	149
4.3.4. Activitat glicosintasa dels dobles mutants, polimerització de (GlcNAc) ₅ -ox	151
4.3.5. Mutant <i>SpChiD</i> D149A/D151A.....	155
4.4. Tercera generació glicosintasa	158
4.4.1. Disseny racional dels triples mutants d' <i>SpChiD</i>	158
4.4.2. Expressió i purificació dels triples mutants.....	163
4.4.3. Activitat hidrolítica dels triples mutants.....	164
4.4.4. Activitat glicosintasa dels triples mutants, polimerització de (GlcNAc) ₅ -ox	165
4.4.5. Mutant <i>SpChiD</i> Y28A/D149A/D151A	171
4.4.5.1. Reacció de polimerització de (GlcNAc) ₅ -ox.....	171
4.4.5.2. Polimerització de COS parcialment desacetilats	172
4.4.5.3. Condensació donador-acceptor	175
4.5. Relació efecte-funció dels residus d' <i>SpChiD</i>	177
4.6. Aplicació de l'estratègia glicosintasa d' <i>SpChiD</i> a <i>TkChiA</i>	180
4.6.1. Mutant del residu assistent <i>TkChiA</i> D1022A.....	180
4.6.2. Mutant doble <i>TkChiA</i> D1020A/D1022A	181
4.6.3. Propostes de futur per al disseny d'una glicosintasa a partir de <i>TkChiA</i>	184
Conclusions.....	193
Part experimental	197
Disseny dels gens sintètics	197
Manipulació de l'ADN i subclonatge	197
Obtenció dels mutants	197
Mutants del residu assistent.....	197

Mutants de la segona generació glicosintasa	198
Mutants de la tercera generació glicosintasa	199
Expressió i purificació de proteïnes	199
Proves d'expressió de les quitinases	199
Expressió i purificació de quitinases	200
Expressió i purificació de VcCDA.....	200
Caracterització de l'activitat enzimàtica de les quitinases i els seus mutants	201
Activitat hidrolítica	201
Activitat glicosintasa	203
Desacetilació parcial de COS amb VcCDA	204
Mètode HPLC-MS per a l'anàlisi dels COS parcialment desacetilats	204
Anàlisi per cromatografia en capa fina (TLC).....	205
Síntesi química d'oxazolines	205
Anàlisi d'RMN dels productes oxazolina.....	205
Mètode HPLC-MS per a l'anàlisi d'oxazolines.....	205
Síntesi de (GlcNAc) ₂ -ox	206
Síntesi de (GlcNAc) ₅ -ox	206
Síntesi d'ADAAA-ox.....	207
Síntesi d'ADA-ox	207
Assaig d'estabilitat del derivat oxazolina d' <i>N</i> -acetil-β-D-glucosamina	207
Procediments bioinformàtics	207
Procediments generals	207
Obtenció estructura <i>SpChiD</i> en complex amb (GlcNAc) ₅	208
Disseny del model estructural de <i>TkChiA</i>	208
Bibliografia	211
Annexes	225

SUMARI

Sumari

Els quitosans i quitooligosacàrids (COS), obtinguts per enzims modificadors de la quitina, presenten un elevat interès biotecnològic a causa de l'important nombre d'aplicacions en àrees tant diverses com són l'agricultura, el tractament d'aigües, la indústria alimentària, la biomedicina i la cosmètica, entre d'altres. D'entre les funcions biològiques dins la indústria medicofarmacèutica destaquen activitats antiinflamatòries, immunoestimulants, antimicrobianes, antitumorals, de prevenció de l'obesitat i control del colesterol, com a vectors per a teràpia gènica i de promoció de la cicatrització i regeneració de la pell. Aquestes propietats biològiques dels COS no només són dependents del grau de polimerització i acetilació sinó que possiblement també depenen del patró d'acetilació d'aquests.

Actualment la síntesi de COS presenta dos problemes principals: poca reproductibilitat entre lots i l'origen animal dels productes, que dificulten la seva utilització en la indústria medicofarmacèutica. Amb l'objectiu de sobreposar-se a aquestes limitacions s'ha pretès desenvolupar una plataforma biotecnològica per a la producció de COS de baix pes molecular amb seqüències definides. El projecte pretén utilitzar l'activitat transglicosidasa de les quitinases com a eina sintètica per a obtenir oligòmers de quitina i quitosà definits amb patrons d'acetilació repetitius.

Les quitinases són glicosil hidrolases que catalitzen la hidròlisi d'enllaços glicosídics β 1,4 de polímers de quitina i quitosà. Algunes quitinases presenten també activitat de transglicosidació (TG) mitjançant la qual són capaces d'introduir nous enllaços glicosídics entre un molècula donadora i una acceptora amb la consegüent generació de COS oligomèrics. Aquestes quitinases poden utilitzar-se per a la polimerització *in vitro* de COS, però l'activitat hidrolítica que presenten tendeix a despolimeritzar els productes de TG ràpidament.

Amb l'objectiu d'augmentar l'activitat de TG de quitinases per a la obtenció de nous COS estructuralment definits, en aquesta tesi s'ha aplicat l'estratègia glicosintasa (GS) sobre diferents quitinases de la família GH18 per mutació del residu assistent i l'ús d'un derivat oxazolina com a donador, amb les que s'ha aconseguit una important disminució de l'activitat hidrolítica i un increment de l'activitat de TG. Tot i l'increment de l'activitat de TG, l'activitat hidrolítica residual que presenten dona lloc a la hidròlisi dels productes GS i de TG formats que impedeix augmentar el rendiment. Amb aquest propòsit s'ha optat per la modificació d'un dels enzims seleccionats per enginyeria de proteïnes. Mitjançant mutagènesi dirigida s'ha aconseguit incrementar el rendiment en polímer fins a un 60% (p/p) amb l'ús d'un derivat oxazolina d'un COS de quitina (el 60% del qual correspon al producte de la reacció GS), i també la obtenció d'oligòmers/polímers de quitosà amb l'ús de derivats oxazolina de quitooligosacàrids parcialment desacetilats, estructuralment definits.

Sumario

Los quitosanos y quitooligosacáridos (COS), obtenidos por enzimas modificadores de la quitina, presentan un elevado interés biotecnológico debido al importante número de aplicaciones en áreas tan dispares como son la agricultura, el tratamiento de aguas, la industria alimenticia, la biomedicina y la cosmética, entre otras. Entre las funciones biológicas dentro de la industria médico-farmacéutica destacan actividades antiinflamatorias, inmunoestimulantes, antimicrobianas, antitumorales, de prevención de la obesidad y control del colesterol, como vectores de terapia génica y de promoción de la cicatrización y regeneración de la piel. Estas propiedades biológicas de los COS no solo son dependientes del grado de polimerización y acetilación sino que posiblemente también dependen del patrón de acetilación de estos.

Actualmente la síntesis de COS presenta dos problemas principales: poca reproducibilidad entre lotes y el origen animal de los productos, que dificultan su utilización en la industria médico-farmacéutica. Con el objetivo de sobreponerse a estas limitaciones se ha pretendido desarrollar una plataforma biotecnológica para la producción de COS de bajo peso molecular con secuencias definidas. El proyecto pretende utilizar la actividad transglicosidasa de las quitinasas como herramienta sintética para obtener oligómeros de quitina y quitosano definidos con patrones de acetilación repetitivos.

Las quitinasas son glicosil hidrolasas que catalizan la hidrólisis de enlaces glicosídicos β 1,4 de polímeros de quitina y quitosano. Algunas quitinasas presentan también actividad de transglicosidación (TG) mediante la cual son capaces de introducir nuevos enlaces glicosídicos entre una molécula donadora y una aceptora con la consecuente generación de COS oligoméricos. Estas quitinasas pueden utilizarse para la polimerización *in vitro* de COS, pero la actividad de hidrólisis que presentan tiende a despolimerizar los productos de TG rápidamente.

Con el objetivo de aumentar la actividad de TG de quitinasas para la obtención de nuevos COS estructuralmente definidos, en esta tesis se ha aplicado la estrategia glicosintasa (GS) sobre diferentes quitinasas de la familia GH18 por mutación del residuo asistente y el uso de un derivado oxazolina como donador, con las que se ha logrado una importante disminución de la actividad de hidrólisis y un incremento de la actividad de TG. A pesar del incremento de la actividad de TG, la actividad hidrolasa residual que presentan da lugar a la hidrólisis de los productos GS y de TG formados que impide el aumento del rendimiento. Con este propósito se ha optado por la modificación de una de las enzimas seleccionadas por ingeniería de proteínas. Mediante mutagénesis dirigida se ha logrado incrementar el rendimiento en polímero hasta un 60% (p/p) con el uso de un derivado oxazolina de un COS de quitina (el 60% del cual corresponde al producto de la reacción GS), y también la obtención de oligómeros/polímeros de quitosano con el uso de derivados oxazolina de quitooligosacáridos parcialmente desacetilados, estructuralmente definidos.

Summary

Chitosan and chitooligosaccharides (COS), obtained by chitin-modifying enzymes, are of interest to a wide variety of areas such as agriculture, water treatment, food industry, biomedicine and cosmetics, among others, due to their important number of applications. Among the biological roles on the medical-pharmaceutical industry are amply demonstrated anti-inflammatory, immunostimulants, antimicrobians and antitumorals activities, obesity prevention and cholesterol control, ability of gene and drug delivery, wound healing and skin regeneration activities. These biological properties are not only related to their degree of polymerization and acetylation, but possibly they are also dependent on their pattern of acetylation.

Nowadays the synthesis of COS has two main hurdles: a poor reproducibility between batches and the animal origin of the products, which difficult their usage in the medical-pharmaceutical industry. With the goal of overcome these limitations, we were aiming at the development of a biotechnological platform for the production of sequence-defined low molecular weight chitosans. The project addresses the use of the transglycosidase activity of chitinases as a synthetic tool to obtain well-defined oligomers with repeating patterns of acetylation.

Chitinases are glycoside hydrolases that catalyse the hydrolysis of β 1,4 glycosidic bonds of chitin and chitosan polymers. Some chitinases have also transglycosydase activity (TG), allowing them to introduce new glycosidic bonds between donor and acceptor sugar molecules with the consequent generation of oligomeric COS. Such transglycosylating chitinases can be used for the *in vitro* polymerization of COS, but the hydrolytic activity of these enzymes tends to depolymerise the TG products quickly.

With the main goal of increase TG activity of chitinases to obtain new well-defined COS, in the present work we use the glycosynthase technology (GS) on different GH18 chitinases by mutation of the assisting residue and the use of an activated glycosyl donor (an oxazoline derivative), with which an important diminish of the hydrolytic activity and an increase of the TG activity have been obtained. Despite the higher TG activity, the residual hydrolytic activity of the assisting residue mutants results in the hydrolysis of the GS and TG products that not allow the increase of the polymer yield. Protein engineering (rational approach) was used to modify one of the selected enzymes. By site-directed mutagenesis it has been possible to increase the polymer yield up to 60% (w/w) using a chitin oligomer oxazoline derivative (the 60% of which corresponds to the product of the GS reaction), and it has also been possible to obtain chitosan oligomers/polymers using structurally defined partially deacetylated COS oxazoline derivatives.

LLISTAT DE FIGURES

Llistat de figures

Figura I. 1. Mecanismes catalítics de les glicosidases.....	3
Figura I. 2. Reaccions de transglicosidació catalitzades per glicosidases amb retenció de configuració.....	4
Figura I. 3. Enzims glicosintasa.	6
Figura I. 4. Estructures químiques de la quitina i els quitosans.	8
Figura I. 5. Relació filogenètica dels dominis catalítics dels membres de la família 18 de les glicosil hidrolases.	13
Figura I. 6. Estructura de la quitinasa B de <i>Serratia marcescens</i>	14
Figura I. 7. Mecanisme catalític assistit per substrat present en les quitinases de la família GH18.....	16
Figura I. 8. Residus clau de la maquinària catalítica de quitinases de la família GH18.	17
Figura I. 9. Mecanisme de reacció d' <i>SmChiB</i> obtingut a partir dels estudis computacionals de QM/MM.	18
Figura 1.1. Logotip HMM de la família GH18	32
Figura 1.2. Resum estructural de les quitinases de <i>S. marcescens</i>	44
Figura 1.3. Organització en dominis de la quitinasa A de <i>Thermococcus kodakaraensis</i> (<i>TkChiA</i>) i models esquemàtics dels mutants.....	52
Figura 1.4. Model esquemàtic de l'organització en dominis de <i>TkChiA</i> i PF- <i>ChiA</i> , i dels mutants recombinants de PF- <i>ChiA</i>	53
Figura 1.5. Alineament de seqüència dels dominis catalítics de les quitinases GH18 seleccionades	55
Figura 1.6. Arbre filogenètic de les quitinases GH18 seleccionades	56
Figura 1.7. Superposició dels dominis catalítics de les quitinases GH18 seleccionades	57
Figura 1.8. Organització en dominis dels gens sintètics de les quitinases seleccionades	57
Figura 2.1. Esquema de la reacció d'hidròlisi de (GlcNAc) _n -MU	62
Figura 2.2. Determinació de l'activitat específica d' <i>SpChiD wt</i> i del mutant D151A per als diferents substrats fluorogènics.....	63
Figura 2.3. Esquema dels possibles productes d'hidròlisi de (GlcNAc) ₄	64
Figura 2.4. Comprovació de l'aturada enzimàtica	65
Figura 2.5. Cromatograma dels patrons de quitoooligosacàrids obtingut a partir del mètode HPLC establert.....	66
Figura 2.6. Rectes patró utilitzades per a la quantificació de substrat restant i la formació de productes	67
Figura 2.7. Determinació de la linealitat del mètode analític desenvolupat.....	68

Figura 2.8. Evolució de la reacció d'hidròlisi de (GlcNAc) ₄	70
Figura 2.9. Curs de reacció de l'activitat hidrolasa d' <i>SpChiD wt</i>	72
Figura 2.10. Determinació de l'activitat específica d' <i>SpChiD wt</i>	72
Figura 2.11. Curs de reacció de l'activitat hidrolasa d' <i>SpChiD D151A</i>	73
Figura 2.12. Determinació de les velocitats específiques d' <i>SpChiD D151A</i>	73
Figura 2.13. Síntesi de (GlcNAc) ₂ -ox mitjançant la utilització de CDMBI	76
Figura 2.14. Espectre d' ¹ H-RMN de la síntesi de (GlcNAc) ₂ -ox.	77
Figura 2.15. Síntesi de (GlcNAc) ₅ -ox mitjançant la utilització de CDMBI.....	77
Figura 2.16. Anàlisi del producte de síntesi del derivat oxazolina de pentaacetilquitopentaosa.	78
Figura 2.17. Cromatograma de purificació <i>Strep-Trap</i> del domini catalític de <i>VcCDA</i>	79
Figura 2.18. SDS-PAGE del domini catalític de <i>VcCDA</i>	79
Figura 2.19. Cromatograma d'HPLC-MS de la reacció de desacetilació de (GlcNAc) ₅ amb <i>VcCDA</i>	80
Figura 2.20. Cromatogrames d'HPLC-MS del procés de purificació de DP5(N)	81
Figura 2.21. Síntesi d'ADAAA-ox mitjançant la utilització de CDMBI.....	81
Figura 2.22. Anàlisi del producte de síntesi del derivat oxazolina d'ADAAA.	82
Figura 2.23. Cromatogrames d'HPLC-MS de la reacció de desacetilació de (GlcNAc) ₃ amb <i>VcCDA</i>	83
Figura 2.24. Síntesi d'ADA-ox mitjançant la utilització de CDMBI	83
Figura 2.25. Cromatogrames d'HPLC-MS de la reacció de síntesi d'ADA-ox	84
Figura 2.26. Estabilitat del donador oxazolina a diferents valors de pH	85
Figura 2.27. Esquema de l'assaig acoblat de cribratge en placa per a la detecció de mutants glicosintasa.....	86
Figura 2.28. Activitat d'hidròlisi de la quitinasa d' <i>S. griseus</i>	86
Figura 2.29. Efecte de NaN ₃ sobre l'activitat d'hidròlisi de (GlcNAc) ₃ -MU de la quitinasa d' <i>S. griseus</i>	88
Figura 2.30. Efecte de NaN ₃ sobre l'activitat d'hidròlisi de (GlcNAc) ₃ -MU de la quitinasa d' <i>S. griseus</i> , assaig en microplaca.....	88
Figura 2.31. Espectre d'RMN de (GlcNAc) ₂ -ox tractada amb 360 mM d'NaN ₃	89
Figura 2.32. Esquema de la reacció d'auto-condensació de (GlcNAc) ₅ -ox	89
Figura 2.33. Espectre de MALDI-TOF-MS de la reacció control de (GlcNAc) ₅ -ox.....	90
Figura 2.34. Espectre de MALDI-TOF de la reacció de polimerització de (GlcNAc) ₅ -ox catalitzada per <i>SpChiD D151A</i>	91
Figura 3.1. Mecanisme de les quitinases GH18 que operen per catàlisi assistida per substrat.....	97

Figura 3.2. Alineament de seqüència de les quitinases seleccionades. S'observa el domini DxDxE conservat en totes elles.	98
Figura 3.3. Mapa d'un exemple de constructe de pET22b(+) amb el gen codificant per una quitinasa	98
Figura 3.4. Prova d'expressió de les quitinases GH18 seleccionades	99
Figura 3.5. SDS-PAGE de les quitinases GH18 wt seleccionades	100
Figura 3.6. SDS-PAGE dels mutants del residu assistent	101
Figura 3.7. Determinació de l'activitat específica de les quitinases i dels corresponents mutants del residu assistent per als diferents substrats fluorogènics.	103
Figura 3.8. Representació de la conversió de la reacció amb (GlcNAc) ₃ -MU	105
Figura 3.9. Representació esquemàtica del posicionament dels substrats fluorogènics en el centre actiu de les quitinases de la família GH18.	105
Figura 3.10. Curs de reacció de la hidròlisi de (GlcNAc) ₄	107
Figura 3.11. Determinació de l'activitat específica de les quitinases i dels corresponents mutants del residu assistent per a (GlcNAc) ₄	109
Figura 3.12. Representació esquemàtica del posicionament de (GlcNAc) ₄ en el centre actiu de les quitinases de la família GH18.	111
Figura 3.13. Espectre de masses dels productes de la fracció insoluble de la reacció de transglicosidació de (GlcNAc) ₅ catalitzada pels mutants del residu assistent de quitinases GH18.	114
Figura 3.14. Espectre de masses dels productes de la fracció insoluble de la reacció de polimerització de (GlcNAc) ₅ -ox catalitzada pels mutants del residu assistent de les quitinases GH18.	118
Figura 3.15. Representació esquemàtica dels COS obtinguts en la reacció de polimerització de (GlcNAc) ₅ -ox.....	121
Figura 4.1. Estructura de la quitinasa <i>SpChiD</i> (PDB: 4NZC)	128
Figura 4.2. Estructura d' <i>SpChiD</i> on es mostra els residus del motiu DxDxE (PDB: 4NZC) ...	129
Figura 4.3. Perfils de pH i temperatura d' <i>SpChiD</i>	130
Figura 4.4. Curs de reacció de l'activitat hidrolítica d' <i>SpChiD</i> wt i del mutant D151A amb GlcNAc-MU.....	138
Figura 4.5. Espectre de MALDI-TOF dels productes de la fracció insoluble de la reacció de polimerització de (GlcNAc) ₅ -ox catalitzada per l'enzim <i>SpChiD</i> wt.	139
Figura 4.6. Representació dels productes de TG presents en la reacció de polimerització de (GlcNAc) ₅ -ox catalitzada per <i>SpChiD</i> D151A en funció de la concentració d'enzim i de la concentració de donador.....	140
Figura 4.7. Espectre de MALDI-TOF dels productes de la fracció insoluble de la reacció de condensació de (GlcNAc) ₅ -ox com a donador i (GlcNAc) ₂ com a acceptor, catalitzada pel mutant <i>SpChiD</i> D151A.....	141

Figura 4.8. Espectre de MALDI-TOF dels productes de la fracció insoluble de la reacció de condensació de (GlcNAc) ₅ -ox com a donador i ADAAA com a acceptor, catalitzada pel mutant <i>SpChiD</i> D151A.....	142
Figura 4.9. Representació esquemàtica dels possibles COS formats en la reacció de condensació d'ADAAA-ox	143
Figura 4.10. Espectre de MALDI-TOF dels productes de la fracció soluble de la reacció de polimerització d'ADAAA-ox catalitzada pel mutant <i>SpChiD</i> D151A.....	144
Figura 4.11. Espectre de MALDI-TOF dels productes de la fracció insoluble de la reacció de polimerització d'ADAAA-ox catalitzada pel mutant <i>SpChiD</i> D151A.....	144
Figura 4.12. Estructura d' <i>SpChiD</i> en complex amb (GlcNAc) ₅	146
Figura 4.13. Estructura d' <i>SpChiD</i> on es mostra els residus proposats a ser substituïts en la 2a generació GS	147
Figura 4.14. Residus proposats a ser substituïts en la 2a generació GS	148
Figura 4.15. SDS-PAGE dels mutants dobles d' <i>SpChiD</i>	149
Figura 4.16. Espectre de MALDI-TOF dels productes de la fracció insoluble de la reacció de polimerització de (GlcNAc) ₅ -ox catalitzada pels mutants dobles d' <i>SpChiD</i>	152
Figura 4.17. Comparació del curs de reacció de l'activitat hidrolítica dels mutants D151A i D149A/D151A amb GlcNAc-MU.....	156
Figura 4.18. Representació dels productes de TG presents en la reacció de polimerització de (GlcNAc) ₅ -ox catalitzada per <i>SpChiD</i> D149A/D151A en funció de la concentració d'enzim i de la concentració de donador	156
Figura 4.19. Espectre de MALDI-TOF dels productes de la fracció soluble de la reacció de polimerització d'ADAAA-ox catalitzada pel mutant <i>SpChiD</i> D149A/D151A.	157
Figura 4.20. Espectre de MALDI-TOF dels productes de la fracció insoluble de la reacció de condensació de (GlcNAc) ₅ -ox com a donador i (GlcNAc) ₂ com a acceptor, catalitzada pel mutant <i>SpChiD</i> D149A/D151A.....	158
Figura 4.21. Estructura d' <i>SpChiD</i> on es mostra els residus proposats a ser substituïts en la 3a generació GS.	159
Figura 4.22. Residus proposats a ser substituïts en la 3a generació GS.	162
Figura 4.23. SDS-PAGE dels mutants triples d' <i>SpChiD</i>	164
Figura 4.24. Espectre de MALDI-TOF dels productes de la fracció insoluble de la reacció de polimerització de (GlcNAc) ₅ -ox catalitzada pels mutants triples d' <i>SpChiD</i>	167
Figura 4.25. Comparació del curs de reacció de l'activitat hidrolítica dels mutants D149A/D151A i Y28A/D149A/D151A amb GlcNAc-MU.....	171
Figura 4.26. Espectre de MALDI-TOF dels productes de la fracció insoluble de la reacció de polimerització de (GlcNAc) ₅ -ox, catalitzada pel mutant <i>SpChiD</i> Y28A/D149A/D151A.	172
Figura 4.27. Espectre de MALDI-TOF dels productes de la fracció soluble de la reacció de polimerització d'ADAAA-ox catalitzada pel mutant <i>SpChiD</i> Y28A/D149A/D151A..	173
Figura 4.28. Esquema de l'estratègia seguida per a la obtenció de polímers de quitosà amb patró d'acetilació definit a partir de (GlcNAc) ₃	174

Figura 4.29. Espectre de MALDI-TOF dels productes de la mescla de reacció de polimerització d'ADA-ox, catalitzada pel mutant <i>SpChiD</i> Y28A/D149A/D151A.	175
Figura 4.30. Espectre de MALDI-TOF dels productes de la fracció insoluble de la reacció de condensació de (GlcNAc) ₅ -ox com a donador i (GlcNAc) ₂ com a acceptor, catalitzada pel mutant <i>SpChiD</i> Y28A/D149A/D151A.....	175
Figura 4.31. Espectre de MALDI-TOF dels productes de la fracció insoluble de la reacció de condensació de (GlcNAc) ₅ -ox com a donador i ADAAA com a acceptor, catalitzada pel mutant <i>SpChiD</i> Y28A/D149A/D151A.....	176
Figura 4.32. Espectre de MALDI-TOF dels productes de la fracció insoluble de la reacció de condensació d'ADAAA-ox com a donador i (GlcNAc) ₅ com a acceptor, catalitzada pel mutant <i>SpChiD</i> Y28A/D149A/D151A.....	177
Figura 4.33. Rendiment de l'activitat GS amb (GlcNAc) ₅ -ox com a donador.....	178
Figura 4.34. Curs de reacció de l'activitat hidrolítica de <i>TkChiA</i> wt i del mutant D1022A amb (GlcNAc) ₂ -MU.	181
Figura 4.35. Curs de reacció de l'activitat hidrolítica dels mutants <i>TkChiA</i> D1022A i D1020A/D1022A amb (GlcNAc) ₂ -MU.	181
Figura 4.36. Espectre de MALDI-TOF dels productes de la fracció insoluble de la reacció de polimerització de (GlcNAc) ₅ -ox, catalitzada pel mutant <i>TkChiA</i> D1020A/D1022A.	182
Figura 4.37. Espectre de MALDI-TOF dels productes de la fracció soluble de la reacció de polimerització d'ADAAA-ox catalitzada pel mutant <i>TkChiA</i> D1020A/D1022A.	183
Figura 4.38. Model estructural del segon domini catalític de la quitinasa <i>TkChiA</i>	185
Figura 4.39. Model estructural de <i>TkChiA</i> en complex amb (GlcNAc) ₅ , residus subjeti -1.	186
Figura 4.40. Model estructural de <i>TkChiA</i> en complex amb (GlcNAc) ₅ , residus subjets positius	188
Figura 4.41. Model estructural de <i>TkChiA</i> en complex amb (GlcNAc) ₅ , altres residus.....	189

LLISTAT DE TAULES

Llistat de taules

Taula I. 1. Principals aplicacions dels quitosans	9
Taula 1.1. Quitinases GH18 amb activitat de transglicosidació reportada utilitzant quitooligosacàrids (COS) com a substrat	33
Taula 1.2. Quitinases GH18 amb activitat de transglicosidació reportada utilitzant derivats oxazolina de COS com a substrat	42
Taula 1.3. Estructures 3D de quitinases GH18 procariotes en complex amb substrat	43
Taula 1.4. Quitinases GH18 procariotes seleccionades per al disseny d'una glicosintasa	45
Taula 2.1. Condicions de l'assaig fluorimètric per a la determinació de l'activitat específica d'hidròlisi.....	62
Taula 2.2. Activitat específica ($V_0/[E]$) d' <i>SpChiD wt</i> i del mutant D151A. Lot 1.....	63
Taula 2.3. Activitat específica ($V_0/[E]$) d' <i>SpChiD wt</i> i del mutant D151A.....	63
Taula 2.4. Condicions cromatogràfiques finals d'HPLC per a la separació i detecció de (GlcNAc) ₄ i els seus productes d'hidròlisi.....	65
Taula 2.5. Condicions finals del mètode de detecció MS.....	66
Taula 2.6. Repetibilitat del mètode analític.	69
Taula 2.7. Límit de detecció i quantificació de (GlcNAc) ₂ , (GlcNAc) ₃ i (GlcNAc) ₄	69
Taula 2.8. Condicions de l'assaig de determinació de l'activitat específica d'hidròlisi de quitinases GH18, (GlcNAc) ₄ com a substrat.	71
Taula 2.9. Velocitats específiques ($V_0/[E]$) per al lot 1 d' <i>SpChiD wt</i>	72
Taula 2.10. Velocitats específiques ($V_0/[E]$) per al lot 1 d' <i>SpChiD D151A</i>	73
Taula 2.11. Taula resum de les velocitats específiques ($V_0/[E]$) per a <i>SpChiD</i>	74
Taula 2.12. Passos per a la determinació de l'activitat hidrolasa de (GlcNAc) ₄	74
Taula 2.13. Reaccions de comprovació de l'assaig acoblat	87
Taula 2.14. Condicions de l'assaig d'activitat glicosintasa	90
Taula 2.15. Anàlisi dels adductes presents en la mostra de la reacció de polimerització de (GlcNAc) ₅ -ox.	93
Taula 3.1. Activitat específica ($V_0/[E]$) de les diferents quitinases <i>wt</i> i els mutants del residu assistent utilitzant (GlcNAc) _n com a substrats.....	104
Taula 3.2. Activitat específica ($V_0/[E]$) de les diferents quitinases <i>wt</i> i els mutants del residu assistent utilitzant (GlcNAc) ₄ com a substrat	110
Taula 3.3. Productes de TG a partir de (GlcNAc) ₅ com a substrat obtinguts pels mutants del residu assistent	115
Taula 3.4. Productes glicosintasa de la reacció de polimerització de (GlcNAc) ₅ -ox catalitzada pels mutants del residu assistent	119
Taula 4.1. Activitat hidrolítica i de TG dels mutants de la quitinasa <i>SpChiD</i> reportats en bibliografia	132

Taula 4.2. Activitat hidrolítica dels dobles mutants d' <i>SpChiD</i> amb substrats fluorogènics.	149
Taula 4.3. Activitat hidrolítica dels dobles mutants d' <i>SpChiD</i> amb (GlcNAc) ₄ com a substrat	150
Taula 4.4. Productes glicosintasa de la reacció de polimerització de (GlcNAc) ₅ -ox catalitzada pels mutants de la 2a generació GS d' <i>SpChiD</i>	154
Taula 4.5. Activitat hidrolítica dels triples mutants d' <i>SpChiD</i> amb substrats fluorogènics .	164
Taula 4.6. Activitat hidrolítica dels triples mutants d' <i>SpChiD</i> amb (GlcNAc) ₄ com a substrat	165
Taula 4.7. Productes glicosintasa de la reacció de polimerització de (GlcNAc) ₅ -ox catalitzada pels mutants de la 3a generació GS d' <i>SpChiD</i>	169
Taula 4.8. Activitat hidrolítica dels mutants de <i>TkChiA</i> amb substrats fluorogènics.....	181
Taula 4.9. Activitat hidrolítica dels mutants de <i>TkChiA</i> amb (GlcNAc) ₄ com a substrat	182
Taula E. 1. Seqüència dels oligonucleòtids dels mutants puntuals per a mutagènesi dirigida	198
Taula E. 2. Seqüència dels oligonucleòtids dels mutants dobles d' <i>SpChiD</i>	198
Taula E. 3. Seqüència dels oligonucleòtids del mutant doble de <i>TkChiA</i>	199
Taula E. 4. Seqüència dels oligonucleòtids dels mutants triples d' <i>SpChiD</i>	199
Taula E. 5. Condicions finals del mètode de detecció MS	202
Taula E. 6. Preparació estocs dels patrons d'HPLC-MS.....	202

ABREVIATURES

Abreviatures

4-MU	4-metilumbeliferona
A	GlcNAc, quan fa referència a l'anotació d'oligosacàrids de quitina/quitosa
ACN	Acetonitril
ADN	Àcid desoxiribonucleic
BCA	Àcid <i>bicinchonínic</i>
CAZy	<i>Carbohydrate Active enZymes</i>
CBM	<i>Carbohydrate-Binding Module</i> (Domini d'unió a carbohidrats)
CD	<i>Catalytic Domain</i> (Domini catalític)
CDMBI	clorur de 2-clor-1,3-dimetil-1H-benzimidazole-3-oni
ChBD	<i>Chitin Binding Domain</i> (Domini d'unió a quitina)
COS	<i>Chitin Oligosaccharides</i> (Oligosacàrids de quitina)
CV	Coefficient de Variació
D	GlcNH ₂ , quan fa referència a l'anotació d'oligosacàrids de quitosa
DA	<i>Degree of Acetylation</i> (Grau d'acetilació)
DHB	Àcid 2,3-dihidroxibenzoic
DMBI	1,3-dimetil-1H-benzimidazole-2-ona
DP	<i>Degree of Polymerization</i> (Grau de polimerització)
DP _n	Quitooligosacàrid amb un grau de polimerització n
DP(N) _n	Quitooligosacàrid amb un grau de polimerització n monodesacetilat
DP(N,N) _n	Quitooligosacàrid amb un grau de polimerització n didesacetilat
DP(N,N,N) _n	Quitooligosacàrid amb un grau de polimerització n tridesacetilat
DMSO	Dimetil sulfòxid
FnIII	<i>Fibronectin-type III domain</i> (Domini de la fibronectina tipus III)
(GlcNAc) _n -MU	Oligosacàrid de quitina amb un grau de polimerització n unit al fluoròfor 4-metilumbeliferona
(GlcNAc) _n -pNP	Quitooligosacàrid amb un grau de polimerització n unit al cromòfor <i>p</i> -nitrofenil
ESI	<i>Electro Spray Ionization</i> (Ionització per electroesprai)
FR	Factor de resposta
GH	Glicosil Hidrolases o Glicosidases
GlcNAc	<i>N</i> -acetil glucosamina
GlcNH ₂	Glucosamina
GS	Glicosintasa

HABA	Àcid 2-hidroxi-4-aminobenzoic
HILIC	<i>Hydrophilic Interaction Chromatography</i> (Cromatografia Líquida d'Interacció Hidrofílica)
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografia Líquida d'Alta Resolució)
IPTG	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosid
LB	Medi de cultiu Luria Bertani
LD	Límit de detecció
LQ	Límit de quantificació
MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time Of Flight</i> (Desorció/ionització mitjançant làser assistida per Matriu - Temps de vol)
MS	<i>Mass Spectrometry</i> (Espectrometria de masses)
Mw	<i>Molecular Weight</i> (Pes Molecular)
OD ₆₀₀	Densitat òptica a 600 nm
ON	<i>Over-Night</i> (Durant la nit)
PA	<i>Pattern of Acetylation</i> (Patró d'acetilació)
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i> (Tampó fosfat salí)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reacció en cadena de la polimerasa)
PKD	<i>Polycystic Kidney Disease</i>
PMSF	Fluorur de fenilmetanosulforil
RMN	Ressonància Magnètica Nuclear
rpm	Revolucions per minut
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate-PoliAcrylamide Gel Electrophoresis</i> (Electroforesis en gel de poliacrilamida amb dodecilsulfat sòdic)
SIM	<i>Single Ion Monitoring</i>
TG	Activitat de Transglicosidació
TLC	<i>Thin Layer Chromatography</i> (Cromatografia de capa fina)
UV	Ultraviolada
VMD	<i>Visual Molecular Dynamics</i>
V ₀	Velocitat inicial
wt	<i>wild type</i> (versió salvatge)

INTRODUCCIÓ

Introducció

I.1. Glicosidases com a eina per a la síntesi de glicòsids

Els carbohidrats són biomolècules presents en tots els organismes vius i participen en una àmplia varietat de funcions biològiques que inclouen processos de reconeixement cel·lular, regulació i senyalització, proliferació cel·lular, interaccions patogen-hoste, resposta immunitària, rol com a components estructurals de les parets cel·lulars i emmagatzematge d'energia (Whitelock and Iozzo, 2005; Adamczyk, Tharmalingam and Rudd, 2012; Schnaar, 2016).

La síntesi de glicòsids i glicoconjugats naturals i no-naturals, estructuralment definits, té una elevada rellevància en els camps de la glicobiologia i la glicoquímica i conseqüentment hi ha un elevat interès en el desenvolupament d'estratègies eficients per a la síntesi d'aquests tant química com enzimàticament. Els processos de síntesi química tradicional requereixen etapes de protecció i desprotecció així com estratègies d'activació per a mantenir la regio- i estereoselectivitat dels productes, que resulten en processos complexos amb rendiments finals normalment baixos (Demchenko, 2008). En canvi, la síntesi enzimàtica ofereix avantatges a causa de l'elevada selectivitat dels enzims, que possibiliten el control tant de la configuració anomèrica com de la regioselectivitat, sense la necessitat de l'ús de grups protectors.

L'ús d'enzims com a biocatalitzadors proporciona l'alternativa a les limitacions de la síntesi química, donades les seves particularitats: elevada activitat catalítica, absència de reaccions secundàries, condicions de reacció suaus i sobretot una alta estereoselectivitat i regioselectivitat. El conjunt d'enzims actius en carbohidrats, involucrats en la formació, modificació i hidròlisi d'oligosacàrids, polisacàrids i glicoconjugats, es classifiquen a la base de dades CAZy (*Carbohydrate Active Enzymes database*, www.cazy.org) (Lombard *et al.*, 2014) en funció de la similitud de seqüència i conseqüentment de plegaments comuns en les seves estructures. Segons l'activitat del seu domini catalític es classifiquen en (i) glicosiltransferases (GTs), que catalitzen la formació d'enllaços glicosídics; (ii) glicosil hidrolases o glicosidases (GHs), encarregades d'hidrolitzar enllaços glicosídics; (iii) polisacàrid liases (PLs), responsables de l'escissió no hidrolítica d'enllaços glicosídics; (iv) esterases de carbohidrats (CEs), que hidrolitzen els èsters de carbohidrats i, (v) activitats auxiliars (AAs), enzims redox que actuen conjuntament amb altres enzims actius en carbohidrats. També es classifiquen a CAZy els mòduls d'unió a carbohidrats (CBMs, *carbohydrate-binding modules*), dominis sense funció catalítica que contribueixen a la unió i accessibilitat dels substrats als centres catalítics d'altres CAZymes.

Les dues famílies implicades en la formació d'enllaços glicosídics són les glicosiltransferases, que transfereixen un monosacàrid donador activat a un acceptor, i les glicosidases, que a més d'hidrolitzar enllaços glicosídics, també són capaces de catalitzar la formació d'aquests invertint la reacció d'hidròlisi o mitjançant reaccions de transglicosidació. A diferència de la síntesi de carbohidrats mitjançant GTs, que requereix substrats complexos i estrictes

especificitats de substrat, i alhora és complicada a causa de la dificultat d'obtenció dels enzims i la poca estabilitat d'aquests, la síntesi mitjançant GHs mostra avantatges tant en la obtenció i estabilitat dels enzims com en la poca especificitat de substrat en relació a l'acceptor i l'ús de substrats accessibles.

I.1.1. Glicosil Hidrolases o Glicosidases (GHs)

Les glicosidases es divideixen en dues classes segons el mecanisme d'acció: enzims amb inversió de la configuració anomèrica i enzims amb retenció de la configuració. A més, en funció de la localització de l'enllaç glicosídic hidrolitzat dins la cadena oligomèrica, les glicosidases s'agrupen en enzims *exo*- (alliberen un monosacàrid o disacàrid d'un dels extrems de la cadena, principalment l'extrem no-reductor) o *endo*- (actuen en els enllaços interns de la cadena). Aquesta regioespecificitat de tall és conseqüència de la topologia del centre actiu (Davies and Henrissat, 1995).

Ambdues classes, GHs amb inversió i GHs amb retenció de la configuració, actuen mitjançant un mecanisme catalític d'àcid-base general i presenten dos residus catalítics essencials, generalment aspartats o glutamats (Mccarter and Withers, 1994), però difereixen en el mecanisme catalític.

Les glicosidases que actuen amb inversió de configuració ho fan mitjançant un mecanisme d'únic desplaçament via un estat de transició de tipus oxocarbocatiònic. El residu que actua com a base general incrementa la nucleofília d'una molècula d'aigua, la qual ataca al carboni anomèric al mateix temps que el residu àcid general assisteix el trencament de l'enllaç *O*-glicosídic cedint un protó a l'oxigen glicosídic a escindir (Figura I. 1A). En canvi, les glicosidases que actuen mitjançant retenció de configuració segueixen una reacció de doble-desplaçament en la que es dona la formació i hidròlisi d'un intermedi enzim-substrat (intermedi covalent glicosil-enzim). En la primera etapa, anomenada glicosilació, el grup àcid/base cedeix un protó a l'oxigen glicosídic mentre que el residu nucleòfil ataca al carboni anomèric formant l'intermedi covalent. En la segona etapa, desglicosilació, el residu catalític prèviament desprotonat actua com a base recuperant un protó d'una molècula d'aigua, la qual ataca al carboni anomèric, rendint el producte d'hidròlisi amb la mateixa configuració anomèrica que el glicòsid de partida (Figura I. 1B). Existeix una variant del mecanisme amb retenció de configuració, present en glicosidases que catalitzen la hidròlisi de l'enllaç glicosídic de sucres que presenten un grup 2-acetamido (quitinases GH18, hexosaminidases GH20, hialuronidases GH56, endo- β -acetilglucosaminidases GH84 i GH85 i β -*N*-acetilgalactosaminidases GH123). Aquestes glicosidases no presenten nucleòfil, i actuen mitjançant una catàlisi assistida per substrat, on el grup *N*-acetil del substrat actua com a nucleòfil intern donant lloc a la formació d'un intermedi oxazolina, que en el segon pas de reacció és atacat per una molècula d'aigua, assistida per la base conjugada del residu àcid general, donant lloc al producte amb retenció de la configuració anomèrica (Figura I. 1C). Aquests enzims presenten un residu auxiliar que forma un pont d'hidrogen amb el NH- del grup acetamida assistint la formació de l'intermedi oxazolina (Tews *et al.*, 1997).

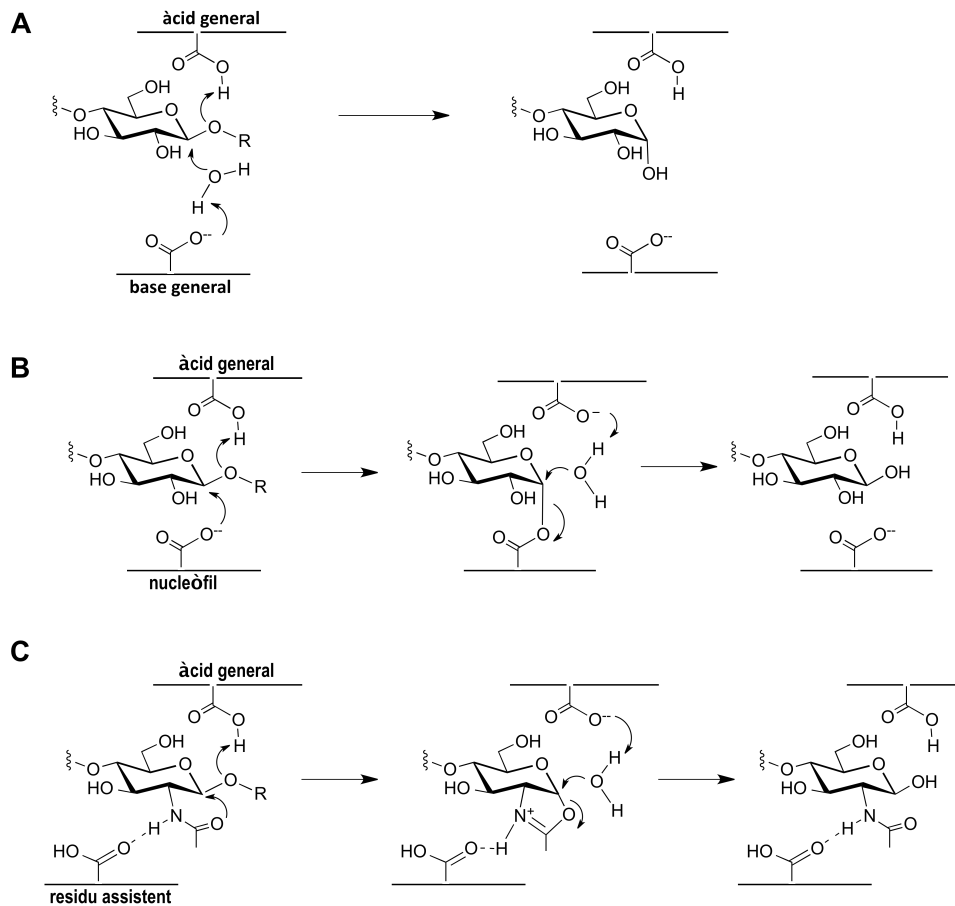


Figura I. 1. Mecanismes catalítics de les glicosidases

A) GHs amb inversió de configuració, B) GHs amb retenció de configuració amb presència de nucleòfil, a través de la formació de l'intermedi glicòsid-enzim i C) GHs amb retenció de configuració mitjançant un mecanisme catalític assistit per substrat, a través de la formació de l'intermedi oxazolini/oxazolina. Adaptada de Planas *et al.* (Planas, Fajjes and Codera, 2015)

Les glicosidases amb retenció de configuració a més de catalitzar la reacció d'hidròlisi de l'enllaç glicosídic també poden catalitzar la formació d'aquest. El potencial d'aquestes glicosidases com a eina per a la síntesi regio- i estereoespecífica de glicòsids s'està explotant des dels anys 80. Les dues estratègies clàssiques més destacades en la síntesi enzimàtica d'enllaços glicosídics es basen en invertir la reacció d'hidròlisi (i) desplaçant l'equilibri cap a la formació de l'enllaç (control termodinàmic) o, (ii) utilitzant donadors glicosídics activats (control cinètic). L'estratègia de control termodinàmic es basa en el desplaçament de l'equilibri de reacció mitjançant l'alteració de les condicions d'aquesta, com per exemple, utilitzar elevades concentracions de substrat, augmentar la temperatura, o afegir solvents orgànics. Per altra banda, l'estratègia de control cinètic més comuna es basa en accelerar la formació de l'intermedi de reacció i afavorir que un sucre acceptor ataquí ràpidament aquest intermedi, abans que una molècula d'aigua. Per a aquesta estratègia s'utilitza donadors glicosídics activats (fluorurs de glicosil, arilglicòsids, oligosacàrids o oligosacàrids activats (oxazolines)) amb l'objectiu d'augmentar la concentració de l'intermedi enzim-substrat (Figura I. 2A) o oxazolina (Figura I. 2B) un cop

finalitzada la primera etapa del mecanisme catalític. Sota les condicions apropiades, un sucre acceptor nucleofílic pot interceptar l'intermedi de reacció i formar un nou enllaç glicosídic (producte de transglicosidació) amb la mateixa configuració anomèrica que el donador glicosídic.

L'eficiència de transglicosidació és depenent de com l'enzim pot acomodar el sucre acceptor per a competir contra una molècula d'aigua. S'han desenvolupat diferents estratègies per afavorir la transglicosidació respecte la hidròlisi, amb un èxit variable en funció de l'enzim i del donador/acceptor utilitzats, però tot i afavorir la formació de l'enllaç glicosídic, la reacció d'hidròlisi sempre es manté present, ja que els enzims segueixen essent hidrolíticament actius. El producte de transglicosidació esdevé substrat del propi enzim, i l'equilibri és desplaçat lentament cap a la hidròlisi. La competència entre hidròlisi i transglicosidació ve donada per dos processos: hidròlisi primària, referent a la hidròlisi de l'intermedi de reacció per l'atac d'una molècula d'aigua en l'etapa de desglicosilació, i hidròlisi secundària, referent a la hidròlisi del producte de transglicosidació que és substrat del propi enzim (Figura I. 2).

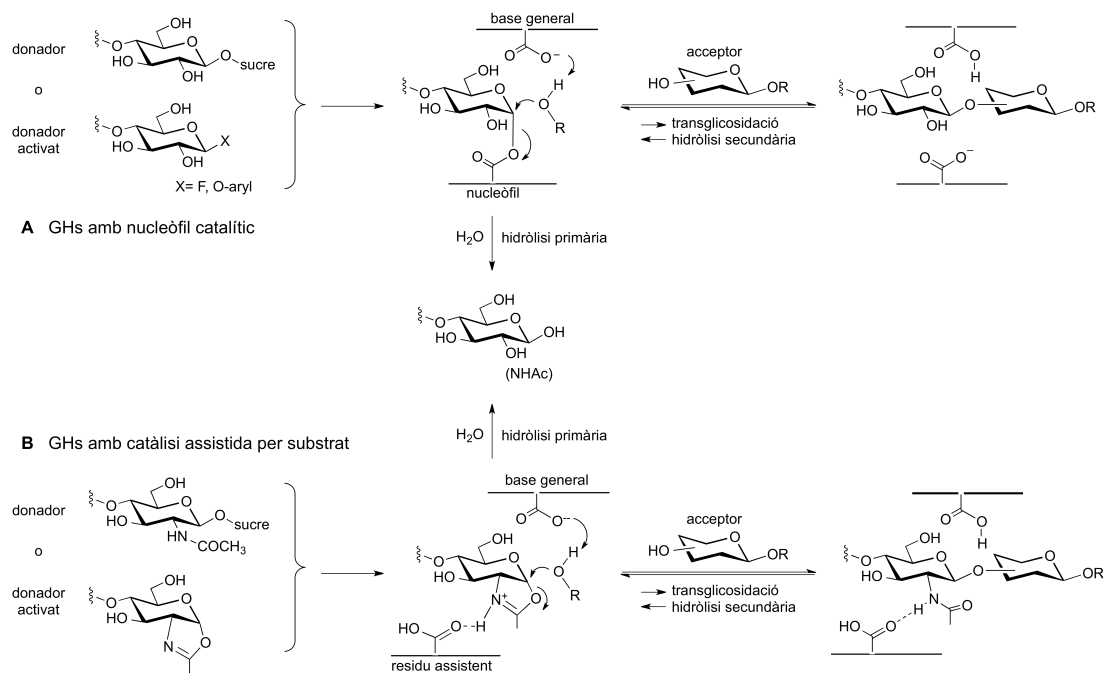


Figura I. 2. Reaccions de transglicosidació catalitzades per glicosidases amb retenció de configuració.

A) Glicosidases amb nucleòfil catalític, B) Glicosidases que operen amb catalisi assistida per substrat.

Adaptada de Planas *et al.* (Planas, Faijes and Codera, 2015)

L'eficàcia de transglicosidació de GHs també es pot incrementar mitjançant enginyeria de proteïnes. Les dues estratègies d'enginyeria generalment utilitzades consisteixen en el disseny racional en base a la informació estructural accessible i en estratègies d'evolució dirigida amb l'ús d'estratègies de cribratge potents. En l'estratègia de mutagènesi dirigida, els procediments que actualment es duen a terme es focalitzen en: (i) alterar les interaccions en el subseti -1, donant lloc a un increment de l'energia lliure dels estats de transició tant de l'etapa de glicosidació com de desglicosidació, que es tradueix en una

disminució de la velocitat d'hidròlisi; (ii) modificar els residus situats en els subsetis positius per a afavorir la unió de l'acceptor en l'etapa de desglicosidació, principalment amb la introducció de residus aromàtics i (iii) modificar els residus implicats en la interacció amb la molècula d'aigua catalítica (principalment substitucions de residus Tyr), o el bloqueig de l'entrada dels canals d'aigua (Bissaro *et al.*, 2015). Per altra banda, l'evolució dirigida permet incrementar l'activitat de transglicosidació sense el coneixement previ de la relació estructura-funció.

L'any 1998 es va aconseguir un gran progrés en la síntesi enzimàtica d'oligosacàrids amb el desenvolupament de l'estratègia glicosintasa (Mackenzie *et al.*, 1998; Malet and Planas, 1998), basada no només en l'enginyeria enzimàtica sinó també en l'ús d'un donador modificat.

1.1.2. Glicosintases

El concepte glicosintasa va ser introduït l'any 1998 tant en una *exo-glicosidasa* (Mackenzie *et al.*, 1998) com en una *endo-glicosidasa* (Malet and Planas, 1998). Les glicosintases són glicosil-hidrolases amb retenció de configuració en les que s'ha substituït el residu catalític que actua de nucleòfil per un residu no nucleofílic, donant lloc a un enzim hidrolíticament inactiu. Es tracta d'un redisseny racional del centre actiu que permet suprimir l'activitat hidrolasa. Aquests enzims, a causa de l'absència de nucleòfil, no poden formar l'intermedi glicosil-enzim, però són capaços de catalitzar la reacció de transglicosidació a partir d'un donador glicosídic activat (fluorurs de glicosil) amb configuració anomèrica oposada a la del substrat de la reacció d'hidròlisi, que mimetitza l'intermedi de reacció (Figura 1. 3A). A causa de la mutació del nucleòfil carboxilat per un residu més petit, la cavitat creada en el centre actiu permet la unió del donador activat. La transferència del glicòsid a un sucre acceptor és afavorida respecte la hidròlisi, i el producte de condensació no pot ser hidrolitzat per l'enzim a causa de la manca del nucleòfil catalític, incrementant així el rendiment de transglicosidació (Planas, Fajjes and Codera, 2015). Al llarg dels anys s'han desenvolupat diverses glicosintases de diferents famílies de glicosidases amb les que s'han obtingut importants rendiments en productes de condensació (Fajjes and Planas, 2007; Shaikh and Withers, 2008; Armstrong and Withers, 2013).

El concepte inicial desenvolupat en glicosidases amb retenció de configuració utilitzant donadors fluorur de glicosil va ser estès a altres aproximacions que inclouen (i) la generació *in situ* del donador glicosídic activat mitjançant un nucleòfil extern, (ii) glicosintases derivades de glicosidases que actuen mitjançant un mecanisme catalític assistit per substrat i, (iii) fins i tot, glicosintases derivades de glicosidases amb inversió de configuració, en les que l'estratègia seguida es basa en un concepte similar però diferent. En aquest últim tipus d'enzims la metodologia es basa en la mutació del residu que actua com a base i l'ús d'un substrat activat fluorur de glicosil amb la mateixa configuració anomèrica que el producte d'hidròlisi. Els enzims resultants són capaços de transglicosidar i l'activitat hidrolítica es veu disminuïda però no suprimida, així doncs aquests mutants són considerats *glycosynthase-like*.

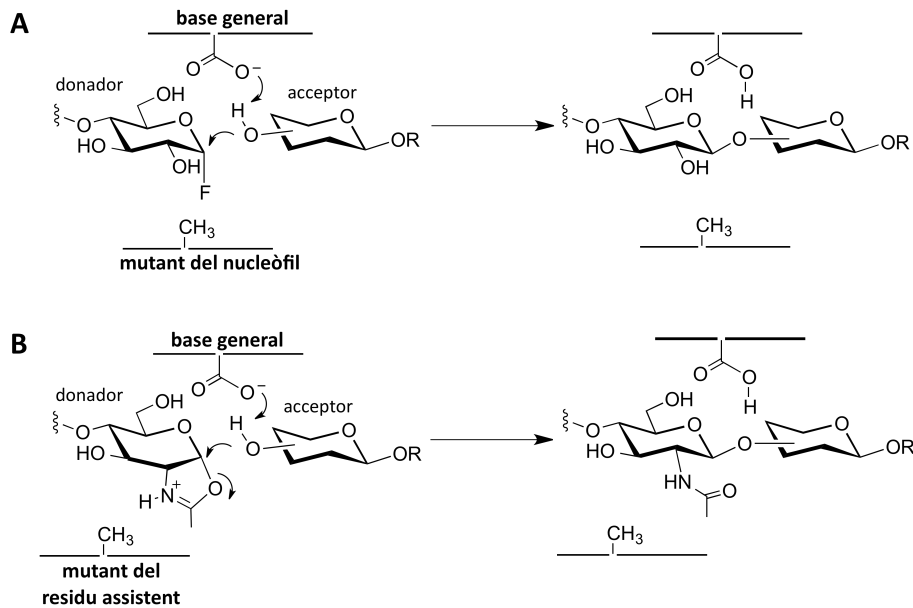


Figura 1. 3. Enzims glicosintasa.

A) Mutant del residu nucleòfil d'una glicosidasa amb retenció de configuració amb un fluorur de glicosil com a donador. B) Mutant del residu assistent d'una glicosidasa amb retenció de configuració que actua mitjançant un mecanisme catalític assistit per substrat, amb un derivat oxazolina com a donador.

En el cas de les glicosidases que actuen mitjançant un mecanisme catalític assistit per substrat, en el que els enzims no presenten residu nucleòfil, l'estratègia utilitzada és diferent, substituint el residu assistent del centre actiu, que té un paper important en la formació de l'intermedi de reacció (Figura 1. 3B) i l'ús de derivats oxazolina com a substrat. El primer exemple de glicosintasa que actua mitjançant catàlisi assistida per substrat va ser una endo- β -N-acetilglucosaminidasa (*Endo-M*) de la família GH85. En la família GH85 hi ha un residu Asn conservat que té un paper en la orientació del grup 2-acetamido i promou l'atac nucleofílic d'aquest a la posició anomèrica, per a formar l'intermedi oxazolina en el mecanisme hidrolític. La mutació d'aquest residu per una Ala dona lloc a un enzim incapaç de formar l'intermedi de reacció amb la conseqüent pèrdua d'activitat hidrolasa, però el mutant segueix essent capaç d'utilitzar un donador oxazolina per a la reacció de transglicosidació. L'impacte d'aquesta mutació N175A resulta en la pèrdua quasi total de l'activitat hidrolítica (0,024% respecte l'enzim *wt*) i també la pèrdua de l'activitat de TG de l'enzim, el que indica que aquest Asn és un residu essencial per a la catàlisi. En canvi, l'enzim resultant de la mutació d'aquest residu assistent en l'enzim *Endo-M* és capaç de dur a terme la reacció de condensació a partir d'un donador activat oxazolina, i el glicopèptid resultant no és hidrolitzat (Umekawa *et al.*, 2008). En aquesta família GH85 la substitució de l'Asn que assisteix a la formació de l'intermedi oxazolina té un impacte molt elevat sobre la hidròlisi, el que resulta en el desenvolupament d'un enzim glicosintasa eficient, incapaç d'hidrolitzar el producte GS format. Aquesta metodologia ha estat estesa a altres enzims GH85 (*Endo-A* i *Endo-D*) (Wang and Huang, 2009; Yamamoto, 2013) amb èxit, però l'aplicació d'aquesta estratègia pot no tenir el mateix impacte sobre l'activitat hidrolítica en les altres famílies amb mecanisme catalític assistit per substrat. Més recentment, també

s'ha començat a estendre en enzims de la família GH18 (Huang *et al.*, 2012; Martinez *et al.*, 2012).

I.2. Quitina i quitosans

La quitina va ser descoberta l'any 1811 per Henri Braconnot, aïllant-se d'un extracte de fongs i va ser anomenada *fungina* (Braconnot, 1811). No va ser fins l'any 1823 que aquest polímer va ser anomenat quitina, quan es va obtenir a partir de la desmineralització de la closca d'escarabats (Odier, 1823; Campbell, 1929) i l'any 1929, l'investigador suís Albert Hofmann en va descriure l'estructura química (Karrer and Hofmann, 1929).

Per altra banda, el quitosà va ser descobert l'any 1859 per C. Rouget, en bullir la quitina en presència d'hidròxid de potassi concentrat, que va provocar la desacetilació parcial d'aquesta (Rouget, 1859) però aquest nou polímer no va rebre el nom de quitosà fins l'any 1894 (Hoppe-Seyler, 1894). L'any 1954 es va aïllar per primera vegada quitosà natural, per extracció de les parets cel·lulars del fong *Phycomyces blakesleanus* (Kreger, 1954).

Des del seu descobriment, l'interès per aquests dos polímers ha estat contínua i a partir del segle XX s'ha començat a obtenir més informació tant dels propis compostos com de les seves aplicacions (Zikakis, 2012).

I.2.1. Propietats i Estructura

La quitina és el segon polímer natural més abundant en la natura, just després de la cel·lulosa, i és considerada una de les fonts renovables més abundants de la Terra. Principalment actua com a component estructural i es troba en els exosquelets d'artròpodes (insectes i crustacis), els endosquelets de mol·luscs, en molts invertebrats i en la paret cel·lular de fongs i algunes algues diatomees (Kurita, 2001). Químicament, està definida com a un polisacàrid lineal format per monòmers d'*N*-acetil-*D*-glucosamina (GlcNAc) units per enllaços $\beta(1\rightarrow4)$ (Figura I. 4A). En la natura es troba present en forma de 3 tipus de macrofibril·les diferents, en funció de l'organització del polímers que les formen: α -quitina, formada per cadenes antiparal·leles; β -quitina, formada per cadenes paral·leles; i γ -quitina, formada per una mescla de cadenes paral·leles i antiparal·leles. De les diferents isoformes, l' α -quitina és la més abundant (Rinaudo, 2006). A causa de la presència del grup *N*-acetil del carboni C2 del monòmer de GlcNAc, la quitina és molt poc soluble tant en aigua com en els dissolvents orgànics comuns.

El processat de la quitina, a partir de processos de despolimerització i des-*N*-acetilació dona lloc a una varietat de compostos amb importants funcions biològiques, entre els que es troben els quitosans i els quitoooligosacàrids de quitina i de quitosà.

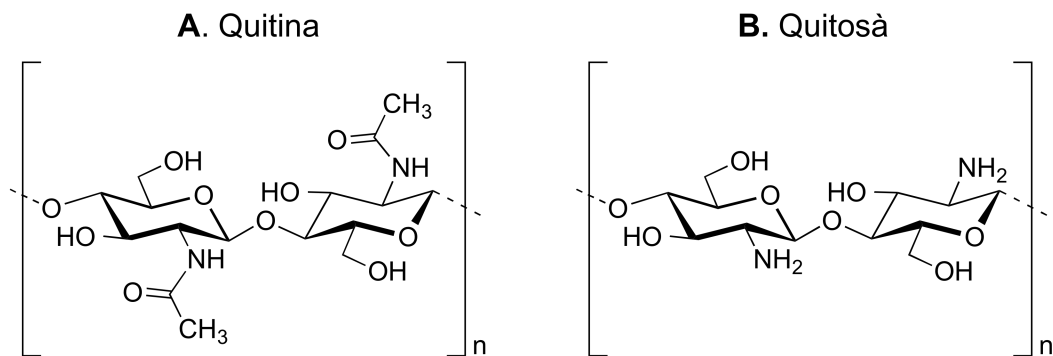


Figura I. 4. Estructures químiques de la quitina i els quitosans.

A) Estructura de la quitina, definida com a un homopolisacàrid lineal compost per monòmers d'*N*-acetil-*D*-glucosamina units per enllaços $\beta(1\rightarrow4)$; B) Estructura dels quitosans, definida com a heteropolisacàrids lineals compostos per monòmers d'*N*-acetil-*D*-glucosamina i glucosamina units per enllaços $\beta(1\rightarrow4)$.

Els quitosans són una família de compostos derivats de la quitina els quals s'obtenen a partir de des-*N*-acetilacions parcials d'aquesta. Són copolímers lineals formats per residus de GlcNAc i glucosamina (GlcNH₂) (Figura I. 4B). El procés natural de desacetilació de la quitina no és molt comú, de fet només s'ha descrit en fongs dels llinatges *Zygomycota*, *Basidiomycota* i *Ascomycota*, i en les algues del gènere *Chlorella* (Kreger, 1954; Kapaun and Reisser, 1995; Latil de Ros, 2017). Aquesta desacetilació parcial resulta en grups amina lliures que confereixen càrrega positiva als quitosans, que esdevenen, així, els únics polisacàrids policatiónics naturals, amb capacitat d'interaccionar amb molècules carregades negativament, com per exemple ADN, proteïnes i fosfolípids de membrana (Se-Kwon, 2010). A més, a causa de la desacetilació, els quitosans presenten noves propietats químiques, respecte la quitina, com són la solubilitat, flexibilitat, viscositat, porositat i conductivitat (Philibert, Lee and Fabien, 2016).

Aquestes característiques dels quitosans, juntament amb la seva biocompatibilitat, biodegradabilitat i baixa toxicitat, fan d'aquests polímers uns excel·lents candidats per al seu ús en la indústria, a causa de les seves potencials aplicacions en àrees tant diferents com són la medicina i l'agricultura (Kumar, 2000).

Les funcions biològiques dels quitosans són molt diverses i estan altament relacionades amb el grau de polimerització (DP), que correspon al nombre de residus de la cadena; el grau d'acetilació (DA), és a dir la proporció relativa de monòmers acetilats i desacetilats; i del patró d'acetilació (PA), referent a la distribució dels monòmers GlcNAc i GlcNH₂ en la cadena oligomèrica.

I.2.2. Aplicacions

Els quitosans presenten unes propietats fisicoquímiques i biològiques diferencials de la quitina, i com a conseqüència d'aquestes els quitosans són uns polímers amb un elevat interès en diversos camps com són l'agricultura, el tractament d'aigües i residus, la indústria alimentària, la medicina i la cosmètica, entre d'altres (Taula I. 1) (Kumar, 2000;

Rinaudo, 2006; Croisier and Jérôme, 2013; Azuma *et al.*, 2014; Pestov and Bratskaya, 2016; Philibert, Lee and Fabien, 2016).

Taula I. 1. Principals aplicacions dels quitosans

Agricultura	Mecanisme de defensa de plantes Estimulació del creixement de plantes Recobriment de llavors Protecció contra gelades Alliberació controlada de fertilitzants i nutrients
Tractament d'aigües i residus	Floculant per a la clarificació d'aigua Eliminació de metalls Polímer ecològic (substitució de polímers sintètics) Disminució d'olors
Indústria alimentària i de begudes	Fibra dietètica no digerible Captura de greixos, reducció del colesterol Conservant Espessidor i estabilitzador de salses Recobriment protector, fungicida i antibacterià de fruites
Indústria cosmètica	Manteniment de la humitat de la pell Tractament de l'acne Suplement capil·lar Reductor de l'electricitat estàtica del cabell Manteniment del color de la pell Tractaments orals (pasta de dents, xiclets)
Indústria medicofarmacèutica	Regulador del sistema immune Antitumoral Hemostàtic i anticoagulant Cicatritzant Bacteriostàtic <i>Drug-delivery</i>

Adaptada de Rinaudo *et al.* (Rinaudo, 2006)

No només els quitosans, sinó també els oligòmers derivats d'aquests i de quitina (*Partially Acetylated Chitosan Oligosaccharides* (paCOS) i *Chitin Oligosaccharides* (COS)) són igualment rellevants gràcies a les seves aplicacions potencials dins diferents àrees de producció industrial, de les que destaquen la indústria medicofarmacèutica i l'agricultura.

Dins la indústria medicofarmacèutica destaquen les següents aplicacions: (i) activitat antiinflamatòria, inhibeixen la resposta inflamatòria induïda per lipopolisacàrids i també l'activació de basòfils, neutròfils i limfòcits (Yoon *et al.*, 2007; Chung, Park and Park, 2012; Yousef *et al.*, 2012); (ii) immunoestimulants, promouen les funcions del sistema immunitari innat i adaptatiu (Feng, Zhao and Yu, 2004; Zhang *et al.*, 2014); (iii) activitats antimicrobianes, tenen activitat bactericides i bacteriostàtiques contra bacteris gram negatius i gram positius (Chung *et al.*, 2004; Xia *et al.*, 2011; Hosseinnjad and Jafari, 2016); (iv) antitumorals, interrompen el creixement de cèl·lules canceroses en diferents estadis del desenvolupament, i fins i tot, indueixen mort cel·lular en alguns tumors (Shen *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2011); (v) prevenció de l'obesitat i control del colesterol, són eficients en la reducció de lípids en el plasma (Pokhis *et al.*, 2015; Trivedi *et al.*, 2016); (vi) activitat anti-diabètica, poden reduir la presència de glucosa en sang (Kondo *et al.*, 2000; Lee *et al.*,

2003); (vii) vectors per a teràpia gènica i administració de fàrmacs (*gene delivery* i *drug delivery*) (Maclaughlin *et al.*, 1998; Mansouri *et al.*, 2004; Ahmed and Aljaeid, 2016); i, (viii) promoció de la cicatrització i regeneració de la pell (Ueno *et al.*, 1999; Ueno, Mori and Fujinaga, 2001; Patrulea *et al.*, 2015), entre d'altres. Dins el sector de l'agricultura participen en el tractament antimicrobià, antifúngic i antiviral de plantes (Kendra and Hadwiger, 1984; Ben-Shalom *et al.*, 2003; Kulikov *et al.*, 2006); com a promotors del creixement (Nge *et al.*, 2006; Mondal *et al.*, 2012; Chamnanmanoontham *et al.*, 2015) i del sistema immunitari de les plantes (Hadwiger, 2013; Katiyar *et al.*, 2014).

L'ampli ventall d'aplicacions dels quitosans ha provocat un increment de l'interès en l'obtenció i producció d'aquests, però els mètodes de producció actuals són principalment químics, i donen lloc a una mescla de quitosans heterogènia. Aquest fet impossibilita la realització d'estudis precisos per a relacionar cadascun dels compostos amb la seva activitat biològica (El Gueddari *et al.*, 2007; Jung and Park, 2014; Hosseinnejad and Jafari, 2016).

1.2.3. Producció de quitina i quitosà

Avui en dia, la quitina s'obté principalment a partir de les restes de gambes i crancs, subproductes de la indústria pesquera, però també pot obtenir-se de l'endosquelet de calamars, de fongs o de cutícules d'insectes, tot i que amb menor quantitat.

El procés d'extracció i obtenció de quitina consta principalment de tres etapes: desproteïnitació, desmineralització i decoloració. La primera etapa es basa en l'eliminació de proteïnes a partir de tractaments alcalins, normalment amb NaOH o KOH; a continuació, es realitza la desmineralització mitjançant tractaments amb dissolucions d'àcids, majoritàriament amb HCl, per a eliminar els dipòsits de fosfat càlcic i carbonat càlcic presents en les closques dels crustacis. Finalment, un cop rentat i assecat el producte, es realitza els tractaments de decoloració per a eliminar els pigments i lípids presents en el polímer mitjançant l'ús principalment de permanganat potassi i d'altres compostos com a tractaments complementaris (Kumar, 2000; Dhillon *et al.*, 2013). Aquest procés dona lloc a la obtenció de quitina pura.

Per altra banda, els quitosans s'obtenen a partir de des-*N*-acetilacions químiques de la quitina. Per a aquest procés s'empren condicions alcalines severes (elevades concentracions de bases fortes) i temperatures elevades (entre 90°C i 120°C) (Horton and Lineback, 1965). A més, per a la obtenció dels quitoooligosacàrids, tant de quitina com de quitosà, s'afegeix una nova etapa d'hidròlisi dels polímers mitjançant l'ús d'àcids (HCl és el més utilitzat) (Einbu, Grasdalen and Va, 2007).

L'obtenció química de quitina i quitosà requereix l'ús d'una quantitat elevada d'àcids i bases, així com d'aigua, té uns requisits energètics elevats i produeix una quantitat abundant de residus (Kumar, 2000). A més, la durada dels tractaments, així com les concentracions d'àcids i bases emprades, i les temperatures utilitzades afecten a les propietats fisiològiques del producte resultant, que finalment esdevé una mescla

heterogènia de quitosans que difereixen en el grau de polimerització, grau d'acetilació i patró d'acetilació. Aquesta variabilitat, juntament amb la dependència de recursos naturals, compromet la reproductibilitat entre lots, i dificulta l'estudi de les relacions estructura-funció biològica de cadascun dels diferents productes.

Per tal de superar aquests desavantatges s'ha començat a desenvolupar l'ús de processos biotecnològics per a la producció de quitosans. Existeixen referències de síntesi quimioenzimàtica (Pantaleone, Yalpani and Scollar, 1992; Jeon, Park and Kim, 2001), en els que s'utilitza enzims en els processos d'extracció de quitina i/o desacetilació d'aquesta per a la obtenció de quitosans; i actualment, s'ha iniciat la utilització d'estratègies d'enginyeria metabòlica amb l'objectiu d'obtenir oligòmers i polímers de quitosà amb estructures definides (Naqvi and Moerschbacher, 2017). Tot i així, la utilització d'aquestes estratègies es troba en una etapa molt primerenca, i encara es necessita un gran estudi i desenvolupament d'aquestes, que són altament complexes, principalment per la presència d'un gran nombre d'enzims implicats.

1.2.4. Projecte Nano3Bio

Amb l'objectiu de desenvolupar una alternativa a la producció industrial actual de quitosans es va crear el projecte europeu *NanoBioEngineering of BioInspired BioPolymers* (Nano3Bio).

L'objectiu del consorci és establir i desenvolupar mètodes biotecnològics de producció d'oligòmers i polímers de quitosans parcialment desacetilats, purs i d'alta qualitat, completament definits. El projecte engloba l'ús d'estratègies *in vitro*, basades en processos biotecnològics innovadors que utilitzen tecnologies quimioenzimàtiques, com estratègies *in vivo*, per enginyeria metabòlica, amb el propòsit d'obtenir nous oligòmers i polímers de quitosà amb graus de polimerització i acetilació coneguts així com amb patrons d'acetilació regulars i definits. Els principals enzims estudiats per al desenvolupament d'aquesta plataforma biotecnològica inclouen quitinasintases, quitinadesacetilases, quitinases i quitosanases.

El projecte Nano3Bio pretén utilitzar quitinadesacetilases per a generar quitosans amb patrons d'acetilació regulars, i quitinases i quitosanases per a hidrolitzar enllaços glicosídics dels polímers de quitosà en seqüències específiques, per tal de generar oligòmers de quitosà ben definits. A més, també es pretén utilitzar algunes quitinases amb activitat transglicosidasa per a la polimerització *in vitro* d'oligòmers de quitosà definits.

En aquesta estratègia s'afegeix l'ús de quitinasintases bacterianes per a produir els oligòmers de quitina *in vivo*, que poden ser parcialment desacetilats per quitinadesacetilases tant *in vivo* com *in vitro*, o bé ser polimeritzats utilitzant transglicosidases o glicosintases.

L'estratègia *in vitro* permet obtenir quitosans definits i aporta una solució a la poca reproductibilitat obtinguda en els assajos biològics de quitosans produïts per mètodes

químics; i per altra banda, l'estratègia *in vivo* pot també sobreposar-se al desavantatge que suposa l'ús de productes d'origen animal, principalment en el sector medicofarmacèutic i de la cosmètica, problema que presenten els quitosans disponibles en el mercat avui en dia.

Les tasques del grup del projecte Nano3Bio comprenen tant el descobriment de nous gens i enzims involucrats en la síntesi i modificació de la quitina i quitosans, com l'enginyeria de proteïnes per al desenvolupament de nous biocatalitzadors, i l'enginyeria metabòlica per a crear noves soques cel·lulars bacterianes capaces de produir nous oligòmers i/o polímers de quitosans. A més, també es pretén trobar noves aplicacions per als quitosans definits produïts biotecnològicament. Per últim, també s'inclou l'estudi de l'impacte mediambiental que comporta tot el procés de producció biotecnològica.

I.3. Quitinases de la família GH18

Les quitinases (EC 3.2.1.14) són enzims de la família de les glicosil hidrolases que catalitzen la hidròlisi dels enllaços $\beta(1\rightarrow4)$ presents en homopolímers de quitina. Es troben presents en una gran varietat d'organismes, que inclouen bacteris, fongs, plantes i animals i estan associades amb els rols fisiològics dels seus substrats. Les quitinases contribueixen a la generació de carboni i nitrogen en el ecosistema. En bacteris, principalment s'encarreguen de la degradació de la quitina per a la seva utilització com a font d'energia, però també participen en el control biològic de malalties de plantes causades per fongs patògens degradant la paret cel·lular d'aquests; en fongs també presenten funcions en la morfogènesi, nutricionals, d'autòlisi, i parasitàries; en llevats són necessàries per a la separació cel·lular durant el creixement; en plantes actuen de mecanisme de defensa davant patògens fúngics, i també participen en processos fisiològics vitals com l'embriogènesi i en insectes, participen en el procés d'ècdisis i tenen funcions de defensa contra els propis paràsits (Hamid *et al.*, 2013).

En base a la similitud de seqüència, es classifiquen principalment en quatre subfamílies, GH18, GH19, GH23 i GH48, que difereixen en estructura i mecanisme d'acció, essent les dues primeres les més nombroses (Henrissat and Davies, 1997). La majoria de quitinases d'origen bacterià, fúngic, víric, i animal i també algunes presents en plantes formen part de la família GH18, la qual és la única que actua mitjançant un mecanisme catalític assistit per substrat amb retenció de configuració. Les quitinases de les altres tres famílies actuen mitjançant mecanismes amb inversió de la configuració.

La similitud de seqüència entre les quitinases de la família GH18 no és gaire elevada, però els centres actius contenen varis residus altament conservats amb funcions catalítiques conegudes (Terwisscha van Scheltinga, Hennig and Dijkstra, 1996; Synstad *et al.*, 2004). Les quitinases GH18 presenten dos motius de seqüència altament conservats en el centre actiu que participen en el mecanisme catalític, el motiu SxGG i el motiu DxDxE, que conté el residu Glu que actua d'àcid/base general.

Per altra banda, les quitinases es divideixen en funció del seu origen taxonòmic. Les quitinases bacterianes es classifiquen en tres subfamílies (A, B i C), en base a l'anàlisi filogenètic dels dominis catalítics (Suzuki *et al.*, 1999); les quitinases fúngiques es divideixen en 3 grups (A, B, C), en funció de la similitud de seqüència entre les quitinases de *Hypocrea jecorina* (Seidl *et al.*, 2005) i les quitinases de plantes en dues classes, III i V, en base a la seqüència i l'estructura (Passarinho and Vries, 2002).

Més recentment, s'ha obtingut una classificació unificadora de tots els membres GH18, mitjançant l'anàlisi de les seqüències genòmiques (Karlsson and Stenlid, 2009). L'anàlisi filogenètica, a partir de 379 dominis catalítics de proteïnes GH18, classifica els membres GH18 en 3 subfamílies diferents (A, B i C) en funció de la relació filogenètica de les seqüències proteïques dels dominis catalítics GH18 (Figura I. 5). Les subfamílies A i B contenen quitinases bacterianes, fúngiques i de plantes, mentre que la família C només conté quitinases bacterianes i una quitinasa d'arqueu. Totes les quitinases víriques, animals i les altres dues quitinases d'arqueus conegudes es troben dins la subfamília A, essent aquesta la subfamília amb més membres. Cada família conté subgrups, cadascun dels quals està format per organismes amb el mateix origen taxonòmic. No hi ha patrons definits per a explicar la separació d'aquestes 3 famílies, però les subdivisions que contenen mostren patrons similars en relació als dominis que presenten, a més del domini catalític, i algunes presenten substitucions de residus catalítics que es conserven dins el subgrup, fets que suggereixen una diferenciació funcional dels membres de la família GH18. En relació a aquestes mutacions, alguns membres contenen substitucions en regions conservades que resulten en proteïnes sense activitat quitinolítica. Les subfamílies de quitinases bacterianes A, B i C descrites per Suzuki *et al.* es troben dins les subfamílies A, B i C, respectivament, d'aquesta nova subdivisió.

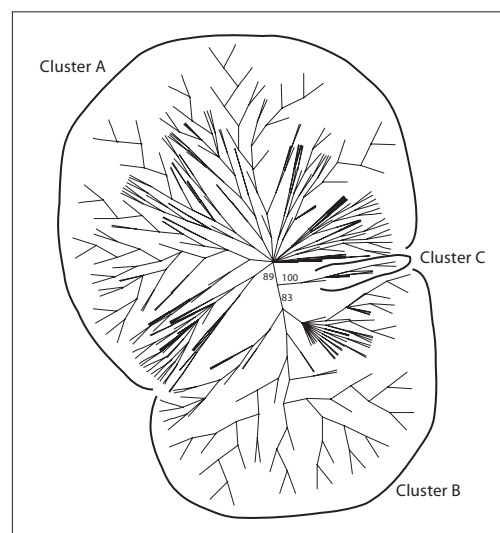


Figura I. 5. Relació filogenètica dels dominis catalítics dels membres de la família 18 de les glicosil hidrolases. El clúster A conté representants de bacteris, arqueus, fongs, plantes, animals i virus; el clúster B conté membres de bacteris, fongs i plantes; i el clúster C conté bacteris i un representant arqueu. Extreta de Karlsson *et al.* (Karlsson and Stenlid, 2009)

Les quitinases poden ser de tipus *exo-*, si alliberen GlcNAc o el disacàrid quitobiosa des d'un dels extrems de la cadena, principalment l'extrem no-reductor, o *endo-*, si hidrolitzen els enllaços interns de la cadena de quitina. A més, els enzims també poden ser processius, si la unió de la cadena de quitina es produeix una sola vegada i després de cada procés d'hidròlisi es dona un lliscament d'aquesta pel centre actiu fins a la següent unió productiva; o bé, no-processius, si es dona l'alliberació de la cadena de quitina després de cada esdeveniment d'hidròlisi.

Algunes d'aquestes quitinases són també transglicosidases, és a dir, són capaces de formar nous enllaços glicosídics entre dues molècules de sucre (donador i acceptor) generant oligòmers de quitina amb graus de polimerització més elevats que el substrats de partida.

I.3.1. Estructura

El domini catalític de les quitinases de la família GH18 consisteix en un plegament en barril triosafosfat isomerasa (β/α)₈ comú (*TIM barrel*) (Perrakis *et al.*, 1994; Terwisscha van Shellinga *et al.*, 1994; van Aalten *et al.*, 2000) que conté els dos motius de seqüència altament conservats, SxGG i DxExE, localitzats a l'extrem de les cadenes β 3 i β 4, respectivament (Figura I. 6). A més, el centre actiu està envoltat de residus aromàtics que contribueixen en la unió a substrat (van Aalten *et al.*, 2000; Uchiyama *et al.*, 2001).

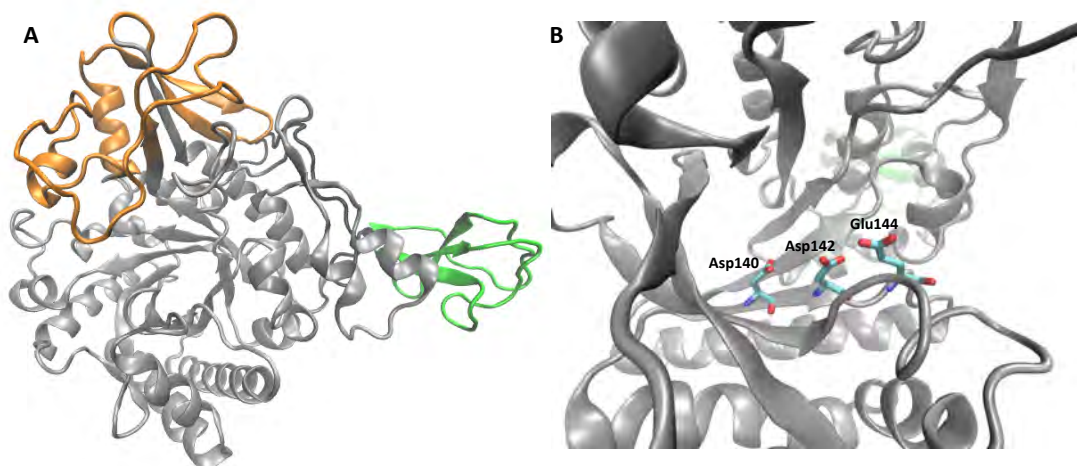


Figura I. 6. Estructura de la quitinasa B de *Serratia marcescens*.

A) Estructura d'*SmChiB* (PDB: 4Z2I). El domini catalític es troba acolorit de gris, en verd es mostra el CBM i en taronja la inserció $\alpha+\beta$ present entre les cadenes β 7 i β 8 del *TIM barrel*; B) Aminoàcids corresponents als residus del motiu conservat DxExE d'*SmChiB*.

Algunes quitinases presenten una inserció amb plegament $\alpha+\beta$ entre les cadenes β 7 i β 8 del *TIM barrel* (Figura I. 6), que conté *loops* que participen en la unió del substrat i que els confereix una cavitat d'unió a substrat més profunda (Suzuki *et al.*, 1999; Svein J. Horn *et al.*, 2006). La presència d'aquesta inserció $\alpha+\beta$ és un tret característic de les quitinases bacterianes de la subfamília A, i no es troba en cap membre de les quitinases de les subfamílies B i C, i està relacionada amb la processivitat enzimàtica.

El grau de processivitat enzimàtica està relacionat amb la forma i composició del solc catalític. Típicament els enzims no-processius exhibeixen cavitats més obertes amb pocs residus aromàtics mentre que enzims altament processius contenen cavitats més tancades o profundes amb un elevat nombre de residus aromàtics conservats que contacten directament amb el lligand. Els enzims processius contenen el domini d'inserció amb plegament $\alpha+\beta$ i també altres *loops* que fan el solc d'unió a substrat més profund. A més de la geometria del centre actiu, hi ha 3 efectes distintius de processivitat: una menor flexibilitat del centre actiu, particularment dels residus catalítics, en concret del Glu àcid/base general; una menor flexibilitat del substrat quan es troba unit i una menor solvatació d'aquest substrat, a causa de la cavitat d'unió a substrat més delimitada (Payne *et al.*, 2012). A més, els residus aromàtics del centre actiu, que interaccionen mitjançant interaccions carbohidrat- π , són crucials en la determinació del grau i direccionalitat de la processivitat (Svein J Horn *et al.*, 2006; Zakariassen *et al.*, 2009). Les interaccions hidrofòbiques d'apilament entre els residus aromàtics i el lligand expliquen com es mantenen units enzim i substrat i com aquest pot lliscar durant el mecanisme processiu (Vaaje-Kolstad *et al.*, 2013).

A més, les quitinases presenten arquitectures diferents, que consten del domini catalític GH18 i d'altres dominis que participen d'alguna manera en la degradació de la quitina. Moltes d'aquestes quitinases contenen un o més mòduls d'unió a carbohidrats (CBMs) per assegurar la degradació eficient de substrats quitinolítics polimèrics, cristal·lins i inaccessibles. Els CBMs milloren l'eficiència de les quitinases a causa de la seva adhesió i alteració del substrat (Zakariassen *et al.*, 2009). La presència de CBMs incrementa tant l'afinitat d'unió a substrat com l'eficiència d'hidròlisi, tot i que es desconeix exactament com succeeix (Madhuprakash, *et al.*, 2015). A més dels CBMs, la presència d'altres mòduls d'unió com els dominis PKD (*Polycystic kidney disease*) o dominis fibronectina (FnIII) també afavoreixen la unió i hidròlisi de quitina cristal·lina. També hi ha quitinases que no contenen cap domini d'unió a quitina addicional i només presenten el domini catalític GH18 (Purushotham and Podile, 2012; Vaikuntapu *et al.*, 2016). Moltes quitinases contenen també un pèptid senyal, que marca la proteïna per a ser excretada o cap a una localització subcel·lular determinada.

1.3.2. Mecanisme

Les quitinases de la família GH18 actuen mitjançant un mecanisme catalític assistit per substrat amb retenció de configuració. No presenten residu nucleòfil, sinó que l'atac nucleofílic és dut a terme pel grup acetamida del monòmer posicionat en el subseti -1 amb la participació del segon Asp del motiu DxDxE. El mecanisme catalític implica la distorsió del substrat en el subseti -1, en una conformació en el camí cap a la formació de l'estat intermedi. Aquesta distorsió del GlcNAc del subseti -1 ha estat confirmada a través de varis estudis cristal·logràfics (Tews *et al.*, 1997; Papanikolau *et al.*, 2001; van Aalten *et al.*, 2001). A causa del mecanisme catalític, les quitinases de la família GH18 requereixen la presència

d'una molècula d'*N*-acetilglucosamina en el subseti -1, mentre que l'especificitat en la resta de subsetis és menys severa (Honda *et al.*, 2000; Sørboten *et al.*, 2005).

Arrel de l'estructura de la quitinasa B de *S. marcescens*, el grup de Vincent G. H. Eijsink proposa el següent mecanisme catalític per a les quitinases GH18 (van Aalten *et al.*, 2001; Vaaje-Kolstad *et al.*, 2013). En l'estat de repòs, els dos residus Asp del motiu DxDxE interaccionen mitjançant pont d'hidrogen (Figura I. 7A). En una primera etapa, la unió del substrat indueix la rotació del residu Asp assistent cap a l'àcid general Glu per formar un pont d'hidrogen. Al mateix temps, la unió del substrat provoca una distorsió del GlcNAc situat al subseti- 1, que adopta una conformació de nau, i el Glu actua d'àcid general i facilita l'alliberació del grup sortint mitjançant la protonació de l'oxigen glicosídic. Simultàniament, es dona l'atac nucleofílic del grup acetamida del GlcNAc del subseti -1, que també ajuda a promoure l'alliberació del grup sortint, donant lloc a la formació de l'intermedi oxazolini, que és estabilitzat per l'Asp assistent. Finalment, en la segona etapa, el residu Glu actua de base general i activa una molècula acceptora que ataca el ió oxazolini. En funció de l'acceptor, la reacció resulta en la formació de producte d'hidròlisi o de transglicosidació amb retenció de la conformació del carboni anomèric (Figura I. 7).

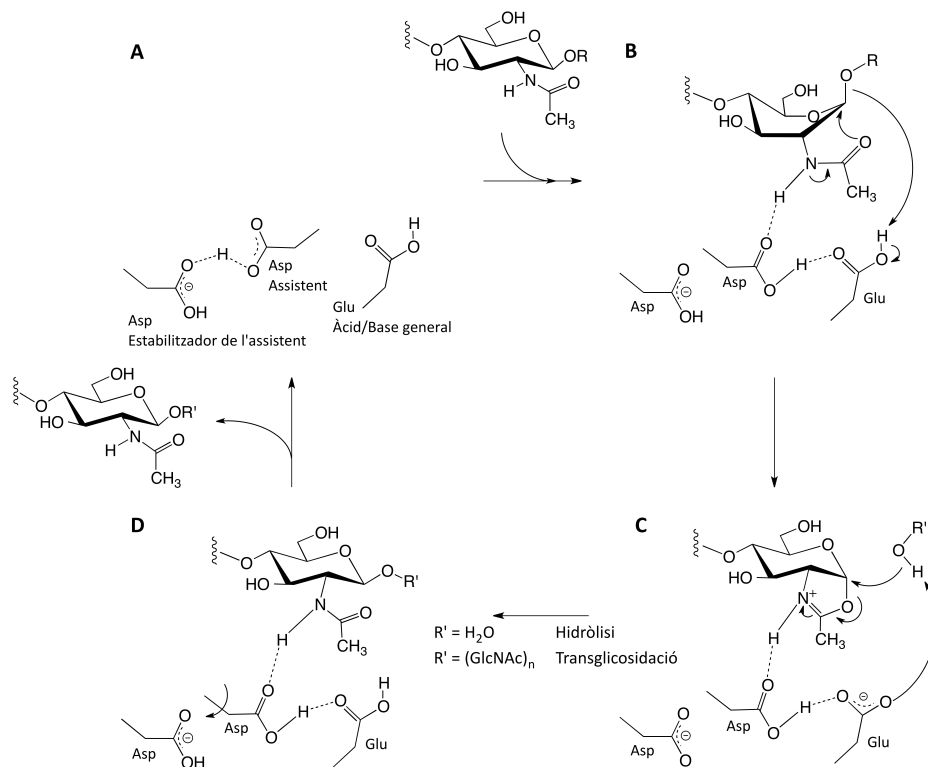


Figura I. 7. Mecanisme catalític assistit per substrat present en les quitinases de la família GH18.

Els dos residus Asp del motiu DxDxE interaccionen mitjançant un enllaç per pont d'hidrogen quan l'enzim està lliure (A). Quan s'uneix el substrat hi ha una rotació del residu Asp assistent per a formar un pont d'hidrogen amb el residu àcid general (Glu), el qual protona l'oxigen glicosídic (B). Conseqüentment es produeix l'atac nucleofílic del grup acetamida de la unitat GlcNAc situada en el subseti -1, donant lloc a la formació de l'intermedi oxazolini/oxazolina (C). El residu assistent Asp estabilitza l'intermedi oxazolini/oxazolina. En la segona etapa, el residu Glu actua de base general. En funció de l'acceptor ($R'OH$), es donarà hidròlisi o transglicosidació (D). Quan s'allibera el producte, l'Asp assistent rota i torna a formar pont d'hidrogen amb l'Asp estabilitzador de l'assistent (A), (Zakariassen *et al.*, 2011).

L'Asp assistent afecta l'estabilitat de l'intermedi ió oxazolini i el pK_a del Glu catalític, que varia al llarg de la catàlisi a causa del seu rol dual, com a àcid en l'etapa de glicosilació i com a base activadora en la hidròlisi del ió oxazolini. A part dels residus catalítics essencials, durant la catàlisi es veuen involucrats varis residus més, d'entre els quals destaquen el primer Asp del motiu Dx Dx E, que és crucial per a mantenir l'Asp assistent protonat; la Ser del motiu Sx GG, i una Tyr que interaccionen amb el primer Asp del motiu Dx Dx E mitjançant ponts d'hidrogen per a compensar la càrrega negativa d'aquest quan l'Asp assistent es troba interaccionant amb el Glu àcid/base; un altre residu Tyr (Tyr214 en *SmChiB*), que estabilitza el grup acetamida en la forma distorsionada per a que es produeixi l'atac nucleofílic; i un Asp que participa en la unió del monòmer GlcNAc del subseti -1 en la conformació distorsionada (Figura I. 8) (van Aalten *et al.*, 2001; Synstad *et al.*, 2004; Vaaje-Kolstad *et al.*, 2013). A més, els enzims GH18 també presenten residus carregats positivament en la part inferior del *TIM barrel* que poden afectar l'electrostàtica del centre actiu (Vaaje-Kolstad *et al.*, 2013).

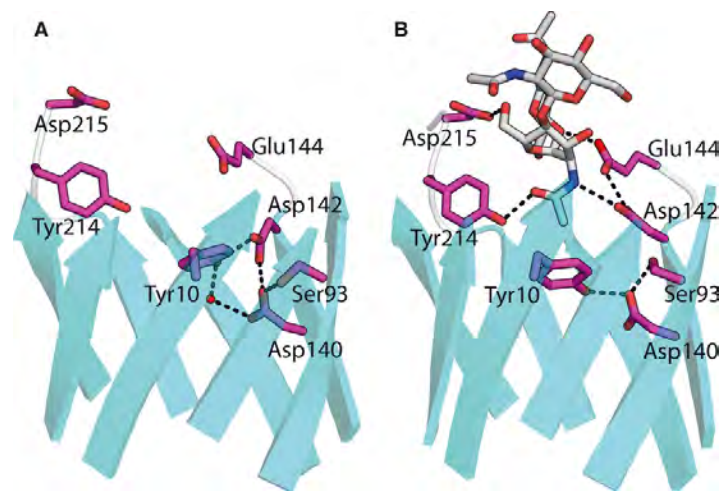


Figura I. 8. Residus clau de la maquinària catalítica de quitinases de la família GH18.

La imatge mostra dues situacions observades en l'estructura de la quitinasa ChiB de *Serratia marcescens* (van Aalten *et al.*, 2001). Les cadenes laterals dels aminoàcids implicats en la catàlisi i el substrat es troben acolorits de magenta i gris, respectivament. Els aminoàcids Asp140, Asp142 i Glu144 corresponen als residus del motiu de seqüència Dx Dx E. En l'estructura apo- (A), els residus Asp140 i Asp142 comparteixen un protó. Quan s'uneix el substrat (B), el residu Asp142, amb el protó, rota cap al Glu144, i aquesta rotació és acompanyada d'altres canvis que estabilitzen l'Asp140. Extreta de Vaaje-Kolstad *et al.* (Vaaje-Kolstad *et al.*, 2013).

Tot i que aquest mecanisme és comú per a totes les quitinases GH18, la resolució de l'estructura cristal·logràfica del domini catalític d'una quitinasa d'arqueu, quitinasa B de *P. furiosus*, mostra diferències en les interaccions enzim-substrat tant dels residus catalítics presents en el motiu Dx Dx E, l'Asp assistent es troba encarat sempre cap el Glu àcid/base i no interacciona amb el primer Asp del motiu conservat, com en d'altres residus implicats en la formació de l'intermedi oxazolina (la Tyr implicada en l'estabilització del monòmer GlcNAc distorsionat situat al subseti -1 en quitinases d'arqueus és una Met) que suggereixen petites diferències en les interaccions dels diferents residus involucrats en la catàlisi entre quitinases d'arqueus i quitinases bacterianes (Tsuji *et al.*, 2010).

Recentment en el nostre grup, en col·laboració amb el grup de la Dra. Carme Rovira (UB, Barcelona), s'ha estudiat computacionalment la natura de l'intermedi de reacció de les quitinases GH18 i la seva reactivitat, a partir de simulacions de metadinàmica QM/MM en la quitinasa B de *S. marcescens*, amb els que s'ha demostrat que l'intermedi de reacció és una oxazolina neutre amb conformació ${}^4C_1/{}^4H_5$, i no un ió oxazolini com es creia fins el moment (Coines *et al.*, 2018). El mecanisme implica una xarxa dinàmica de ponts d'hidrogen que assisteix la catàlisi (Figura I. 9).

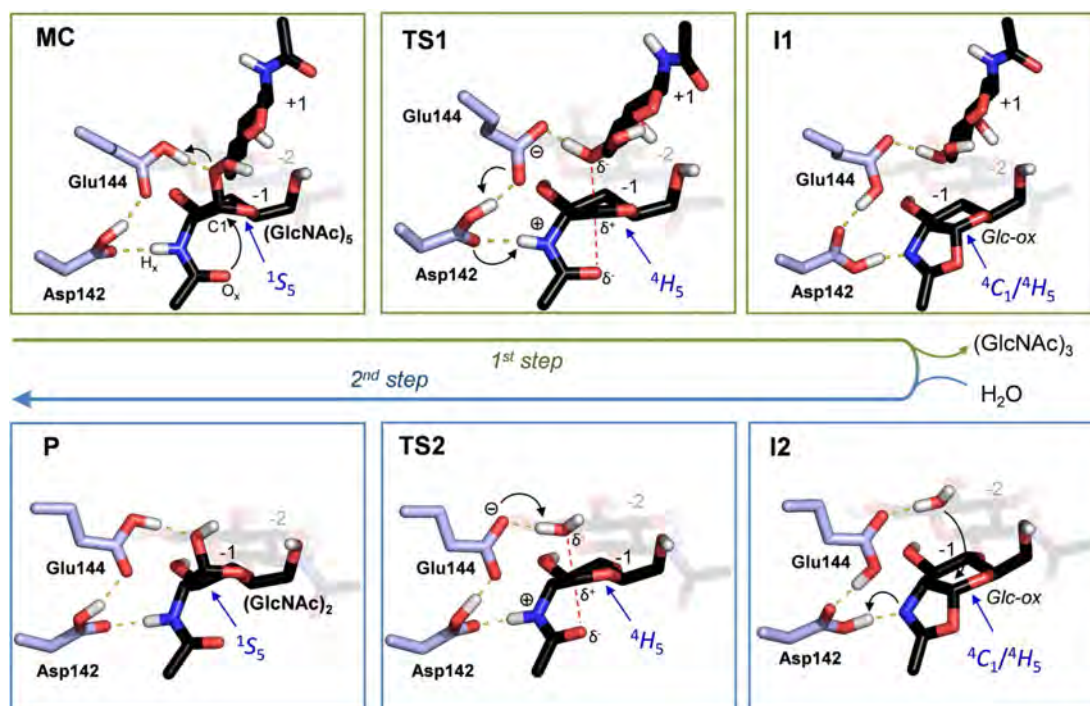


Figura I. 9. Mecanisme de reacció d'SmChiB obtingut a partir dels estudis computacionals de QM/MM. MC: complex de Michaelis; TS: estat de transició; I: intermedi de reacció; P: producte de reacció. L'estat intermedi (I) s'ha anomenat I1 o I2 en funció de si el grup present en el centre actiu és el grup sortint GlcNAc del subsest +1 (I1) o una molècula d'aigua (I2). La xarxa de ponts d'hidrogen que es dona en la catàlisi es representa amb línies grogues discontinues. Extreta de Coines *et al.* (Coines *et al.*, 2018).

En la primera etapa de la reacció de doble desplaçament, etapa de glicosilació, el protó del grup *N*-acetil del GlcNAc situat al subsest -1 és cedit a l'Asp assistent (Asp142), el que afavoreix que l'àtom d'oxigen d'aquest se situï més proper al carboni anomèric, establint l'intermedi oxazolina. Al mateix temps, el Glu catalític (Glu144), que es troba formant pont d'hidrogen amb l'Asp assistent, actua d'àcid general i cedeix un protó al grup sortint. En la segona etapa, desglicosilació, l'aproximació de la molècula d'aigua entrant al carboni anomèric desestabilitza l'enllaç entre l'oxigen del grup acetamida i el carboni anomèric, i activa la protonació de l'oxazolina, és a dir, el protó de l'Asp assistent torna cap al nitrogen de l'oxazolina. L'Asp assistent és establintzat pel pont d'hidrogen que forma amb el Glu144, que finalment actua de base i desprotona la molècula d'aigua entrant, que forma un enllaç covalent amb el carboni anomèric donant lloc a l'alliberació dels productes de reacció. A més, aquests productes són establintzats per la interacció entre el grup carbonil

de l'*N*-acetil i el grup hidroxil de la Tyr214, el que suporta el rol d'aquest residu com a estabilitzador.

Aquest model suggereix que l'intermedi de reacció és una oxazolina que adquireix un protó al llarg de la reacció, que involucra la formació d'un ió oxazolini en l'estat de transició entre l'estat intermedi i l'alliberació dels productes. Així doncs, l'intermedi oxazolina estable evoluciona cap a un ió oxazolini transitori durant la catàlisi a causa de la xarxa de ponts d'hidrogen altament definida entre la molècula d'aigua nucleofílica, el residu àcid/base general, el residu assistent i l'àtom de nitrogen de l'oxazolina. De la mateixa manera, en la primera etapa de reacció també té lloc l'estat de transició ió oxazolini abans de la formació de l'intermedi oxazolina.

1.3.3. Quitinases com a eines sintètiques de COS

Com a conseqüència de les potencials aplicacions de la quitina i quitosans així com dels seus productes d'hidròlisi en els sectors de l'agricultura, cosmètica i medicina, ha sorgit un alt interès per a la obtenció de quitooligosacàrids amb estructures definides. Per aquest motiu, l'ús de quitinases GH18 com a eina sintètica de COS també ha incrementat en els últims anys.

Amb l'objectiu d'incrementar l'activitat de TG de quitinases salvatges, s'ha seguit diferents estratègies com són la variació en la condicions de reacció (temperatura, pH, concentració de salts) (Usui *et al.*, 1987; Nanjo *et al.*, 1989), variacions en les concentracions de substrat i/o enzim (Purushotham and Podile, 2012), l'ús de solvents orgànics (Makino *et al.*, 2006) o l'ús de substrats oxazolina que mimetitzen l'intermedi de reacció (Kobayashi, Kiyosada and Shoda, 1996, 1997). Per altra banda, també s'ha incrementat l'activitat de TG de quitinases, per a obtenir COS amb graus de polimerització DP6-DP10, mitjançant l'aplicació d'estratègies de mutagènesi dirigida (Suginta *et al.*, 2005; Aronson Jr. *et al.*, 2006; Zakariassen *et al.*, 2011; Madhuprakash *et al.*, 2012). Aquestes mutacions majoritàriament es troben restringides als residus catalítics conservats o als residus aromàtics presents en el centre actiu.

Mutacions que impliquen la introducció o eliminació de residus aromàtics resulten en canvis en l'activitat de TG, relacionats amb la interacció/unió del donador o acceptor en els subsetis negatius o positius, respectivament. La mutació d'aquests residus aromàtics en els subsetis negatius resulta en l'increment de l'activitat de TG (Aronson Jr. *et al.*, 2006), mentre que aquesta es veu disminuïda amb la substitució de residus aromàtics en els subsetis positius (Taira *et al.*, 2010). A més, també s'ha aconseguit incrementar l'activitat de TG amb la introducció de nous residus aromàtics en els subsetis positius (Umamoto *et al.*, 2013, 2015).

Per altra banda, la mutació del residu Glu àcid/base dona lloc a enzims completament inactius tant en la hidròlisi com en l'activitat de TG (Shoda *et al.*, 2002; Martinez *et al.*, 2012), en canvi, mutacions del segon aspàrtic del motiu DxDxE, corresponent al residu

assistent, provoca canvis electrostàtics que disminueixen la probabilitat de l'atac d'una molècula d'aigua, fet que redueix l'activitat hidrolítica de l'enzim, i en general l'activitat de TG es veu incrementada (Zakariassen *et al.*, 2011; Martinez *et al.*, 2012; Sirimontree *et al.*, 2014).

En el capítol 1 es recullen les quitinases GH18 que presenten activitat de TG, descrites fins al moment, i els rendiments obtinguts en productes de TG amb aquestes.

I.4. Marc del projecte

La quitina i els quitosans, així com els quitooligosacàrids derivats, presenten un elevat interès a causa de les potencials aplicacions en diversos sectors, principalment en l'agricultura i la medicina. Avui en dia, els quitosans comercials s'obtenen a partir de des-*N*-acetilacions químiques de la quitina, que prové de les restes de crustacis marins de la indústria pesquera. Aquests processos químics comporten tractaments molt severos que resulten en l'obtenció de mesclures heterogènies de quitosans, la qual cosa compromet la reproductibilitat entre lots. A més, els processos de producció descrits fins el moment requereixen l'ús d'una quantitat elevada d'àcids i bases, així com d'aigua i generen una quantitat abundant de residus. Un altre desavantatge per a l'ús d'aquests quitosans, principalment en cosmètica i biomedicina, és el seu origen animal. Com a alternativa, per tal de sobreposar-se a aquests desavantatges, s'està desenvolupant l'ús d'eines biotecnològiques per a la producció de quitosans amb estructures definides.

A partir del coneixement estructura-funció de quitinases, el present projecte pretén desenvolupar, utilitzant estratègies de disseny racional, nous biocatalitzadors per a la polimerització de COS activats per a obtenir polímers de baix pes molecular amb estructures definides.

Algunes quitinases tenen activitat transglicosidasa i s'estan utilitzant com a eina sintètica de COS, però l'activitat hidrolítica d'aquests enzims tendeix a despolimeritzar els productes de TG ràpidament. Per a utilitzar aquestes quitinases com a biocatalitzadors eficients, mitjançant enginyeria de proteïnes es pretén desenvolupar una glicosintasa per a reduir l'activitat hidrolítica i incrementar l'activitat de TG amb l'objectiu de generar nous polímers de quitosà amb patrons d'acetilació regulars i definits.

Amb aquestes bases, la present tesi aborda dos propòsits principals: i) la selecció i aplicació de l'estratègia glicosintasa sobre el residu assistent de diferents quitinases i ii) l'optimització d'una glicosintasa mitjançant enginyeria de proteïnes per a la síntesi d'oligosacàrids de quitina i quitosà definits.

OBJECTIUS

Objectius

La tesi es desenvolupa en el marc del projecte europeu Nano3Bio, que té com a objectiu principal l'obtenció de quitoooligosacàrids de quitosà altament definits en termes de grau de polimerització (DP), grau d'acetilació (DA) i patró d'acetilació (PA). Dins el projecte s'ha estat treballant en el desenvolupament de nous biocatalitzadors per a la síntesi enzimàtica, tant *in vitro* com *in vivo*, d'un ampli ventall de quitosans.

L'ús de quitinases com a eina sintètica de COS està essent àmpliament estudiada però l'activitat hidrolítica inherent d'aquestes resulta en la hidròlisi dels productes de TG formats. Amb el propòsit de vèncer aquestes limitacions aquesta tesi té com a objectiu general desenvolupar una glicosintasa a partir d'una quitinasa GH18 per a la obtenció de COS estructuralment definits.

Per a acomplir amb l'objectiu general del treball s'han plantejat els següents objectius específics:

- Seleccionar diferents quitinases GH18 candidates per al disseny de la primera generació glicosintasa per mutació del residu assistent.
- Analitzar l'efecte de la mutació del residu assistent en les diferents quitinases GH18
- Modificar per enginyeria de proteïnes el candidat seleccionat per a optimitzar la seva capacitat de polimerització
- Obtenir nous oligosacàrids/polisacàrids a partir de les glicosintases dissenyades

ORGANITZACIÓ DE LA TESI

Organització de la tesi

Els resultats obtinguts en aquesta tesi s'estructuren en 4 capítols:

- El **Capítol 1** es basa en una anàlisi bibliogràfica i bioinformàtica de les diferents quitinases de la família GH18 amb el propòsit de seleccionar diferents quitinases candidates per a l'anàlisi de la mutació del residu assistent.
- El **Capítol 2** es focalitza en la metodologia desenvolupada i emprada per a la caracterització dels diferents enzims i s'exemplifica cadascun dels mètodes utilitzats amb els resultats obtinguts per a la quitinasa D de *Serratia proteamaculans*. En aquest capítol es recull el desenvolupament del mètode HPLC-MS emprat per a la caracterització de l'activitat hidrolítica amb substrats naturals i el mètode d'anàlisi de l'activitat glicosintasa emprant un donador activat oxazolina.
- En el **Capítol 3** es recull la caracterització de les diferents quitinases candidates i dels corresponents mutants del residu assistent emprant la metodologia explicada en el capítol 2. Es compara l'efecte de la mutació del residu assistent en les diferents quitinases. Els resultats presentats en aquest capítol es recullen en l'article publicat: Cristina Alsina, Magda Fajjes, Antoni Planas (2019) *Glycosynthase-type GH18 mutant chitinases at the assisting catalytic residue for polymerization of chitooligosaccharides*. Carbohydrate Research, 478, 1-9. (Annex 4).
- El **Capítol 4** consta del desenvolupament d'una glicosintasa a partir del mutant del residu assistent de la quitinasa D de *Serratia proteamaculans*. Es recull el desenvolupament i caracterització d'una segona i tercera generació de mutants d'*SpChiD* a partir d'estratègies de mutagènesi dirigida. Per altra banda, també es desenvolupa l'aplicació d'aquesta estratègia en la quitinasa A de *T. kodakaraensis* i es proposen nous mutants pel desenvolupament de la glicosintasa a partir d'aquest enzim. Els resultats d'aquest capítol es troben en fase de redacció per a la seva publicació.

La metodologia emprada per al desenvolupament del treball es recull en la secció **Part experimental**.

CAPÍTOL 1

Capítol 1. Selecció de diferents quitinases de la família GH18 per al disseny d'una glicosintasa

Amb l'objectiu de produir *in vitro* polímers de quitina i quitosà definits, es pretén aplicar la tecnologia glicosintasa per a modificar quitinases. Mitjançant mutagènesi es vol disminuir l'activitat hidrolítica d'aquestes i incrementar l'activitat de transglicosidació pròpia de l'enzim, per tal de catalitzar la polimerització controlada d'oligosacàrids mitjançant la utilització de substrats activats, que mimetitzen l'intermedi de reacció.

Per tal d'assolir els objectius desitjats, es pretén seleccionar diverses quitinases per a dur a terme un primer cribratge i escollir la quitinasa a partir de la qual generar una glicosintasa efectiva per a la polimerització de COS activats. Primerament s'ha realitzat una anàlisi bibliogràfica i bioinformàtica de quitinases per a la posterior selecció de diferents candidates.

1.1. Anàlisi bioinformàtica i bibliogràfica de quitinases

El primer criteri de selecció ha estat el fet de que fossin enzims amb retenció de configuració, és a dir, el producte d'hidròlisi resultant ha de tenir la mateixa configuració anomèrica que el substrat de partida. Basant-nos en aquest criteri, les quitinases a seleccionar han de ser de la família 18 de les glicosil hidrolases, ja que les quitinases de les altres famílies (GH19, GH23 i GH48) actuen mitjançant un mecanisme amb inversió de la configuració.

A l'inici del treball (juliol 2014) es va realitzar una anàlisi bioinformàtica de les diferents bases de dades enzimàtiques. Es van identificar 6246 seqüències classificades com a glicosil hidrolases de la família GH18 en la base de dades CAZy, i només 424 d'aquestes estaven caracteritzades. Dins aquesta família GH18 es troben diferents activitats: activitat quitinasa, lisozim i endo- β -*N*-acetilglucosaminidasa. En la base de dades PDB només s'hi trobaven 62 estructures. Per altra banda, en la base de dades PFAM hi havia 8946 seqüències identificades com a Glyco_hydro_18, amb 253 arquitectures diferents. En aquesta mateixa base de dades també s'hi troba generat el logotip HMM de quitinases (Figura 1.1), en el que es mostra els dos motius de seqüència conservats SxGG i DxDxE, on es localitza la tríada catalítica.

A dia d'avui (març 2019) es troben 17542 seqüències corresponents a GH18 a CAZy de les quals 482 estan caracteritzades, i es troben 90 estructures dipositades en la base de dades PDB. En la plataforma PFAM s'hi troben 20360 seqüències identificades com a Glyco_hydro_18 amb 675 arquitectures diferents.

Taula 1.1. Quitinases GH18 amb activitat de transglucosidació reportada utilitzant quitooligosacàrids (COS) com a substrat

Organisme	Quitinasa	Enzim	Activitat TG	Rendiment (%) ¹	% TG ²	% conv ³	T _{opt.} ⁴	Observacions	Referències
BACTERIS									
<i>Bacillus cereus</i>	ChiCW	wt	DP4 → DP6	-	-	-		traces DP6 per TLC	(Huang and Chen, 2005)
<i>Bacillus circulans</i>	BcChiA1	wt	DP6 → DP8	8,2% (DP8)	5,2% (DP8)	55%	60 min	traces DP6-DP12 per MALDI-TOF	(Sasaki et al., 2002)
	D200A	wt	DP5 → DP2-DP12	-	-	-	18 h	traces DP6-DP12 per MALDI-TOF	(Martinez et al., 2012)
	D202A ⁵	wt	DP5 → DP2-DP12	-	-	-	18 h	traces DP6-DP12 per MALDI-TOF	(Martinez et al., 2012)
<i>Burkholderia cepacia</i> KH2	Chitinase	wt	DP4 → DP5 + DP6	-	3,8% (DP5), 2,8% (DP6)	-	-	-	(Ogawa et al., 2002)
<i>Enterobacter cloacae</i>	EcChi1	wt	DP3 → DP4-DP7	8% (DP4-DP6)	15% (DP4-DP6) 5,3% (DP5), 4,4% (DP6)	83,5%	30 min	traces DP7 per HPLC	(Mallakuntia et al., 2017)
		wt	DP4 → DP5-DP8	-	5,3% (DP5), 4,4% (DP6)	-	-	5,3% (DP5, 60 min), 4,4% (DP6, 5 min); traces DP7-DP8 per HPLC	(Mallakuntia et al., 2017)
		wt	DP5 → DP6-DP9	-	2,5% (DP6)	-	45 min	traces DP7-DP9 per HPLC	(Mallakuntia et al., 2017)
		wt	DP6 → DP7-DP9	-	-	-	-	1 MALDI-TOF traces DP7-DP9 per HPLC	(Mallakuntia et al., 2017)
<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	FjChIB	wt	DP5 → DP6-DP8	-	0,26% (DP6)	68%	30 min	traces DP7-DP8 per HPLC	(Vaikuntapu et al., 2018)
		wt	DP6 → DP7-DP9	-	-	-	-	traces DP7-DP9 per HPLC	(Vaikuntapu et al., 2018)
	G106W	wt	DP5 → DP6 + DP7	-	0,19% (DP6)	57%	6 h	traces DP7 per HPLC	(Vaikuntapu et al., 2018)
	D148N ⁵	wt	DP5 → DP6 + DP7	-	0,19% (DP6)	87%	12 h	traces DP7 per HPLC	(Vaikuntapu et al., 2018)
<i>Nocardia orientalis</i>	Chitinase	wt	DP4 → DP6	13% (DP6)	11% (DP6)	42%	22 h	-	(Usui et al., 1987; Nanjo et al., 1989)
		wt	DP5 → DP7	-	-	-	-	-	(Usui et al., 1987)
		wt	DP4 → DP6	21% (DP6)	16,5% (DP6)	74%	75 h	-	(Nanjo et al., 1989)
<i>Serratia marcescens</i>	SmChiA	wt	DP4 → DP3 ⁶	-	-	-	-	DP4 → [DP2] → [DP6] -- > DP3 ⁶ , no GlcNAc traces DP5-DP6 per MALDI-TOF	(Zakariassen et al., 2011)
	D313N ⁵	wt	DP4 → DP3-DP6	-	-	-	-	traces DP5-DP6 per MALDI-TOF	(Zakariassen et al., 2011)
	D313N/F396A	wt	DP4 → DP3-DP6	-	-	-	-	traces DP5-DP6 per MALDI-TOF	(Zakariassen et al., 2011)
	D313N/F396W	wt	DP4 → DP3-DP8	-	-	-	-	traces DP5-DP8 per MALDI-TOF	(Zakariassen et al., 2011)

¹ Rendiment (%) de productes de transglucosidació; ² %TG; productes de TG en relació als productes totals a temps de reacció òptim; ³ % conversió; percentatge de substrat consumit a temps de reacció òptim; ⁴ t_{opt.}: temps de reacció òptim (quan el %TG és màxim); ⁵ mutant del residu assistent; ⁶ reacció de TG que resulta en la formació d'oligòmers més curts que el substrat, resultants de productes de TG intermedis. La reacció proposada que dona lloc als productes finals es detalla a "observacions"; DP2-pNP: glicòsids p-nitrofenil de COS (DP2 or DP3) com a substrat. Els valors corresponents al rendiment (%), % TG a temps òptim i % conversió de reacció han estat calculats a partir de les dades proporcionades en la bibliografia. En negreta es mostren els valors reportats en la bibliografia. DPn fa referència a (GlcNAc)_n.

Organisme	Quitinasa	Enzim	Activitat TG	Rendiment (%) ¹	% TG ²	% conv ³	T _{opt.} ⁴	Observacions	Referències
<i>Serratia marcescens</i>	SmChIA	W167A	DP4 -> DP5 + DP6	-	-	-	-	traces DP5-DP6 per HPLC	(Aronson Jr. et al., 2006)
			DP5 -> DP6 + DP7	-	-	-	-	traces DP6-DP7 per HPLC	(Aronson Jr. et al., 2006)
			DP6 -> DP5 ⁶	-	-	-	-	DP6 -> [DP2, DP3, DP4] -> DP5, no GlcNAc	(Aronson Jr. et al., 2006)
			DP3 -> DP2 ⁶	-	-	-	-	DP3 -> [DP2+GlcNAc] -> [DP4] -> DP2 ⁶ (quasi no GlcNAc)	(Aronson Jr. et al., 2006)
			DP4 -> DP3 ⁶	-	-	-	-	DP4 -> [DP2] -> [DP6] -> DP3 ⁶ , no GlcNAc	(Madhupratkash et al., 2018)
			DP4 -> DP3 ⁶	-	-	-	-	DP4 -> [DP2] -> [DP6] -> DP3 ⁶ , no GlcNAc	(Madhupratkash et al., 2018)
<i>Serratia marcescens</i>	SmChIB	D313N/F396W /Y163A /D313N/F396W /Y390F	DP4 -> DP3 ⁶	-	-	-	-	DP4 -> [DP2] -> [DP6] -> DP3 ⁶ , no GlcNAc	(Zakarjassen et al., 2011)
			DP4 -> DP3 ⁶	-	-	-	-	DP4 -> [DP2] -> [DP6] -> DP3 ⁶ , no GlcNAc	(Zakarjassen et al., 2011)
			DP4 -> DP3 ⁶	-	-	-	-	DP4 -> [DP2] -> [DP6] -> DP3 ⁶ , no GlcNAc	(Zakarjassen et al., 2011)
			DP4 -> DP3 ⁶	-	-	-	-	DP4 -> [DP2] -> [DP6] -> DP3 ⁶ , no GlcNAc	(Zakarjassen et al., 2011)
			DP4 -> DP3 ⁶	-	-	-	-	DP4 -> [DP2] -> [DP6] -> DP3 ⁶ , no GlcNAc	(Zakarjassen et al., 2011)
			DP4 -> DP3 ⁶	-	-	-	-	DP4 -> [DP2] -> [DP6] -> DP3 ⁶ , no GlcNAc	(Zakarjassen et al., 2011)
<i>Serratia marcescens</i> GRS5	SmChID	wt	DP3 -> DP4-DP6	-	2,6% (DP4-DP6)	-	3 h	traces DP7-DP8 per MALDI-TOF	(Vaikuntapu et al., 2016)
			DP4 -> DP5 + DP6	-	5,2% (DP5), 3,7% (DP6)	-	30 min	traces DP7-DP8 per MALDI-TOF	(Vaikuntapu et al., 2016)
			DP5 -> DP6	-	3,9% (DP6)	-	-	traces DP7-DP8 per MALDI-TOF	(Vaikuntapu et al., 2016)
			DP6 -> DP7 + DP8	-	-	-	-	traces DP7-DP8 per MALDI-TOF	(Vaikuntapu et al., 2016)
			DP3 -> DP4-DP7	10% (DP4-DP6)	13% (DP4-DP6)	60%	15 min	traces DP7 per HPLC i MALDI-TOF	(Purushotham and Podile, 2012)
			DP4 -> DP5-DP10	14,3% (DP5+DP6)	10,8% (DP5+DP6)	79%	45 min	traces DP7-DP10 per MALDI-TOF	(Purushotham and Podile, 2012)
<i>Serratia proteomaculans</i>	SpChID	wt	DP5 -> DP6-DP12	5% (DP6)	4,4% (DP6)	89%	90 min	traces DP7-DP12 per MALDI-TOF	(Purushotham and Podile, 2012)
			DP6 -> DP7-DP13	-	-	-	-	traces DP7-DP13 per MALDI-TOF	(Purushotham and Podile, 2012)
			DP4 -> DP5 + DP6	10,9% (DP5+DP6)	6,3% (DP5), 4% (DP6)	62,5%	30 min	traces DP7-DP13 per MALDI-TOF	(Madhupratkash et al., 2012)
			DP4 -> DP5 + DP6	2% (DP5 + DP6)	1% (DP5), 1,1% (DP6)	12,5%	6 h	traces DP7-DP13 per MALDI-TOF	(Madhupratkash et al., 2012)
			DP4 -> DP5 + DP6	10,9% (DP5+DP6)	6,3% (DP5), 4% (DP6)	62,5%	30 min	traces DP7-DP13 per MALDI-TOF	(Madhupratkash et al., 2012)
			DP4 -> DP5 + DP6	2% (DP5 + DP6)	1% (DP5), 1,1% (DP6)	12,5%	6 h	traces DP7-DP13 per MALDI-TOF	(Madhupratkash et al., 2012)

¹ Rendiment (%) de productes de transglicosidació; ² %TG: productes de TG en relació als productes totals a temps de reacció òptim; ³ % conversió: percentatge de substrat consumit a temps de reacció òptim; ⁴ T_{opt.}: temps de reacció òptim (quan el %TG és màxim); ⁵ mutant del residu assistent; ⁶ reacció de TG que resulta en la formació d'oligòmers més curts que el substrat, resultants de productes de TG intermedis. La reacció proposada que dona lloc als productes finals es detalla a "observacions"; ⁷ DP2-pNP, DP3-pNP, DP3-pNP-glicòsids p-nitrofenil de COS (DP2 or DP3) com a substrat. Els valors corresponents al rendiment (%), % TG a temps òptim i % conversió de reacció han estat calculats a partir de les dades proporcionades en la bibliografia. En negreta es mostren els valors reportats en la bibliografia. Dp1 fa referència a (GlcNAc)_n.

Organisme	Quitinasa	Enzim	Activitat TG	Rendiment (%) ¹	% TG ²	% conv ³	T _{opt.} ⁴	Observacions	Referències
<i>Serratia proteamaculans</i>	SpChid	Y154A	DP4 → DP5 + DP6	15,4% (DP5+DP6)	8,8% (DP5), 4,6% (DP6)	65%	5 min		(Madhuprakash et al., 2012)
		M220A	DP4 → DP5 + DP6	1,9% (DP5+DP6)	12% (DP5), 5,8% (DP6)	75%	6 h		(Madhuprakash et al., 2012)
		Y222A	DP4 → DP5 + DP6	16,9% (DP5+DP6)	13,6% (DP5), 6,8% (DP6)	80%	6 h		(Madhuprakash et al., 2012)
		R278A	DP4 → DP5 + DP6	13,5% (DP5+DP6)	9,8% (DP5), 6,2% (DP6)	80%	3 h		(Madhuprakash et al., 2012)
		F58W	DP4 → DP5 + DP6	20,8% (DP5+DP6)	12,9% (DP5), 6,6% (DP6)	75%	1 h		(Madhuprakash et al., 2012)
		S110G	DP4 → DP5 + DP6	2,1% (DP5+DP6)	11,7% (DP5), 8,8% (DP6)	72,5%	3 h		(Madhuprakash et al., 2012)
		F119A	DP4 → DP5 + DP6	20,3% (DP5+DP6)	10,4% (DP5), 7,8% (DP6)	67,5%	6 h		(Madhuprakash et al., 2012)
		W241A	DP4 → DP5 + DP6	16,4% (DP5+DP6)	9,8% (DP5), 7,2% (DP6)	58,4%	6 h		(Madhuprakash et al., 2012)
		G113S	DP4 → DP5 + DP6	18,4% (DP5+DP6)	9,5% (DP5), 8,4% (DP6)	60%	6 h		(Madhuprakash et al., 2012)
		G113W	DP4 → DP5 + DP6	2% (DP5 + DP6)	0,8% (DP5), 1,1% (DP6)	65%	6 h		(Madhuprakash et al., 2014)
		W114A	DP4 → DP5 + DP6	2,3% (DP5+DP6)	1% (DP5), 0,5% (DP6)	50%	5 min		(Madhuprakash et al., 2012)
		G195W	DP4 → DP5 + DP6	18,8% (DP5+DP6)	8,6% (DP5), 8,6% (DP6)	50%	90 min		(Madhuprakash et al., 2014)
		W290A	DP4 → DP5 + DP6	7,3% (DP5+DP6)	4,3% (DP5), 6,3% (DP6)	81,3%	30 min		(Bobbili, et al., 2015)
		W395A	DP4 → DP5 + DP6	7,5% (DP5+DP6)	12,4% (DP5), 4,3% (DP6)	80%	12 h		(Bobbili, et al., 2015)
		Y28A	DP4 → DP5 + DP6	9,2% (DP5+DP6)	9,3% (DP5), 6,8% (DP6)	90%	8 h		(Bobbili, et al., 2015)
		T36G	DP4 → DP5 + DP6	-	3,8% (DP5), 5,8% (DP6)			3,8% (DP5, 30 min), 5,8% (DP6, 5 min)	(Madhuprakash, Bobbili, et al., 2015)
		T36F	DP4 → DP5 + DP6	-	4,3% (DP5), 9% (DP6)			4,3% (DP5, 60 min), 9% (DP6, 30 min)	(Bobbili, et al., 2015)
		E153D/F58W	DP4 → DP5 + DP6	7,3% (DP5+DP6)	5,9% (DP5), 0,8% (DP6)	10%	6 h		(Madhuprakash, Bobbili, et al., 2015)
		Δ(Asn30-Asp42)	DP4 → DP5 + DP6	8,5% (DP5+DP6)	9,7% (DP5), 8,4% (DP6)	90%	8 h		(Madhuprakash, Bobbili, et al., 2015)

¹ Rendiment (%) de productes de transglicosidació; ² TG: productes de TG en relació als productes totals a temps de reacció òptim; ³ % conversió: percentatge de substrat consumit a temps de reacció òptim; ⁴ t_{opt.}: temps de reacció òptim (quan el %TG és màxim); ⁵ mutant del residu assistent; ⁶ reacció de TG que resulta en la formació d'oligòmers més curts que el substrat, resultants de productes de TG intermedis. La reacció proposada que dona lloc als productes finals es detalla a "Observacions"; ⁷ DP2-pNP, DP3-pNP; glicòsids p-nitrofenil de COS (DP2 or DP3) com a substrat. Els valors corresponents al rendiment (%), % TG a temps òptim i % conversió de reacció han estat calculats a partir de les dades proporcionades en la bibliografia. En negreta es mostren els valors reportats en la bibliografia. DPn fa referència a (GlcNAc)_n.

Organisme	Quitnasa	Enzim	Activitat TG	Rendiment (%) ¹	% TG ²	% conv ³	T _{opt.} ⁴	Observacions	Referències
<i>Serratia proteomaculans</i>	SpChID	wt	DP4 --> DP5 + DP6	11% (DP5+DP6)	-	83%	15 min		(Madhuprakash et al., 2018)
		Y28A	DP4 --> DP5 + DP6	21% (DP5+DP6)	-			[DP5] màx. als 180 min; [DP6] màx. als 45 min. Traces DP7-DP8 per HPLC	(Madhuprakash et al., 2018)
		Y222A	DP4 --> DP5 + DP6	21% (DP5+DP6)	-			[DP5] màx. als 15 min; [DP6] màx. als 60 min. Traces DP7-DP8 per HPLC	(Madhuprakash et al., 2018)
		Y226W	DP4 --> DP5 + DP6	15% (DP5+DP6)	-			[DP5] màx. als 15 min; [DP6] màx. als 5 min. Traces DP7-DP8 per HPLC	(Madhuprakash et al., 2018)
		D151N ⁵	DP4 --> DP5 + DP6	19% (DP5+DP6)	-			[DP5] màx. a les 12 h; [DP6] màx. a les 6 h. Traces DP7-DP8 per HPLC	(Madhuprakash et al., 2018)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	StrmChIA	D151N/Y228A	DP4 --> DP5 + DP6	15% (DP5+DP6)	-	75%	24 h	traces DP7-DP8 per HPLC	(Madhuprakash et al., 2018)
		D151N/Y222A	DP4 --> DP5 + DP6	22% (DP5+DP6)	-			[DP5] màx. a les 8,8h; [DP6] màx. a les 24h. Traces DP7-DP8 per HPLC	(Madhuprakash et al., 2018)
		D151N/Y226W	DP4 --> DP5 + DP6	22% (DP5+DP6)	-			[DP5] i [DP6] màx. a les 12h. Traces DP7-DP8 per HPLC	(Madhuprakash et al., 2018)
		D151N/Y226W /Y28A	DP4 --> DP5 + DP6	17% (DP5+DP6)	-	57%	24 h	traces DP7-DP8 per HPLC	(Madhuprakash et al., 2018)
		D151N/Y226W /Y222A	DP4 --> DP5 + DP6	22% (DP5+DP6)	-			[DP5] màx. a les 6h; [DP6] màx. a les 12h. Traces DP7-DP8 per HPLC	(Madhuprakash et al., 2018)
		wt	DP4 --> DP4 ⁵	-	-	-		DP4 --> [DP2] --> DP4 ⁶	(Suma and Podile, 2013;
		wt	DP6 --> DP6 ⁶	-	-	-		DP6 --> [DP2,DP3,DP4] --> DP6 ⁶	(Suma and Podile, 2013)
		W306A	DP3 --> DP4 + DP5	<1% (DP4), <1% (DP5)	<1% (DP4), <1% (DP5)	25%	15 min		(Bhuvanachandra, Madhuprakash and Podile, 2018)
		W306A	DP4 --> DP5 + DP6	3% (DP5), 8% (DP6)	2,5% (DP5), 7,2% (DP6)	65%	15 min		(Bhuvanachandra, Madhuprakash and Podile, 2018)
		W306A	DP5 --> DP6 + DP7	5% (DP6)	4,2% (DP6)	64%	5 min	traces DP7 per HPLC	(Bhuvanachandra, Madhuprakash and Podile, 2018)
W679A	DP3 --> DP4 + DP5	5% (DP4), 1% (DP5)	6,8% (DP4), 1,5% (DP5)	30%	12 h		(Bhuvanachandra, Madhuprakash and Podile, 2018)		
W679A	DP4 --> DP5 + DP6	5% (DP5), 6% (DP6)	5% (DP5), 5,8% (DP6)	30%	12 h		(Bhuvanachandra, Madhuprakash and Podile, 2018)		
W679A	DP5 --> DP6 + DP7	2% (DP6)	1,7% (DP6)	4%	3 h	traces DP7 per HPLC	(Bhuvanachandra, Madhuprakash and Podile, 2018)		

¹ Rendiment (%) de productes de transglicosidació; ² %TG: productes de TG en relació als productes totals a temps de reacció òptim; ³ % conversió: percentatge de substrat consumit a temps de reacció òptim; ⁴ T_{opt.}: temps de reacció òptim (quan el %TG és màxim); ⁵ mutant del residu assistent; ⁶ reacció de TG que resulta en la formació d'oligòmers més curts que el substrat, resultants de productes de TG intermediaris. La reacció proposada que dona lloc als productes finals es detalla a "Observacions"; ⁷ DP2-pNP, DP3-pNP, glicòsids p-nitrofenil de COS (DP2 or DP3) com a substrat. Els valors corresponents al rendiment (%), % TG a temps òptim i % conversió de reacció han estat calculats a partir de les dades proporcionades en la bibliografia. En negreta es mostren els valors reportats en la bibliografia. DPh fa referència a (GICNAc)_n.

Organisme	Quitinasa	Enzim	Activitat TG	Rendiment (%) ¹	% TG ²	% conv ³	T _{opt.} ⁴	Observacions	Referències
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	StmChiA	D464N ⁵	DP4 → DP5 + DP6	1,3% (DP5), 1,8% (DP6)	1% (DP5), 1,5% (DP6)	17%	3 h		(Bhuvanachandra, Madhuprakash and Podile, 2018)
		D464N ⁵	DP5 → DP6 + DP7	2,5% (DP6)	2,2% (DP6)	29%	3 h	traces DP7 per HPLC	(Bhuvanachandra, Madhuprakash and Podile, 2018)
<i>Vibrio harveyi</i>	VhChiA	wt	DP3 → DP4-DP6	-	-	-	-	traces DP4-DP6 per HPLC	(Suginta et al., 2005)
		D392N	DP3 → DP4-DP6	-	-	-	-	traces DP4-DP6 per HPLC	(Suginta et al., 2005)
		wt	DP4 → DP5 + DP6 + DP8	-	-	-	-	Ràtio TG/H = 12%, expressat com (DP5+DP6)/DP2	(Suginta et al., 2005)
		D392N	DP4 → DP5 + DP6 + DP8	-	-	-	-	Ràtio TG/H = 23%, expressat com (DP5+DP6)/DP2	(Suginta et al., 2005)
		wt	DP5 → DP6-DP8	-	-	-	-	traces DP6-DP8 per HPLC	(Suginta et al., 2005)
		D392N	DP5 → DP6-DP8	-	-	-	-	traces DP6-DP8 per HPLC	(Suginta et al., 2005)
		wt	DP2pNP ⁷ → DP3 + DP4	-	-	-	-	traces DP3-DP4 per HPLC	(Suginta et al., 2005)
		D392N	DP2pNP ⁷ → DP3 + DP4	-	-	-	-	traces DP3-DP4 per HPLC	(Suginta et al., 2005)
		wt	DP3pNP ⁷ → DP4-DP6	-	-	-	-	traces DP4-DP6 per HPLC	(Suginta et al., 2005)
		D392N	DP3pNP ⁷ → DP4-DP6	-	-	-	-	traces DP4-DP6 per HPLC	(Suginta et al., 2005)
		W168G	DP4 → DP5	-	-	-	-	traces DP5 per TLC	(Suginta et al., 2007)
		wt	DP4 → DP3 ⁶	-	-	-	-	DP4 → DP2 → [DP6] → DP3 ⁶ , no GlnNac	(Sirimontree et al., 2014)
		wt	DP5 → DP4 ⁶	-	-	-	-	DP5 → DP2, DP3 → [DP7] → DP4 ⁶ , no GlnNac	(Sirimontree et al., 2014)
		W570G	DP4 → DP3 ⁶ + DP5	7,40% (DP5)	5,80% (DP5)	56%	15 min	DP4 → DP2 → [DP6] → DP3 → DP5, no GlnNac	(Sirimontree et al., 2014)
		W570G	DP5 → DP4 ⁶	-	-	-	-	DP5 → DP2, DP3 → [DP7] → DP4 ⁶ , no GlnNac	(Sirimontree et al., 2014)
W570G	DP6 → DP5 ⁶	-	-	-	-	DP6 → DP2, DP3, DP4 → [DP8] → DP5 ⁶ , no GlnNac	(Sirimontree et al., 2014)		
D392N	DP4 → DP3 ⁶	-	-	-	-	DP4 → DP2 → [DP6] → DP3 ⁶ , no GlnNac	(Sirimontree et al., 2014)		
D392N	DP5 → DP4 ⁶	-	-	-	-	DP5 → DP2, DP3 → [DP7] → DP4 ⁶ , no GlnNac	(Sirimontree et al., 2014)		
D313A ⁵	DP4 → DP6	-	-	-	-	traces DP6 per HPLC	(Sirimontree et al., 2014)		
D313N ⁵	DP4 → DP6	-	-	-	-	traces DP6 per HPLC	(Sirimontree et al., 2014)		
D313A ⁵	DP5 → DP7	-	-	-	-	traces DP7 per HPLC	(Sirimontree et al., 2014)		
D313N ⁵	DP5 → DP7	-	-	-	-	traces DP7 per HPLC	(Sirimontree et al., 2014)		
D313A ⁵	DP6 → DP8	-	-	-	-	traces DP8 per HPLC	(Sirimontree et al., 2014)		
D313N ⁵	DP6 → DP8	-	-	-	-	traces DP8 per HPLC	(Sirimontree et al., 2014)		

¹ Rendiment (%) de productes de transglicosidació; ² %TG: productes de TG en relació als productes totals a temps de reacció òptim; ³ % conversió: percentatge de substrat consumit a temps de reacció òptim; ⁴ t_{opt.}: temps de reacció òptim (quan el %TG és màxim); ⁵ mutant del residu assistent; ⁶ reacció de TG que resulta en la formació d'oligòmers més curts que el substrat, resultants de productes de TG intermedis. La reacció proposada que dona lloc als productes finals es detalla a "observacions"; ⁷ DP2-pNP, DP3-pNP: glicòsids p-nitrofenil de COS (DP2 or DP3) com a substrat. Els valors corresponents al rendiment (%), % TG a temps òptim i % conversió de reacció han estat calculats a partir de les dades proporcionades en la bibliografia. En negreta es mostren els valors reportats en la bibliografia. DPn fa referència a (GlcNac)_n.

Organisme	Quitinasa	Enzim	Activitat TG	Rendiment (%) ¹	% TG ²	% conv ³	T _{opt.} ⁴	Observacions	Referències
ARQUEUS									
<i>Thermococcus kodakaraensis</i>	TkChIA	ChIA44	DP3 -> DP4 + DP5	-	-	-	-	traces DP4-DP5 per TLC	(Tanaka, Fukui and Imanaka, 2001)
<i>KOD1</i>		ChIA44	DP4 -> DP5 + DP6	-	-	-	-	traces DP5-DP6 per TLC	(Tanaka, Fukui and Imanaka, 2001)
		ChIA44	DP5 -> DP6	-	-	-	-	traces DP6 per TLC	(Tanaka, Fukui and Imanaka, 2001)
		ChIA45	DP3 -> DP4 + DP5	-	-	-	-	traces DP4-DP5 per TLC	(Tanaka, Fukui and Imanaka, 2001)
		ChIA45	DP4 -> DP5 + DP6	-	-	-	-	traces DP5-DP6 per TLC	(Tanaka, Fukui and Imanaka, 2001)
		ChIA45	DP5 -> DP6	-	-	-	-	traces DP6 per TLC	(Tanaka, Fukui and Imanaka, 2001)
ANIMALS									
<i>Homo sapiens sapiens</i>	Quitotri-sidasa	wt	DP2-pNP ⁷ + GlcNAc-MU -> 4MU + altres	-	-	-	-	DP2-pNP + GlcNAc-MU -> [pNP + DP3-MU] -> 4MU + [DP3]. No hidròlisi de GlcNAc-MU	(Aguilera et al., 2003)
		wt	DP5 -> DP6-DP9	8% (DP6-DP9)	6% (DP6-DP9)	48%	10 min		(Aguilera et al., 2003)
FONGS									
<i>Aspergillus fumigatus</i>	ChIB1	wt	DP6 -> DP8	2% (DP8)	1,7% (DP8)	31%	20 min		(Jaques et al., 2003)
		wt	DP5 -> DP7	2% (DP7)	1,3% (DP7)	65%	90 min		(Jaques et al., 2003)
		wt	DP4 -> DP6	2,6% (DP6)	2% (DP6)	35%	30 min		(Lü et al., 2009)
		wt	DP2-pNP ⁷ -> DP2 + GlcNAc-pNP ⁶	-	-	-	-	DP2-pNP -> [DP4-pNP] -> DP3 + GlcNAc-pNP ⁶ . Ràtio GlcNAc-pNP/DP2 = 0,2 als 45 min	(Lü et al., 2009)
		M243E	DP2-pNP ⁷ -> DP2 + GlcNAc-pNP ⁶	-	-	-	-	DP2-pNP -> [DP4-pNP] -> DP3 + GlcNAc-pNP ⁶	(Lü et al., 2009)
		D246E	DP2-pNP ⁷ -> DP2 + GlcNAc-pNP ⁶	-	-	-	-	DP2-pNP -> [DP4-pNP] -> DP3 + GlcNAc-pNP ⁶ . Ràtio GlcNAc-pNP/DP2 = 0,7 als 45 min	(Lü et al., 2009)
		wt	DP4 -> DP5 + DP6	-	-	-	-	traces DP5-DP6 per TLC	(Lü et al., 2009)
		M243E	DP4 -> DP5 + DP6	-	-	-	-	traces DP5-DP6 per TLC	(Lü et al., 2009)
		D246E	DP4 -> DP5 + DP6	-	-	-	-	traces DP5-DP6 per TLC	(Lü et al., 2009)
		wt	DP5 -> DP6	-	-	-	-	traces DP6 per TLC	(Lü et al., 2009)

¹ Rendiment (%) de productes de transglicosidació; ²%TG: productes de TG en relació als productes totals a temps de reacció òptim; ³% conversió: percentatge de substrat consumit a temps de reacció òptim; ⁴T_{opt.}: temps de reacció òptim (quan el %TG és màxim); ⁵mutant del residu assistent; ⁶reacció de TG que resulta en la formació d'oligòmers més curts que el substrat, resultants de productes de TG intermediaris. La reacció proposada que dona lloc als productes finals es detalla a "Observacions"; ⁷DP2-pNP, DP3-pNP, glicòsids *p*-nitrofenil de COS (DP2 or DP3) com a substrat. Els valors corresponents al rendiment (%), % TG a temps òptim i % conversió de reacció han estat calculats a partir de les dades proporcionades en la bibliografia. En negreta es mostren els valors reportats en la bibliografia. DpN fa referència a (GlcNAc)_N.

Organisme	Quitinasa	Enzim	Activitat TG	Rendiment (%) ¹	% TG ²	% conv ³	T _{opt.} ⁴	Observacions	Referències
<i>Coccidioides immitis</i>	CIX1	wt	DP6 --> DP8	9,3% (DP8)	8,3% (DP8)	33%	90 min		(Fukamizo <i>et al.</i> , 2001)
		wt	DP5 --> DP7	10,9% (DP7)	9,2% (DP7)	55%	3 h		(Fukamizo <i>et al.</i> , 2001)
		wt	DP4 --> DP6	10,3% (DP6)	8,5% (DP6)	52%	2,5 h		(Fukamizo <i>et al.</i> , 2001)
		wt	DP4 --> DP6	24% (DP6)					(Usui, Matsui and Isobe, 1990)
PLANTES									
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtChiC	wt	DP6 --> DP7-DP8	-	-			traces DP7-DP8 per MALDI-TOF	(Ohnuma, Numata, Osawa, Mizuhara, Lampela, <i>et al.</i> , 2011)
	G75W	G75W	DP4 --> DP6	7,35% (DP6)	5,9% (DP6)	26%	20 min		(Umamoto <i>et al.</i> , 2013)
	G75W	G75W	DP4 --> DP5-DP11	-	-			traces DP5-DP11 per MALDI-TOF	(Umamoto <i>et al.</i> , 2013)
	G75W	G75W	DP5 --> DP7	6,9% (DP7)	5,9% (DP7)	69%	15 min		(Umamoto <i>et al.</i> , 2013)
<i>Cycas revoluta</i>	G75W	G75W	DP6 --> DP8-DP12	10,9% (DP8)	7,75% (DP8)	62%	15 min	traces DP9-DP12 per MALDI-TOF	(Umamoto <i>et al.</i> , 2013)
	CrChi-A	wt	DP6 --> DP5 ⁵ -DP9	-	-			DP6 --> [DP2,DP3,DP4] --> DP5 ⁵ , no GlcNAC. Traces DP7-DP9 per MALDI-TOF	(Taira <i>et al.</i> , 2009)
		wt	DP4 --> DP3 ⁶	-	-			DP4 --> [DP2] --> [DP6] --> DP3 ⁶ , no GlcNAC	(Umamoto <i>et al.</i> , 2015)
		wt	DP5 --> DP4 ⁶	-	-			DP5 --> [DP2,DP3] --> DP4 ⁶ , no GlcNAC	(Umamoto <i>et al.</i> , 2015)
		G77W	DP4 --> DP5 + DP6	4,7% (DP5+DP6)	4% (DP5+DP6)	55%	30 min		(Umamoto <i>et al.</i> , 2015)
		G77W	DP5 --> DP6	9,8% (DP6)	8,7% (DP6)	68%	30 min		(Umamoto <i>et al.</i> , 2015)
<i>Nicotiana tabacum</i>	G77W	G77W	DP6 --> DP7	8,3% (DP7)	7,2% (DP7)	62%	10 min	traces DP8-DP10 per MALDI-TOF	(Umamoto <i>et al.</i> , 2015)
	NiChiA	wt	DP4 --> DP6	-	-			traces DP6 per MALDI-TOF	(Ohnuma, Numata, Osawa, Mizuhara, Vårum, <i>et al.</i> , 2011)
		wt	DP6 --> DP7 + DP8	-	-			traces DP7 i DP8 per MALDI-TOF	(Ohnuma, Numata, Osawa, Mizuhara, Vårum, <i>et al.</i> , 2011)
	G74W	G74W	DP4 --> DP3 ⁶	-	-			DP4 --> [DP2] --> [DP6] --> DP3 ⁶ , no GlcNAC	(Umamoto <i>et al.</i> , 2013)

¹ Rendiment (%) de productes de transglicosidació; ² %TG: productes de TG en relació als productes totals a temps de reacció òptim; ³ % conversió: percentatge de substrat consumit a temps de reacció òptim; ⁴ t_{opt.}: temps de reacció òptim (quan el %TG és màxim); ⁵ mutant del residu assistent; ⁶ reacció de TG que resulta en la formació d'oligòmers més curts que el substrat, resultants de productes de TG intermedis. La reacció proposada que dona lloc als productes finals es detalla a "observacions"; ⁷ DP2-pNP, DP3-pNP: glicòsids p-nitrofenil de COS (DP2 or DP3) com a substrat. Els valors corresponents al rendiment (%), % TG a temps òptim i % conversió de reacció han estat calculats a partir de les dades proporcionades en la bibliografia. En negreta es mostren els valors reportats en la bibliografia. DPn fa referència a (GlcNAC)_n.

Vàries quitinases, principalment bacterianes, presenten activitat de TG en temps inicials de reacció, però els productes de TG són ràpidament hidrolitzats a causa de l'activitat hidrolítica que presenten. Per aquest motiu, els rendiments de TG que s'obtenen no són gaire elevats i en la majoria de casos no es reporten. A partir dels rendiments calculats, s'ha observat que el rendiment de TG de quitinases *wt* caracteritzades fins el moment no supera el 10%, a excepció de la quitinasa D de *Serratia proteamaculans* (*SpChiD*) que presenta un rendiment del 14% en formació de (GlcNAc)₅-(GlcNAc)₉ a partir de (GlcNAc)₄ com a substrat, fet que la caracteritza com a quitinasa hipertransglicosidasa (Purushotham and Podile, 2012). També cal destacar les quitinases de *Trichoderma reesei* i de *Nocardia orientalis*, amb els que s'ha assolit un rendiment de TG del 24% i 21%, respectivament, utilitzant (GlcNAc)₄ com a substrat, mitjançant l'addició de sulfat i/o acetat d'amoni en la reacció, amb l'objectiu de desafavorir la presència de molècules d'aigua en el centre actiu i per tant, afavorir la reacció de TG (Nanjo *et al.*, 1989; Usui, Matsui and Isobe, 1990).

Amb l'objectiu d'incrementar el rendiment de TG, s'ha aplicat estratègies de mutagènesi dirigida principalment tant en residus implicats en la catàlisi com en residus responsables de la unió de l'acceptor, és a dir, residus situats en els subsetis positius. Mitjançant aquestes mutacions s'ha aconseguit augmentar l'activitat de TG respecte les quitinases *wt* resultant en un increment en la quantitat de productes de TG i/o en un canvi en la durada de formació d'aquests. Tot i així, en bibliografia tampoc no es reporta el rendiment de TG dels mutants, excepte en el cas dels mutants de *SpChiD*, la quitinasa més àmpliament estudiada en relació a l'activitat de TG, en el que es reporta la proporció de productes de TG respecte el total de productes a un temps determinat de reacció (% TG). A partir dels rendiments calculats, s'observa que mitjançant mutagènesi s'ha aconseguit incrementar el rendiment de TG de *SpChiD* fins a un 21% amb els mutants simples F58W i S110G (Madhuprakash *et al.*, 2012). Recentment s'ha aconseguit incrementar el rendiment fins al 22% en (GlcNAc)₅ i (GlcNAc)₆ (com a productes de TG a partir de (GlcNAc)₄ com a substrat) amb els mutants D151N/Y222A, D151N/Y226W i D151N/Y222A/Y226W d'*SpChiD* (Madhuprakash *et al.*, 2018). Tot i així, els rendiments són calculats a partir de les concentracions màximes de (GlcNAc)₅ i (GlcNAc)₆ al llarg del curs de reacció, obtingudes en diferents temps de reacció, és a dir, no hi ha un temps de reacció en concret en el que s'obtingui aquest rendiment de TG.

Recentment, el grup d'A. R. Podile ha reportat noves quitinases amb activitat de TG: quitinasa D de *Serratia marcescens* (*SmChiD*) (Vaikuntapu *et al.*, 2016), quitinasa 1 d'*Enterobacter cloacae* (Mallakuntla *et al.*, 2017) i quitinasa B de *Flavobacterium johnsoniae* (Vaikuntapu *et al.*, 2018), i a més, també s'ha reportat increments en l'activitat de TG de les quitinases A de *Stenotrophomonas maltophilia* i *Serratia marcescens* mitjançant mutagènesi (Bhuvanachandra, Madhuprakash and Podile, 2018; Madhuprakash *et al.*, 2018).

D'entre els mutants dels residus catalítics, s'ha observat que la mutació del segon aspàrtic del motiu conservat DxDxE, corresponent al residu assistent, per una asparagina en les quitinases A i B de *Serratia marcescens* (Zakariassen *et al.*, 2011), manté l'activitat de TG de

l'enzim, tot i que disminueix l'activitat hidrolítica d'aquest, i consegüentment la formació de productes de TG es prolonga al llarg del temps. També es troba reportada la mutació del residu assistent de la quitinasa A1 de *Bacillus circulans* (D202A) amb la que s'obté una mescla de COS com a productes de TG amb graus de polimerització de fins a 12 a partir de (GlcNAc)₅ com a donador (Martinez *et al.*, 2012), i de la quitinasa A de *Vibrio harveyi* (D313A, D313N), amb les que s'obté (GlcNAc)₈ a partir de (GlcNAc)₆ com a substrat (Sirimontree *et al.*, 2014). A causa de l'increment en l'activitat de TG resultant de la mutació del residu assistent, els estudis recents han optat per la mutació d'aquest residu per a potenciar l'activitat de TG de les diferents quitinases. Així doncs, aquest últim any també s'ha reportat la mutació d'aquest residu per a les quitinases *StmChiA* (D464N), *SpChiD* (D151N) i *FjChiB* (D148N) (Bhuvanachandra, Madhuprakash and Podile, 2018; Madhuprakash *et al.*, 2018; Vaikuntapu *et al.*, 2018).

Per altra banda, es troben citats diferents estudis en els que s'utilitza derivats oxazolina com a substrat per a la reacció de TG (Taula 1.2). Kobayashi *et al.* reporten el primer exemple de glicosidació enzimàtica de quitinases en el que s'utilitza un derivat oxazolina com a donador glicosídic (Kobayashi, Kiyosada and Shoda, 1996, 1997). Amb les quitinases *wt* de *Bacillus sp.*, a pH bàsic, on la hidròlisi de COS es troba reduïda significativament, el substrat oxazolina és capaç d'actuar com a donador glicosídic donant lloc a la formació d'oligòmers més llargs. Seguint aquesta estratègia, s'ha obtingut quitobiosa per reacció del derivat oxazolina de GlcNAc com a donador i GlcNAc com a acceptor, i també altres polímers de quitina artificial a partir de (GlcNAc)₂-ox com a substrat, mitjançant la quitinasa de *Bacillus sp.* Posteriorment, també s'ha utilitzat l'oxazolina del disacàrid GlcNβ(1→4)GlcNAc per a la obtenció de polímers de quitosà a partir de l'acció de les quitinases comercials de *Bacillus sp.*, *Serratia marcescens* i *Streptomyces griseus*, amb les que s'ha obtingut polímers de fins a 8-12 monòmers, amb rendiments de TG aparents de 64%, 62% i 34%, respectivament (Makino *et al.*, 2006). Recentment, s'ha combinat l'ús d'enzims amb la mutació del residu assistent i la utilització de derivats oxazolina de COS per a la obtenció de polímers de quitina. Per reacció del mutant D202A de *B. circulans* amb el derivat oxazolina de (GlcNAc)₂ s'ha obtingut una mescla de COS amb graus de polimerització d'entre 3 i 13. Amb el mutant D170A de *Trichoderma harzianum*, també utilitzant el derivat oxazolina de (GlcNAc)₂, s'obté una mescla de COS amb graus de polimerització parells d'entre 4 i 10. A més, també s'han realitzat reaccions de condensació donador + acceptor a partir de les quals també s'obté una mescla de productes de TG (Martinez *et al.*, 2012).

Taula 1.2. Quitinases GH18 amb activitat de transglucosidació reportada utilitzant derivats oxazolina de COS com a substrat

Organisme	Quitinasa	Enzim	Activitat TG	t _{reacció} ¹	Observacions	Referències
BACTERIS						
<i>Bacillus sp.</i>	Preparat comercial	wt	DP2-ox --> (GlcNAc) _n	50 h	M _v = 4,6 x 10 ⁴	(Kobayashi, Kiyosada and Shoda, 1996)
		wt	GlcNAc-ox + GlcNAc --> DP2	6 h		(Kobayashi, Kiyosada and Shoda, 1997)
		wt	GalGlcNAc-ox + GlcNAcβ-OMe--> GalGlcNAcGlcNAcβ-OMe	30 min	%TG ³ = 55%	(Shoda <i>et al.</i> , 2002)
		wt	GalGlcNAc-ox + GlcNAcβ-SMe--> GalGlcNAcGlcNAcβ-SMe	24 h	%TG ³ ≈ 60%	(Shoda <i>et al.</i> , 2002)
		wt	GlcNGlcNAc-ox --> (GlcNGlcNAc) ₄ + altres	0,7 h	%TG ³ = 64%. Traces DP4-DP14 (n=2-7) per MALDI-TOF	(Makino <i>et al.</i> , 2006)
		wt	GlcNGlcNAc-ox --> (GlcNGlcNAc) _{4,5} + altres	3 h	%TG ³ = 58%	(Makino <i>et al.</i> , 2006)
<i>Bacillus circulans</i>	BcChiA1	wt	GalGlcNAc-ox + DP2--> Gal(GlcNAc) ₃		pH 7,0, %TG ³ ≈ 35% als 20 min pH 10,4, %TG ³ ≈ 25% a les 4 h	(Shoda <i>et al.</i> , 2002)
		wt	GalGlcNAc-ox + GlcNAcβ-OMe--> GalGlcNAcGlcNAcβ-OMe		pH 7,0 i 10,4	(Shoda <i>et al.</i> , 2002)
		D202N ²	GalGlcNAc-ox + DP2--> Gal(GlcNAc) ₃		pH 7,0, %TG ³ ≈ 40% a les 4 h pH 10,4, %TG ³ ≈ 25% a les 4 h	(Shoda <i>et al.</i> , 2002)
		Y279F	GalGlcNAc-ox + DP2--> Gal(GlcNAc) ₃		pH 7,0, rendiments superiors que l'enzim wt.	(Shoda <i>et al.</i> , 2002)
		D280N	GalGlcNAc-ox + DP2--> Gal(GlcNAc) ₃		pH 7,0, rendiments superiors que l'enzim wt.	(Shoda <i>et al.</i> , 2002)
		W433F	GalGlcNAc-ox + DP2--> Gal(GlcNAc) ₃		pH 7,0, rendiments superiors que l'enzim wt.	(Shoda <i>et al.</i> , 2002)
		wt	Gal(GlcNAc) ₂ -ox + DP2 --> Gal(GlcNAc) ₄	5-6 h	pH 10; ràtio producte TG/donador restant = 32,5	(Martinez <i>et al.</i> , 2012)
		D200A	Gal(GlcNAc) ₂ -ox + DP2 --> Gal(GlcNAc) ₄	48 h	pH7; ràtio producte TG/donador restant = 22	(Martinez <i>et al.</i> , 2012)
		D202A ²	Gal(GlcNAc) ₂ -ox + DP2 --> Gal(GlcNAc) ₄	56 h	pH7; ràtio producte TG/donador restant = 8	(Martinez <i>et al.</i> , 2012)
		D200A	DP2-ox --> DP3-DP13	24 h	traces DP3-DP13 per MALDI-TOF del precipitat	(Martinez <i>et al.</i> , 2012)
		D202A ²	DP2-ox --> DP3-DP13	24 h	traces DP3-DP13 per MALDI-TOF del precipitat	(Martinez <i>et al.</i> , 2012)
		D200A	Gal(GlcNAc) ₂ -ox + DP5 --> Gal(GlcNAc) ₇ + altres	18 h	traces per MALDI-TOF del precipitat: Gal(GlcNAc) ₇ + DP6-DP12 + Gal(GlcNAc) ₈ -Gal(GlcNAc) ₁₃	(Martinez <i>et al.</i> , 2012)
		D202A ²	Gal(GlcNAc) ₂ -ox + DP5 --> Gal(GlcNAc) ₇ + altres	18h	traces per MALDI-TOF del precipitat: Gal(GlcNAc) ₇ + DP6-DP12 + Gal(GlcNAc) ₈ -Gal(GlcNAc) ₁₃	(Martinez <i>et al.</i> , 2012)
		wt	DP2-ox --> DP3-DP6		traces DP3-DP6 per HPLC	(Sakamoto <i>et al.</i> , 2001)
E204Q	DP2-ox --> DP4 + DP6		traces DP4 i DP6 per HPLC	(Sakamoto <i>et al.</i> , 2001)		
<i>Serratia marcescens</i>	Preparat comercial	wt	GlcNGlcNAc-ox --> (GlcNGlcNAc) ₄ + altres	16 h	%TG ³ = 62%. Traces DP4-DP14 (n=2-7) per MALDI-TOF	(Makino <i>et al.</i> , 2006)
		wt	GlcNGlcNAc-ox --> (GlcNGlcNAc) _{5,6} + altres	24 h	%TG ³ = 75%	(Makino <i>et al.</i> , 2006)
<i>Streptomyces griseus</i>	Preparat comercial	wt	GlcNGlcNAc-ox --> (GlcNGlcNAc) ₄ + altres	0,7 h	%TG ³ = 34%. Traces DP4-DP14 (n=2-7) per MALDI-TOF	(Makino <i>et al.</i> , 2006)
FONGS						
<i>Trichoderma harzianum</i>	ThChit42	D170N ²	DP2-ox --> mescla de COS	18 h	traces per MALDI-TOF del precipitat	(Martinez <i>et al.</i> , 2012)
		D170A ²	DP2-ox --> DP4-DP10	18 h	traces DP4-DP10 per MALDI-TOF del precipitat, només COS amb DPs parells	(Martinez <i>et al.</i> , 2012)
		D170A ²	Gal(GlcNAc) ₂ -ox + DP5 --> DP5 + Gal(GlcNAc) ₇ + altres	18 h	traces per MALDI-TOF del precipitat: DP5 + Gal(GlcNAc) ₇ + petita quantitat de COS amb DPs elevats	(Martinez <i>et al.</i> , 2012)

¹t_{reacció}: temps de reacció en el que s'ha analitzat els productes de TG de les mostres; ²mutant del residu assistent; ³%TG: productes de TG respecte el total de productes presents en la mescla en el temps de reacció òptim.

1.1.2. Anàlisi estructural de quitinases procariotes

Entre les 88 estructures de la família 18 de les glicosil hidrolases es troben diverses estructures de quitinases, que exhibeixen arquitectures diferents. El domini catalític de totes elles presenta el plegament $(\alpha/\beta)_8$, característic de quitinases GH18. D'entre les estructures cristal·logràfiques es troben resoltes diferents estructures de quitinases eucariotes, com per exemple les quitinases fúngiques ChiB1 d'*Aspergillus fumigatus* i la quitinasa 1 de *Coccidioides immitis*; la quitinasa CTS1 de *Saccharomyces cerevisiae*; quitinases de plantes com la quitinasa C d'*Arabidopsis thaliana*, la quitinasa A de *Cycas revoluta* o la quitinasa ChiV de *Nicotiana tabacum*; o la Quitotriosidasa humana. També es troben resoltes estructures de quitinases bacterianes com les quitinases A, B i C de *S. marcescens*, la quitinasa D de *S. proteamaculans* o la quitinasa A de *Vibrio harveyi*. En canvi, només es troba resolta l'estructura d'una quitinasa pertanyent al regne *Archaea*, corresponent al domini catalític AD2 de la quitinasa B de *Pyrococcus furiosus*.

D'entre les estructures de quitinases GH18 procariotes resoltes, s'ha realitzat una cerca específica d'aquelles que es troben resoltes en complex amb substrat (Taula 1.3).

Taula 1.3. Estructures 3D de quitinases GH18 procariotes en complex amb substrat

Origen	Quitinasa	UNIPROT	PDB	Organització en dominis	Substrat en l'estructura
<i>Serratia marcescens</i>	ChiA	P07254	1EHN	FnIII-GH18	(GlcNAc) ₈
			1EIB		(GlcNAc) ₈
			1FFR		(GlcNAc) ₆
			1NH6		(GlcNAc) ₆
			1K9T		(GlcNAc) ₄
	ChiB	P11797	1E6N	GH18-CBM5/12	(GlcNAc) ₅
			1E6Z		(GlcNAc) _{2-ox}
<i>Serratia proteamaculans</i>	ChiD	A8GFD6	4Q22 4PTM	GH18	(GlcNAc) (GlcNAc)
<i>Moritella marina</i>	Chi60	B1VBB0	4HME 4MB4 4MB5	GH18-CBM5/12	(GlcNAc) ₂ (GlcNAc) ₄ (GlcNAc) ₅
<i>Bacillus cereus</i>	ChiNCTU2	D0VV09	3N13 3N15 3N17 3N18	GH18	(GlcNAc) ₂ (GlcNAc) ₂ (GlcNAc) ₂ (GlcNAc) ₄
<i>Vibrio harveyi</i>	ChiA	Q9AMP1	3B9A 3B9D	CBM5/12-GH18	(GlcNAc) ₆ (GlcNAc) ₅
<i>Pyrococcus furiosus</i>	ChiB	Q8U1H5	3A4W 3A4X	GH18 (AD2)	(GlcNAc) ₅ (GlcNAc) ₄

Per a l'anàlisi estructural de les diferents quitinases bacterianes s'utilitzarà com a referència les quitinases de *Serratia marcescens*, ja que la seva caracterització estructural i bioquímica es troba reportada en detall.

Serratia marcescens té 4 quitinases, 3 de les quals han estat àmpliament estudiades: la quitinasa A (ChiA) que té activitat principalment *exo*- i és processiva des de l'extrem reductor, la quitinasa B (ChiB) que també té activitat *exo*- i és processiva des de l'extrem no-reductor, i la quitinasa C (ChiC) que té activitat *endo*- i és no-processiva (Svein J. Horn *et al.*, 2006). A nivell estructural, el domini catalític de les tres quitinases presenta un plegament $(\alpha/\beta)_8$ (*TIM barrel*). Les quitinases ChiA i ChiB contenen a més un domini d'inserció $\alpha+\beta$ entre les cadenes $\beta 7$ i $\beta 8$ del *TIM barrel* que dona lloc a una cavitat d'unió a substrat profunda, tret característic de les quitinases bacterianes de la subfamília A. En canvi, la quitinasa ChiC no conté aquest domini d'inserció i conseqüentment la cavitat d'unió a substrat és menys profunda (Figura 1.2) (Vaaje-Kolstad *et al.*, 2013). Actualment s'ha descobert una nova quitinasa, la quitinasa D, de la qual encara no s'ha resolt l'estructura cristal·logràfica, tot i que per alineament de seqüència s'ha detectat la presència del domini d'inserció $\alpha+\beta$ present també en les quitinases A i B de *S. marcescens* (Vaikuntapu *et al.*, 2016).

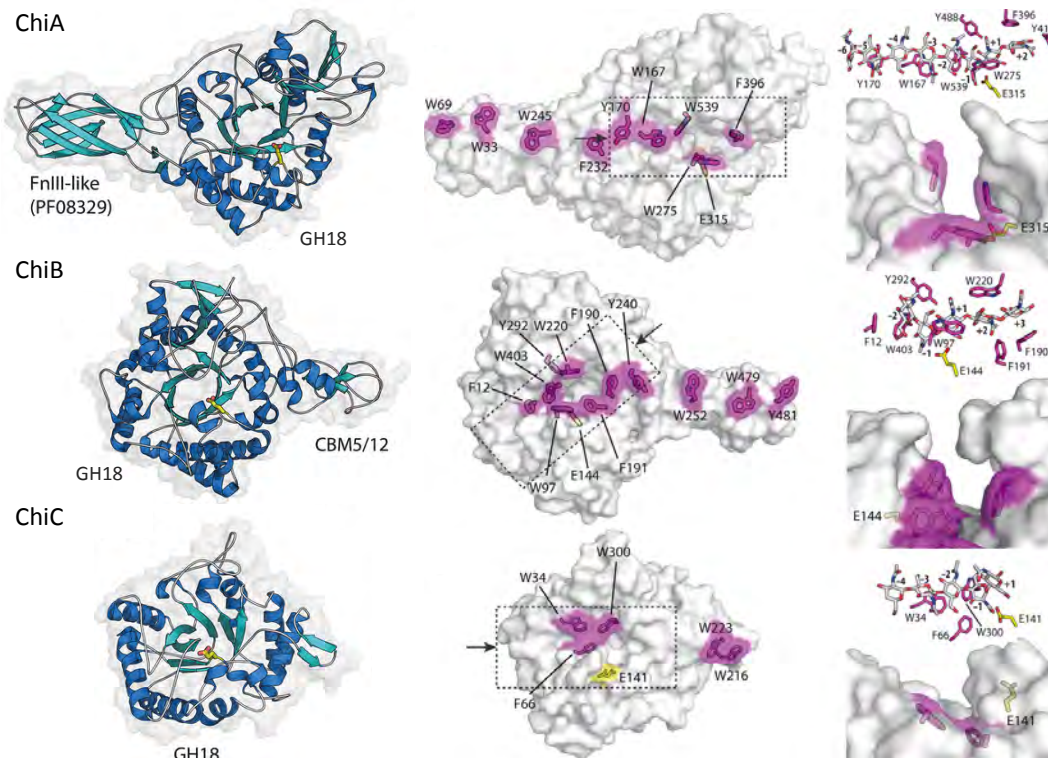


Figura 1.2. Resum estructural de les quitinases de *S. marcescens*

A l'esquerra es mostra les estructures cristal·logràfiques de ChiA, ChiB i del domini catalític de ChiC, a la dreta, les cavitats d'unió a substrat. Es mostren en magenta els residus aromàtics que interaccionen amb el substrat mitjançant interaccions d'apilament (*stacking*). Adaptada de Vaaje-Kolstad *et al.* (Vaaje-Kolstad *et al.*, 2013)

1.2. Quitinases seleccionades per al desenvolupament d'una glicosintasa

A partir de la cerca bibliogràfica, s'ha decidit enfocar la selecció en quitinases d'origen procarionta, per una banda a causa de que la majoria de quitinases amb activitat de TG

reportada són bacterianes, i es coneix molt poc sobre quitinases d'organismes eucariotes que presentin activitat de TG; i per altra, per a facilitar el procés d'expressió i purificació d'aquestes, ja que es vol obtenir les proteïnes recombinants en *E. coli*.

Tenint en compte l'activitat de transglicosidació reportada de les quitinases *wt*, finalment s'han seleccionat 9 quitinases, 7 quitinases bacterianes i 2 d'arqueus (Taula 1.4), per a un primer cribratge amb l'objectiu final de dissenyar una glicosintasa efectiva per a la síntesi de COS definites.

Taula 1.4. Quitinases GH18 procariotes seleccionades per al disseny d'una glicosintasa

Origen	Quitinasa	UNIPROT	Org. en dominis	endo-/exo-	TG	PDB	S en PDB	Referències
<i>Bacillus circulans</i>	BcChiA1	P20533	GH18-FnIII-FnIII-CBM12	endo-	DP6 → DP8 GalCOII _{oxa} + DP2 → GalCOIV DP2 _{ox} → DP3-DP6	1ITX (GH18)	Apo-	(Matsumoto <i>et al.</i> , 1999; Sasaki <i>et al.</i> , 2002)
<i>Laceyella putida</i>	LpChiA	W0T116	ChBD-FnIII-GH18	?	?	-	-	
<i>Rhodothermus marinus</i>	RmChiA	Q66SU9	GH18	endo-	DP2 → DP4	-	-	(Hobel <i>et al.</i> , 2005)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	StmChiA	B2FMT1	ChBD3-PKD-FnIII-GH18	endo-	DP4 → DP4 DP6 → DP6	-	-	(Suma and Podile, 2013)
<i>Serratia marcescens</i>	SmChiC	Q700B8	GH18-FnIII-CBM12	endo-	?	4AXN (GH18)	Apo-	(Payne <i>et al.</i> , 2012)
<i>Serratia proteamaculans</i>	SpChiD	A8GFD6	GH18	endo-	DP3 → DP4-DP6 DP4 → DP5-DP9 DP5 → DP6-DP10 DP6 → DP7-DP10	4Q22 4PTM	GlcNAc GlcNAc	(Purushotham and Podile, 2012)
<i>Vibrio harveyi</i>	VhChiA	Q9AMP1	CBM5/12-GH18	endo-	DP3 → DP4-DP6 DP4 → DP5, DP6, DP8 DP5 → DP6, DP7, DP8	3B9A 3B9D	DP6 DP5	(Suginta <i>et al.</i> , 2005; Songsiritthigul <i>et al.</i> , 2008)
<i>Pyrococcus furiosus</i>	PfChiB	Q8U1H5	CBD2-AD2 (GH18)	exo-/endo-	?	3A4W (GH18) 3A4X (GH18)	DP5 DP4	(Tsuji <i>et al.</i> , 2010)
<i>Thermococcus kodakaraensis KOD1</i>	TkChiA	Q9UWR7	ChBD1-GH18(A)-ChBD2-ChBD3-GH18(B)	GH18(A): exo- GH18(B): endo-	GH18(A): DP3 → DP4, DP5 GH18(B): DP3 → DP4, DP5	-	-	(Tanaka, Fukui and Imanaka, 2001)

D'entre les candidates bacterianes s'han seleccionat les quitinases A de *Rhodothermus marinus* i *Laceyella putida* pel seu caràcter termoestable, tot i que la darrera no s'ha descrit si presenta o no activitat de TG. S'ha seleccionat la ChiC de *S. marcescens* ja que tampoc ha estat descrita la presència o absència d'activitat de TG de l'enzim, i per la diferència estructural que presenta respecte les quitinases ChiA i ChiB de *S. marcescens*, que sí han estat caracteritzades. També s'han seleccionat les quitinases A de *Vibrio harveyi* i A1 de *Bacillus circulans* com a quitinases a les que s'ha dut a terme mutagènesi del residu assistent, presentant els nous enzims mutants un increment de l'activitat de TG respecte els enzims salvatges. En aquest cas, s'ha caracteritzat l'activitat de TG de la quitinasa ChiA1 de *B. circulans* a partir de la utilització de COS activats com a substrat. Una altra de les quitinases seleccionades és la quitinasa A de *Stenotrophomonas maltophilia* com a quitinasa nova amb activitat de TG reportada. Per últim, s'ha seleccionat la quitinasa D de *Serratia proteamaculans*, per ser la quitinasa *wt* que presenta major activitat de TG, donant lloc a un 14% de rendiment en productes de TG a partir de la utilització de (GlcNAc)₄ com a substrat. Per altra banda, s'han seleccionat dues quitinases del regne *Archaea*: la quitinasa A de *Thermococcus kodakaraensis*, la única quitinasa que presenta dos dominis catalítics, i ambdós presenten activitat de TG i la quitinasa B de *Pyrococcus furiosus*, la única quitinasa d'arqueu de la qual s'ha resolt l'estructura del domini catalític i per la seva similitud amb TkChiA.

A continuació es resumeixen les característiques reportades en la bibliografia de cadascuna de les quitinases seleccionades:

Quitinasa A1 de *Bacillus circulans*

La quitinasa A1 de *Bacillus circulans* WL-12 està classificada dins la subfamília A de les quitinases bacterianes ja que presenta el domini d'inserció $\alpha+\beta$ i varis residus aromàtics en la cavitat d'unió a substrat. En l'extrem N-terminal presenta el domini catalític, classificat com a GH18, seguit de dos dominis fibronectina (FnIII) i en l'extrem C-terminal presenta un domini d'unió a quitina (ChBD). L'estructura cristal·logràfica del domini catalític es troba resolta en la forma apo- (PDB: 1ITX) i també s'ha resolt l'estructura del domini catalític en complex amb dos inhibidors, allosamidin i demethylallosamidin, i del mutant E204Q en complex amb (GlcNAc)₇, però les estructures encara no han estat dipositades (Matsumoto *et al.*, 1999). Els autors descriuen que l'estructura 3D en complex amb substrat ha permès detectar l'existència de 7 subsetis en el centre actiu de l'enzim (del -5 al +2) i la presència de varis residus aromàtics en la cavitat d'unió a substrat que interaccionen amb els residus GlcNAc dels diferents subsetis. Entre ells es troba els residus Trp433 i Tyr279 que interaccionen amb el GlcNAc del subseti -1 i que es troben conservats en la resta de quitinases, essent residus essencials per a la catàlisi. BcChiA1 ha estat caracteritzada per a diferents substrats polimèrics i oligomèrics, donant com a producte final principalment (GlcNAc)₂. L'enzim hidrolitza tant microfibrilles de β -quitina, quitina col·loidal com també quitosans amb diferents graus d'acetilació (fins a un DA de l'1%). L'enzim hidrolitza el segon enllaç des de l'extrem reductor en substrats polimèrics, però en canvi, hidrolitza el segon enllaç des de l'extrem no-reductor de quitoooligosacàrids (Sugiyama *et al.*, 1999; Sasaki *et al.*,

2002; Watanabe *et al.*, 2003). Aquest fet suggereix un mecanisme d'entrada i unió del substrat diferent en funció del grau de polimerització d'aquest. S'ha proposat que l'enzim presenta activitat d'hidròlisi processiva en la hidròlisi de quitina insoluble, en la que el primer tall es realitza en el segon enllaç des de l'extrem reductor, llavors la cadena de quitina llisca cap als subunitats positius fins a ocupar els subunitats +1 i +2 per a la següent hidròlisi (Watanabe *et al.*, 2003). S'ha detectat activitat de TG de l'enzim a partir de $(\text{GlcNAc})_6$, donant lloc a la formació de $(\text{GlcNAc})_8$ a partir de la unió de $(\text{GlcNAc})_2$ provinent de la reacció d'hidròlisi i la posterior condensació d'aquest amb una nova molècula de $(\text{GlcNAc})_6$ (Sasaki *et al.*, 2002). No es reporta el rendiment de TG, però a partir de la informació proporcionada s'ha calculat que aquest ($\text{mM } (\text{GlcNAc})_8 / \text{mM } (\text{GlcNAc})_6$ inicial) és aproximadament del 8,2%. També s'ha reportat la utilització de diferents derivats oxazolina com a substrats per a la síntesi d'oligosacàrids a partir de l'enzim *wt* (Kobayashi, Kiyosada and Shoda, 1996, 1997; Sakamoto *et al.*, 2001; Martinez *et al.*, 2012). A partir de la utilització de $(\text{GlcNAc})_2$ -ox s'ha obtingut una barreja de COS amb graus de polimerització de 4 a 6, provinents de la reacció de TG; a més, s'ha obtingut $\text{Gal}(\text{GlcNAc})_4$ per reacció de $\text{Gal}(\text{GlcNAc})_2$ -ox com a donador i $(\text{GlcNAc})_2$ com acceptor, obtenint una relació producte TG/donador restant = 32,5 al cap de 5-6h de reacció. Per altra banda s'han dissenyat i caracteritzat diferents mutants de l'enzim tant dels residus aromàtics com dels residus implicats en el mecanisme de catàlisi (Watanabe *et al.*, 1993, 1994, 2001, 2003; Martinez *et al.*, 2012). Els mutants dels residus catalítics, D200A i D202A, corresponents a la mutació dels residus aspàrtics del motiu DxExE, tenen la capacitat de dur a terme la polimerització de $(\text{GlcNAc})_2$ -ox donant lloc a una mescla de COS amb graus de polimerització de fins a 13, però tampoc no es reporta el rendiment de TG (Martinez *et al.*, 2012).

Quitinasa A de *Laceyella putida*

L. putida és un organisme marí termoestable i conseqüentment la quitinasa A present en aquest organisme té una temperatura òptima de 75°C i una vida mitjana de 360 h a 50°C. Tot i que l'estructura 3D de l'enzim no ha estat resolta, l'enzim es troba dins la subfamília A de les quitinases bacterianes, per similitud de seqüència amb d'altres quitinases d'aquesta subfamília. L'enzim consta d'un pèptid senyal seguit d'un ChBD (de la família CBM5), un domini FnIII i el domini catalític, GH18, que es localitza en l'extrem C-terminal. L'enzim es proteolitza entre el domini FnIII i el domini catalític (CD) i posteriorment es dona la dimerització del CD per a donar lloc a l'enzim actiu. Fins al moment *LpChiA* no ha estat produïda de manera recombinant, i els estudis realitzats han estat duts a terme a partir de l'obtenció de l'enzim del propi organisme. L'activitat hidrolasa de l'enzim ha estat testada davant diferents substrats polimèrics, essent la quitina col·loïdal el substrat preferent, donant lloc a $(\text{GlcNAc})_2$ i una petita quantitat de GlcNAc com a productes finals, i també davant diferents COS. L'enzim no té la capacitat d'hidrolitzar el disacàrid, però té activitat davant $(\text{GlcNAc})_3$ - $(\text{GlcNAc})_6$, donant lloc a $(\text{GlcNAc})_2$ com a producte final majoritari i també GlcNAc en la hidròlisi dels COS amb graus de polimerització senars (Shibasaki *et al.*, 2014). Fins al moment no ha estat reportat si l'enzim presenta o no activitat de TG.

Quitinasa A de *Rhodotermus marinus*

R. marinus és un bacteri gramnegatiu marí termoestable que conté dins el seu genoma el gen codificant per la quitinasa A, una quitinasa no modular amb un únic domini catalític GH18. La proteïna recombinant sense el pèptid senyal (Chi Δ sp) té una temperatura òptima de 70°C i un temps de vida mitjana de 3 h a 90°C, essent la quitinasa bacteriana més termoestable descrita fins al moment. *RmChiA* està classificada dins la subfamília A de les quitinases bacterianes ja que presenta els dos motius GGWTWS i FDGxDxDWEYP específics d'aquest grup, i l'estructura 3D no ha estat resolta fins al moment. En relació a l'activitat hidrolasa de l'enzim, aquest ha estat caracteritzat davant substrats COS marcats, mostrant només alliberació del cromòfor quan s'utilitza (GlcNAc)₂-pNP com a substrat. No s'ha detectat alliberació de -pNP a partir de GlcNAc-pNP ni (GlcNAc)₃-pNP, el que suggereix que només s'obté (GlcNAc)₂ i GlcNAc-pNP com a productes finals. També s'ha determinat l'activitat davant diferents COS, (GlcNAc)₂-(GlcNAc)₈, donant com a productes finals (GlcNAc)₂ + GlcNAc en el cas de substrats amb graus de polimerització senars. La hidròlisi de (GlcNAc)₆ i (GlcNAc)₈ dona lloc a productes intermedis, (GlcNAc)₃ i (GlcNAc)₅, suggerint una activitat *endo*- de l'enzim. Per altra banda, assajos amb quitosà amb un DA 27% mostren una ràpida disminució de la viscositat d'aquest, confirmant l'activitat *endo*- de l'enzim. La hidròlisi de quitina col·loïdal i de cru de quitina dona lloc a dímers i monòmers com a productes finals. A més, s'ha observat l'acumulació de (GlcNAc)₄, tant en reaccions d'hidròlisi de substrats solubles com insolubles, fet que s'ha relacionat amb activitat de TG de *RmChiA* que catalitza la formació de tetràmers a partir de dímers (Hobel *et al.*, 2005). Fins al moment, no es troba reportat cap assaig específic per a l'anàlisi de l'activitat de TG.

Quitinasa A de *Stenotrophomonas maltophilia*

StmChiA és un enzim multi-modular que consta d'un domini d'unió a quitina (CBM3) a l'extrem N-terminal, seguit d'un domini *Polycystic Kidney Disease* (PKD), un domini FnIII i un domini catalític GH18 a l'extrem C-terminal i es troba classificada dins la subfamília A de les quitinases bacterianes. L'enzim té una temperatura i pH òptims de 40°C i 5, respectivament. En relació a l'activitat hidrolasa de l'enzim, *StmChiA* hidrolitza quitina col·loïdal donant lloc a quitobiosa com a producte majoritari, i presenta activitat *endo*-. A més, també presenta activitat utilitzant α - i β -quitina com a substrats, hidrolitzant preferiblement la β -quitina, i donant lloc també a (GlcNAc)₂ com a producte final. Per altra banda també s'ha analitzat l'activitat de l'enzim davant diferents COS, essent el dímer el producte final majoritari. *StmChiA* hidrolitza preferentment substrats amb un DP \geq 4, tot i que produeix una baixa concentració de dímer i monòmer a partir de (GlcNAc)₃ al cap d'una hora de reacció. S'ha detectat activitat de TG a partir de (GlcNAc)₄ i (GlcNAc)₆. *StmChiA* hidrolitza (GlcNAc)₄ inicialment donant lloc a (GlcNAc)₂, i posteriorment, quan el substrat és un factor limitant, els oligòmers disponibles (dímers) són transglicosidats donant lloc altra vegada a (GlcNAc)₄. El mateix succeeix per a (GlcNAc)₆, l'activitat hidrolítica inicial resulta en la formació de (GlcNAc)₂ + (GlcNAc)₃ + (GlcNAc)₄ i posteriorment es dona activitat de TG esdevenint en la formació de (GlcNAc)₆ (Suma and Podile, 2013). Aquest últim any s'ha reportat l'increment de l'activitat de TG a partir dels mutants D464N, corresponent a la mutació del residu

assistent, i dels mutants W306A i W679A, residus aromàtics que formen interaccions d'apilament amb l'anell piranosil del GlcNAc dels subsetis -3 i -1, respectivament. El mutant W679A és el que mostra un increment de l'activitat de TG més important, amb el que s'obté fins a 10,8% de (GlcNAc)₅ i (GlcNAc)₆, respecte el total de productes, al cap de 12 h de reacció a partir de (GlcNAc)₄ com a substrat. Per al mutant W306A, la proporció màxima obtinguda de (GlcNAc)₅ i (GlcNAc)₆ és de 9,7% però al cap de 15 minuts de reacció. Ambdós mutants presenten també activitat de TG davant (GlcNAc)₃ com a substrat, a diferència del mutant D464N que no en mostra. La proporció màxima de (GlcNAc)₅ i (GlcNAc)₆ obtinguda amb el mutant D464N a partir de (GlcNAc)₄ com a substrat és del 2,5%. A més, també s'han obtingut (GlcNAc)₆ i (GlcNAc)₇ a partir de la hidròlisi de (GlcNAc)₅ amb els 3 mutants (Bhuvanachandra, Madhuprakash and Podile, 2018).

Quitinasa C de *Serratia marcescens*

La quitinasa C de *Serratia marcescens* està classificada dins la família B de les quitinases bacterianes, per tant, no conté el domini d'inserció $\alpha\beta$, i conseqüentment la cavitat d'unió a substrat és menys profunda. És un enzim multi-modular que conté el domini catalític GH18 a l'extrem N-terminal, seguit d'un domini FnIII i un domini ChBD (CBM de la família 12). L'enzim (ChiC1) és proteolitzat donant lloc a ChiC2, corresponent només al domini catalític (Suzuki *et al.*, 1999). L'estructura del domini catalític (PDB: 4AXN) mostra el plegament $(\alpha/\beta)_8$ típic de quitinases. A més, el Glu àcid/base general catalític (Glu141) forma interaccions per pont d'hidrogen amb els residus Asp107 i Ala108 situats en el *loop* entre les cadenes β - α 3, que conté el domini SxGG altament conservat. Simulacions de dinàmica molecular de ChiC2 (amb i sense (GlcNAc)₇) mostren 3 conformacions diferents del Glu141 respecte l'Asp139 entre els quals s'observa el complex catalíticament actiu. Juntament amb la flexibilitat del residu Glu141 i en general del centre catalític, també s'ha detectat una major solvatació i flexibilitat del substrat, trets característics d'enzims no-processius (Payne *et al.*, 2012). S'han caracteritzat ambdues formes enzimàtiques (ChiC1 i ChiC2), essent ChiC2 més actiu per a substrats insolubles que ChiC1, a causa de la presència del domini CBM12, que a més d'afavorir el procés d'unió i guiatge del substrat, d'alguna manera és important per a la hidròlisi de substrats cristal·lins (Suzuki *et al.*, 1999). Ambdós enzims són més actius davant substrats solubles, essent la quitina en pols el substrat pel que presenten menor afinitat. Per altra banda, presenta activitat *endo*- ja que hidrolitza β -quitina donant lloc a la formació d'una mescla d'oligòmers llargs en temps inicials, que posteriorment s'hidrolitzen en dímers i monòmers com a productes finals (S J Horn *et al.*, 2006). *SmChiC* també hidrolitza diferents COS i polímers de quitosà fins a un DA 10%. A partir dels COS formats en la hidròlisi de quitosà, s'ha determinat la preferència d'unió de GlcNAc (A) o GlcNH₂ (D) dels diferents subsetis. En el subseti -1 totes les quitinases GH18 requereixen exclusivament GlcNAc, ja que actuen mitjançant el mecanisme de catàlisi assistit per substrat, per tant, tots els extrems reductors dels oligòmers formats consisteixen en unitats A. Per a *SmChiC* el monòmer que precedeix l'extrem reductor és gairebé sempre A, indicant una preferència de GlcNAc en el subseti -2, tot i que també pot trobar-se el monòmer desacetilat quan el substrat -AA- s'ha esgotat. *SmChiC* no presenta preferència per GlcNAc o GlcNH₂ en el subseti +1 (Svein J. Horn *et al.*, 2006). *SmChiC* té un

pH òptim d'entre 3,9 i 4,5 i una temperatura òptima de 65°C. Fins al moment, no s'ha descrit la presència o absència d'activitat de TG.

Quitinasa D de *Serratia proteamaculans*

La quitinasa D de *S. proteamaculans* és un enzim no modular, que consta només d'un domini catalític GH18. L'estructura del domini catalític es troba reportada tant en la forma apo- (PDBs: 4LGX, 4NZC; (Madhuprakash *et al.*, 2013)) com en complex amb *N*-acetilglucosamina (PDBs: 4Q22, 4PTM). Recentment també s'ha resolt l'estructura del mutant E153Q, corresponent al residu àcid/base, en complex amb GlcNAc (PDB: 6F8N, (Madhuprakash *et al.*, 2018)). El domini catalític presenta el plegament $(\alpha/\beta)_8$ típic i també presenta el domini d'inserció, pel que forma part de la subfamília A de quitinases bacterianes. A més, el domini catalític conté un *loop* format pels residus Asn30-Aps42 que bloqueja parcialment l'accés a la cavitat d'unió a substrat, reduint-la en grandària. Simulacions bioinformàtiques amb $(\text{GlcNAc})_4$ mostren dues unions productives d'aquest: entre els subetis -2 i +2 i entre -1 i +3. L'enzim té una temperatura i pH òptims de 40°C i 6, respectivament. L'enzim presenta activitat davant varis substrats polimèrics, mostrant la major activitat davant el quitosà clorhidrat. A més, és actiu hidrolíticament davant diferents COS, $(\text{GlcNAc})_2$ - $(\text{GlcNAc})_6$, presentant activitat quitobiasa, és a dir, capacitat per hidrolitzar el dímer. *SpChiD* mostra activitat de TG a partir de $(\text{GlcNAc})_3$ - $(\text{GlcNAc})_6$, resultant en una mescla de COS amb graus de polimerització d'entre 2 i 13 quan s'utilitza $(\text{GlcNAc})_6$ com a substrat (Purushotham and Podile, 2012). Per reacció de $(\text{GlcNAc})_4$ com a substrat, *SpChiD* dona lloc a una mescla de productes $(\text{GlcNAc})_2$ - $(\text{GlcNAc})_{10}$, dels quals $(\text{GlcNAc})_2$ i $(\text{GlcNAc})_3$ corresponen a productes d'hidròlisi i $(\text{GlcNAc})_5$ - $(\text{GlcNAc})_{10}$ a productes de TG. La proporció màxima de $(\text{GlcNAc})_5$ i $(\text{GlcNAc})_6$, únics productes de TG que són quantificats, respecte al total de productes en la mescla, correspon al 10,8% i s'adquireix al cap de 45 minuts de reacció. *SpChiD* és la quitinasa amb major activitat de TG reportada fins el moment. A causa d'aquesta elevada activitat de TG, s'han dissenyat i caracteritzat diferents mutants amb l'objectiu d'incrementar l'activitat de TG i entendre la relació d'aquesta amb l'activitat hidrolasa de l'enzim. Els mutants S110G i Y222A són els que presenten un major increment de l'activitat de TG, obtenint un 20% de productes de TG ($(\text{GlcNAc})_5$ + $(\text{GlcNAc})_6$) respecte el total de productes a partir de $(\text{GlcNAc})_4$ (Madhuprakash *et al.*, 2012). Aquest últim any s'han reportat nous assajos de mutagènesi amb els que s'ha aconseguit incrementar el rendiment de TG fins al 22% a partir de mutants dobles i triples (Madhuprakash *et al.*, 2018), (veure capítol 4).

Quitinasa A de *Vibrio harveyi*

La quitinasa A de *V. harveyi* consta de dos dominis, un ChBD en l'extrem N-terminal i un domini catalític GH18 en l'extrem C-terminal. L'estructura 3D de l'enzim (PDB: 3B8S) revela el plegament típic TIM barrel $(\alpha/\beta)_8$ del domini catalític i la presència d'un domini d'inserció $\alpha+\beta$, que consta de 5 cadenes β anti-paral·leles envoltades d'hèlix α . La presència d'aquest domini classifica la quitinasa dins la subfamília A de les quitinases bacterianes, tot i que prèviament a la resolució de l'estructura cristal·logràfica *VhChiA* havia estat classificada dins la subfamília B (Suzuki *et al.*, 1999). Per altra banda, també s'ha resolt l'estructura apo-

del mutant E315M, corresponent a la mutació del Glu àcid/base general, i les estructures del mutant en complex amb (GlcNAc)₅ i (GlcNAc)₆ (PDBs: 3B9E, 3B9D i 3B9A, respectivament). Les estructures en complex amb substrat han permès identificar diferents modes d'unió dels substrats, presentant (GlcNAc)₆ més interaccions enzim-substrat en l'extrem reductor (subsets -1, +1 i +2) en comparació amb (GlcNAc)₅. L'elevada interacció enzim-substrat en els subsets positius respecte als subsets negatius suggereix una elevada importància d'aquesta en la definició de la unió primària. A més, s'han detectat dues conformacions del substrat diferents: (GlcNAc)₅ ocupa 4 subsets (-3, -2, +1 i +2) i presenta una conformació recta, no òptima per a la catàlisi, coneguda com a conformació de reconeixement, mentre que (GlcNAc)₆ ocupa 6 subsets (-4, -3, -2, -1, +1 i +2) i presenta una torsió, una rotació de l'enllaç situat entre els subsets -1 i +1, i a més, el residu GlcNAc situat en el subset -1 presenta una conformació de nau (Songsiriritthigul *et al.*, 2008). Aquesta observació ha donat lloc a la hipòtesi de que *VhChiA* segueix el mecanisme de catàlisi *slide and bend*, proposat per Watanabe *et al.* per a la quitinasa *BcChiA1* (Watanabe *et al.*, 2003). En relació a l'activitat enzimàtica, l'enzim presenta activitat *endo-*, i dona lloc a la formació d'una barreja de COS, GlcNAc-(GlcNAc)₇, com a productes de la hidròlisi de quitina col·loïdal, essent la quitobiosa el producte majoritari. L'enzim presenta més afinitat per a COS llargs (DP_≥4), donant lloc a la formació del dímer com a producte majoritari, i aquest no és hidrolitzat al cap del temps. En la hidròlisi de (GlcNAc)₆ es detecta (GlcNAc)₂, (GlcNAc)₄ i també (GlcNAc)₃ i (GlcNAc)₅ com a productes inicials i aquests són hidrolitzats donant lloc a (GlcNAc)₂ i GlcNAc com a productes finals. S'ha detectat activitat de TG en les reaccions amb (GlcNAc)₃-(GlcNAc)₅. S'ha obtingut una proporció de productes de TG respecte productes d'hidròlisi del 12% (expressada com a ((GlcNAc)₅ + (GlcNAc)₆)/GlcNAc₂), a partir de (GlcNAc)₄ com a substrat amb l'enzim *wt*, i aquesta s'ha incrementat fins el 23% amb el mutant D392N. A més, s'ha obtingut la formació de (GlcNAc)₇ i (GlcNAc)₈ a partir de (GlcNAc)₅ (Suginta *et al.*, 2005). Per altra banda, s'han dissenyat i caracteritzat diferents mutants dels residus aromàtics localitzats en el ChBD i en el centre actiu del domini catalític que han permès identificar residus implicats en el guiatge de la cadena de quitina (Trp70, Trp168, Tyr171), d'altres implicats en el posicionament i unió del substrat per a la catàlisi (Trp275, Trp570), i d'altres implicats principalment en la unió de substrats solubles (Trp275, Trp397) (Suginta *et al.*, 2005, 2007; Pantoom, Songsiriritthigul and Suginta, 2008). També s'han dissenyat els mutants D313A i D313N, corresponents a mutants del residu assistent, amb els que s'ha incrementat l'activitat de TG en relació a l'acumulació de productes de TG amb graus de polimerització més llargs durant el temps de reacció, tot i que tampoc no es citen rendiments (Sirimontree *et al.*, 2014).

Quitinasa A de *Thermococcus kodakaraensis*

T. kodakaraensis KOD1 és un arqueu hipertermòfil que produeix una quitinasa extracel·lular. Aquesta quitinasa, codificada a partir d'un únic gen (*chiA*), té 134 kDa i és la quitinasa més gran descrita fins el moment. *TkChiA* es troba dividida en dues regions amb els seus centres actius respectius. Les regions N-terminal i C-terminal presenten similitud de seqüència amb la quitinasa A1 de *B. circulans* i la quitinasa de *S. erythraeus*, respectivament. Tal i com es

representa en la Figura 1.3, la proteïna consta de dos dominis catalítics GH18 (GH18(A) i GH18(B)) i tres ChBDs (ChBD1, ChBD2 i ChBD3).

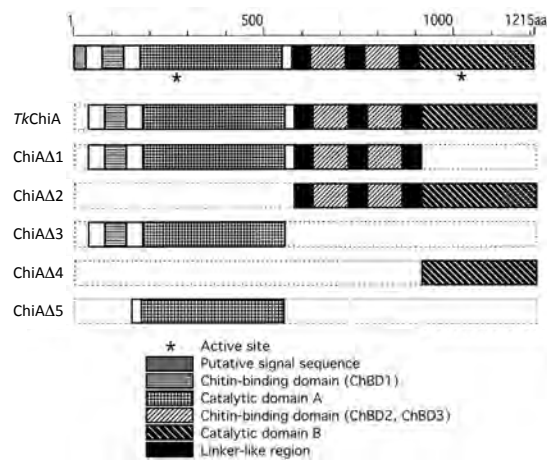


Figura 1.3. Organització en dominis de la quitinasa A de *Thermococcus kodakaraensis* (TkChiA) i models esquemàtics dels mutants. Adaptada de Tanaka *et al.* (Tanaka *et al.*, 1999; Tanaka, Fukui and Imanaka, 2001)

TkChiA presenta una temperatura òptima de 85°C i un pH òptim de 5. En relació a l'activitat, hidrolitza quitina col·loïdal donant lloc a la formació de quitobiosa com a producte final. També hidrolitza quitooligosacàrids, $(\text{GlcNAc})_3\text{-(GlcNAc)}_6$, obtenint el dímer i monòmer com a productes finals i no presenta activitat davant quitobiosa ni GlcNAc-MU (Tanaka *et al.*, 1999). S'han dissenyat varis mutants a partir de la deleció dels diferents dominis i s'ha vist que ambdós dominis catalítics (ChiAΔ5 i ChiAΔ4) són actius individualment. Tots els mutants presenten activitat davant quitina col·loïdal, essent ChiAΔ1 i ChiAΔ2 més actius, fet correlacionat amb la presència de ChBD2 i ChBD3, implicats en la hidròlisi de substrats llargs. Ambdós dominis catalítics presenten una similitud de seqüència molt baixa, aproximadament del 17%, però tots dos són de la família GH18, ja que contenen els motius de seqüència conservats. Per similitud de seqüència ChiAΔ5 està classificada dins la subfamília A, mentre que ChiAΔ4 dins la subfamília C. Ambdós presenten activitat davant diferents substrats polimèrics (quitina col·loïdal, quitina cristal·lina i quitosans fins a DA 2%) i oligomèrics ($(\text{GlcNAc})_3\text{-(GlcNAc)}_6$ i $(\text{GlcNAc})_2\text{-pNP-(GlcNAc)}_5\text{-pNP}$) resultant principalment en la formació de quitobiosa com a producte final. ChiAΔ4 hidrolitza la quitina col·loïdal donant lloc a una mescla de COS amb diferents graus de polimerització que posteriorment són hidrolitzats fins a quitobiosa. A més, a partir de la hidròlisi dels diferents COS s'ha observat que ChiAΔ4 pot alliberar una unitat de GlcNAc donant lloc a productes amb un DP una unitat més curts que el substrat inicial. Aquests resultats indiquen que ChiAΔ4 presenta activitat *endo*- i hidrolitza tots els enllaços excepte el primer enllaç des de l'extrem no-reductor. En canvi, ChiAΔ5 presenta activitat *exo*- i hidrolitza preferentment el segon enllaç des de l'extrem no-reductor en substrats oligomèrics. Per similitud amb *BcChiA1*, es suggereix que ChiAΔ5 pot ser que hidrolitzi el segon enllaç des de l'extrem reductor en substrats polimèrics. En relació a l'activitat de TG, s'ha detectat per TLC que ambdós

dominis catalítics presenten activitat de TG a partir de $(\text{GlcNAc})_3$ donant lloc a la formació de $(\text{GlcNAc})_4$ i $(\text{GlcNAc})_5$ (Tanaka, Fukui and Imanaka, 2001).

Quitinases A i B de *Pyrococcus furiosus*

P. furiosus també és un arqueu hipertermòfil que té la capacitat de créixer en presència de quitina. L'anàlisi de la seqüència genòmica ha permès identificar dos ORFs diferenciats que codifiquen per quitinases GH18. El primer ORF (PF1234) codifica una proteïna de 39,7 kDa mentre que el segon ORF (PF1233), separat 37 nucleòtids del primer, dóna lloc a una proteïna de 84,3 kDa. Les quitinases han estat anomenades ChiA i ChiB, respectivament. Sembla ser que ambdós gens han estat separats al llarg de l'evolució a causa de la inserció d'un únic nucleòtid que ha provocat un canvi en el marc de lectura, incorporant un codó stop en el centre actiu de PF1234. Ambdues quitinases presenten una elevada homologia amb *TkChiA*. Amb l'objectiu d'expressar ambdós gens conjuntament, i produir una única quitinasa corresponent a la unió de ChiA i ChiB simulant *TkChiA*, s'ha eliminat el nucleòtid 1006A localitzat en el gen codificant per ChiA. La quitinasa resultant consta de dos dominis ChBD (CBD1 i CBD2) i dos dominis catalítics GH18 (AD1 i AD2). Per altra banda, també s'han generat varis mutants a partir de la delecció dels diferents dominis (Figura 1.4).

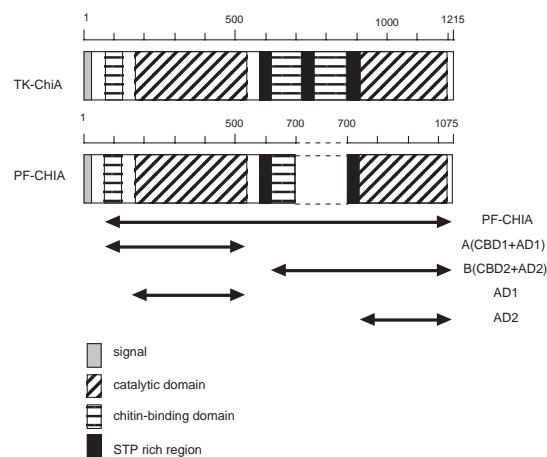


Figura 1.4. Model esquemàtic de l'organització en dominis de *TkChiA* i *PF-ChiA*, i dels mutants recombinants de *PF-ChiA*. Extreta de Oku *et al.* (Oku and Ishikawa, 2006)

La quitinasa ChiA conté un domini ChBD de la família CBM5 (CBD1) en l'extrem N-terminal, que presenta un 85% d'identitat de seqüència amb el ChBD1 de *TkChiA*, i el domini catalític (AD1) en l'extrem C-terminal, que mostra un 90% d'identitat amb el domini GH18(A) de *TkChiA*. Per altra banda, ChiB també conté un únic domini ChBD (CBD2) i un domini catalític (AD2). CBD2, membre de la família CBM2, presenta un 65% d'identitat de seqüència amb els dos dominis ChBD1 i ChBD2 de *TkChiA*, mentre que AD2 presenta un 80% d'identitat amb GH18(B). Tots els mutants presenten activitat davant quitina col·loidal, α - i β -quitina resultant en la formació de $(\text{GlcNAc})_2$ i GlcNAc com a productes finals. ChiA no hidrolitza GlcNAc-pNP ni quitooligosacàrids amb $\text{DP} \leq 4$ i la barreja de productes d'hidròlisi provinents de $(\text{GlcNAc})_5$ i $(\text{GlcNAc})_6$ suggereixen que té activitat *endo*-. Per altra banda, el domini catalític de ChiB, AD2, tampoc presenta activitat quitobiasa, i la hidròlisi de diferents COS

resulta en la formació principalment de $(\text{GlcNAc})_2$ com a producte majoritari (Gao *et al.*, 2003; Oku and Ishikawa, 2006). S'ha resolt l'estructura 3D del domini catalític AD2 en la forma apo- (PDBs: 2DSK) i dels mutants D524A, la forma apo- i en complex amb $(\text{GlcNAc})_5$ (PDBs: 3AFB i 3A4X, respectivament), i E526A en complex amb $(\text{GlcNAc})_5$ (PDB: 3A4W), corresponents a mutants dels residus catalítics Asp assistent i Glu àcid/base general, respectivament. L'estructura mostra el plegament *TIM barrel* $(\alpha/\beta)_8$ amb una cavitat d'unió a substrat tipus túnel, però no conté el domini d'inserció $\alpha+\beta$, ni tampoc el *loop* que fa de barrera en el subseti -3 present en la quitinasa B de *S. marcescens*, conseqüentment la cavitat d'unió a substrat es troba oberta per ambdós costats, fet que explica la unió de substrats més llargs. Tot i que els assajos cinètics amb COS suggereixen que l'enzim presenta activitat *exo-*, l'anàlisi estructural de la cavitat d'unió a substrat suggereix una activitat *endo-* d'AD2 (Nakamura *et al.*, 2007). Les estructures dels mutants en complex amb substrat mostren una conformació de nau del tercer residu (NAG3) de $(\text{GlcNAc})_5$ i una torsió de l'enllaç entre el tercer i quart residus. A més, hi ha un elevat nombre d'interaccions d'hidrogen i hidrofòbiques entre l'enzim i el tercer residu del substrat. D'entre els residus implicats en les interaccions hidrofòbiques destaca el Trp664 que està formant interaccions d'apilament (*stacking*) amb l'anell de piranosa del NAG3. La mutació d'aquest residu per una Ala causa una important disminució de l'activitat hidrolasa de l'enzim. L'estructura del mutant D524A en complex amb $(\text{GlcNAc})_5$ mostra dues conformacions del residu Glu526, una conformació A semblant a la presentada en l'estructura d'AD2 apo-, corresponent a la conformació activa, i una conformació B en la que la cadena lateral del Glu526 es troba rotada i exposada cap al solvent. Aquesta estructura revela la participació del residu Asp524 en el manteniment de la conformació A del Glu526 mitjançant interaccions de ponts d'hidrogen, per a que aquest pugui actuar d'àcid general en la catàlisi. A partir de les estructures en complex amb $(\text{GlcNAc})_5$ s'ha identificat la presència de 5 subsetis en el centre actiu (-3, -2, -1, +1 i +2). Les estructures 3D mostren el residu Asp524, corresponent al residu assistent, sempre encarat cap al Glu àcid/base general, i per tant aquest no interaccionaria amb Asp522, corresponent al primer Asp del motiu DxDxE, que no estaria implicat en la catàlisi, però participaria en la xarxa de ponts d'hidrogen per estabilitzar el plegament *TIM barrel*. Fins el moment no ha estat reportat si les quitinases ChiA i ChiB de *P. furiosus* presenten o no activitat de TG.

En la Figura 1.5 es mostra l'alineament de seqüència dels dominis catalítics de les quitinases seleccionades. Tot i la baixa similitud de seqüència entre aquestes, tret característic de quitinases de la família 18, s'observa varis residus conservats. Entre aquests residus conservats es detecta els dos motius de seqüència SxGG i DxDxE, en el que es localitza el glutamat que actua d'àcid general i l'aspartat que actua d'assistant per a la formació de l'intermedi oxazolina.

<i>BcChiA/41-451</i>	41	-----MDSYKIVGYYP SWAAY--GRNYNVADIDPT----KVTHIN YAFADICWNGIHG-	87
<i>LpChiA/177-560</i>	177	SPDPDPQPPTSKKIIGYYPAWATY--GRNYQVADIDAS----KITHIN YAFANI-----	224
<i>RmChiA/19-355</i>	19	-----EQPALDFRVVGYLYG-----PRMDSLPLVLELS----GLTHLN YAFANVRPD----	60
<i>StmChiA/291-656</i>	291	-----DGGTTGKRVIIGYFTQWGIY--GRNYRVKNIDSSGSAARLTHIN YAFGNVRRNRC EVG	345
<i>SmChiC/13-328</i>	13	DDAAIMP SIANKKILMGFWHNWAAGA-SDGYQQQGFANM----NLTDIPTEYNVVAVAFMKG-	69
<i>SpChiD/21-415</i>	21	-----MSYLSVGYFNGGGDVTAGPGGDINKLDVT----QITHLN YSFGLIYNDEKQET	69
<i>VhChiA/160-588</i>	160	-----VMGTYFVEWGIY--GRDYTVDNMPVD----NLTHILYGFIPICGPNESVK	203
<i>PfChiB/409-706</i>	409	-----	410
<i>TkChiA/911-1215</i>		-----	
<i>BcChiA/41-451</i>	88	NPDP SGNPNTVTWCQNEKSQTIINVPNGTIVLGGDPWIDTGTGK----F-----AGDTW	134
<i>LpChiA/177-560</i>	225	-----TNGEIVVGDYADTKF----F-----PGDCW	247
<i>RmChiA/19-355</i>	61	-----GRVLET S-----	68
<i>StmChiA/291-656</i>	346	VTQPSDPNS-----GAGGDAFADYTKA----FSAAE--SVSGSADTW	381
<i>SmChiC/13-328</i>	70	-----Q-----G-----IPTFKPYNLS-----	81
<i>SpChiD/21-415</i>	70	NPALKDPSRL-----	83
<i>VhChiA/160-588</i>	204	SVGGNSFNALQTAACR-----GVNDYEVV IHPWAAAYQKS--FPQ-----AGHEY	245
<i>PfChiB/409-706</i>	411	NP IPEHFFA-----PYIDMSLVHKPLVEYAKLTGTYFTLAFILYSSVYNGPAW	460
<i>TkChiA/911-1215</i>	911	-----LPEHFFA-----PYIDMSLGIHKPLVEEYNTGTPYFTLAFVLYSSVYNGPAW	958
<i>BcChiA/41-451</i>	135	DQPI-AG-NINQLNKLKQTNPNLKTIIISVGGWTSNRFSDVAATAATREVFANSAVDFL----	191
<i>LpChiA/177-560</i>	248	DPGCKRG-NFNQLQKLKAAYPHLKTLISVGGWTSNRFSDAALTDASRTKFADSAVRFV----	305
<i>RmChiA/19-355</i>	69	DDSVR---LRRLVGM-RMEGPRILLSVGGWTSNRFSDAALTEASRORFAESAGSLL----	122
<i>StmChiA/291-656</i>	382	DQPL-RG-NWNQLKQLKAKYPSMKVLLISVGGWTSNRFSDAALTEASRORFAESAGSLL----	441
<i>SmChiC/13-328</i>	82	DT EFR---RQVGL--NSQGRAVLLISVGGWTSNRFSDAALTEASRORFAESAGSLL----	128
<i>SpChiD/21-415</i>	84	LSPKVMA-DLQLLPVLRKQNP ELKVLISVGGWTSNRFSDAALTEASRORFAESAGSLL----	140
<i>VhChiA/160-588</i>	246	STPI-KG-NYAMLMLKQRNPDLKILPSVGGWTSNRFSDAALTEASRORFAESAGSLL----	302
<i>PfChiB/409-706</i>	461	AGSIPLEKFDVRELE--REIGGEV IIFGGAVGPLYLQQAS-T--PEQLAEWYIKVI--	513
<i>TkChiA/911-1215</i>	959	AGSIP LDAFDVREKGL--REAGGDV IIFGGAVGPLYLQQAK-T--PEQLAQWYIQVI--	1011
<i>BcChiA/41-451</i>	192	-----RKNYFDGVDLDWEYVPSGGLDGN SKRPE-DKQNYTLLLSKIR EKLDAAAGAV	241
<i>LpChiA/177-560</i>	306	-----RQYGFDDGVDLDWEYVPGGGLN--PGRPE-DKQNYTLLLSKIR EKLDAAAGAV	353
<i>RmChiA/19-355</i>	123	-----VAFDL DGLDLDWEYVPGQPGE--EGNVYREE-DREHFTWLSA SVRAVLSLEQA	171
<i>StmChiA/291-656</i>	442	LPVTDGAGGAGAA LGVFDGLDLDWEYVACGIE--CGKPE-DNANFTALMAEFRQLDAVR--	499
<i>SmChiC/13-328</i>	129	-----EVYGFDDGLDLDLEQAAIGAANNKT-----VLPAAALKKVKD-HYAA	167
<i>SpChiD/21-415</i>	141	-----KQYHL DGLDLDWEYVPGNAGWLVESQPA--DRANFTLLLAELHKALD----	185
<i>VhChiA/160-588</i>	303	-----TWKFYDGLDLDWEYVPGGGAADKGDVPNDGPAYIALMREL RVMLDELEAE	353
<i>PfChiB/409-706</i>	514	-----DTYNATYLDFDIEA--GIDADKL-----ADALLIV-ORERP--	547
<i>TkChiA/911-1215</i>	1012	-----DTYNATYLDFDIEA--GVDADKL-----ADALLIV-ORERP--	1045
<i>BcChiA/41-451</i>	242	DGKKYLLT IASGASATYA--ANT ELAKIAAIVDWINIMT--YDFNGAWQKISAHNAPLNYDP-	299
<i>LpChiA/177-560</i>	354	DGKKYLLT IASGASPNYV--QNT ELGQVKDYVDWINIMT--YDFHGGWENVS GHNAPLYVDP-	411
<i>RmChiA/19-355</i>	172	HGRYLLT IAAAAGPEYL--KHVEIAQVQALVDFINLMT--YDFHGSWTPHTGHHANLFPSS-	229
<i>StmChiA/291-656</i>	500	--PGLLLT VAVGAGIDKI--RVTDP AAYHPYLDYINVMT--YDFHGWDAKTNHQSA LFDSPA-	555
<i>SmChiC/13-328</i>	168	QGNFIIISMAPEF--P-----YLRNTNGTYLDYINALEGYYDFIAPQYYNQQGD-GIWWDEL	220
<i>SpChiD/21-415</i>	186	--KGLLLT IAVGANVKSPO--EWDVVKGIAPYLDYINLMT--YDMAYGTQY--FNSNLYDSK	239
<i>VhChiA/160-588</i>	354	TGRYELT SAIGVGYDKI--EDVDYADAVQYMDYIFAMT--YDFYGGWNNVPGHOTALYCGS-	411
<i>PfChiB/409-706</i>	548	VKFSFTLP SDPG IGLAGGYG IETMAKKGVRVDRVNPMT--MDYY--WTPSNAENA-IKVAE-	604
<i>TkChiA/911-1215</i>	1046	VRFSTLP SDPG IGLAGGYG IETMAKKGVI DRVNPMT--MDYY--WTPANADNA-ISVAE-	1102
<i>BcChiA/41-451</i>	300	AASA----AG-----VPDANTFN-V-AAGA QGHLDAGVPAAKLV LGVPFYGRWDGCAQA	348
<i>LpChiA/177-560</i>	412	SDP-----SPNKDNFN-V-AAAVQNHINAGVPASKIVMGMPFYGRWQGCKST	457
<i>RmChiA/19-355</i>	230	LDP-----EGIS-V-DGAVRRYLAAGVPGEKLVVGVFPYGRGWGRVPE	271
<i>StmChiA/291-656</i>	556	NDP S---TG-----DQ--KLYN-S-NDAEAFISRGVPAAKLNLGIGYGRWTVGANA	602
<i>SmChiC/13-328</i>	221	NAWITQNNDA-----MKEDFLYLTESLVTGTRGYAKIPAAKFVIGLPSNNDAAA-----	270
<i>SpChiD/21-415</i>	240	QWPT-----VAADRY S-A-NFVVDNYLAAGLKPALNLGIGYGRVPRAT EP	286
<i>VhChiA/160-588</i>	412	FMRPGQCDGGGVDENGEPYKGPAYT-A-DNGIQLLLAQGVPAANKLV LGTAMYGRWEGVTPD	471
<i>PfChiB/409-706</i>		-----	
<i>TkChiA/911-1215</i>		-----	
<i>BcChiA/41-451</i>	349	GNGQ-----YQTCTGGSSVGTW-----EAGSFDYFDLEAN-----YINKNGYTRY	388
<i>LpChiA/177-560</i>	458	NNGQ-----YQSCTGT-PTGTW-----ETGVDFDSDLENN-----YINKNGYTRY	496
<i>RmChiA/19-355</i>	272	HNGR-----YQPYEAS-----LTEELSFATLQRD-----YIGRAGFVRY	305
<i>StmChiA/291-656</i>	603	NNGL-----YQATGA-APGTY-----EAGIEDWKVLKN-----LAWPGY	636
<i>SmChiC/13-328</i>	271	-----TG--YV-----VNKQAVY-----NAFSRLDAKNL--SIKGLMTWSIN	303
<i>SpChiD/21-415</i>	287	GIDWDKADAANKPVTQPYFTARETAVFKAMGLDLTKDSYFKYNDIVSKLL--NDPQRRFTA	346
<i>VhChiA/160-588</i>	472	T LTD-PNDPMTGTATGK LKGSTAGGVW-----EDGVIDYKGISFMLGANNTGINGFEYG	525
<i>PfChiB/409-706</i>	605	-----NVFRQLKQIYPEKSDDEIWKMI GLTPM-----	631
<i>TkChiA/911-1215</i>	1103	-----HVFNQLKQIY PDKSDDEI WGMIGLTPM-----	1129
<i>BcChiA/41-451</i>	389	WNDT--AKVPYLYNAS--NKRFI SYDDAESVGYKTAYIKSKGLGGAMFWELSGDRNKT LQ	444
<i>LpChiA/177-560</i>	497	WNDT--SKVPYLYNP S--NGVFI SYDDAESFGYKTSFLKSKLGGAMFWELSGDRNKT LL	552
<i>RmChiA/19-355</i>	306	WDEE--ARAPYLWHA--ERIFI SYEDTQLAEKVAVYRAHRLGGLMFWEYSGD-----	355
<i>StmChiA/291-656</i>	637	T DNT--AGATWYNGS--TL--WSFD-----	656
<i>SmChiC/13-328</i>	304	WDNGKSKAGVAYNWFEK-----TRYAPLIQ	328
<i>SpChiD/21-415</i>	347	WDS--AQVPYLTMKSAEGKPLFAISYENR SVALKADYIKSKGLGGAMFWEYGADDNRLA	406
<i>VhChiA/160-588</i>	526	YDAQ--AEAPWVWNR S--TGELITFDHR SVLAKGNYAKSLGLAGLFSWEIADANGDILL	580
<i>PfChiB/409-706</i>	632	-----IGV-----NDDKSVFTLEDAQ--QLVDWAIQHKIGSLAFWSVDRDHPGPTG	675
<i>TkChiA/911-1215</i>	1130	-----IGT-----NDDKSVFSLQDAE--KLVDWAIQHKIRSLAFWSVDRDHPGPTG	1173
<i>BcChiA/41-451</i>	445	NK--LKADL-----	451
<i>LpChiA/177-560</i>	553	NK--LYNDLN-----	560
<i>RmChiA/19-355</i>		-----	
<i>StmChiA/291-656</i>		-----	
<i>SmChiC/13-328</i>		-----	
<i>SpChiD/21-415</i>	407	HQ--LAESLGI-----	415
<i>VhChiA/160-588</i>	581	NA--MHEGMA-----	588
<i>PfChiB/409-706</i>	676	EVSP LHRGTNDP DWA FSHV FVKFMEA FYGTYF-----	706
<i>TkChiA/911-1215</i>	1174	EVSP IHRGTSDP DWA FSHA FLRFMKA FQPVA STAQVAVVPV-----	1215

Figura 1.5. Alineament de seqüència dels dominis catalítics de les quitinases GH18 seleccionades

Per altra banda, utilitzant les seqüències de proteïna de les quitinases seleccionades s'ha analitzat la relació filogenètica entre aquestes (Figura 1.6). Les quitinases d'arqueus es troben agrupades i segregades de les quitinases bacterianes, d'entre les quals, *SmChiC* sembla ser la més propera a les del regne *Archaea*.

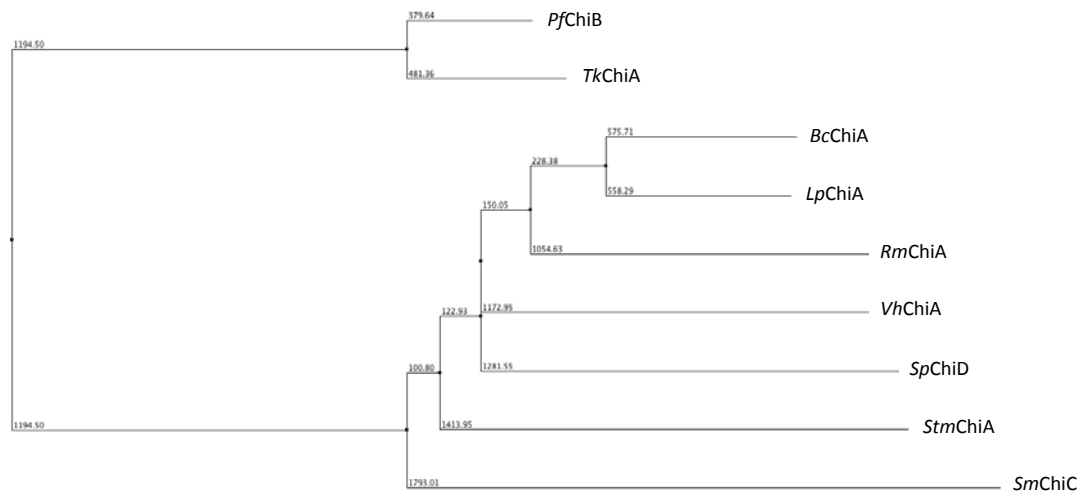
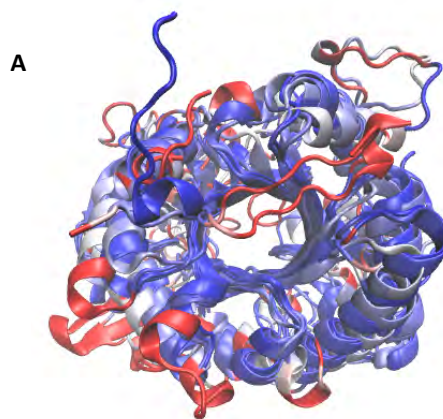


Figura 1.6. Arbre filogenètic de les quitinases GH18 seleccionades
Relació filogenètica entre les diferents quitinases obtinguda a partir de la seqüència proteica dels dominis catalítics.

A nivell estructural, de les 9 quitinases seleccionades, només es troba reportada l'estructura 3D dels dominis catalítics de *BcChiA1*, *SpChiD*, *SmChiC* i *PfChiB* i l'estructura multi-modular de *VhChiA*. Com s'ha mencionat anteriorment, totes presenten un plegament de *TIM barrel* amb el domini d'inserció $\alpha\beta$, excepte *SmChiC* i la quitinasa del regne *Archaea PfChiB* que no contenen aquest domini d'inserció i consegüentment tenen un solc catalític menys profund.

En la Figura 1.7 es mostra la superposició del domini catalític de les estructures resoltes de les diferents quitinases seleccionades en la que s'observa la conservació de l'estructura *TIM barrel* (α/β)₈. A més, en la Figura 1.7B i C, respectivament, també es mostra la presència o absència del domini $\alpha\beta$ de les diferents quitinases.



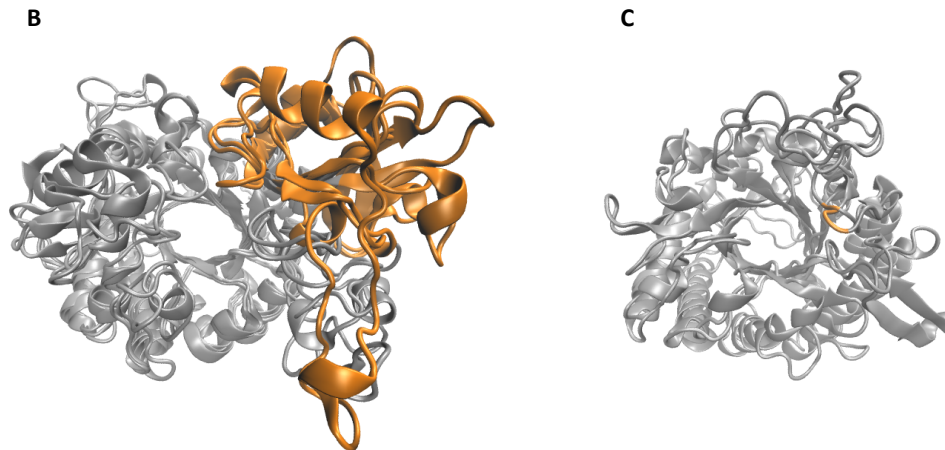


Figura 1.7. Superposició dels dominis catalítics de les quitinases GH18 seleccionades
 A) Superposició de la regió del domini catalític de les estructures de *BcChiA1* (PDB: 1ITX), *SmChiC* (PDB: 4AXN), *SpChiD* (PDB: 4NZC), *VhChiA* (PDB: 3B8S) i *PfChiB* (PDB: 2DSK). Estructures colorejades considerant RMSD. B) Superposició de *BcChiA1*, *SpChiD* i *VhChiA*. En taronja es representa el domini d'inserció $\alpha+\beta$. C) Superposició de *SmChiC* i *PfChiA*, estructures que no presenten el domini d'inserció $\alpha+\beta$.

1.3. Gens sintètics per a l'expressió de proteïnes recombinants

Un cop seleccionades les quitinases, s'han dissenyat els gens sintètics per a la producció de les proteïnes recombinants en *E. coli*. En funció dels estudis reportats en la bibliografia, cadascun dels gens sintètics de les quitinases seleccionades s'ha dissenyat amb una organització en dominis diferent (Figura 1.8). Així doncs, els gens sintètics han estat dissenyats de la mateixa manera que està reportat en bibliografia, però s'ha decidit eliminar el pèptid senyal de totes les quitinases que en presenten. En el cas de les quitinases d'arqueus, el gen sintètic dissenyat consta del segon domini catalític i els ChBDs corresponents, equivalents als constructes B i ChiA Δ 2 de *P. furiosus* i *T. kodakaraensis*, respectivament (Tanaka *et al.*, 1999; Oku and Ishikawa, 2006). Per altra banda, sota el nostre coneixement, *LpChiA* no ha estat expressada prèviament de manera heteròloga, per tant, s'ha dissenyat el gen sintètic a partir de la seqüència de la regió codificant disponible a la base de dades *Genbank* (*Genbank Accession no.* AB829901).

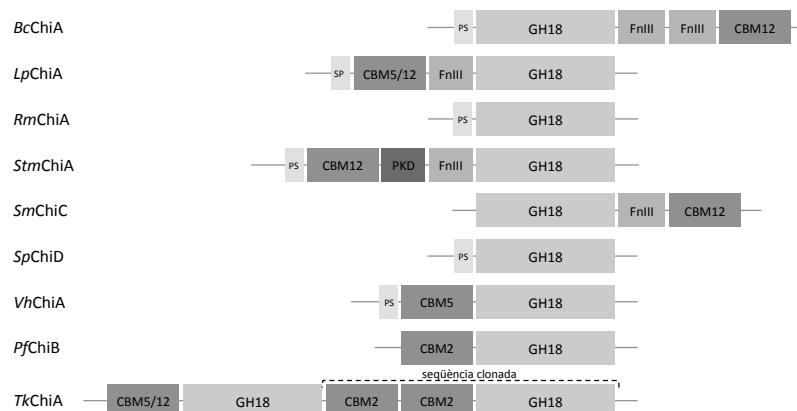


Figura 1.8. Organització en dominis dels gens sintètics de les quitinases seleccionades
 S'indica els pèptids senyal (PS), dominis catalítics (GH18), dominis d'unió a quitina (CBM), dominis fibronectina-tipus III (FnIII) i domini *Polycystic Kidney Domain* (PKD).

CAPÍTOL 2

Capítol 2. Desenvolupament de mètodes analítics, el cas de la quitinasa D de *Serratia proteamaculans* (SpChiD), enzim *wt* i mutant D151A

Per a la caracterització enzimàtica de les diferents quitinases seleccionades s'han desenvolupat diferents mètodes analítics amb l'objectiu d'analitzar tant l'activitat hidrolasa com l'activitat glicosintasa.

En aquest capítol es desenvolupa la metodologia per a la caracterització i s'exposa com a exemple els resultats obtinguts per la quitinasa D de *Serratia proteamaculans*, tant de l'enzim salvatge (*wt*) com del mutant D151A, corresponent a la mutació del residu assistent. L'expressió i purificació dels enzims model pel desenvolupament dels mètodes analítics es descriuen al capítol 3.

2.1. Activitat hidrolítica

Primerament s'analitza l'activitat hidrolasa de l'enzim mitjançant la determinació de l'activitat específica. Per als assajos s'utilitza diferents concentracions d'enzim i una única concentració de substrat.

Per a la determinació de l'activitat específica d'hidròlisi de les diferents quitinases seleccionades s'han desenvolupat dos mètodes d'anàlisi diferents, amb diferents substrats, basats en dues estratègies de detecció. Per una banda, s'han utilitzat substrats fluorogènics (4-metilumbeliferil-glicòsids) i s'ha monitoritzat l'alliberació del grup fluoròfor com a conseqüència de l'activitat hidrolasa de l'enzim. Per altra banda, s'ha utilitzat un substrat natural de l'enzim, (GlcNAc)₄, i s'ha seguit els productes d'hidròlisi per HPLC-MS.

2.1.1. Assaig fluorimètric per a substrats fluorogènics

Es determina l'activitat específica mitjançant un assaig fluorimètric en el que es determina la concentració de fluoròfor alliberat com a conseqüència de l'activitat d'hidròlisi de l'enzim. Els substrats emprats són 4-metilumbeliferil glicòsids i es monitoritza l'alliberació de l'aglicona fluorogènica 4-metilumbeliferona (4-MU).

Es determina l'activitat per a tres substrats diferents (GlcNAc-MU, (GlcNAc)₂-MU i (GlcNAc)₃-MU). Amb aquest assaig només es quantifica el producte resultant de la hidròlisi de l'enllaç que rendeix el fluoròfor lliure, sabent que l'enzim també és capaç d'hidrolitzar altres enllaços glicosídics del substrat (Figura 2.1).

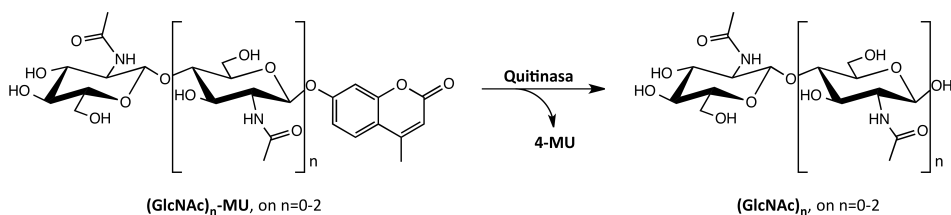


Figura 2.1. Esquema de la reacció d'hidròlisi de $(\text{GlcNAc})_n\text{-MU}$

Cal tenir en consideració la poca solubilitat dels substrats de quitina fluorogènics, per aquest motiu l'activitat enzimàtica es realitza a una concentració de substrat de $50 \mu\text{M}$. Com que es treballa a una $[S]$ baixa (segurament inferior a la K_M), es considera que $V_0/[E] \approx k_{\text{cat}}/K_M$.

Per tal de quantificar el fluoròfor lliure es realitza una recta patró de 4-metilumbeliferona tenint en compte les concentracions de treball.

L'anàlisi es realitza de forma discontinua prenent alíquotes en el temps. El grup hidroxil de la 4-metilumbeliferona té un pK_a de 7,79, per aquest motiu, amb l'objectiu d'incrementar la fluorescència, es realitza una dilució 1:4 en un tampó bàsic (Glicina 0.3M, pH 10.3).

A continuació es mostra, com a exemple, l'activitat hidrolítica d'*SpChiD wt* i del mutant D151A davant els substrats GlcNAc-MU , $(\text{GlcNAc})_2\text{-MU}$ i $(\text{GlcNAc})_3\text{-MU}$. Les condicions de l'assaig d'activitat es mostren a la Taula 2.1. La concentració de proteïna es determina per assaig de BCA.

Taula 2.1. Condicions de l'assaig fluorimètric per a la determinació de l'activitat específica d'hidròlisi

Substrat	$[(\text{GlcNAc})_n\text{-MU}] = 50 \mu\text{M}$
Tampó	Fosfat 50 mM pH 7, 37°C
Enzim	$[wt] = 2-20 \text{ nM}$, $[\text{mutant}] = 0,5-8 \mu\text{M}$
Condicions	$\lambda_{\text{em}} = 360 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{ex}} = 460 \text{ nm}$

Es representa la V_0 ($\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$) enfront la concentració d'enzim emprada per a cadascun dels substrats, on el pendent de la recta és l'activitat específica $V_0/[E]$ (min^{-1}) (Figura 2.2, Taula 2.2).

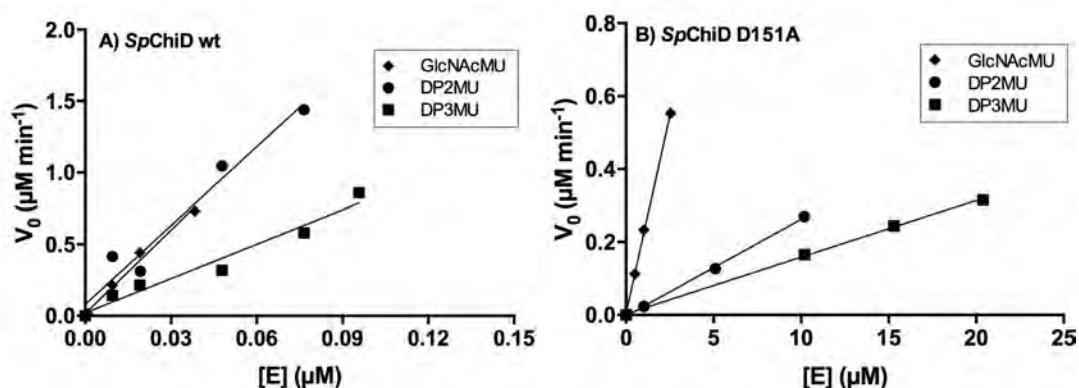


Figura 2.2. Determinació de l'activitat específica d'*SpChiD wt* i del mutant D151A per als diferents substrats fluorogènics. A) *SpChiD wt*; B) *SpChiD D151A*. Condicions de l'assaig: $[(\text{GlcNAc})_n\text{-MU}] = 50 \mu\text{M}$, tampó fosfat 50 mM , pH 7, 37°C .

Taula 2.2. Activitat específica ($V_0/[E]$) d'*SpChiD wt* i del mutant D151A. Lot 1.

	$V_0/[E] \text{ (min}^{-1}\text{)}$		
	GlcNAc-MU	$(\text{GlcNAc})_2\text{-MU}$	$(\text{GlcNAc})_3\text{-MU}$
<i>SpChiD wt</i>	19,413	18,333	8,000
<i>SpChiD D151A</i>	0,217	0,027	0,016
D151A/ <i>wt</i>	$1,12 \times 10^{-2}$	$1,45 \times 10^{-3}$	$1,94 \times 10^{-3}$

Es determina l'activitat enzimàtica per a diferents lots d'enzim ($n \geq 3$) i es calcula la mitjana obtenint els resultats d'activitat definitius (Taula 2.3).

Taula 2.3. Activitat específica ($V_0/[E]$) d'*SpChiD wt* i del mutant D151A

	$V_0/[E] \text{ (min}^{-1}\text{)}^1$		
	GlcNAc-MU	$(\text{GlcNAc})_2\text{-MU}$	$(\text{GlcNAc})_3\text{-MU}$
<i>SpChiD wt</i>	$14,7 \pm 5,6$	$13,5 \pm 6,7$	$7,1 \pm 1,7$
<i>SpChiD D151A</i>	$0,17 \pm 0,04$	$0,022 \pm 0,004$	$0,016 \pm 0,002$
D151A/ <i>wt</i>	$1,1 \times 10^{-2}$	$1,6 \times 10^{-3}$	$2,3 \times 10^{-3}$

Condicions de reacció: $50 \mu\text{M}$ de substrat en Na_2HPO_4 50 mM pH 7. ¹Mitjana de 3 repeticions

2.1.2. Mètode cromatogràfic (HPLC-MS) per a substrats naturals

L'activitat hidrolasa de les diferents quitinases també s'ha caracteritzat mitjançant substrats naturals per a determinar la hidròlisi dels diferents enllaços *O*-glicosídics interns del substrat. Concretament en l'assaig s'utilitza tetraacetilquitotetraosa, $(\text{GlcNAc})_4$, com a substrat, i s'analitzen els diferents productes de reacció formats (Figura 2.3).

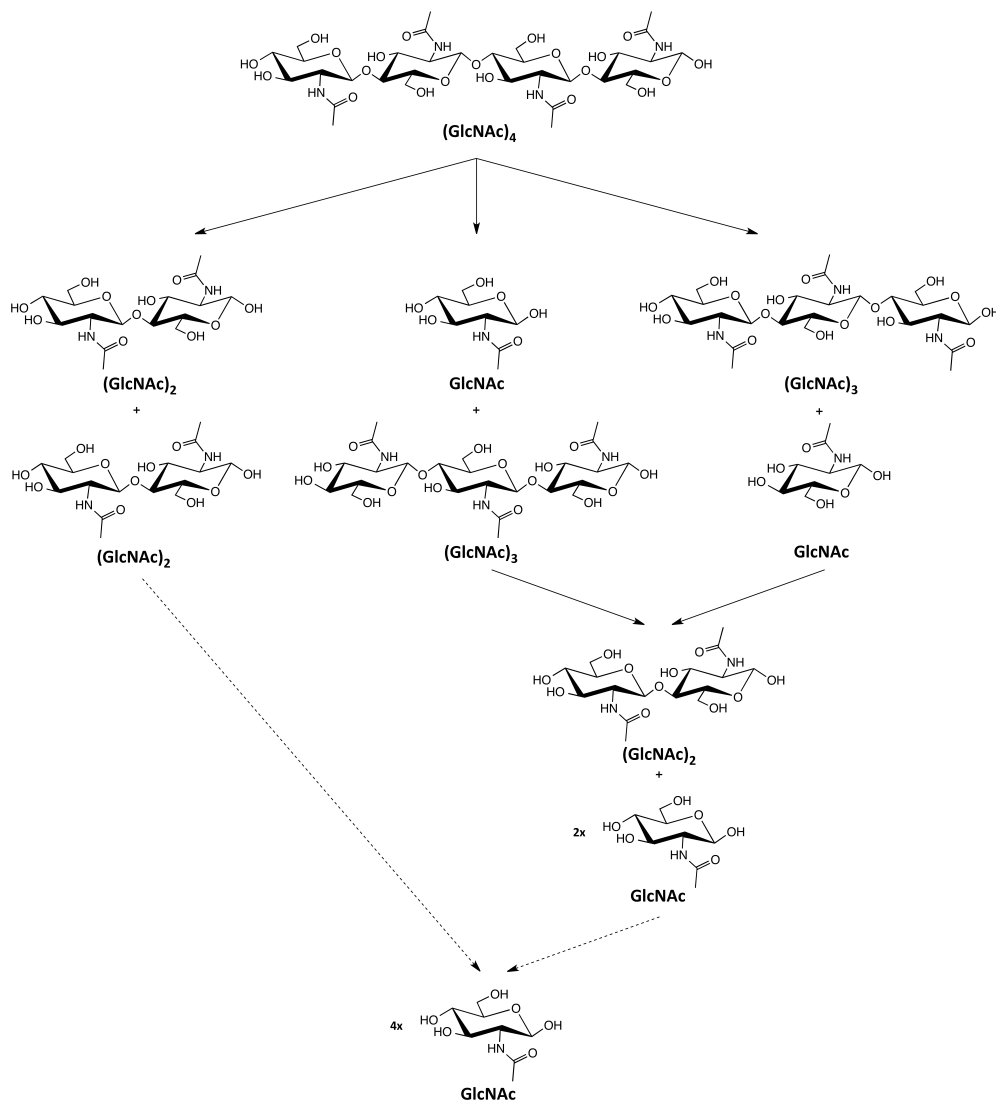


Figura 2.3. Esquema dels possibles productes d'hidròlisi de (GlcNAc)₄

Per a la determinació de l'activitat específica d'hidròlisi utilitzant (GlcNAc)₄ com a substrat s'ha desenvolupat i optimitzat un mètode analític d'HPLC-MS. Aquest mètode pretén seguir el progrés de la reacció d'hidròlisi de (GlcNAc)₄ a diferents intervals de temps.

L'anàlisi es realitza de forma discontinua prenent alíquotes en el temps. Per tant, cal aturar la reacció enzimàtica amb una substància química que inactivi l'enzim, i que alhora asseguri l'estabilitat dels substrats i productes durant un període de temps suficientment llarg per a poder realitzar l'anàlisi de les mostres sense que hi hagi degradació d'aquestes.

Experiències prèvies en el Laboratori de Bioquímica mostren la utilització d'una mescla de n-propanol al 50% en aigua per a aturar la reacció, assegurant l'estabilitat d'oligosacàrids de quitina i quitosà. Per aquest motiu, s'ha comprovat si la reacció enzimàtica d'hidròlisi també s'atura amb una dilució 1:9 en aquesta solució d'n-propanol:H₂O (1:1). Per a la reacció enzimàtica s'ha utilitzat SpChiD wt (500 nM) com a enzim i 2 mM de (GlcNAc)₄ com

a substrat. S'analitza una alíquota de reacció presa al minut 10 i diluïda 1:9, després de 5 i 25 minuts d'aturar la reacció (Figura 2.4).

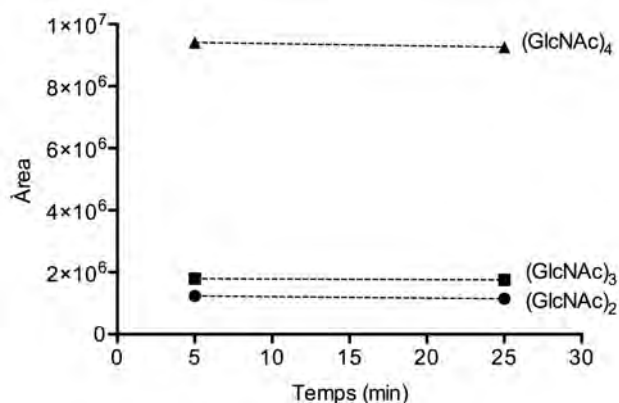


Figura 2.4. Comprovació de l'aturada enzimàtica

S'utilitza una mescla d'*n*-propanol:H₂O (1:1) com a tampó de parada. Mostra dels 10 minuts de reacció analitzada 5 i 25 minuts després d'aturar-la.

Tal com es mostra en la Figura 2.4, la concentració de substrat restant i productes formats es manté constant en el temps, fet que confirma l'aturada de la reacció enzimàtica.

Un cop establert el tampó de parada de la reacció, es procedeix al desenvolupament del mètode cromatogràfic d'HPLC. S'utilitza una columna *HILIC* (*Hydrophilic Interaction Chromatography*) de naturalesa amida, *XBridge*, degut a la polaritat dels compostos a separar.

Per a l'estudi i optimització dels paràmetres de cromatografia líquida HPLC (fase mòbil, temperatura, flux, volum d'injecció) s'ha dissolt els principals quitoooligosacàrids presents en la reacció enzimàtica ((GlcNAc)₂, (GlcNAc)₃ i (GlcNAc)₄) en Na₂HPO₄ 50 mM pH 7 i s'ha realitzat una dilució 1:9 en la dissolució de parada de la reacció (*n*-propanol:H₂O 1:1). Per a la detecció dels compostos s'utilitza el mètode d'adquisició SIM⁺ (*Single Ion Monitoring*), en el que cada canal de detecció monitoritza l'abundància relativa dels diferents ions d'un compost. Tanmateix, s'utilitza un dels canals de detecció per al mètode d'escaneig (*scan*).

Es segueixen els adductes [M+H]⁺ i [M+Na]⁺ per a cadascun dels tres quitoooligosacàrids analitzats, ja que es detecten ambdós ions en l'espectre de masses (Figura 2.5). Les condicions cromatogràfiques finals es mostren a la Taula 2.4.

Taula 2.4. Condicions cromatogràfiques finals d'HPLC per a la separació i detecció de (GlcNAc)₄ i els seus productes d'hidròlisi.

Columna	<i>XBridge</i> BEH <i>Amide</i> XP 130 Å, 2'5 μm, 3x100 mm
Fase mòbil	ACN:H ₂ O (70:30) 1% àcid fòrmic
Volum injecció	5 μL
Flux	0,7 mL·min ⁻¹
Temperatura de la columna	60°C

La Figura 2.5 mostra un cromatograma obtingut mitjançant el mètode d'HPLC desenvolupat.

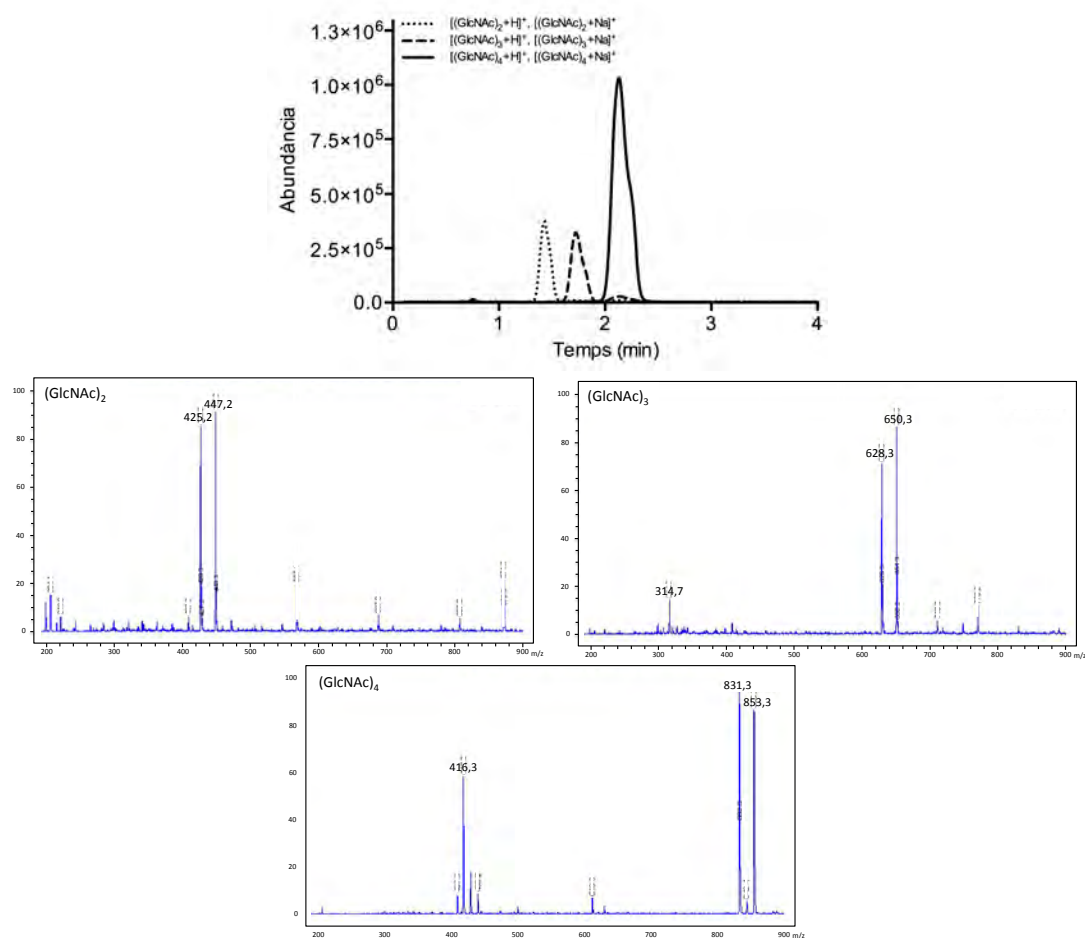


Figura 2.5. Cromatograma dels patrons de quitooligosacàrids obtingut a partir del mètode HPLC establert.

Monitorització per MS SIM⁺ de [M+H]⁺ i [M+Na]⁺ per a (GlcNAc)₂ (m/z 425,2 i 447,2), (GlcNAc)₃ (m/z 628,3 i 650,3) i (GlcNAc)₄ (m/z 801,3 i 853,3).

Un cop determinades les condicions cromatogràfiques s'han ajustat els paràmetres del mòdul de detecció (MSD *Agilent* acoblat al cromatògraf HPLC 1260). Les condicions finals es troben a la Taula 2.5.

Taula 2.5. Condicions finals del mètode de detecció MS

Mètode de ionització	API-ES positiu
Flux del gas de desolvatació	13 L·min ⁻¹
Temperatura	300°C
Fragmentor	80
Pressió del nebulitzador	40 psig
Voltatge del capil·lar	4 kV
Mètode de detecció	(GlcNAc) ₂ : 425,30 [M+H] ⁺ + 447,30 [M+Na] ⁺ , 25% (GlcNAc) ₃ : 628,30 [M+H] ⁺ + 650,30 [M+Na] ⁺ , 25% (GlcNAc) ₄ : 831,30 [M+H] ⁺ + 853,30 [M+Na] ⁺ , 25% Scan: 100-900 m/z, 25%

Desenvolupament i validació del mètode analític

Un cop definides les condicions cromatogràfiques i els paràmetres necessaris del mòdul de detecció s'ha procedit a la comprovació funcional del mètode. Per a la validació del mètode s'ha determinat la linealitat, la repetibilitat, el límit de quantificació (LQ) i el límit de detecció (LD).

Per a l'assaig enzimàtic es realitza una reacció amb $(\text{GlcNAc})_4$ com a substrat i es monitoritza el progrés d'aquesta prenent mostres al llarg del temps. Es pretén seguir tant el consum de $(\text{GlcNAc})_4$ com la formació de $(\text{GlcNAc})_2$ i $(\text{GlcNAc})_3$, productes de la reacció d'hidròlisi. Per a la quantificació dels productes s'utilitza com a patrons externs els quitoooligosacàrids $(\text{GlcNAc})_2$, $(\text{GlcNAc})_3$ i $(\text{GlcNAc})_4$.

Per tal de quantificar el substrat ($(\text{GlcNAc})_4$) i els productes formats durant la reacció ($(\text{GlcNAc})_2$ i $(\text{GlcNAc})_3$) es realitza una recta patró per a cadascun dels compostos (Figura 2.6). Per a la obtenció de la recta patró s'utilitza una barreja de $(\text{GlcNAc})_2$, $(\text{GlcNAc})_3$ i $(\text{GlcNAc})_4$ a diferents concentracions (0,02-0,5 mM per a $(\text{GlcNAc})_2$ i $(\text{GlcNAc})_3$, i 0,5-2 mM per a $(\text{GlcNAc})_4$) en tampó Na_2HPO_4 50 mM pH 7, aquestes mostres de la barreja de patrons són diluïdes 1:9 en dissolució de parada, de la mateixa manera que les mostres de reacció. Les mostres de la barreja de patrons s'injecten varies vegades (entre 4 i 6, segons el nombre de mostres a analitzar) al llarg de l'anàlisi, intercalades entre les mostres de reacció.

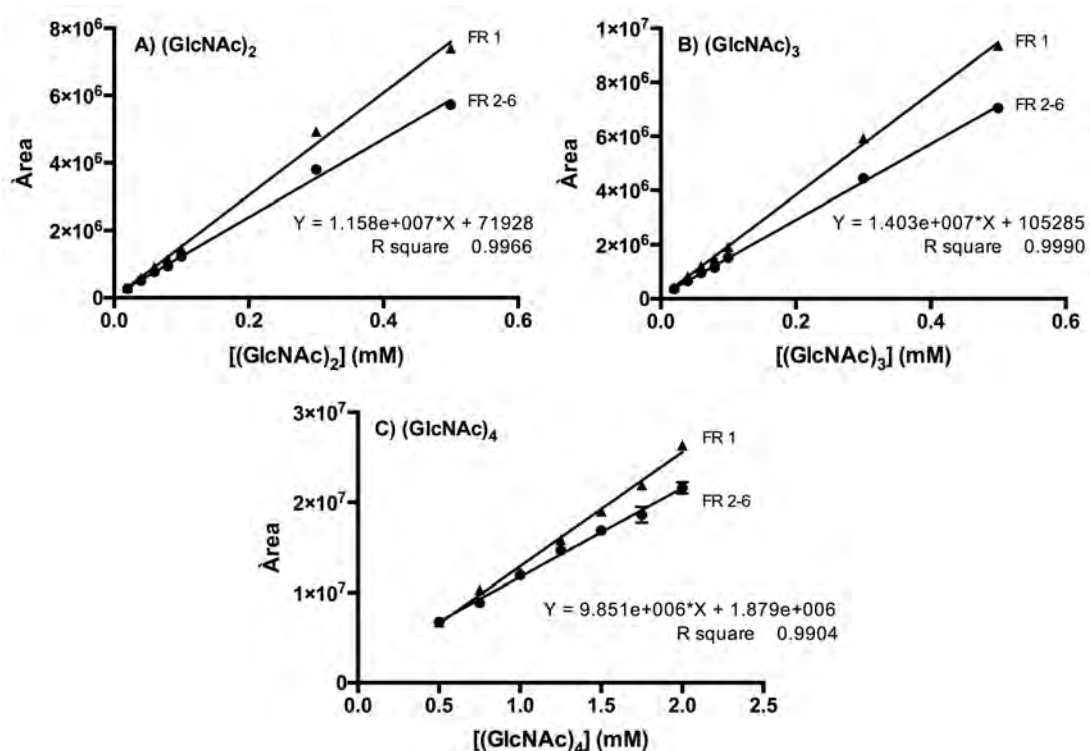


Figura 2.6. Rectes patró utilitzades per a la quantificació de substrat restant i la formació de productes A) $(\text{GlcNAc})_2$, B) $(\text{GlcNAc})_3$ i C) $(\text{GlcNAc})_4$. FR1: Recta patró de la primera injecció de patrons. FR2-6: Recta patró corresponent a la mitjana de les injeccions 2 a 6, en la que es representa les barres d'error.

Els factors de resposta dels patrons varien entre la primera injecció (FR1) i la resta (FR2-6), essent en la primera injecció superiors. Per aquest motiu, per als assajos d'activitat, es decideix injectar a l'inici dues vegades seguides la barreja de patrons a diferents concentracions, i no es considera la primera injecció per a l'anàlisi, utilitzant com a factor de resposta la mitjana dels factors de resposta de les injeccions 2 a 6 dels patrons.

Per a la validació de la linealitat del mètode s'utilitza els valors de les injeccions 2 a 6, la mitjana dels quals correspon al factor de resposta que s'utilitzarà per a la quantificació dels productes en l'assaig (Figura 2.7).

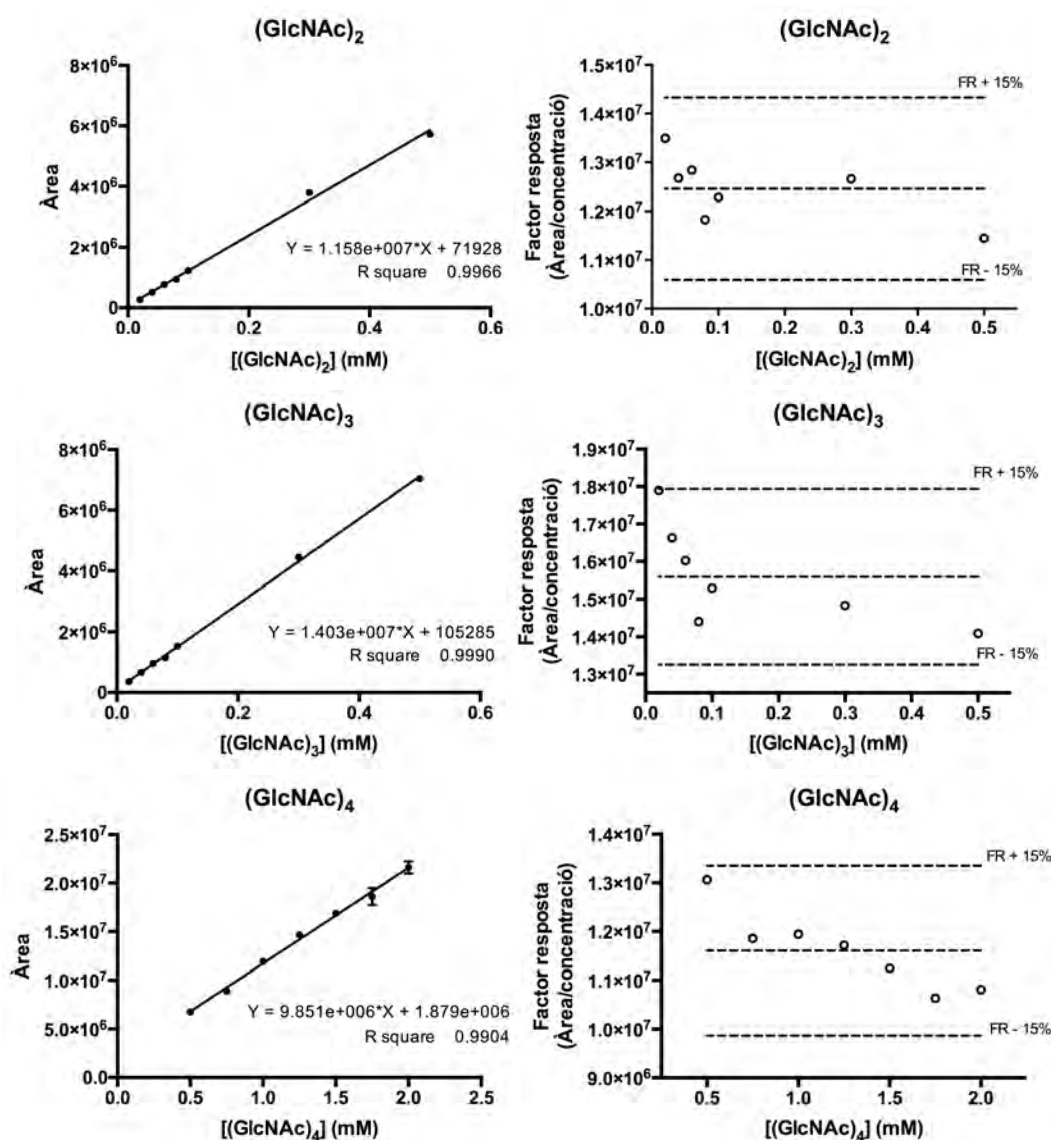


Figura 2.7. Determinació de la linealitat del mètode analític desenvolupat

La recta del factor de resposta correspon a la mitjana de les injeccions 2 a 6, en la que es representa les barres d'error.

Es defineix la linealitat del mètode com l'interval de concentracions amb un factor de resposta (àrea/concentració) dins l'interval $\pm 15\%$ de la mitjana dels FR de les diferents

concentracions de patrons analitzats. El mètode presenta un rang de linealitat de 0,5 mM a 2 mM per a (GlcNAc)₄, i de 0,02 mM a 0,5 mM per a (GlcNAc)₂ i (GlcNAc)₃, essent aquests intervals de concentracions les úniques concentracions assajades en les reaccions enzimàtiques.

La repetibilitat del mètode de quantificació s'ha analitzat mitjançant injeccions consecutives (n=7) de les mostres més i menys concentrades de la barreja de patrons i s'ha determinat el CV de cada compost per a l'àrea del pic i per al temps de retenció (Taula 2.6).

Taula 2.6. Repetibilitat del mètode analític.

		(GlcNAc) ₄		(GlcNAc) ₃		(GlcNAc) ₂		
		Àrea	t. retenció (min)	Àrea	t. retenció (min)	Àrea	t. retenció (min)	
Mostra 1	Mitjana	2,13 x 10 ⁷	2,197	7,04 x 10 ⁶	1,766	5,72 x 10 ⁶	1,433	
	2 mM (GlcNAc) ₄ , 0,5 mM (GlcNAc) ₃ , 0,5 mM (GlcNAc) ₂	SD	4 x 10 ⁵	0,002	8 x 10 ⁴	0,001	4 x 10 ⁴	0,001
	CV	1,7%	0,09%	1,1%	0,08%	0,7%	0,05%	
Mostra 2	Mitjana	6,58 x 10 ⁶	2,201	3,65 x 10 ⁵	1,765	2,67 x 10 ⁵	1,432	
	0,5 mM (GlcNAc) ₄ , 0,02 mM (GlcNAc) ₃ , 0,02 mM (GlcNAc) ₂	SD	7 x 10 ⁴	0,001	5 x 10 ³	0,001	3 x 10 ³	0,001
	CV	1,1%	0,06%	1,4%	0,06%	1,2%	0,06%	

Els valors corresponen a la mitjana de 7 injeccions diferents (n=7)

Referent a la repetibilitat de l'àrea dels pics, ambdues mostres presenten un CV inferior al 2%, i pel que fa al temps de retenció, el CV és inferior al 0,1% en ambdues mostres. El mètode dissenyat presenta una elevada repetibilitat en relació tant al temps de retenció com a les àrees de cada producte entre les diferents injeccions.

Per a la determinació del límit de detecció (LD) i límit de quantificació (LQ) del mètode, s'ha injectat un blanc de reacció 10 vegades (tampó Na₂HPO₄ 50 mM pH 7 dissolt 1:9 en n-propanol:H₂O 1:1), i s'ha considerat el LD i LQ com la concentració que dona una relació senyal:soroll de fons de 3:1 i 10:1, respectivament (Taula 2.7).

Taula 2.7. Límit de detecció i quantificació de (GlcNAc)₂, (GlcNAc)₃ i (GlcNAc)₄

	(GlcNAc) ₂	(GlcNAc) ₃	(GlcNAc) ₄
LD	0,09 μM	0,38 μM	0,08 μM
LQ	0,31 μM	1,27 μM	0,28 μM

Un cop validat el mètode es procedeix a realitzar un assaig d'activitat, per a comprovar la funcionalitat del mètode en l'anàlisi de la reacció d'hidròlisi de (GlcNAc)₄.

Per a la reacció s'utilitza l'enzim *SpChiD wt* i el mutant D151A a una concentració de 91 nM i 93 μM, respectivament. S'utilitza (GlcNAc)₄ com a substrat a una concentració de 2 mM en tampó fosfat 50 mM pH 7. L'assaig es realitza a 37°C. Per a la monitorització de la reacció

enzimàtica es prenen alíquotes de la dissolució de reacció en el temps, realitzant una dilució 1:9 en la dissolució de parada (n-propanol:H₂O 1:1) i s'analitzen per HPLC-MS mitjançant el mètode analític descrit.

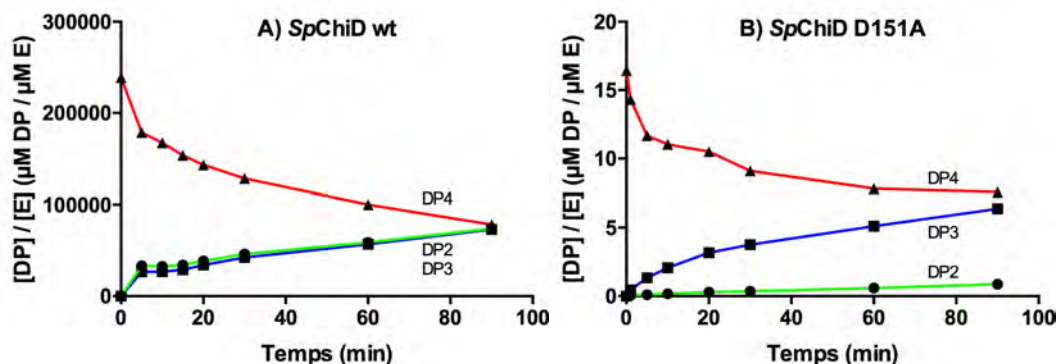


Figura 2.8. Evolució de la reacció d'hidròlisi de (GlcNAc)₄. Gràfics obtinguts mitjançant la monitorització de la reacció d'hidròlisi utilitzant el mètode d'HPLC-MS desenvolupat. A) *SpChiD wt* (90 nM) i B) *SpChiD D151A* (90 µM).

Ambdós enzims hidrolitzen (GlcNAc)₄ formant (GlcNAc)₂ i (GlcNAc)₃ (Figura 2.8). Aquest assaig ens permet identificar la funcionalitat del mètode tant per a la formació de producte com per al consum de substrat, tant en l'enzim *wt* com en un mutant hidrolíticament menys actiu.

Es realitza també un blanc de reacció, sense enzim, en el que es prenen alíquotes en el temps idènticament a les mostres de reacció, per tal de comprovar l'estabilitat de (GlcNAc)₄ en el temps, i confirmar que la presència de (GlcNAc)₂ i (GlcNAc)₃ és conseqüència de l'activitat hidrolasa de l'enzim. Es comprova l'estabilitat de (GlcNAc)₄ al llarg del temps, però també es detecta certa concentració de (GlcNAc)₂ i (GlcNAc)₃ constant en el temps (<60 µM i <120 µM, respectivament). Aquestes concentracions de (GlcNAc)₂ i (GlcNAc)₃ del blanc de reacció es tindran en compte a l'hora d'analitzar les mostres de reacció.

Amb totes les proves realitzades es conclou que el mètode és vàlid per a la caracterització de l'activitat hidrolasa de les quitinases, utilitzant (GlcNAc)₄ com a substrat.

Anàlisi dels resultats d'activitat enzimàtica

A causa de la complexitat de la reacció enzimàtica, el sistema d'anàlisi dels resultats adquireix alhora una elevada importància. A continuació s'exposa la reacció d'hidròlisi d'*SpChiD wt* i del mutant D151A com a exemple per a detallar el procediment d'anàlisi dels resultats.

L'assaig es basa en la determinació de l'activitat específica dels enzims esmentats, per al substrat (GlcNAc)₄. Les condicions de l'assaig es mostren a la Taula 2.8.

Taula 2.8. Condicions de l'assaig de determinació de l'activitat específica d'hidròlisi de quitinases GH18, (GlcNAc)₄ com a substrat.

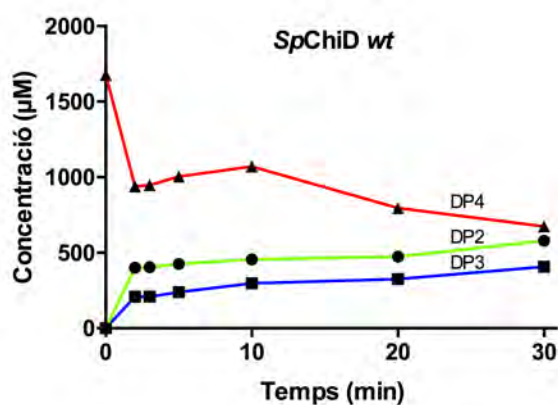
Substrat	[(GlcNAc) ₄] = 2 mM
Tampó	Fosfat 50 mM pH 7, 37°C
Enzim	[wt] = 0,02-1,5 μM [mutant]= 10-100 μM

Les reaccions es realitzen a la plataforma robòtica Bravo (*Agilent*).

Per a la determinació de la concentració de quitoooligòmers presents en la barreja de reacció s'utilitza com a factor de resposta la mitjana dels FR de les diferents injeccions de la mescla de patrons (injeccions 2 a 6), com s'ha justificat anteriorment.

La concentració de (GlcNAc)₄ inicial per a l'anàlisi de cadascuna de les activitats correspon a la mitjana de les concentracions del blanc de reacció (reacció sense enzim). Per al càlcul de la concentració de (GlcNAc)₂ i (GlcNAc)₃ presents en la mostra es resta la mitjana d'aquesta concentració del blanc de reacció, de tal manera que es considera que no hi ha presència de (GlcNAc)₂ i (GlcNAc)₃ inicialment en l'assaig.

La Figura 2.9 mostra el curs de reacció [(GlcNAc)_n] vs. temps) de l'assaig amb 875 nM d'*SpChiD wt*. Per a cada reacció s'observa dues tendències diferents, referents a la velocitat de reacció. Es detecta una disminució de la concentració de (GlcNAc)₄ inicial (entre els temps 0 i 2 minuts de reacció) i un canvi de velocitat del consum d'aquest a partir del segon minut de reacció. Per aquest motiu, per a calcular la V₀ (μM min⁻¹) es consideren dos pendents, i) pendent entre temps inicial (concentracions calculades a partir del blanc) i els dos minuts de reacció i, ii) pendent a partir dels 2 minuts de reacció.



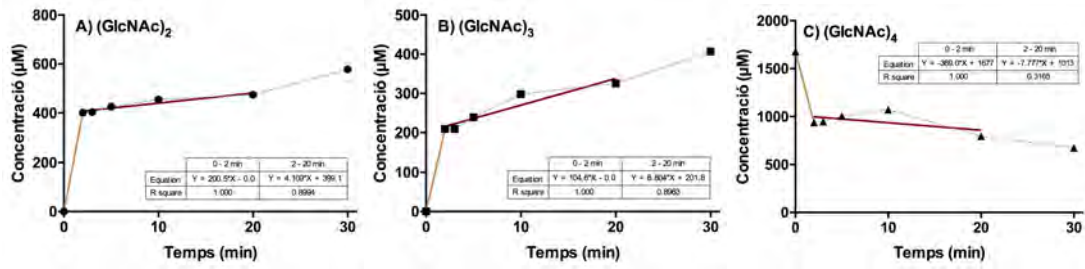


Figura 2.9. Curs de reacció de l'activitat hidrolasa d'*SpChiD wt*

Determinació de les velocitats dels dos comportaments de l'enzim per a la formació de (GlcNAc)₂ i (GlcNAc)₃ i consum de (GlcNAc)₄. Condicions de la reacció: [SpChiD wt] = 875 nM, [(GlcNAc)₄] = 2 mM, tampó fosfat 50 mM, pH 7, 37°C. DP_n=(GlcNAc)_n

Es realitza el mateix assaig a diferents concentracions d'enzim i s'ajusta la recta de la representació de V_0 ($\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$) enfront la concentració d'enzim emprada de tots els experiments d'un mateix lot d'enzim i s'obté l'activitat (min^{-1}) de consum de (GlcNAc)₄ i formació de (GlcNAc)₂ i (GlcNAc)₃, per a les dues V_0 determinades (Figura 2.10, Taula 2.9). La velocitat de (GlcNAc)₄, com que correspon a una velocitat de consum, s'expressarà en negatiu per a diferenciar-la de les velocitats de formació de (GlcNAc)₂ i (GlcNAc)₃.

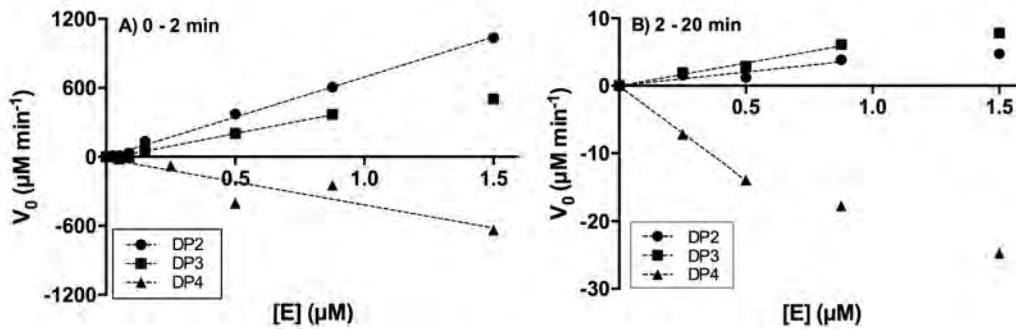


Figura 2.10. Determinació de l'activitat específica d'*SpChiD wt*

A) V_0 determinades entre els 0 i 2 minuts de reacció. B) V_0 determinades entre els 2 i 20 minuts de reacció. DP_n = (GlcNAc)_n

Taula 2.9. Velocitats específiques ($V_0/[E]$) per al lot 1 d'*SpChiD wt*

	Formació $V_0/[E]$ (min^{-1})		Consum $V_0/[E]$ (min^{-1})
	(GlcNAc) ₂	(GlcNAc) ₃	(GlcNAc) ₄
0 – 2 minuts	725,97	461,33	-407,57
2 – 20 minuts	4,16	7,04	-28,93

Es realitza el mateix assaig d'activitat per al mutant D151A. A la Figura 2.11 es mostra el curs de la reacció amb 50 μM d'enzim.

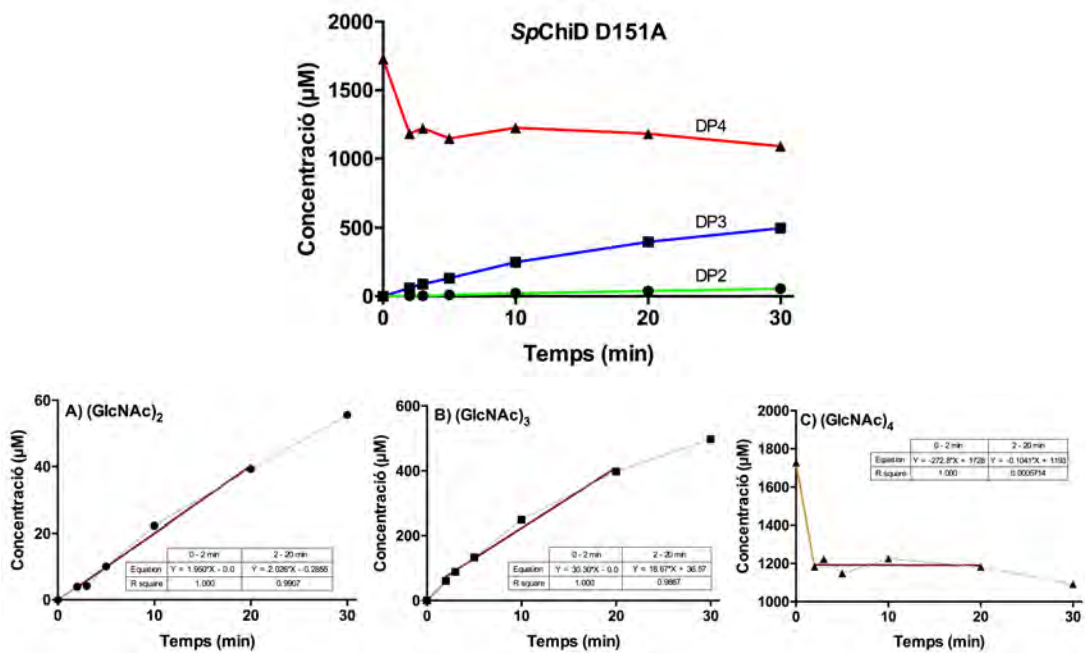


Figura 2.11. Curs de reacció de l'activitat hidrolasa d'*SpChiD* D151A
 Determinació de les velocitats dels dos comportaments de l'enzim per a la formació de $(\text{GlcNAc})_2$ i $(\text{GlcNAc})_3$ i consum de $(\text{GlcNAc})_4$. Condicions de la reacció: $[\text{SpChiD D151A}] = 50 \mu\text{M}$, $[(\text{GlcNAc})_4] = 2 \text{mM}$, tampò fosfat 50mM , pH 7, 37°C . $\text{DP}_n = (\text{GlcNAc})_n$

S'ajusta la recta V_0 vs. $[\text{E}]$ i es determina l'activitat del mutant D151A (Figura 2.12, Taula 2.10).

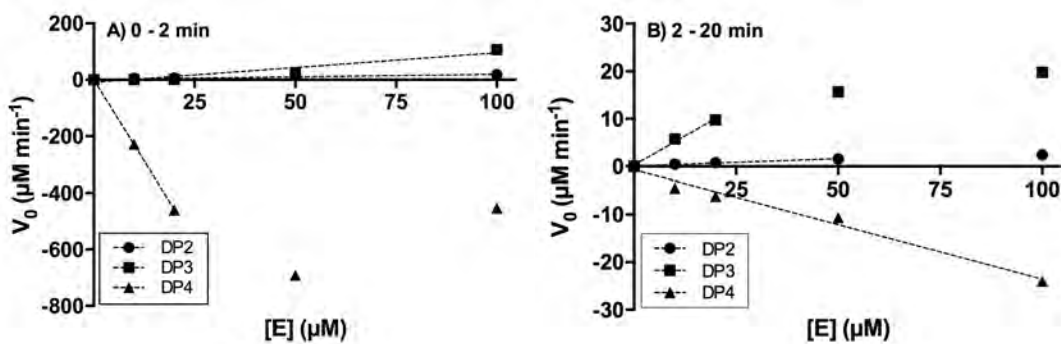


Figura 2.12. Determinació de les velocitats específiques d'*SpChiD* D151A
 A) V_0 determinades entre els 0 i 2 minuts de reacció. B) V_0 determinades entre els 2 i 20 minuts de reacció.
 $\text{DP}_n = (\text{GlcNAc})_n$

Taula 2.10. Velocitats específiques ($V_0/[\text{E}]$) per al lot 1 d'*SpChiD* D151A

	Formació $V_0/[\text{E}]$ (min^{-1})		Consum $V_0/[\text{E}]$ (min^{-1})
	$(\text{GlcNAc})_2$	$(\text{GlcNAc})_3$	$(\text{GlcNAc})_4$
0 – 2 minuts	0,17	1,11	-23,10
2 – 20 minuts	0,03	0,49	-0,23

Es determina l'activitat per a diferents lots d'enzim ($n \geq 3$) i es calcula la mitjana per a obtenir l'activitat específica ($V_0/[E]$) de l'enzim (Taula 2.11).

Taula 2.11. Taula resum de les velocitats específiques ($V_0/[E]$) per a *SpChiD*

	Formació ¹				Consum ¹	
	$V_0/[E]$ (min^{-1})				$V_0/[E]$ (min^{-1})	
	(GlcNAc) ₂		(GlcNAc) ₃		(GlcNAc) ₄	
	0 – 2 min	2 – 20 min	0 – 2 min	2 – 20 min	0 – 2 min	2 – 20 min
<i>SpChiD wt</i>	580 ± 170	8 ± 4	377 ± 90	8 ± 2	-460 ± 130	-27 ± 9
<i>SpChiD D151A</i>	0,23 ± 0,08	0,04 ± 0,03	1,2 ± 0,1	0,4 ± 0,1	-19,5 ± 5,1	-1,1 ± 0,5
D151A/wt	3,9 × 10⁻⁴	5,0 × 10⁻³	3,2 × 10⁻³	5,0 × 10⁻²	4,2 × 10⁻²	4,1 × 10⁻²

Condicions de reacció: 50 μM de substrat en Na_2HPO_4 50 mM pH 7. ¹Mitjana de 3 repeticions

Cal esmentar que el mètode presenta com a limitació el fet que no permet detectar el monosacàrid GlcNAc. Aquesta circumstància, juntament amb que les quitinases a analitzar poden presentar activitat transglicosidasa en les condicions d'assaig, dificulten el seguiment del balanç de matèria present en la reacció. El mètode permet quantificar la concentració de (GlcNAc)₂, (GlcNAc)₃ i (GlcNAc)₄ presents en la barreja de reacció, però no del monosacàrid ni dels possibles productes de TG formats amb $\text{DP} \geq 5$ (aquest últim cas a causa de l'absència de patrons comercials com a conseqüència de l'elevada insolubilitat de la quitina).

A mode de resum, a la Taula 2.12 es mostra els passos a seguir per a l'anàlisi de les dades d'activitat d'hidròlisi per HPLC-MS.

Taula 2.12. Passos per a la determinació de l'activitat hidrolasa de (GlcNAc)₄

1. Calcular V_0 per a cada experiment.

- Utilitzar com a factor de resposta la mitjana dels factors de resposta de les injeccions 2-6 dels patrons
- Considerar com a concentració inicial de (GlcNAc)₄ de la reacció la mitjana de les concentracions de (GlcNAc)₄ del blanc de reacció (sense enzim)
- Considerar la concentració de (GlcNAc)₂ i (GlcNAc)₃ present en el blanc de reacció en les mostres de reacció (es resta la [(GlcNAc)₂] i [(GlcNAc)₃] del blanc a les mostres de reacció, en tots els temps de reacció)
- Calcular les dues " V_0 " ($\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$): considerar el pendent entre els 0 i 2 minuts de reacció i el pendent a partir dels 2 minuts

2. Representar V_0 vs. $[E]$ dels diferents experiments del mateix lot i determinar $V_0/[E]$ (min^{-1}) del lot d'enzim.

3. Determinar l'activitat de l'enzim ($V_0/[E]$ (min^{-1})), corresponent a la mitjana de $V_0/[E]$ dels diferents lots d'enzim. Per a la comparació dels valors d'activitat s'utilitza la V_0 corresponent a la segona etapa.

Amb aquest mètode d'anàlisi es detecta un comportament bifàsic en la reacció d'hidròlisi de $(\text{GlcNAc})_4$, amb un "burst" inicial corresponent a una velocitat inicial molt ràpida, difícil de mesurar, que es considera un estat pre-estacionari, i una segona etapa on la velocitat és més constant, considerada l'estat estacionari. A causa de les dificultats de mesura de la velocitat inicial, que és molt ràpida principalment en les reaccions catalitzades pels enzims wt, tot i calcular ambdues velocitats (0-2 minuts, i de 2 a 20 minuts), per a la comparació d'activitat entre els diferents enzims s'utilitza la velocitat corresponent a l'estat estacionari.

Cal considerar però, que les quitinases presenten dues activitats diferents, que comparteixen el mateix mecanisme catalític, per tant, les concentracions de COS detectades poden provenir d'ambdues activitats (hidrolasa i de transglicosidació), el que dificulta la determinació de l'activitat específica de l'enzim amb substrats naturals. És a dir, els productes d'hidròlisi formats poden ser alhora substrat per l'enzim donant lloc altra vegada a la formació de $(\text{GlcNAc})_4$, o a productes de TG més llargs, que no es detecten per aquest mètode d'anàlisi, que alhora també són substrat de l'enzim i tornen a donar lloc a la formació de $(\text{GlcNAc})_2$ i $(\text{GlcNAc})_3$, entre d'altres.

Tot i així, no és objecte de la tesi la caracterització enzimàtica de l'activitat hidrolasa de les diferents quitinases, sinó la comprovació/confirmació de l'efecte de la substitució del residu assistent sobre aquesta.

2.2. Activitat glicosintasa

Un cop analitzada l'activitat hidrolasa de l'enzim, s'estudia si els mutants dissenyats presenten activitat glicosintasa, és a dir, si tenen la capacitat de formar un enllaç glicosídic entre un donador activat (donador oxazolina) i un substrat acceptor.

Amb l'objectiu d'identificar els mutants que disposen d'aquesta activitat glicosintasa, es plantegen dos mètodes d'anàlisi diferents basats en i) una reacció de condensació donador-acceptor i, ii) una reacció d'auto-condensació d'un donador.

Prèviament al desenvolupament dels mètodes d'anàlisi se sintetitzen els derivats oxazolina que s'utilitzaran com a donadors en els diferents assajos.

2.2.1. Síntesi d'oxazoles

Es troben descrits diferents mètodes per a la preparació de derivats oxazolina però tots ells consten de procediments en diverses etapes que inclouen la protecció i desprotecció dels grups -OH, així com la introducció selectiva d'un grup apropiat al centre anomèric, el que converteix la síntesi de la oxazolina en un procés laboriós. A més, aquests processos requereixen l'ús de solvents orgànics, àcids i bases fortes. L'any 2009, Noguchi *et al.* van desenvolupar un procés de síntesi de derivats oxazolina de sucres *N*-acetil-2-amino no protegits, en un únic pas i en H_2O , mitjançant la utilització del compost clorur de 2-clor-1,2-dimetil-1*H*-imidazoline-3-oni (DMC) com a agent condensador deshidratant soluble en H_2O

(Noguchi *et al.*, 2009). Tot i la gran simplificació del procés de síntesi de derivats oxazolina mitjançant la utilització d'aquest reactiu, alguns desavantatges són la dificultat en el maneig d'aquest, degut a la gran inestabilitat i l'elevada higroscopicitat i, el difícil control de la reactivitat d'aquest, ja que el DMC es descompon en presència d'H₂O donant lloc al producte d'hidròlisi 1,3-dimetil-2-imidazolidine-2-ona (DMI). Amb l'objectiu de solucionar aquests problemes, l'estructura del DMC es va modificar mitjançant la introducció d'un anell benzè donant lloc al compost clorur de 2-clor-1,3-dimetil-1*H*-benzimidazole-3-ona (CDMBI). La utilització d'aquest compost estabilitza l'intermediari reactiu de la síntesi (Noguchi *et al.*, 2012).

La síntesi dels derivats oxazolina utilitzats en aquesta tesi s'ha realitzat mitjançant la utilització del compost CDMBI com a agent condensador deshidratant. La utilització d'aquest compost, a causa de l'existència de l'anell benzè, disminueix la solubilitat del producte format 1,3-dimetil-1*H*-benzimidazole-2-ona (DMBI) i facilita l'eliminació d'aquest per filtració.

2.2.1.1. Síntesi d'oxazolines de COS de quitina

Síntesi del derivat oxazolina de diacetilquitobiosa ((GlcNAc)₂-ox)

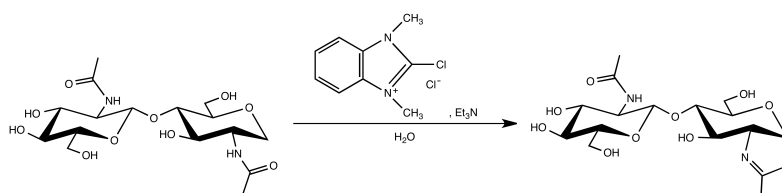


Figura 2.13. Síntesi de (GlcNAc)₂-ox mitjançant la utilització de CDMBI

Per a la síntesi de (GlcNAc)₂-ox (Figura 2.13) es dissol (GlcNAc)₂ en 1 M de Et₃N en D₂O i s'afegeix el CDMBI, s'agita la reacció durant 1 h a 0°C. Seguidament s'elimina el precipitat de DMBI format per filtració i l'excés de Et₃N per destil·lació a pressió reduïda. S'incuba la mescla de reacció amb una resina d'intercanvi aniònic (Amberlyst A21) durant 1 hora per a eliminar les sals de clorur de trietilamoní formades durant la reacció. Finalment el producte es liofil·litza i s'analitza per ¹H-RMN (Figura 2.14).

L'espectre d'RMN mostra un desplaçament de la senyal del protó anomèric de 4,6 ppm corresponent a la senyal de la diacetilquitobiosa a 6,1 ppm, senyal corresponent a l'oxazolina. S'obté un rendiment en pes >100%, a causa de la presència de sals de Et₃N en la mostra.

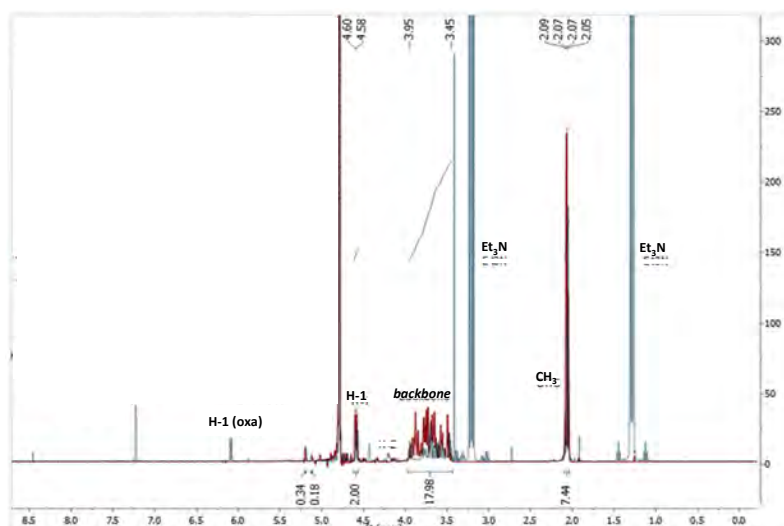


Figura 2.14. Espectre d¹H-RMN de la síntesi de (GlcNAc)₂-ox. En vermell (GlcNAc)₂, en blau (GlcNAc)₂-ox.

Síntesi química del derivat oxazolina de pentaacetilquitopentaosa ((GlcNAc)₅-ox)

La síntesi química del derivat oxazolina de pentaacetilquitopentaosa, (GlcNAc)₅-ox, ha estat duta a terme en col·laboració amb la companyia Enantia SL (Figura 2.15).

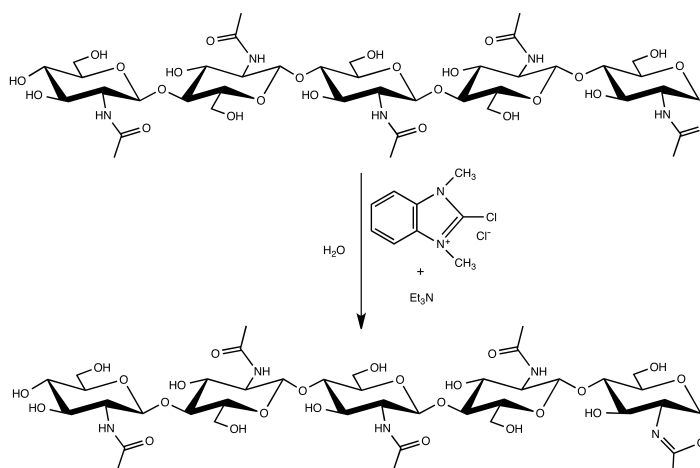


Figura 2.15. Síntesi de (GlcNAc)₅-ox mitjançant la utilització de CDMBI

Per a la síntesi també s'utilitza CDMBI com a agent condensador deshidratant però s'optimitza el protocol variant les condicions de reacció: s'ha variat el volum de reacció i s'han modificat els equivalents dels reactius amb l'objectiu d'assolir conversions pràcticament totals. Com a base de reacció s'ha provat la utilització de K₃PO₄ i Et₃N. Primerament es va utilitzar K₃PO₄, però a causa de l'elevada quantitat de salts presents en el cru de reacció (aproximadament el 70% en pes) es va obtenir una baixa quantitat d'oxazolina pura (100 mg cru/500 mg cartutx PGC). Alternativament, s'ha utilitzat Et₃N com a base, permetent el procés de dessalat per filtració utilitzant una reïna bàsica d'intercanvi iònic (Amberlyst A-21). Les salts de trietilamina són convertides en trietilamina volàtil, que s'elimina posteriorment en el procés de liofilització. Mitjançant la utilització de CDMBI i

Et₃N en medi aquós s'ha obtingut un rendiment del 78% (128 mg d'oxazolina/165 mg de (GlcNAc)₅ inicial). Tot i eliminar les sals, la mostra conté aproximadament un 3% (p/p) de clorur de trietilamoni, calculat a partir de l'anàlisi per ¹H-RMN (Figura 2.16A).

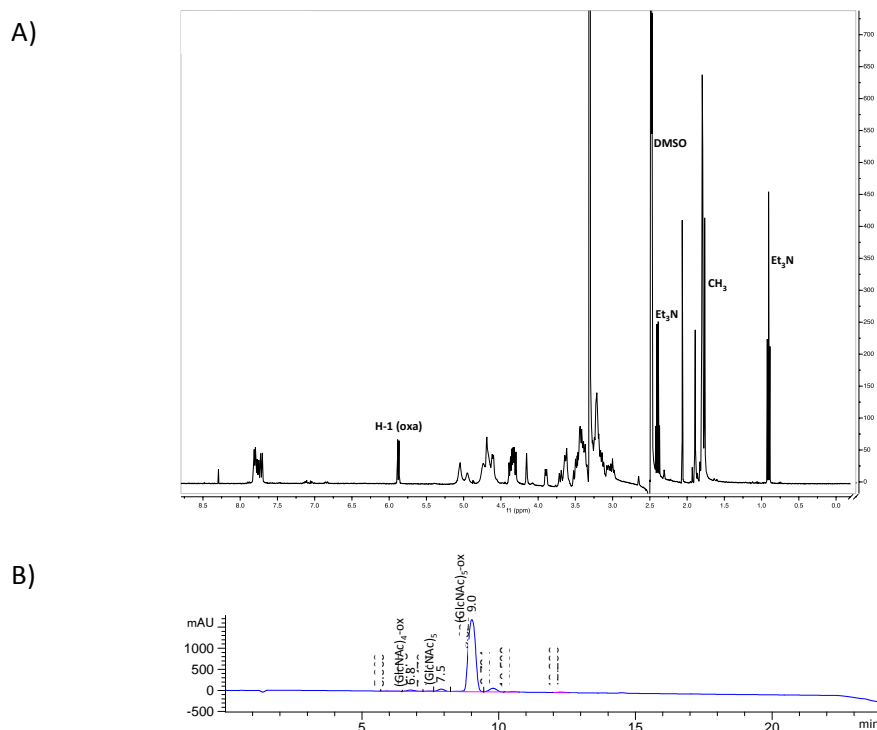


Figura 2.16. Anàlisi del producte de síntesi del derivat oxazolina de pentaacetilquitopentaosa. A) Espectre ¹H-RMN, B) Cromatograma d'HPLC-MS

L'anàlisi per HPLC-MS (Figura 2.16B) revela una puresa del 89% en (GlcNAc)₅-ox, i la presència també d'un 1,4% de (GlcNAc)₄-ox. Ambdues anàlisis, HPLC-MS i ¹H-RMN (5,95 ppm), confirmen la presència del derivat oxazolina.

2.2.1.2. Síntesi d'oxazolines de COS parcialment desacetilats

Previ a la síntesi de la oxazolina, es preparen (GlcNAc)₅ i (GlcNAc)₃ monodesacetilats en la segona unitat des de l'extrem no-reductor per desacetilació dels COS mitjançant la desacetilasa de *Vibrio cholerae* (VcCDA), caracteritzada en el Laboratori de Bioquímica d'IQS (Andrés *et al.*, 2014), que desacetila específicament el segon residu des de l'extrem no-reductor.

L'expressió de l'enzim es realitza mitjançant el mètode d'autoinducció, en cèl·lules d'*E.coli* BL21(DE3)star transformades amb un plasmidi pET22b que conté el gen codificant pel domini catalític de VcCDA en marc de lectura amb una cua *Strep-Tag II*. La proteïna es purifica mitjançant cromatografia d'afinitat amb una columna *Strep-Trap* seguint el protocol del fabricant (GE Healthcare), però es realitza 6 cicles de càrrega-elució-regeneració (Figura 2.17) a causa de l'elevat volum de lisat de proteïna.

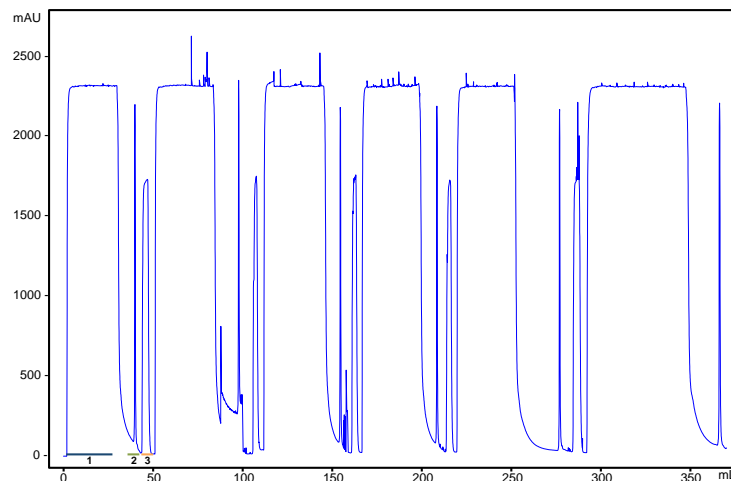


Figura 2.17. Cromatograma de purificació *Strep-Trap* del domini catalític de VcCDA
Cromatograma resultant de la purificació per cromatografia d'afinitat de VcCDA en la que s'ha realitzat 6 càrregues de columna. Els números indiquen les etapes del cicle de càrrega/elució. 1: Càrrega; 2: Elució; 3: Regeneració amb HABA. Entre cadascuna de les etapes hi ha una etapa de rentat.

Es coneix que VcCDA s'expressa en diferents formes oligomèriques, d'entre les quals només són actives el dímer i el monòmer, essent aquest últim el més actiu. Per aquest motiu, el protocol de purificació establert consta d'una segona etapa de purificació per cromatografia de gel-filtració. Com que l'objectiu final és la desacetilació total de $(\text{GlcNAc})_5$ i $(\text{GlcNAc})_3$, i no la caracterització de l'enzim, se suprimeix aquesta segona etapa de purificació. El gel d' SDS-PAGE (Figura 2.18) revela la puresa de la proteïna obtinguda, amb un pes molecular aproximat de 36 kDa, que correspon al pes molecular teòric calculat d'aquesta en funció de la seqüència de proteïna (35,9 kDa).



Figura 2.18. SDS-PAGE del domini catalític de VcCDA
Gel SDS-PAGE del procés de purificació de VcCDA. M: *Marker Low Range*, FI: Fracció insoluble després del procés de lisi cel·lular, FS: Fracció soluble després del procés de lisi cel·lular, FT1-FT6: *Flow through* de la columna, E1-E6: Elucions de la proteïna.

Desacetilació de (GlcNAc)₅ i síntesi d'ADAAA-ox

El procediment d'obtenció de (GlcNAc)₅ monodesacetilat (ADAAA) consisteix en una primera reacció de desacetilació en la que s'incuba (GlcNAc)₅ amb VcCDA en tampó Na₂HPO₄ 50 mM pH 8,5 a 37°C fins a la desacetilació completa, que succeeix al cap de 48 hores de reacció (Figura 2.19) i s'elimina l'enzim mitjançant la columna d'afinitat *Strep-Trap* (GE Healthcare).

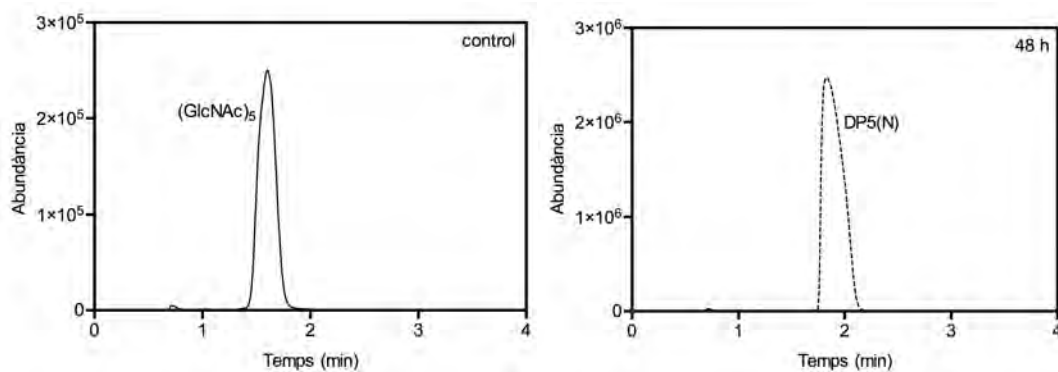
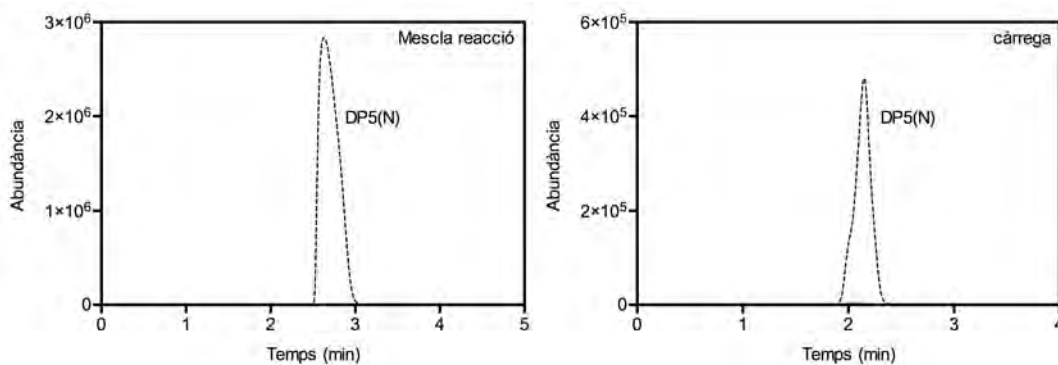


Figura 2.19. Cromatograma d'HPLC-MS de la reacció de desacetilació de (GlcNAc)₅ amb VcCDA. Cromatograma control de (GlcNAc)₅ i a 48 h de reacció de desacetilació de (GlcNAc)₅ amb VcCDA. Cromatogrames de (GlcNAc)₅ i DP5(N) obtinguts pel mètode d'HPLC per a la separació de quitoooligosacàrids de quitosà un cop desacetilats per VcCDA. *m/z* dels adductes [M+H]⁺ de (GlcNAc)₅ (*m/z*=1035) i DP5(N) (*m/z*=993).

Seguidament s'utilitza una reïna d'intercanvi catiònic DOWEX 50WX8-200 per a purificar el producte monodesacetilat de salts i possible (GlcNAc)₅ restant i s'elueix el producte d'interès amb un gradient d'NH₃ (el producte comença a eluir a partir del 3% d'NH₃). En aquesta etapa es perd una gran quantitat de producte monodesacetilat que no queda retengut, obtenint un rendiment final de producte desacetilat ADAAA del 44% (Figura 2.20). Es col·lecten les diferents fraccions, s'evapora el NH₃ i es liofilitza el producte.



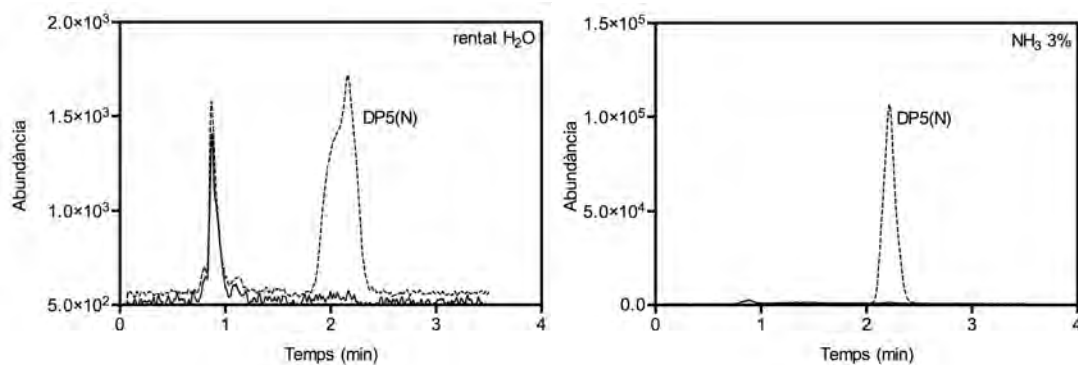


Figura 2.20. Cromatogrames d'HPLC-MS del procés de purificació de DP5(N)
Cromatogrames de les diferents etapes de purificació amb la resina DOWEX 50W8-200 (producte inicial, càrrega, rentat, elució amb NH_3 3%. m/z dels adductes $[\text{M}+\text{H}]^+$ de $(\text{GlcNAc})_5$ ($m/z=1035$) i DP5(N) ($m/z=993$).

La síntesi d'oxazolina es realitza en col·laboració amb Enantia SL. S'utilitza el mateix protocol que per a la síntesi de $(\text{GlcNAc})_5\text{-ox}$, en el que s'utilitza Et_3N com a base i el compost CDMBI com a agent condensador deshidratant, i s'elimina les sals mitjançant una reïna bàsica d'intercanvi iònic (Amberlyst A-21) (Figura 2.21).

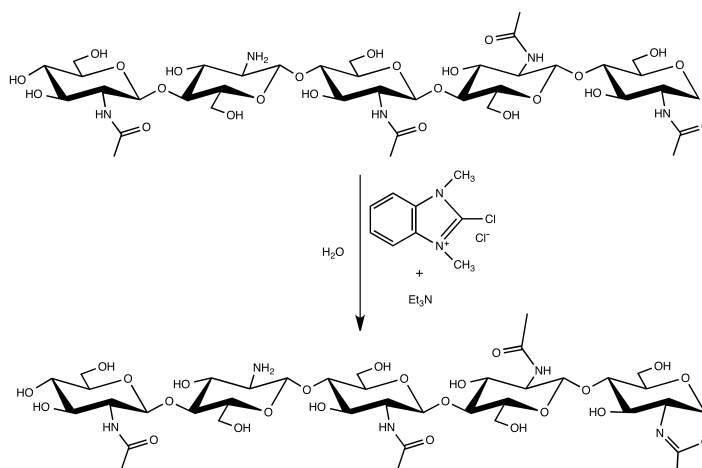


Figura 2.21. Síntesi d'ADAAA-ox mitjançant la utilització de CDMBI

S'ha obtingut un rendiment (p/p) en ADAAA-ox del 82%. Tot i eliminar les sals, la mostra conté aproximadament un 8% (p/p) de clorur de trietilamoni, calculat a partir de l'anàlisi per $^1\text{H-RMN}$ (Figura 2.22A).

L'anàlisi per HPLC-MS (Figura 2.22B) revela una puresa del 75% en ADAAA-ox, i la presència d'un 20% d'un compost no determinat amb una relació $m/z = 990$. Ambdues anàlisis, HPLC-MS i $^1\text{H-RMN}$ (5,95 ppm), confirmen la presència del derivat oxazolina.

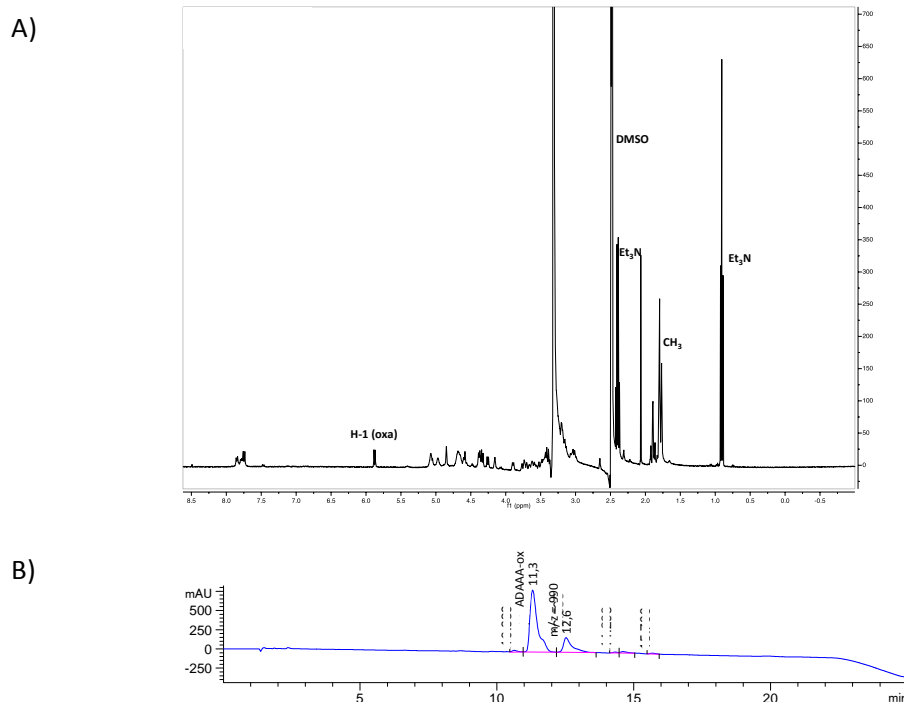


Figura 2.22. Anàlisi del producte de síntesi del derivat oxazolina d'ADAAA.

A) Espectre ¹H-RMN, B) Cromatograma d'HPLC-MS

Desacetilació de (GlcNAc)₃ i síntesi d'ADA-ox

Per a la reacció de desacetilació de (GlcNAc)₃, i després de veure en el cas anterior la pèrdua de producte monodesacetilat DP5(N) en el procés de purificació amb la reina DOWEX 50WX8-200, s'ha decidit eliminar aquesta etapa, i per aquest motiu, un cop purificada la proteïna VcCDA es realitza un canvi de tampó a bicarbonat amoni 25 mM pH 8,5 per a disminuir la presència de salts en la reacció de desacetilació. Prèviament a la reacció de desacetilació preparativa es comprova que VcCDA manté l'activitat amb aquest tampó.

Es realitza 3 reaccions de desacetilació preparatives en les que s'incuba l'enzim VcCDA amb (GlcNAc)₃ en 50 mM NH₄HCO₃ pH 8,5, a 37°C en agitació. Al cap de 2 hores de reacció es torna a afegir enzim a cadascuna de les reaccions i s'incuben fins a una conversió total de (GlcNAc)₃ a ADA, que s'observa al cap de 48 hores. El seguiment de la reacció es realitza per HPLC-MS (Figura 2.23). Un cop finalitzada la reacció es procedeix a l'eliminació de la proteïna mitjançant la columna d'afinitat *Strep-Trap* (GE Healthcare), s'ajunta el producte de les 3 reaccions, es comprova la presència d'ADA per TLC, i es liofilitza el producte abans de la síntesi d'oxazolina.

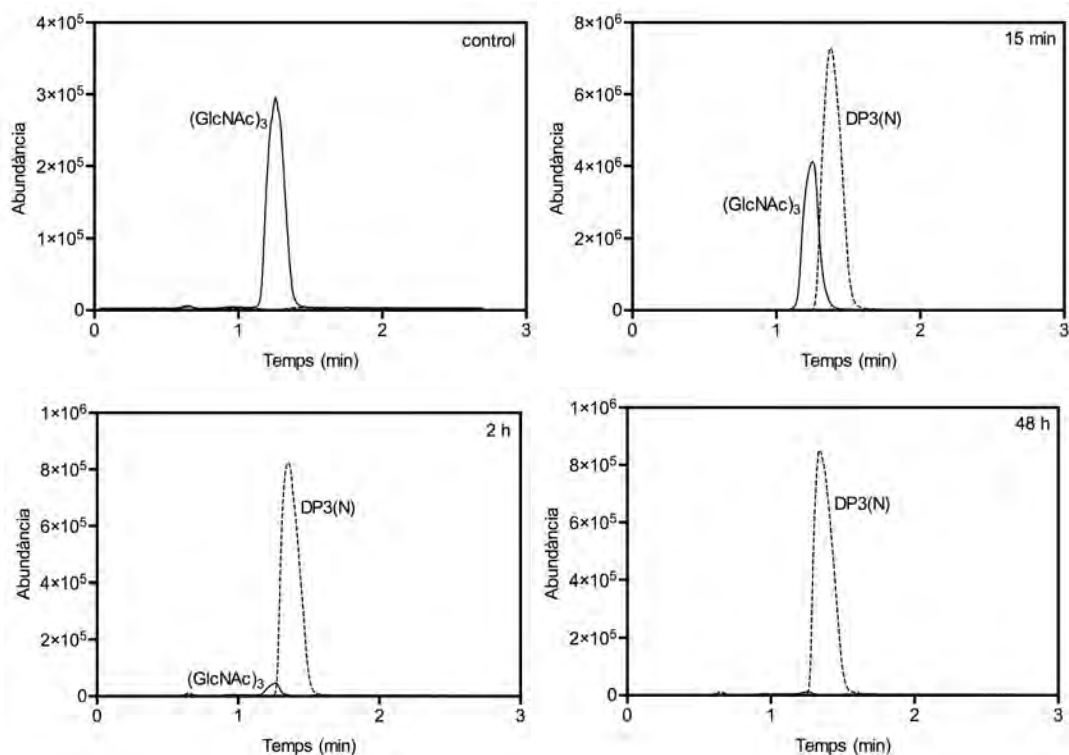


Figura 2.23. Cromatogrames d'HPLC-MS de la reacció de desacetilació de $(\text{GlcNAc})_3$ amb VcCDA. Cromatogrames de diferents temps de reacció (15 min, 2 h i 48 h) de la desacetilació de $(\text{GlcNAc})_3$ amb VcCDA, obtinguts pel mètode d'HPLC per a la separació de quitoooligosacàrids de quitosà un cop desacetilat per VcCDA. m/z dels adductes $[\text{M}+\text{H}]^+$ de $(\text{GlcNAc})_3$ ($m/z=629$) i DP3(N) ($m/z=587$).

Per a la síntesi d'oxazolina (Figura 2.24) s'adapta el protocol modificat per Enantia SL.

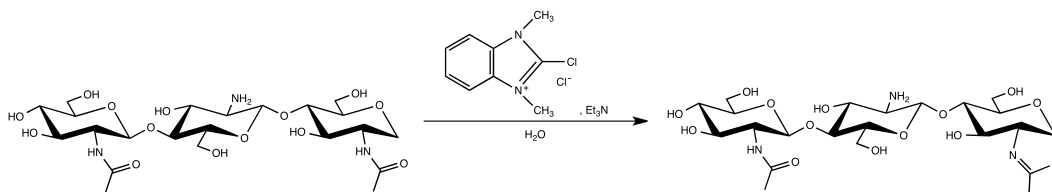
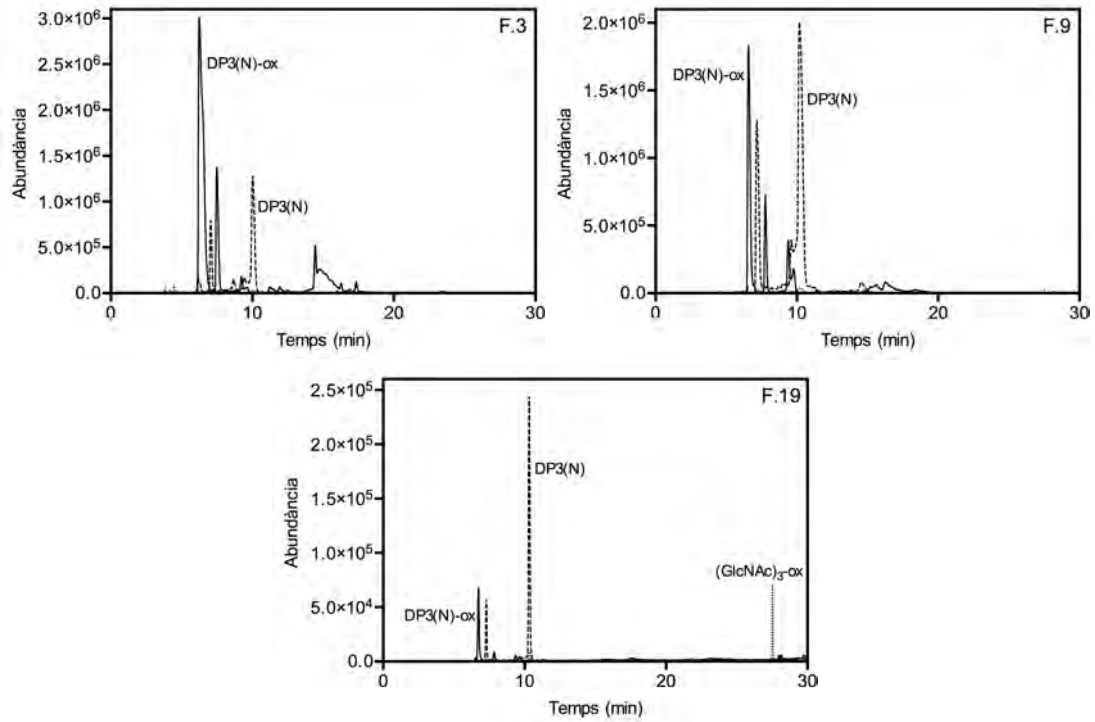


Figura 2.24. Síntesi d'ADA-ox mitjançant la utilització de CDMBI

Les diferents fraccions col·lectades de producte es liofilitzen i s'analitzen per HPLC-MS (Figura 2.25). L'anàlisi de les fraccions 3-9 revela la presència d'ADA-ox ($m/z=568$) però també de producte no activat ADA ($m/z=586$). A partir de la fracció 19 també es detecta un pic amb m/z corresponent a $(\text{GlcNAc})_3$ -ox, el que suggereix que en la mostra de partida utilitzada per a la síntesi d'oxazolina hi ha un romanent de $(\text{GlcNAc})_3$ no desacetilat en la reacció amb VcCDA.

A)



B)

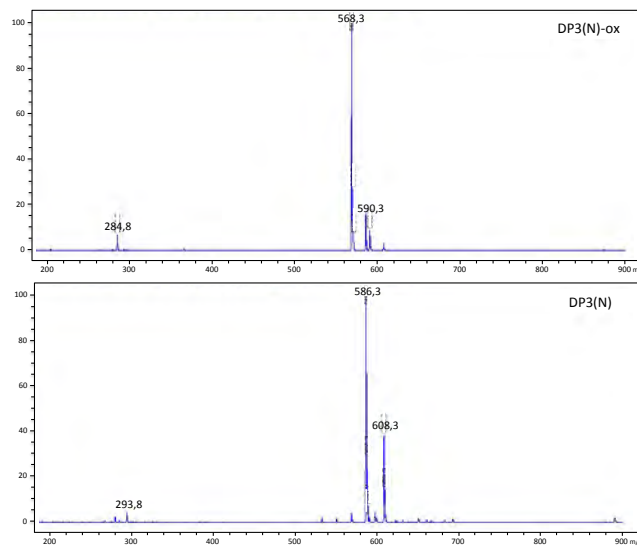


Figura 2.25. Cromatogrames d'HPLC-MS de la reacció de síntesi d'ADA-ox

A) Cromatogrames de diferents fraccions de la reacció de síntesi en els que se segueix les m/z de DP3(N)-ox, DP3(N) i (GlcNAc)₃-ox. B) Espectres iònics de DP3(N)-ox i DP3(N) obtinguts en la fracció 3 (F3). $m/z=285$ [DP3(N)-ox + 2H]²⁺; $m/z=569$ [DP3(N)-ox + H]⁺; $m/z=591$ [DP3(N)-ox + Na]⁺; $m/z=294$ [DP3(N) + 2H]²⁺; $m/z=587$ [DP3(N) + H]⁺; $m/z=609$ [DP3(N) + Na]⁺.

2.2.1.3. Estabilitat de les oxazolines

Anteriorment en el Laboratori de Bioquímica s'ha estudiat l'estabilitat de l'oxazolina utilitzant el derivat oxazolina d'*N*-acetilglucosamina, com a model (Val-Cid, 2016). Es va monitoritzar per ^1H -RMN la hidròlisi de GlcNAc-ox en tampó citrat-fosfat 50 mM amb un 10% de D_2O en un interval de pH d'entre 3,5 i 9, en que es van integrar les senyals a 5,95 ppm ($J= 7,4\text{Hz}$, H-C1 de l'oxazolina), 5,05 ppm ($J= 3,7\text{ Hz}$, H-C1 de l' α -GlcNAc) i 4,50 ppm ($J= 8,9\text{ Hz}$, H-C1 β -GlcNAc). Es van representar les velocitats d'hidròlisi de l'interval de pHs entre 4,5 i 8 (Figura 2.26) i es va calcular un pKa aparent de 5,4. La oxazolina mostra una estabilitat reduïda a pHs àcids essent hidrolitzada espontàniament, mentre que a pHs superiors a 6,5 es manté estable durant les 20 hores de l'anàlisi. Per aquest motiu, les activitats glicosintasa assajades en aquest treball s'han realitzat a pH 7, en que l'oxazolina és estable.

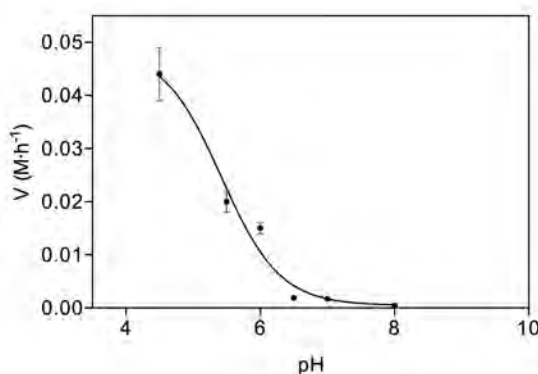


Figura 2.26. Estabilitat del donador oxazolina a diferents valors de pH

2.2.2. Intent de desenvolupament d'un mètode de cribratge en placa

Primerament, per a avaluar els diferents mutants glicosintasa, s'ha decidit desenvolupar un mètode de cribratge en placa per a l'anàlisi en massa dels diferents mutants.

El mètode es basa en un assaig enzimàtic acoblat compost per dues reaccions (Figura 2.27). En la primera reacció, s'utilitza el derivat oxazolina de diacetilquitobiosa com a donador, i GlcNAc-MU com a acceptor per a la reacció glicosintasa. Un mutant glicosintasa actiu ha de ser capaç de formar el producte $(\text{GlcNAc})_3\text{-MU}$, com a producte de la condensació donador-acceptor. El producte d'aquesta primera reacció és substrat de la segona, on una endoquitinasa alliberarà l'aglicó fluorogènic del substrat (però no del GlcNAc-MU inicial) donant lloc a $(\text{GlcNAc})_3$.

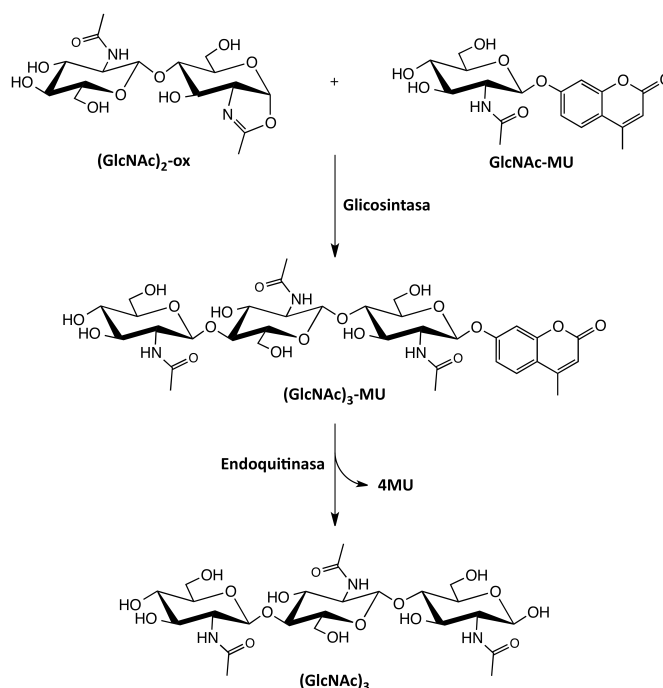


Figura 2.27. Esquema de l'assaig acoblat de cribratge en placa per a la detecció de mutants glicosintasa

El primer pas del desenvolupament de l'assaig s'ha basat en la cerca d'una quitinasa per a la segona reacció, capaç d'hidrolitzar el grup 4-MU del trisacàrid (GlcNAc)₃-MU però no de GlcNAc-MU, utilitzat com acceptor de la primera reacció de l'assaig.

S'ha escollit la quitinasa comercial d'*Streptomyces griseus* que és capaç d'hidrolitzar (GlcNAc)₃-pNP, alliberant -pNP, però no GlcNAc-pNP (Frederiksen *et al.*, 2015).

Amb l'objectiu de comprovar l'activitat de la quitinasa d'*S. griseus*, s'han realitzat dues reaccions, una amb GlcNAc-MU i l'altra amb (GlcNAc)₃-MU. S'ha utilitzat una concentració de substrat de 50 μM dissolt en tampó fosfat 50 mM pH 6 i una concentració d'enzim de 42 μg·mL⁻¹. La reacció s'ha dut a terme a 30°C, i s'ha monitoritzat l'alliberament del grup fluorogènic durant 40 minuts (Figura 2.28).

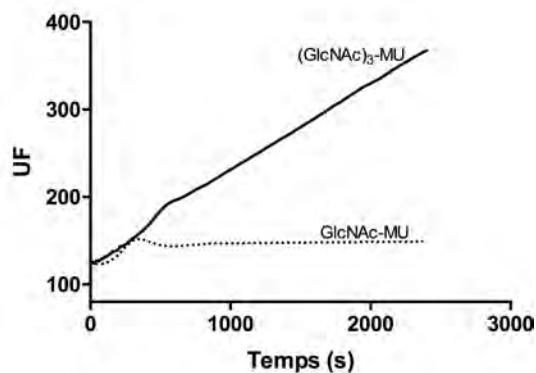


Figura 2.28. Activitat d'hidròlisi de la quitinasa d'*S. griseus*

Condicions de la reacció: [Quitinasa] = 42 μg·mL⁻¹, [Substrat] = 50 μM, tampó fosfat 50 mM, pH 7, 30°C.

Els resultats confirmen la capacitat de l'enzim d'hidrolitzar el grup fluorogènic del trisacàrid però no del monosacàrid. Aquests resultats confirmen la possibilitat d'utilitzar la quitinasa d'*S. griseus* en la segona reacció de l'assaig enzimàtic acoblat.

Un cop seleccionada la quitinasa per a la segona reacció, es procedeix a comprovar la funcionalitat de l'assaig. L'assaig es realitza en microplaca, mitjançant la plataforma robòtica Bravo (*Agilent*). Per a la reacció glicosintasa s'utilitza la quitinasa A de *Bacillus circulans* a una concentració de 100 nM. *BcChiA* és una de les quitinases seleccionades en aquesta tesi per a l'aplicació de l'estratègia glicosintasa per mutació del residu assistent. L'expressió i caracterització de l'enzim *wt* i del mutant D202A es presenten en el capítol 3.

Es mescla (GlcNAc)₂-ox amb un excés d'acceptor GlcNAc-MU (relació 1:5), per a evitar l'autocondensació del donador, en tampó fosfat 50 mM pH 7 i s'afegeix la quitinasa amb activitat de TG (*BcChiA* per a aquest primer assaig). Al cap d'una hora de reacció s'afegeix la quitinasa d'*S. griseus* i s'incuba la reacció a 30°C. Finalitzat el temps d'incubació, s'atura la reacció mitjançant una dilució 1:9 en una solució de glicina 0,3 M pH 10,3 i es llegeix la fluorescència (λexcitació 360 nm, λemissió 460 nm). De la mateixa manera, es realitza una reacció en la que no s'afegeix la quitinasa d'*S. griseus* i una en la que no s'afegeix la quitinasa de *B. circulans*.

Taula 2.13. Reaccions de comprovació de l'assaig acoblat

	1	2	3	4	5	6
GlcNAc-MU	2,5 mM	2,5 mM	2,5 mM	2,5 mM	2,5 mM	2,5 mM
(GlcNAc)₂-ox	0,5 mM	0,5 mM	0,5 mM	-	-	0,5 mM
GS	<i>BcChiA wt</i> 100 nM	<i>BcChiA wt</i> 100 nM	-	<i>BcChiA wt</i> 100 nM	-	-
Quitinasa <i>S. griseus</i>	40 µg·mL ⁻¹	-	40 µg·mL ⁻¹	-	40 µg·mL ⁻¹	-
UF	3210	3330	310	10	24	7

Els resultats d'aquesta primera prova de l'assaig (Taula 2.13) mostren com la quitinasa de *B. circulans* és capaç de formar l'enllaç glicosídic entre (GlcNAc)₂-ox i GlcNAc-MU, donant lloc a (GlcNAc)₃-MU, però a l'hora és capaç d'hidrolitzar-lo alliberant 4-MU. Per altra banda, la quitinasa d'*S. griseus* té activitat transglicosidasa utilitzant (GlcNAc)₂-ox com a donador. Per tant, per a la optimització de l'assaig, s'ha d'eliminar la oxazolina que no ha reaccionat abans de que es doni la segona reacció.

Per tal d'eliminar la oxazolina, es va pensar en utilitzar azida de sodi (NaN₃), per a formar la glicosil-azida. Amb la voluntat d'afegir NaN₃ un cop finalitzat el temps d'incubació de la reacció glicosintasa, i seguidament afegir la quitinasa d'*S. griseus*, primerament es comprova l'efecte de l'azida sobre aquest enzim.

Es realitza dues reaccions en les que s'utilitza 50 µM de (GlcNAc)₃-MU com a substrat i 40 µg·mL⁻¹ d'enzim, dissolts en tampó fosfat 50 mM pH 7. En una de les reaccions s'afegeix 360 mM d'NaN₃. Es monitoritza l'increment de fluorescència com a conseqüència de

l'alliberació de 4-MU (Figura 2.29). S'observa una inhibició parcial de l'activitat d'hidròlisi de la quitinasa d'*S. griseus* en la reacció amb NaN_3 .

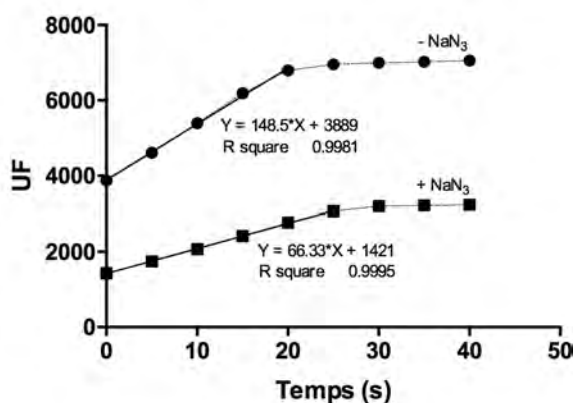


Figura 2.29. Efecte de NaN_3 sobre l'activitat d'hidròlisi de $(\text{GlcNAc})_3\text{-MU}$ de la quitinasa d'*S. griseus*. Condicions de la reacció: [Quitinasa d'*S. griseus*] = $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, [$(\text{GlcNAc})_3\text{-MU}$] = $50 \mu\text{M}$, tampó fosfat 50 mM , pH 7, 30°C .

En paral·lel es realitza el mateix assaig en discontinu, i en microplaca. Els resultats mostren una inhibició parcial de la quitinasa d'*S. griseus* al cap de 5 minuts de reacció, però a temps d'incubació més llargs aquesta diferència és pràcticament inexistent (Figura 2.30). Per tant, els resultats suggereixen que la presència d' NaN_3 no tindria un efecte negatiu en l'acció de la quitinasa d'*S. griseus* en l'assaig acoblat.

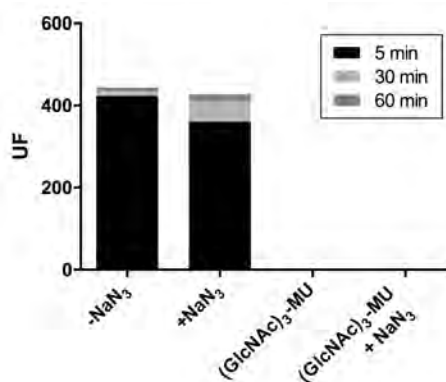


Figura 2.30. Efecte de NaN_3 sobre l'activitat d'hidròlisi de $(\text{GlcNAc})_3\text{-MU}$ de la quitinasa d'*S. griseus*, assaig en microplaca. Condicions de la reacció: [Quitinasa d'*S. griseus*] = $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, [$(\text{GlcNAc})_3\text{-MU}$] = $50 \mu\text{M}$, Na_2HPO_4 50 mM , pH 7, 30°C .

Per altra banda, s'ha analitzat per $^1\text{H-RMN}$ una mostra de $(\text{GlcNAc})_2\text{-ox}$ tractada amb 360 mM d' NaN_3 . Els resultats de l'RMN de protó (Figura 2.31) mostren el senyal corresponent al protó anomèric de la oxazolina ($6,3 \text{ ppm}$), indicant la presència de $(\text{GlcNAc})_2\text{-ox}$ no hidrolitzada en la mostra.

L'addició de NaN_3 en l'assaig no és suficient per a hidrolitzar l'oxazolina completament, per tant, la quitinasa d'*S. griseus* no només hidrolitzarà el $(\text{GlcNAc})_3\text{-MU}$ format pel mutant

glucosintasa sinó que també tindrà lloc la reacció de transglucosidació entre el donador oxazolina restant i l'acceptor.

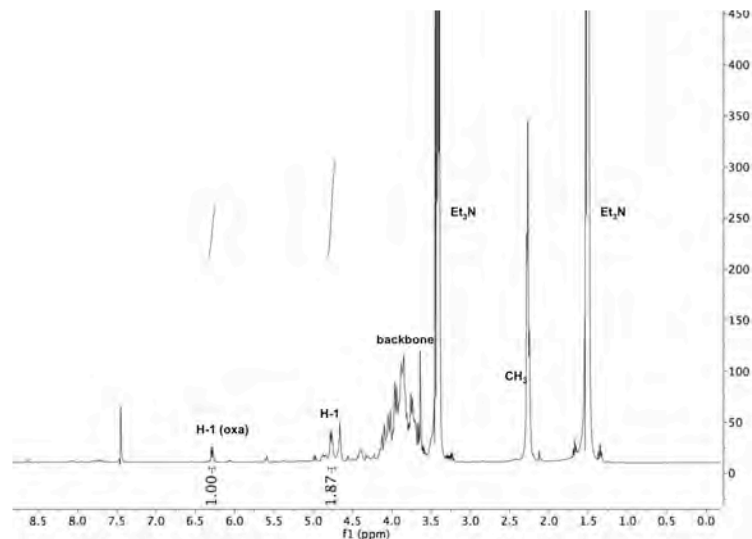


Figura 2.31. Espectre d'RMN de $(\text{GlcNAc})_2\text{-ox}$ tractada amb 360 mM d' NaN_3 durant 24 hores

Com a conseqüència dels resultats obtinguts, no es continua amb la optimització de l'assaig acoblat per al cribratge en massa i s'analitza l'activitat glucosintasa dels enzims seleccionats a partir de reaccions de polimerització.

2.2.3. Reacció de polimerització: anàlisi per MALDI-TOF-MS

Finalment es decideix analitzar l'activitat glucosintasa dels mutants de les diferents quitinases seleccionades per MALDI-TOF-MS.

L'assaig es fonamenta en el seguiment d'una reacció d'auto-condensació del derivat oxazolina de pentaacetilquitopentaosa, $(\text{GlcNAc})_5\text{-ox}$ com a donador activat (Figura 2.32).

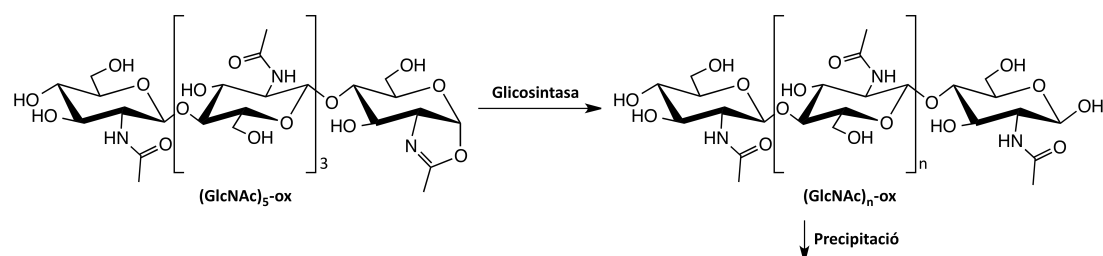


Figura 2.32. Esquema de la reacció d'auto-condensació de $(\text{GlcNAc})_5\text{-ox}$

Per a la reacció de polimerització s'incuba una elevada concentració de donador amb l'enzim i es realitza el seguiment de la formació d'un precipitat, com a conseqüència de la insolubilitat dels polímers de quitina formats. El precipitat format és aïllat per centrifugació i analitzat per MALDI-TOF-MS. Les condicions de l'assaig es mostren a la Taula 2.14.

Taula 2.14. Condicions de l'assaig d'activitat glicosintasa

Donador	[(GlcNAc) ₅ -ox] = 24 mM
Tampó	Fosfat 50 mM pH 7, 37°C
Enzim	1 mg·mL ⁻¹

El precipitat comença a formar-se al cap d'1-2 hores de reacció. Se separa el precipitat format després de 2 i 18 hores de reacció, amb l'objectiu d'identificar els polímers insolubles formats presents en la fracció insoluble i realitzar un seguiment temporal d'aquests.

Es presenta la reacció de polimerització de (GlcNAc)₅-ox del mutant *SpChiD* D151A com a exemple.

Seguint el procediment esmentat, s'incuben 24 mM de (GlcNAc)₅-ox i 1 mg·mL⁻¹ de l'enzim *SpChiD* D151A. A més, en paral·lel, es prepara una reacció control amb (GlcNAc)₅-ox sense enzim. Al cap de 18 hores de reacció, en la reacció control no es detecta formació de precipitat i l'anàlisi per MALDI-TOF-MS revela la presència únicament de (GlcNAc)₅ (Figura 2.33).

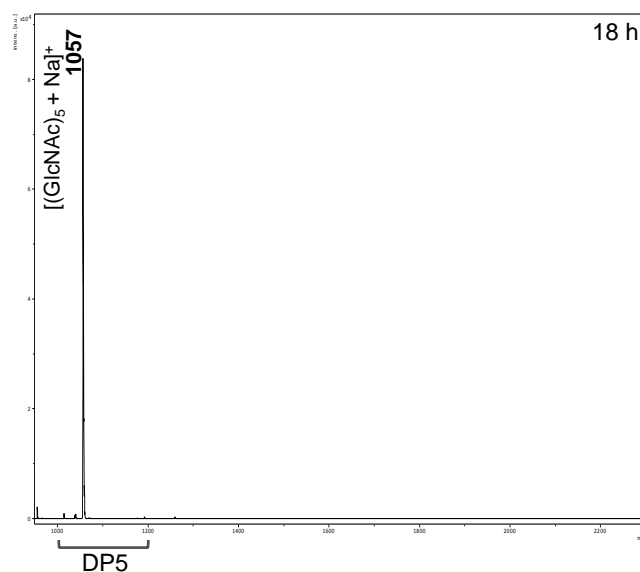


Figura 2.33. Espectre de MALDI-TOF-MS de la reacció control de (GlcNAc)₅-ox, sense enzim. Anàlisi de la mescla de reacció al cap de 18 hores d'incubació.

En canvi, en la reacció amb *SpChiD* D151A, al cap de 2 hores de reacció ja s'observa formació de precipitat, aquest s'aïlla i es liofilitza un cop realitzats els rentats amb aigua. Es calcula la massa del precipitat (en mg) per tal de determinar el rendiment de la reacció (p/p) i s'analitza per MALDI-TOF-MS utilitzant DHB com a matriu (Figura 2.34).

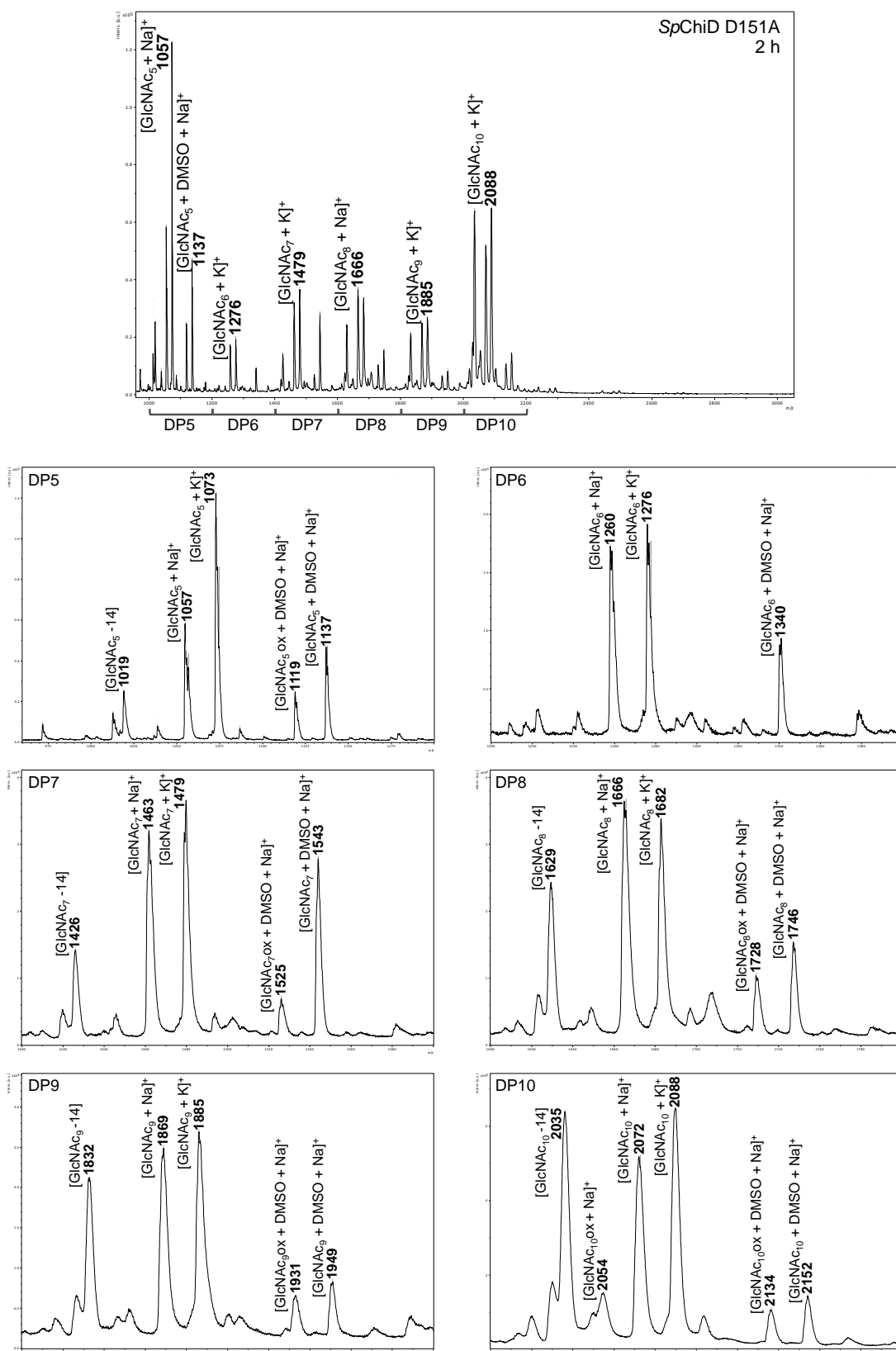


Figura 2.34. Espectre de MALDI-TOF de la reacció de polimerització de (GlcNAc)₅-ox catalitzada per SpChiD D151A.

Espectre dels productes resultants de la polimerització de (GlcNAc)₅-ox catalitzada pel mutant SpChiD D151A al cap de 2 hores de reacció. Anàlisi de la barreja de COS presents en la fracció insoluble. DP_n = (GlcNAc)_n

Per a cadascun dels quitoooligòmers es detecta diferents pics, corresponents a diferents adductes formats. Els pics amb una intensitat més alta corresponen als adductes amb sodi (+23) i potassi (+39). Per a cadascuna de les espècies també es detecta un pic equivalent a una relació m/z corresponent a $M+103$. En presència de DMSO, quan s'utilitza metodologia ESI, es formen també adductes amb sodi amb una relació m/z +101 (Keller *et al.*, 2008). Tot i que aquests adductes no s'han descrit en MALDI-TOF-MS, els pics corresponents a $M+103$ podrien explicar-se com a resultat de la formació de l'adducte $M+DMSO+Na$. Per altra banda també es detecta un altra pic amb una relació m/z corresponent a $M-14$. Aquest podria explicar-se com a causa de la pèrdua de $-CH_2$ del grup *N*-acetil de l'oxazolina.

D'altra banda, també es pretén determinar la composició d'aquest precipitat, és a dir, l'abundància relativa de cadascun dels quitoooligòmers formats en la reacció enzimàtica de polimerització.

En no disposar de patrons per a cadascun dels quitoooligòmers amb $DP>5$ i per tant no poder determinar els factors de resposta (àrea/concentració), no es pot realitzar una anàlisi quantitativa de la mostra. Tot i així, per a conèixer l'abundància aproximada de cadascun dels oligòmers presents, s'ha decidit normalitzar els valors d'intensitat i àrea del total dels adductes de cadascuna de les espècies pel valor d'intensitat o àrea del total dels adductes presents en la mostra analitzada. Amb aquest objectiu, es calcula el percentatge d'intensitat i àrea totals per a cadascuna de les espècies (tenint en compte tots els adductes per a cada una de les espècies) respecte el sumatori de la intensitat i àrea totals de la mostra (Taula 2.15).

Els resultats mostren com a mesura que augmenta el grau de polimerització del quitoooligosacàrid/polisacàrid format, la relació entre àrea i intensitat augmenta, a conseqüència de l'eixamplament dels pics. Per a l'anàlisi dels productes formats, i per a la comparació de l'abundància de cadascun dels COS entre els diferents enzims s'ha decidit utilitzar els valors d'àrea normalitzats.

D'aquesta manera, en aquesta reacció exemplificada, $(GlcNAc)_{10}$ és el polímer més abundant al cap de 2 h de reacció, amb una proporció d'un 42% respecte el total de COS presents en el precipitat format, seguit de $(GlcNAc)_5$ (substrat de la reacció).

És important esmentar que aquest mètode d'anàlisi i detecció (MALDI-TOF-MS) no sempre permet identificar el derivat oxazolina, ja que aquest s'hidrolitza en l'anàlisi. Tot i així, el mètode permet identificar els polímers insolubles formats, caracteritzant així si el mutant dissenyat té activitat glicosintasa mitjançant la detecció de la formació de $(GlcNAc)_{10}$ resultat de la condensació de dues molècules del donador $(GlcNAc)_5$.

Taula 2.15. Anàlisi dels adductes presents en la mostra de la reacció de polimerització de (GlcNAc)₅-OX.

	m/z	Adducte	Intens.	Àrea	Σ intens.	% Intens.	Σ Àrea	% Àrea	% Àrea/ % Intensitat
	971,82		8846	5760					
	1019,14	[DP5 -14]	25309	22986					
	1054,87	[DP5ox + K] ⁺	58165	48788					
	1055,69		41468	27974					
	1056,78	[DP5 + Na] ⁺	36894	59293					
DP5	1072,87	[DP5 + K] ⁺	122510	106927	557307,0	41,3 %	519788,0	27,2 %	0,7
	1073,63		87998	71050					
	1074,62		47281	57059					
	1119,03		24839	18821					
	1119,91	[DP5ox + DMSO + Na] ⁺	19702	15007					
	1137,07		46814	37007					
	1137,89	[DP5 + DMSO + Na] ⁺	37481	49116					
	1259,38	[DP6 + Na] ⁺	17254	12646					
DP6	1275,91	[DP6 + K] ⁺	19120	14591	45155,0	3,3 %	33204,0	1,7 %	0,5
	1340,24	[DP6 + DMSO + Na] ⁺	8781	5967					
	1426,05	[DP7 - 14]	14238	39188					
	1462,83	[DP7 + Na] ⁺	32027	46280					
DP7	1478,99	[DP7 + K] ⁺	31736	22945	142410,0	10,5 %	217492,0	11,4 %	1,1
	1525,28	[DP7ox + DMSO + Na] ⁺	36603	38819					
	1543,08	[DP7 + DMSO + Na] ⁺	27806	70260					
	1629,47	[DP8 - 14]	24316	80119					
	1665,84	[DP8 + Na] ⁺	35145	67091					
DP8	1682,86	[DP8 + K] ⁺	33837	20484	107753,0	8,0 %	186854,0	9,8 %	1,2
	1728,35	[DP8ox + DMSO + Na] ⁺	6939	9059					
	1746,11	[DP8 + DMSO + Na] ⁺	7516	10101					
	1832,64	[DP9 - 14]	21225	3075					
	1868,88	[DP9 + Na] ⁺	24915	62226					
DP9	1884,76	[DP9 + K] ⁺	25800	66541	80241,0	5,9 %	144490,0	7,6 %	1,3
	1930,88	[DP9ox + DMSO + Na] ⁺	3652	5531					
	1949,09	[DP9 + DMSO + Na] ⁺	4649	7117					
	2034,64		63927	119459					
	2035,24	[DP10 - 14]	63872	151318					
	2054,23	[DP10ox + Na] ⁺	14801	20821					
	2072,09		51868	113202					
	2072,77	[DP10 + Na] ⁺	49190	113679					
DP10	2088,86	[DP10ox + K] ⁺	64864	126142	417054,0	30,9 %	806041,0	42,2 %	1,4
	2090,09		64518	141144					
	2105,93		6238	1337					
	2134,24	[DP10ox + DMSO + Na] ⁺	10744	1928					
	2152,37	[DP10 + DMSO + Na] ⁺	12541	10623					
	2154,14		14491	6388					
DP15	3103,63	[DP15+K] ⁺	532	75,7	532,0	0,039 %	75,7	0,004 %	0,1
TOTAL					1350452	100	1907944,7	100	

DP_n = (GlcNAc)_n

CAPÍTOL 3

Capítol 3. Primera generació glicosintasa: mutació del residu assistent

3.1. Estratègia general per al disseny de la primera generació glicosintasa

La tecnologia glicosintasa es basa en la substitució del residu que actua com a nucleòfil per un residu no nucleofílic en una glicosil-hidrolasa amb retenció de configuració donant lloc a un enzim hidrolíticament inactiu. A causa de que les quitinases de la família GH18 actuen mitjançant un mecanisme catalític assistit per substrat, l'estratègia seguida per al disseny d'un enzim glicosintasa és diferent, substituint el residu assistent del centre actiu, que té un paper important en la formació de l'intermedi de reacció (Figura 3.1).

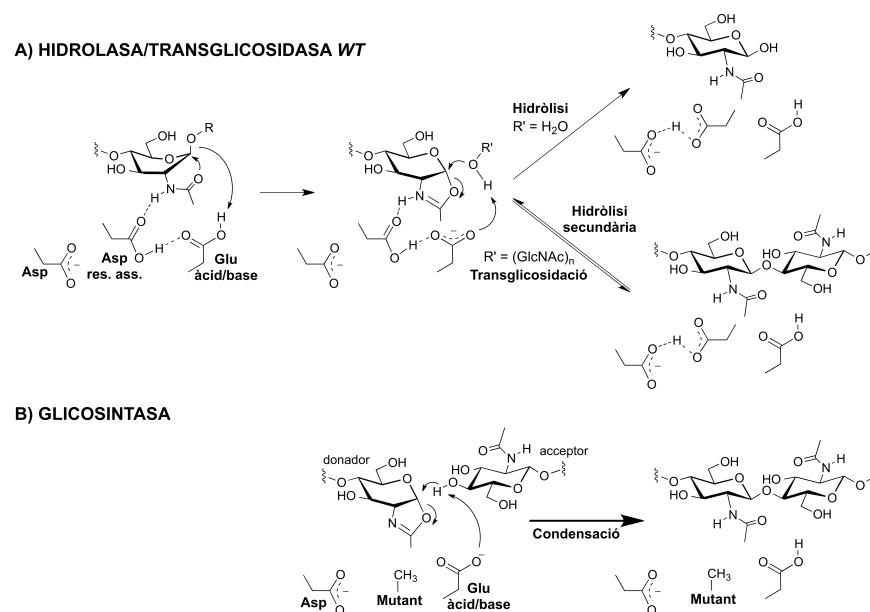


Figura 3.1. Mecanisme de les quitinases GH18 que operen per catàlisi assistida per substrat
 A) Reaccions d'hidròlisi i transglicosidació d'una quitinasa wt. B) Mecanisme tipus glicosintasa per als mutants del residu assistent amb l'ús d'un donador oxazolina com a substrat.

En les quitinases GH18, el residu auxiliar que assisteix a la formació de l'intermedi de reacció és el segon Asp del motiu DxExE, altament conservat en aquesta família. Aquest residu Asp té un paper important en la orientació del grup 2-acetamida que actua com a nucleòfil per formar l'intermedi oxazolina. Està reportat que la mutació d'aquest residu en quitinases de la família GH18 dona lloc a una significativa disminució de l'activitat hidrolasa de l'enzim (Papanikolaou *et al.*, 2001; Synstad *et al.*, 2004; Tsuji *et al.*, 2010; Zakariassen *et al.*, 2011).

Fins al moment, sota el nostre coneixement, només dues publicacions reporten estudis en que s'utilitza quitinases GH18 catalíticament deficientes com a glicosintases i un derivat oxazolina com a donador. Aquesta estratègia s'ha aplicat en la quitinasa ChiA1 de *B. circulans*, en que es reporta la caracterització de diferents mutants dels residus catalítics. La mutació del residu Asp202, corresponent al residu assistent, per una Asn, dona lloc a un

Seguidament, s'han obtingut els mutants del residu assistent per mutagènesi dirigida (SDM) i s'ha confirmat la mutació per seqüenciació d'ADN. Finalment s'han transformat cèl·lules BL21(DE3)star amb els diferents plasmidis per a l'expressió i purificació dels mutants recombinants.

Les proteïnes s'expressen en cultius en medi ric LB i inducció per IPTG. Es realitza una primera prova d'expressió en la que s'indueix el cultiu d'*E.coli* en estat estacionari a 25°C durant 16 hores. Sota aquestes condicions les quitinases *BcChiA*, *SmChiC*, *SpChiD* i *PfChiB* s'expressen en la fracció soluble, *LpChiA* i *TkChiA* s'expressen tant en la fracció soluble com en la insoluble, *RmChiA* i *VhChiA* només es localitzen en la fracció insoluble i en canvi *StmChiA* no s'expressa sota aquestes condicions (Figura 3.4). Es realitzen diferents assajos d'expressió per tal d'obtenir *RmChiA*, *VhChiA* i *StmChiA* en la fracció soluble. Es varia la temperatura, concentració d'inductor, concentració d'antibiòtic, s'afegeix glucosa al medi i també es varia el mètode d'inducció realitzant autoinducció en un medi d'LB suplementat. En cap de les condicions assajades s'obté proteïna soluble.

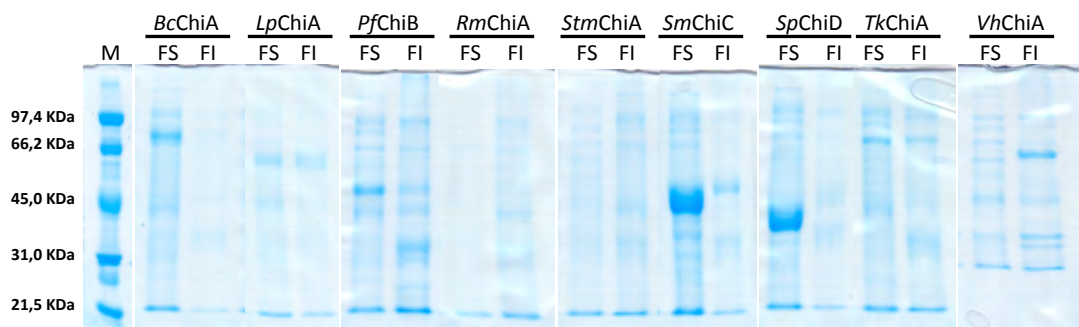


Figura 3.4. Prova d'expressió de les quitinases GH18 seleccionades

Imatges dels gels SDS-PAGE (12% d'acrilamida) en els que s'analitza la fracció soluble (FS) i insoluble (FI) de les proves d'expressió de les quitinases wt seleccionades. *BcChiA*: 69,4 KDa; *LpChiA*: 60,9 KDa; *PfChiB*: 50,5 KDa; *RmChiA*: 40,3 KDa; *StmChiA*: 68,8 KDa; *SmChiC*: 51,8 KDa; *SpChiD*: 44,2 KDa; *TkChiA*: 70,6 KDa i *VhChiA*: 62,9 KDa.

A causa del resultat d'expressió, només es realitza la caracterització enzimàtica de les quitinases *BcChiA*, *LpChiA*, *SmChiC*, *SpChiD*, *PfChiB* i *TkChiA* i dels corresponents mutants del residu assistent, i no de les quitinases *RmChiA*, *StmChiA* i *VhChiA*, que han estat descartades per problemes d'expressió.

Les condicions finals per a l'expressió de les quitinases seleccionades impliquen la inducció amb IPTG a 25°C durant 16 h. Un cop realitzada la lisi cel·lular, la fracció soluble obtinguda és purificada mitjançant cromatografia d'afinitat. L'anàlisi mitjançant un gel d' SDS-PAGE de les fraccions recol·lectades revela que les proteïnes purificades migren segons el pes molecular corresponent (Figura 3.5). Les fraccions que contenen la proteïna d'interès s'ajunten, es realitza un canvi de tampó i es concentren mitjançant un centrífug de membrana de 10 kDa (Merck-Millipore) prèviament a la quantificació de proteïna i la caracterització enzimàtica. S'ha obtingut un rendiment mitjà d'entre 10 i 20 mg de proteïna

per litre de cultiu en el cas de *LpChiA*, *SmChiC*, *PfChiB* i *TkChiA*, en canvi aquest rendiment es veu incrementat fins a $160 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en el cas de *BcChiA* i *SpChiD*.

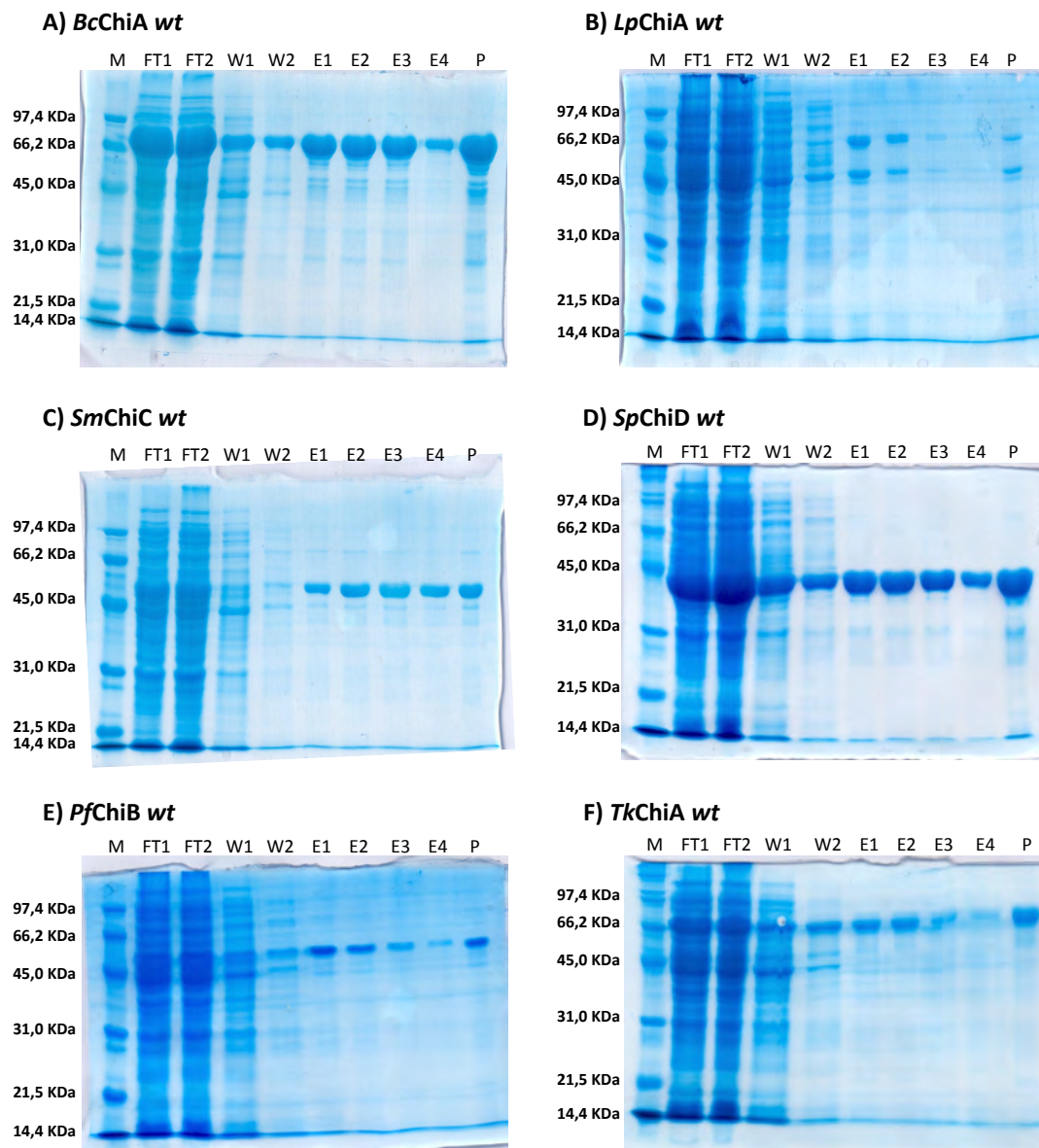


Figura 3.5. SDS-PAGE de les quitinases GH18 *wt* seleccionades

Gels SDS-PAGE del procés de purificació de les quitinases amb les columnes *His SpinTrap columns* (GE Healthcare) A) *BcChiA*: 69,4 kDa; B) *LpChiA*: 60,9 kDa; C) *SmChiC*: 51,8 kDa; D) *SpChiD*: 44,2 kDa; E) *PfChiB*: 50,5 kDa i F) *TkChiA*: 70,6 kDa. M: *Marker Low Range*, FT1-FT2: *Flow through* de la columna, W1-W2: Rentats, E1-E4: Elucions de la proteïna, P: Proteïna final, un cop juntades les elucions i canviat el tampó.

Els corresponents mutants del residu assistent han estat expressats i purificats seguint el mateix protocol i s'han obtingut amb rendiments similars (Figura 3.6).

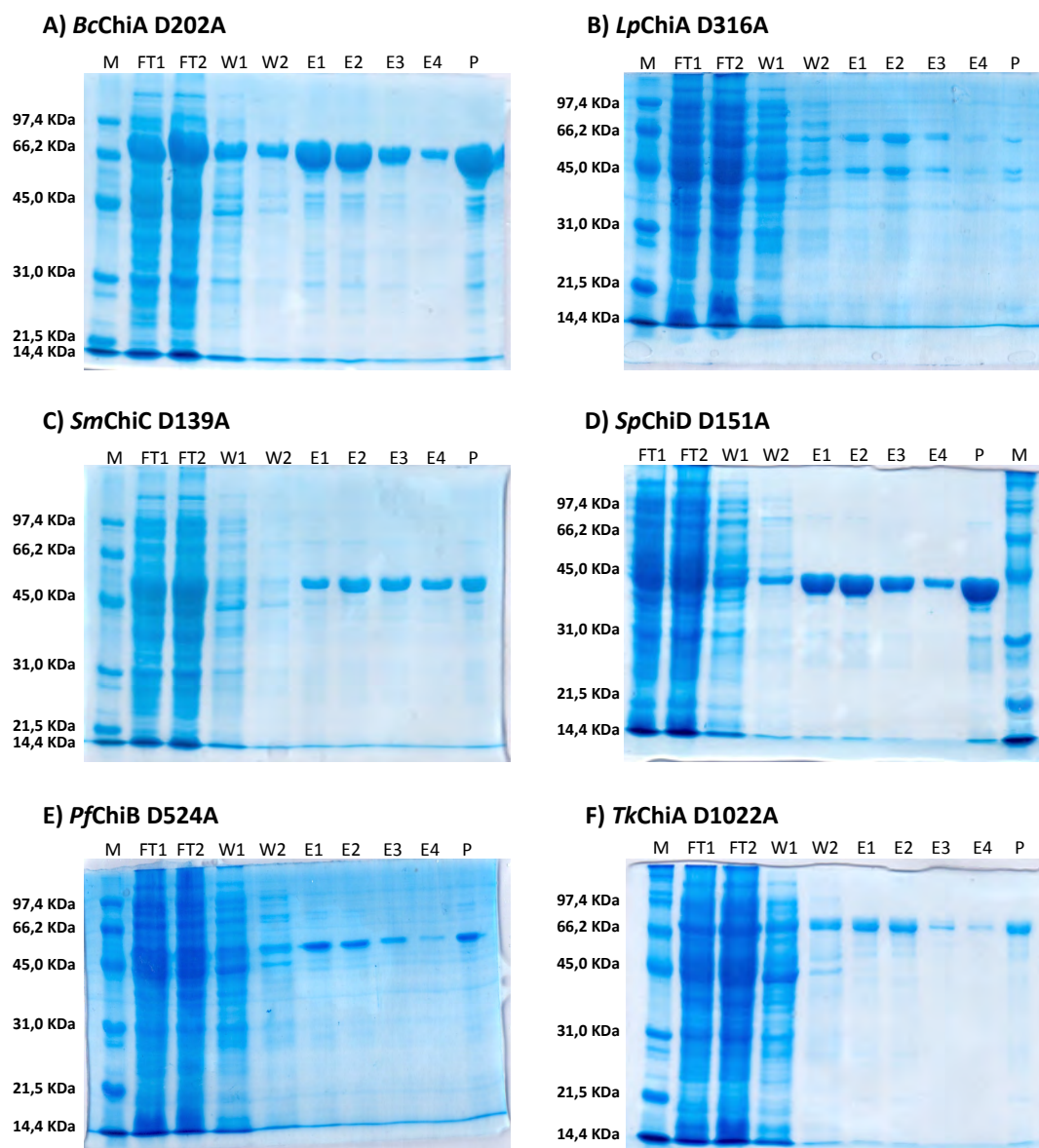


Figura 3.6. SDS-PAGE dels mutants del residu assistent

Gels SDS-PAGE del procés de purificació de les quitinases amb les columnes *His SpinTrap columns* (GE Healthcare) A) *BcChiA* D202A: 69,4 KDa; B) *LpChiA* D316A: 60,9 KDa; C) *SmChiC* D139A: 51,7 KDa; D) *SpChiD* D151A: 44,2 KDa; E) *PfChiB* D524A: 50,4 KDa i F) *TkChiA* D1022A: 70,5 KDa. M: *Marker Low Range*, FT1-FT2: *Flow through* de la columna, W1-W2: Rentats, E1-E4: Elucions de la proteïna, P: Proteïna final, un cop juntades les elucions i canviat el tampó.

3.3. Caracterització de l'activitat hidrolítica residual

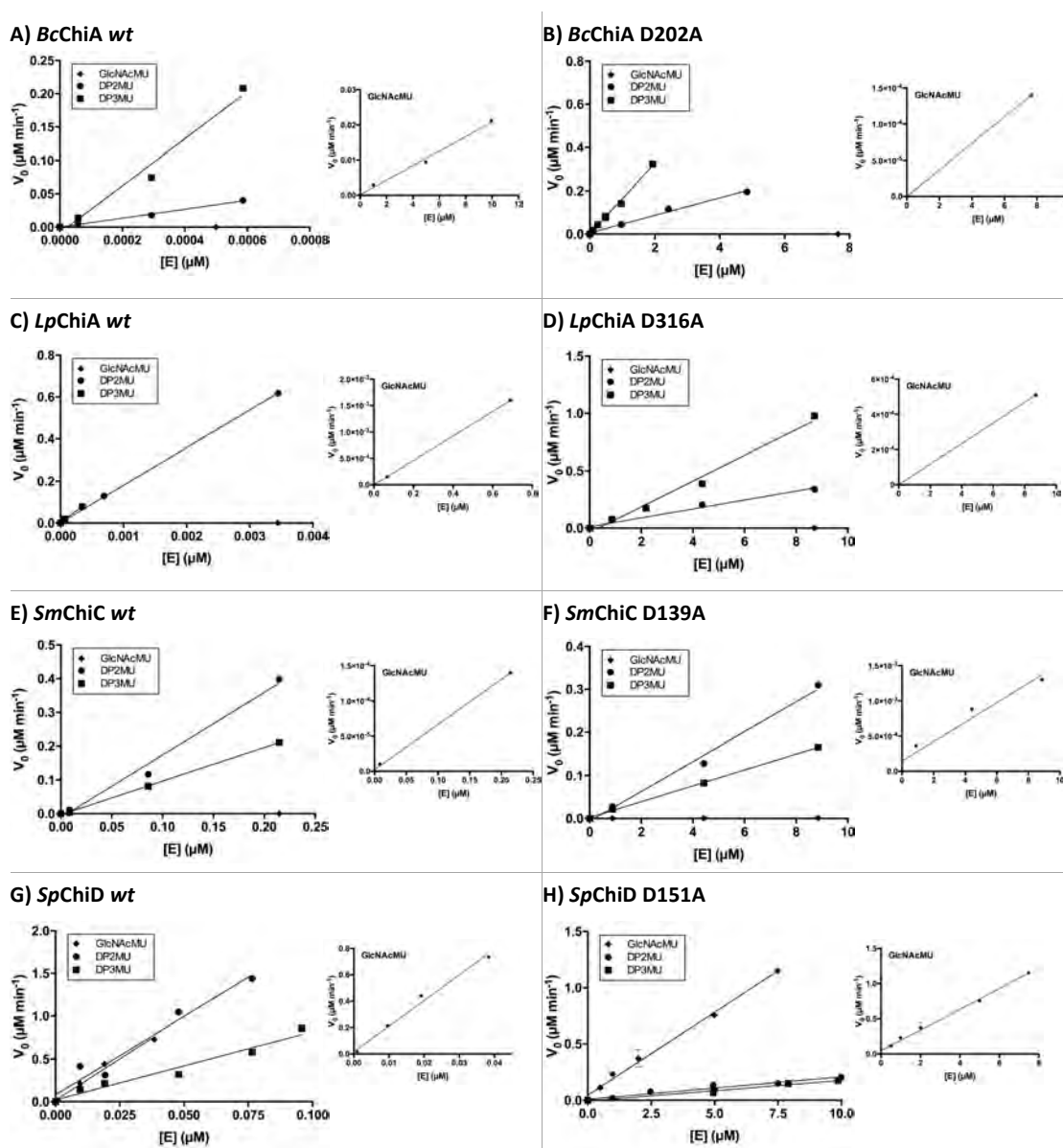
Per a la caracterització de l'activitat hidrolítica tant de les quitinases salvatges com dels corresponents mutants se segueixen dos mètodes d'anàlisi diferents: assaig fluorimètric utilitzant substrats fluorogènics i anàlisi per HPLC-MS utilitzant un substrat natural (veure capítol 2). En ambdós casos s'analiza l'activitat específica dels enzims (V_0 vs [E]) per tal de

comparar l'activitat dels mutants del residu assistent respecte l'activitat de la quitinasa *wt* corresponent, i determinar l'efecte d'aquesta mutació sobre l'activitat de l'enzim.

3.3.1. Activitat hidrolítica utilitzant substrats fluorogènics

Es realitza un estudi de l'activitat a diferents concentracions d'enzim utilitzant els substrats fluorogènics GlcNAc-MU, (GlcNAc)₂-MU i (GlcNAc)₃-MU.

Amb l'objectiu de determinar els valors d'activitat específica ($V_0/[E]$, min^{-1}) es representa la V_0 en front la concentració d'enzim emprada per a cadascun dels substrats utilitzats (Figura 3.7). En tots els casos, tal com s'esperava degut a la implicació del residu assistent en la catàlisi, s'observa una disminució de l'activitat hidrolasa de l'enzim mutant respecte l'enzim salvatge.



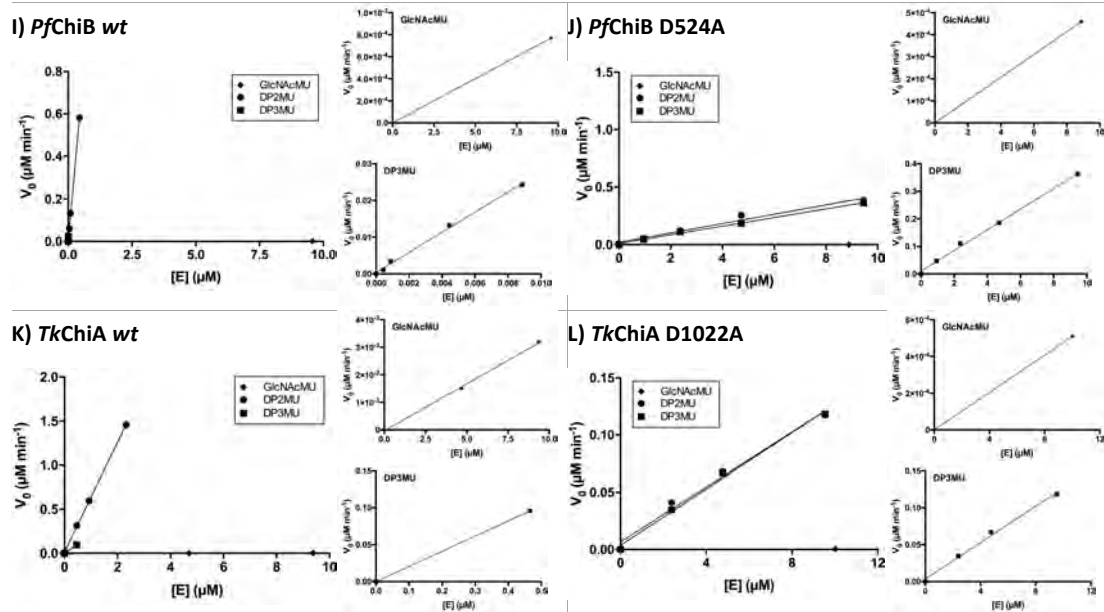


Figura 3.7. Determinació de l'activitat específica de les quitinases i dels corresponents mutants del residu assistent per als diferents substrats fluorogènics.

A) *BcChiA wt*; B) *BcChiA D202A*; C) *LpChiA wt*; D) *LpChiA D316A*; E) *SmChiC wt*; F) *SmChiC D139A*; G) *SpChiD wt*; H) *SpChiD D151A*; I) *PfChiB wt*; J) *PfChiB D524A*; K) *TkChiA wt*; L) *TkChiA D1022A*. Condicions de l'assaig: [(GlcNAc)_n-MU] = 50 µM, tampó fosfat 50 mM, pH 7, 37°C. DP_n = (GlcNAc)_n

A la Taula 3.1 es mostra els valors d'activitat específica obtinguts (min^{-1}) per a cadascun dels enzims estudiats, així com la comparació de l'activitat de cadascun dels mutants respecte l'enzim *wt* corresponent.

En relació a les quitinases bacterianes, *BcChiA* i *LpChiA* mostren l'activitat més elevada quan utilitzen el substrat més llarg, (GlcNAc)₃-MU, en canvi, *SmChiC* és més activa davant (GlcNAc)₂-MU com a substrat. Aquestes tres quitinases mostren una activitat insignificant davant GlcNAc-MU. En canvi, *SpChiD* exhibeix un comportament diferent, essent més actiu davant el substrat més curt, consistent amb la seva activitat quitobiasa reportada (Madhuprakash *et al.*, 2012), i aquesta activitat es veu disminuïda a mesura que augmenta la longitud del substrat. Per altra banda, en referència a les quitinases d'arqueus, *PfChiB* i *TkChiA*, presenten més activitat davant (GlcNAc)₃-MU i (GlcNAc)₂-MU, respectivament, i l'activitat d'ambdues davant GlcNAc-MU és pràcticament negligible. Cal destacar que amb (GlcNAc)₃-MU com a substrat, ambdues quitinases d'arqueus només donen lloc a un 4% de conversió de substrat a -MU i la fluorescència no augmenta al cap de temps de reacció més llargs. Aquest fet suggereix la hidròlisi del segon enllaç *O*-glicosídic des de l'extrem no reductor de (GlcNAc)₃-MU, donant lloc a (GlcNAc)₂ i GlcNAc-MU, productes no detectables mitjançant aquest mètode d'anàlisi. Conseqüentment com que cap dels dos enzims no són actius davant GlcNAc-MU, no es detecta increment de fluorescència al cap de temps d'incubació més llargs. Anàlisis prèvies de l'activitat de *TkChiA* per TLC mostren (GlcNAc)₂ i GlcNAc-pNP com a productes d'hidròlisi de (GlcNAc)₃-pNP com a substrat, d'acord amb els nostres resultats (Tanaka, Fukui and Imanaka, 2001).

Taula 3.1. Activitat específica ($V_0/[E]$) de les diferents quitinases *wt* i els mutants del residu assistent utilitzant $(\text{GlcNAc})_n\text{-MU}$ com a substrats

	$V_0/[E] \text{ (min}^{-1}\text{)}^1$		
	GlcNAc-MU	$(\text{GlcNAc})_2\text{-MU}$	$(\text{GlcNAc})_3\text{-MU}$
<i>BcChiA wt</i>	$(2 \pm 0,1) \times 10^{-3}$	70 ± 4	300 ± 70
<i>BcChiA D202A</i>	$(3 \pm 1) \times 10^{-5}$	$0,036 \pm 0,007$	$0,17 \pm 0,04$
D202A/ <i>wt</i>	$1,5 \times 10^{-2}$	$5,1 \times 10^{-4}$	$5,7 \times 10^{-4}$
<i>LpChiA wt</i>	$(2,5 \pm 0,2) \times 10^{-3}$	180 ± 8	230 ± 10
<i>LpChiA D316A</i>	$(1,2 \pm 0,8) \times 10^{-4}$	$0,040 \pm 0,004$	$0,106 \pm 0,008$
D316A/ <i>wt</i>	$4,8 \times 10^{-2}$	$2,2 \times 10^{-4}$	$4,6 \times 10^{-4}$
<i>SmChiC wt</i>	$(6,3 \pm 0,5) \times 10^{-4}$	$1,90 \pm 0,05$	$1,00 \pm 0,05$
<i>SmChiC D139A</i>	$(1,4 \pm 0,1) \times 10^{-5}$	$0,035 \pm 0,004$	$0,018 \pm 0,002$
D139A/ <i>wt</i>	$2,2 \times 10^{-1}$	$1,8 \times 10^{-2}$	$1,8 \times 10^{-2}$
<i>SpChiD wt</i>	$14,7 \pm 5,6$	$13,5 \pm 6,7$	$7,1 \pm 1,7$
<i>SpChiD D151A</i>	$0,17 \pm 0,04$	$0,022 \pm 0,004$	$0,016 \pm 0,002$
D151A/ <i>wt</i>	$1,1 \times 10^{-2}$	$1,6 \times 10^{-3}$	$2,3 \times 10^{-3}$
<i>PfChiB wt</i>	$(8 \pm 1) \times 10^{-5}$	$1,302 \pm 0,008$	$3,7 \pm 1,4$
<i>PfChiB D524A</i>	$(7 \pm 2) \times 10^{-5}$	$0,040 \pm 0,001$	$0,035 \pm 0,004$
D524A/ <i>wt</i>	$8,8 \times 10^{-1}$	$3,1 \times 10^{-2}$	$9,4 \times 10^{-3}$
<i>TkChiA wt</i>	$(3,2 \pm 0,2) \times 10^{-4}$	$0,58 \pm 0,05$	$0,15 \pm 0,01$
<i>TkChiA D1022A</i>	$(5 \pm 1) \times 10^{-5}$	$0,012 \pm 0,001$	$0,010 \pm 0,002$
D1022A/ <i>wt</i>	$1,6 \times 10^{-1}$	$2,1 \times 10^{-2}$	$6,7 \times 10^{-2}$

Condicions de reacció: 50 μM de substrat en Na_2HPO_4 50 mM pH 7. ¹Mitjana d'un mínim de 3 repeticions

En relació a l'activitat amb GlcNAc-MU, ha estat reportat prèviament que *TkChiA* no és actiu utilitzant aquest substrat (Tanaka *et al.*, 1999), ni tampoc s'ha detectat hidròlisi de $(\text{GlcNAc})_2$ utilitzant *TkChiA* ni *LpChiA* (Tanaka, Fukui and Imanaka, 2001; Shibasaki *et al.*, 2014), confirmant que aquestes quitinases no tenen activitat quitobiasa, fet que es correlaciona amb els resultats obtinguts. A més, es troba reportat que $(\text{GlcNAc})_2$ és el producte final d'hidròlisi majoritari de les diferents quitinases aquí estudiades, excepte per *SpChiD* en que s'obté GlcNAc, el que explica que no siguin actives davant GlcNAc-MU.

Els mutants simples mostren el mateix comportament de preferència de substrat que el corresponent enzim salvatge, excepte els mutants de les quitinases d'arqueus *PfChiB* D524A i *TkChiA* D1022A, que mostren aproximadament la mateixa activitat davant $(\text{GlcNAc})_3\text{-MU}$ i $(\text{GlcNAc})_2\text{-MU}$, a diferència dels enzims *wt* que tenen preferència per $(\text{GlcNAc})_3\text{-MU}$ i $(\text{GlcNAc})_2\text{-MU}$, respectivament. A més, amb ambdós mutants, la conversió de $(\text{GlcNAc})_3\text{-MU}$ a -MU augmenta fins el 30%, a les condicions de reacció assajades. A més, l'activitat dels mutants es veu reduïda entre 2 i 4 ordres de magnitud. En el cas del substrat més curt, GlcNAc-MU, la disminució de l'activitat hidrolítica és menor, només d'entre 1 i 2 ordres de magnitud, possiblement degut a la poca activitat dels enzims *wt* davant aquest substrat.

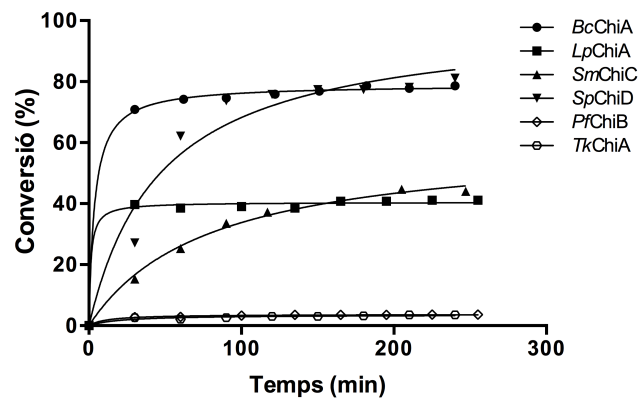


Figura 3.8. Representació de la conversió de la reacció amb (GlcNAc)₃-MU

Tenint en compte la conversió de substrat a producte, és a dir la concentració de 4-MU alliberada respecte la concentració inicial de substrat (Figura 3.8), es pot interpretar la preferència de posicionament del substrat en el centre actiu de l'enzim (Figura 3.9). Quan s'utilitza (GlcNAc)₂-MU com a substrat s'arriba a una conversió del 100% al cap de 4h de reacció amb totes les quitinases *wt* analitzades. Aquest resultat suggereix el posicionament de (GlcNAc)₂-MU entre els subunitis -2 i +1 per a totes les quitinases. En canvi, quan s'utilitza (GlcNAc)₃-MU com a substrat la conversió varia per a cadascuna (Figura 3.8), suggerint una preferència diferent de posicionament del substrat. En el cas de les quitinases d'arqueus, *PfChiB* i *TkChiA*, la conversió és inferior al 5%, el que suggereix que (GlcNAc)₃-MU a més de posicionar-se entre els subunitis -3 i +1, preferiblement es posiciona entre els subunitis -2 i +2 donant lloc a (GlcNAc)₂ i GlcNAc-MU com a productes d'hidròlisi. En el cas de *BcChiA* i *SpChiD* la conversió és d'aproximadament del 80% suggerint una preferència de posicionament entre els subunitis -3 i +1, tot i que també es pot donar el posicionament de (GlcNAc)₃-MU entre els subunitis -2 i +2. Per últim, en el cas de *LpChiA* i *SmChiC* la conversió és del 50%, suggerint que el substrat es posiciona indiferentment entre els subunitis -3 i +1 i -2 i +2.

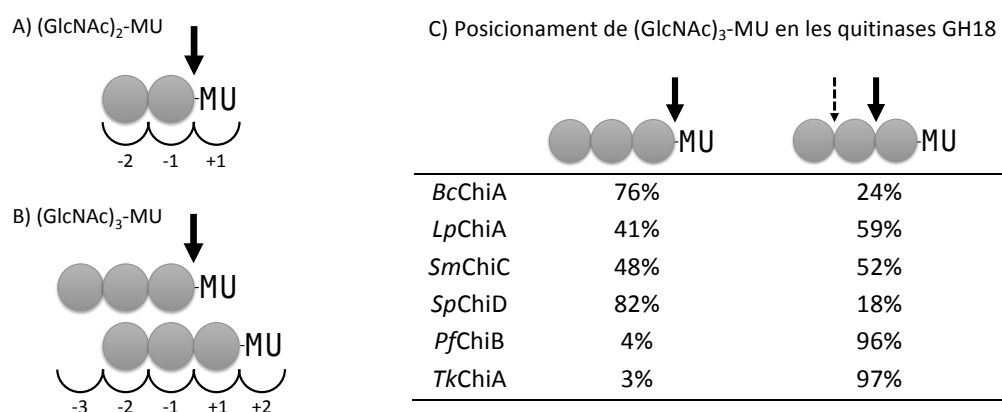


Figura 3.9. Representació esquemàtica del posicionament dels substrats fluorogènics en el centre actiu de les quitinases de la família GH18.

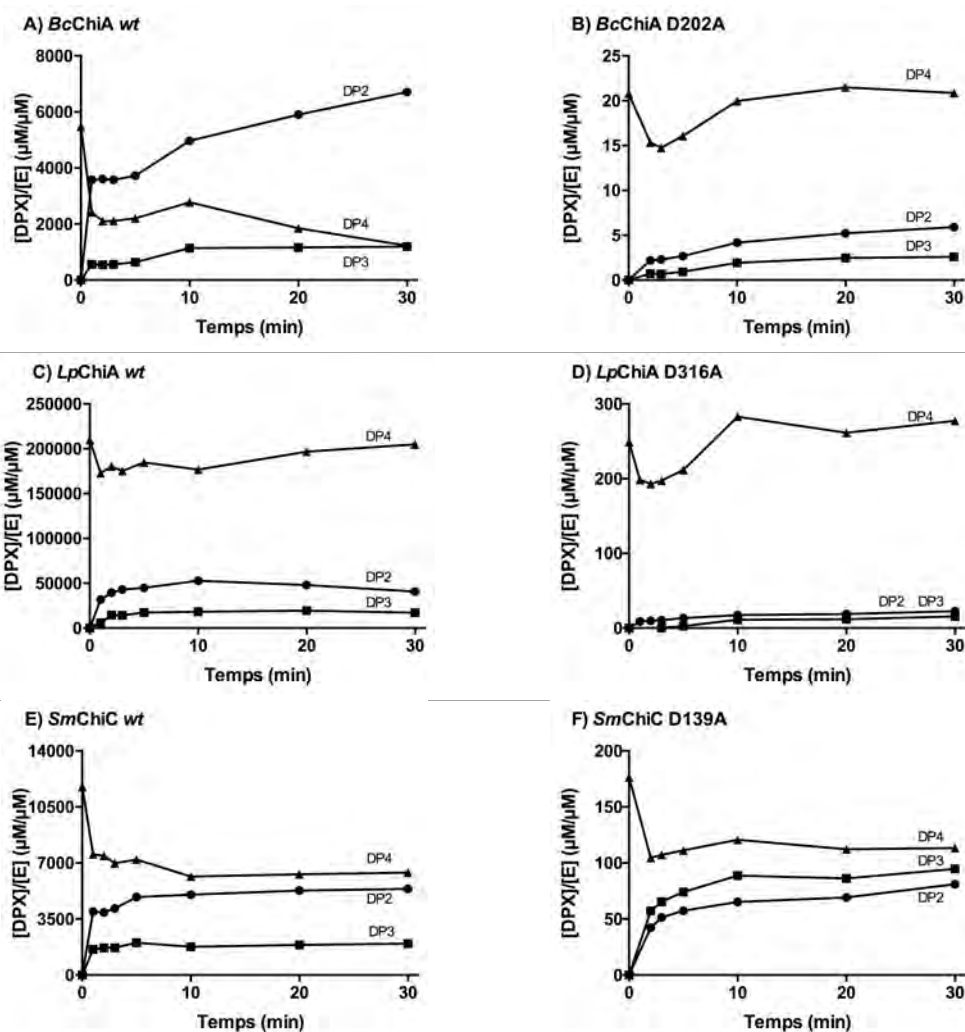
A) Posicionament de (GlcNAc)₂-MU entre els subunitis -2 i +1; B) Posicionament de (GlcNAc)₃-MU, pot donar-se entre els subunitis -3 i +1 o bé entre -2 i +2; C) Deducció del posicionament de (GlcNAc)₃-MU en les quitinases GH18 analitzades. Anàlisi realitzada a partir de l'alliberació de -MU respecte la quantitat inicial de substrat. Cercles gris clar: unitats d' *N*-acetilglucosamina.

A causa de que les quitinases analitzades no hidrolitzen l'enllaç *O*-glicosídic de GlcNAc-MU, la fluorescència no augmenta al llarg del temps i no s'arriba al 100% d'alliberació de 4-MU. En canvi, en el cas d'*SpChiD wt*, s'arriba al 100% de conversió al cap de temps de reacció més llargs, a causa de la capacitat d'aquest enzim d'hidrolitzar GlcNAc-MU.

3.3.2. Activitat hidrolítica per a substrats naturals

Per a determinar el patró d'hidròlisi dels diferents enllaços *O*-glicosídics interns del substrat s'analitza l'activitat utilitzant quitotetraosa, (GlcNAc)₄, el qual és un substrat natural de quitinases. S'analitza tant la disminució del substrat (GlcNAc)₄ com la formació dels productes d'hidròlisi (GlcNAc)₂ i (GlcNAc)₃ per HPLC-MS.

Totes les quitinases i els mutants caracteritzats tenen un comportament cinètic diferenciat en dues fases, una hidròlisi de (GlcNAc)₄ inicial ràpida i conseqüentment un increment ràpid dels productes d'hidròlisi (Figura 3.10) que disminueix al cap d'1-2 minuts de reacció per assolir un estat estacionari (veure capítol 2).



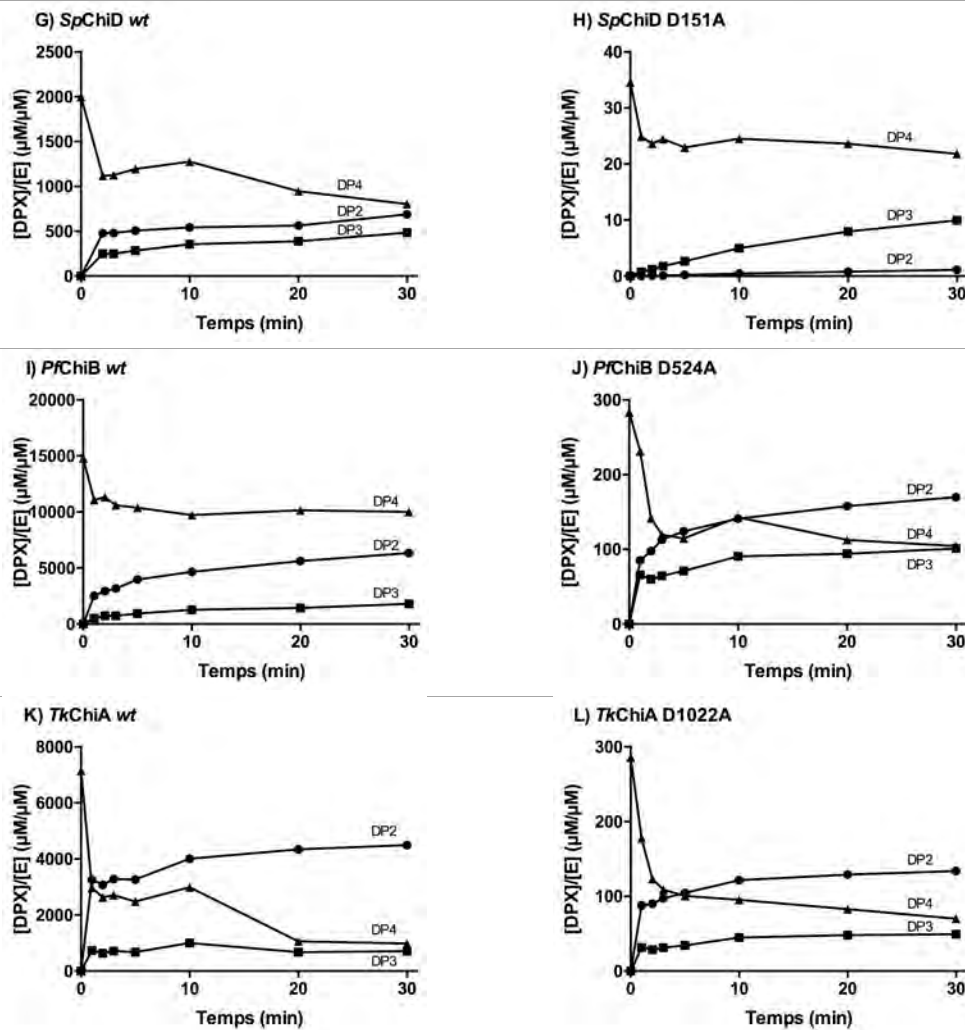
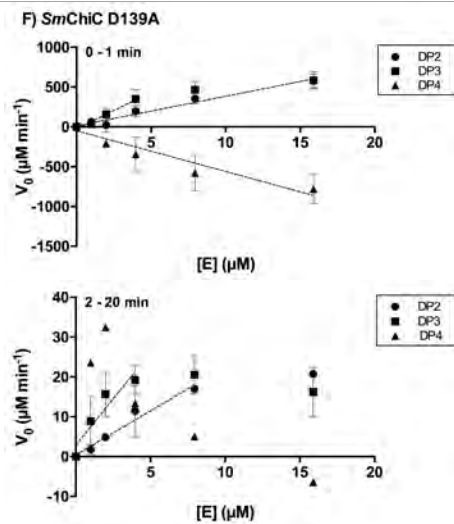
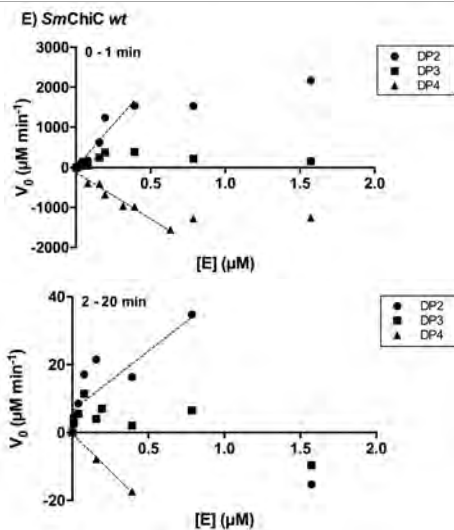
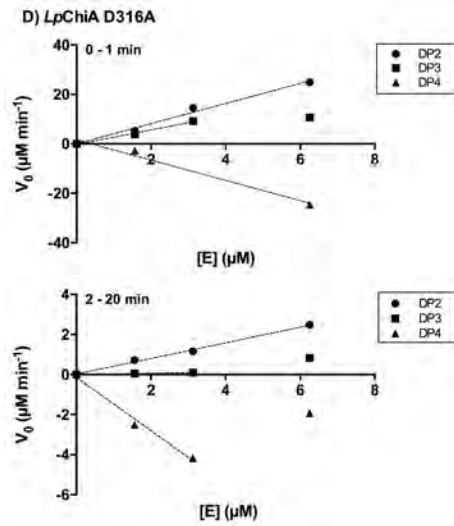
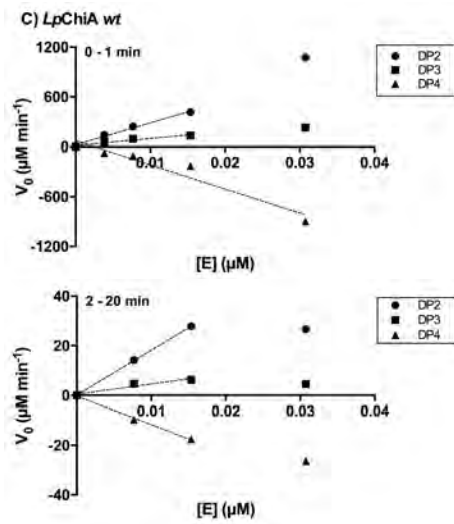
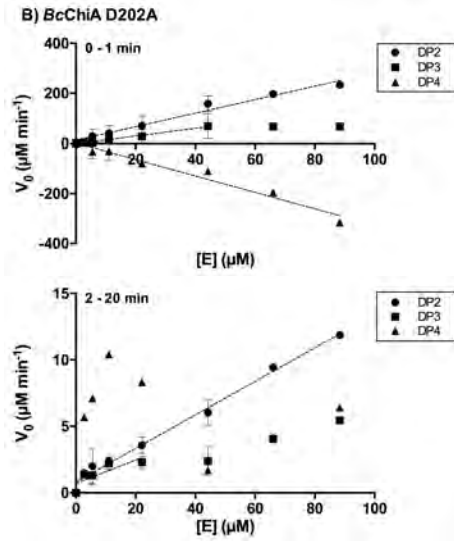
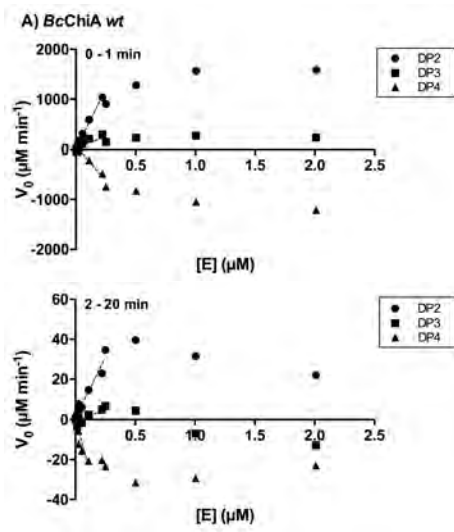


Figura 3.10. Curs de reacció de la hidròlisi de $(\text{GlcNAc})_4$

Representació de la concentració de substrat ($(\text{GlcNAc})_4$) i productes ($(\text{GlcNAc})_2$ i $(\text{GlcNAc})_3$) entre la concentració d'enzim emprada respecte el temps de reacció. Condicions de l'assaig: $[(\text{GlcNAc})_4] = 2 \text{ mM}$, tampó fosfat 50 mM , $\text{pH } 7$, 37°C . Concentracions d'enzim: $250 \text{ nM } BcChiA \text{ wt}$; $65 \text{ } \mu\text{M } BcChiA \text{ D202A}$; $8 \text{ nM } LpChiA \text{ wt}$; $6,5 \text{ } \mu\text{M } LpChiA \text{ D316A}$; $150 \text{ nM } SmChiC \text{ wt}$; $8 \text{ } \mu\text{M } SmChiC \text{ D139A}$; $0,8 \text{ } \mu\text{M } SpChiD \text{ wt}$; $50 \text{ } \mu\text{M } SpChiD \text{ D151A}$; $90 \text{ nM } PfChiB \text{ wt}$; $5 \text{ } \mu\text{M } PfChiB \text{ D524A}$; $190 \text{ nM } TkChiA \text{ wt}$; $6 \text{ } \mu\text{M } TkChiA \text{ D1022A}$.

$\text{DPX} = (\text{GlcNAc})_n$

En totes les reaccions, tal com s'observa en la Figura 3.10, es detecta un *burst* inicial, corresponent al primer temps de reacció, tant en el consum de $(\text{GlcNAc})_4$ com en la formació de $(\text{GlcNAc})_2$ i $(\text{GlcNAc})_3$. Aquest *burst* generalment és més evident en el cas dels enzims *wt*, a causa de l'elevada activitat hidrolasa d'aquests. A més, aquest *burst* inicial, que suggereix un estat pre-estacionari, dificulta la determinació de la velocitat inicial de consum dels enzims *wt*. Per a una determinació més exacte d'aquesta velocitat es requereix d'altres tècniques d'anàlisi com per exemple espectrofotometria *stopped flow*. Tot i així, s'ha determinat la velocitat d'ambdues fases a diferents concentracions d'enzim per a determinar les activitats específiques (Figura 3.11, Taula 3.2).



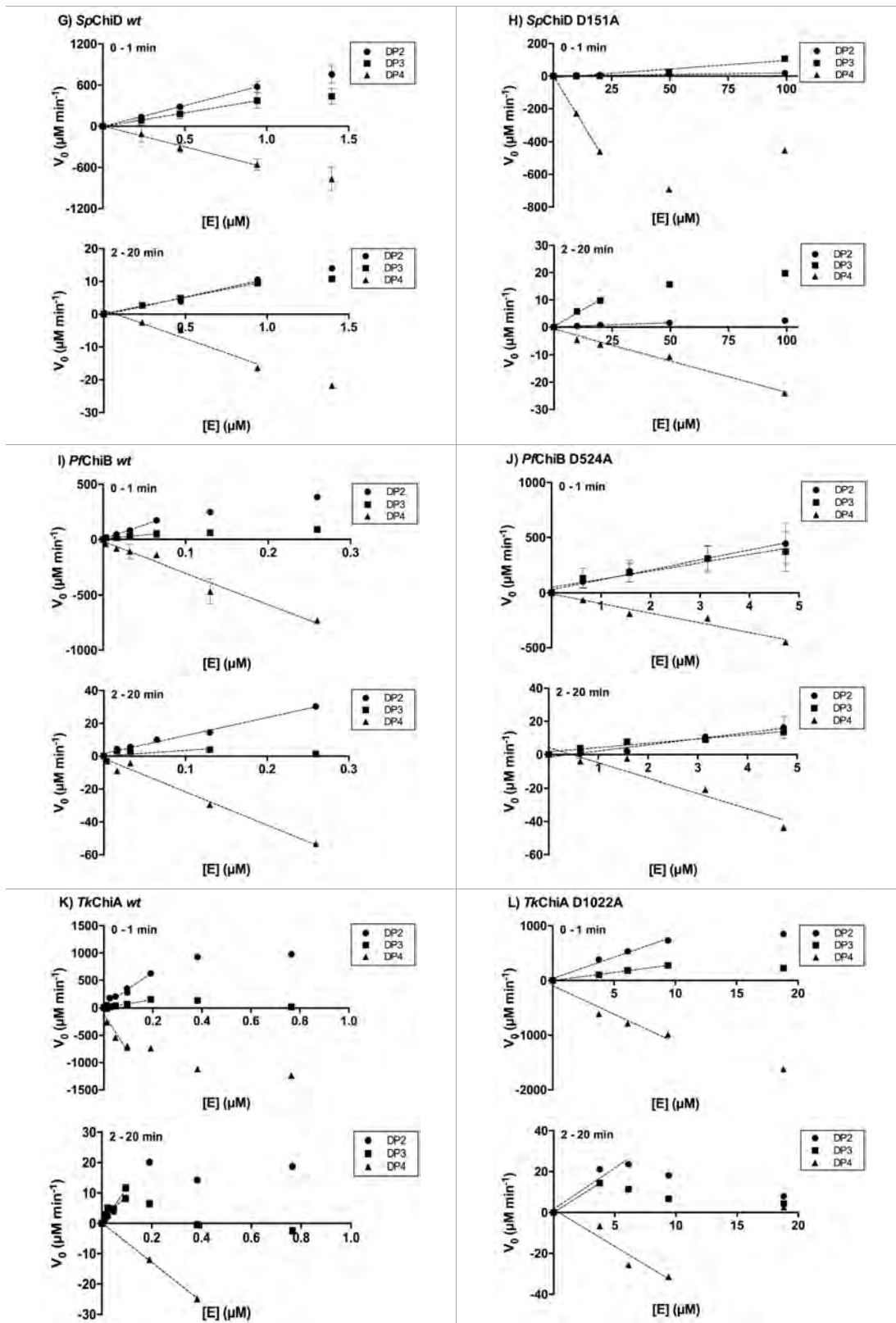


Figura 3.11. Determinació de l'activitat específica de les quitinases i dels corresponents mutants del residu assistent per a $(\text{GlcNAc})_4$. A) *BcChiA wt*; B) *BcChiA D202A*; C) *LpChiA wt*; D) *LpChiA D316A*; E) *SmChiC wt*; F) *SmChiC D139A*; G) *SpChiD wt*; H) *SpChiD D151A*; I) *PfChiB wt*; J) *PfChiB D524A*; K) *TkChiA wt*; L) *TkChiA D1022A*. Condicions de l'assaig: $[(\text{GlcNAc})_4] = 2 \text{ mM}$, tampó fosfat 50 mM , pH 7, 37°C . $\text{DP}_n = (\text{GlcNAc})_n$.

Per als enzims *BcChiA D202A* i *SmChiC D139A*, tot i que sí es detecta formació de (GlcNAc)₂ i (GlcNAc)₃ en la fase estacionària, no es detecta consum de (GlcNAc)₄, potser a causa de reaccions de TG que succeeixen simultàniament.

Per altra banda, en el cas de les quitinases *BcChiA*, *SmChiC* i *TkChiA*, a més del comportament bifàsic esmentat, la linealitat V_0 vs [E] no es manté a concentracions elevades d'enzim. La velocitat de consum de (GlcNAc)₄ i formació de (GlcNAc)₂ i (GlcNAc)₃ es veuen afectades per la concentració d'enzim, disminuint quan la concentració d'enzim augmenta. Aquests resultats poden suggerir una possible inactivació enzimàtica a elevades concentracions d'enzim o bé una oligomerització enzimàtica que causa la disminució de l'activitat. Aquest efecte, en canvi, no s'observa en els mutants del residu assistent, a les concentracions assajades (*BcChiA D202A* fins a 88 μ M, *SmChiC D139A* fins a 17 μ M i *TkChiA D1022A* fins a 19 μ M).

Taula 3.2. Activitat específica ($V_0/[E]$) de les diferents quitinases wt i els mutants del residu assistent utilitzant (GlcNAc)₄ com a substrat

	Formació $V_0/[E]$ (min ⁻¹) ¹				Consum $V_0/[E]$ (min ⁻¹) ¹	
	(GlcNAc) ₂		(GlcNAc) ₃		(GlcNAc) ₄	
	0 – 2 min	2 – 20 min	0 – 2 min	2 – 20 min	0 – 2 min	2 – 20 min
<i>BcChiA wt</i>	4400 ± 600	127 ± 9	870 ± 80	22 ± 3	-2700 ± 120	-178 ± 66
<i>BcChiA D202A</i>	2,5 ± 0,3	0,14 ± 0,03	1,55 ± 0,02	0,09 ± 0,01	-6,63 ± 4,72	≈ -0,01
D202A/wt		1,1 × 10⁻³		4,1 × 10⁻³		5,6 × 10⁻⁵
<i>LpChiA wt</i>	23688 ± 2838	1689 ± 170	6824 ± 2056	540 ± 180	-22700 ± 7700	-2280 ± 1200
<i>LpChiA D316A</i>	4,1 ± 0,5	0,39 ± 0,08	2,9 ± 0,4	0,03 ± 0,01	-4,1 ± 1,5	-1,3 ± 0,5
D316A/wt		2,3 × 10⁻⁴		5,6 × 10⁻⁵		5,7 × 10⁻⁴
<i>SmChiC wt</i>	4230 ± 500	35 ± 5	1890 ± 90	<10	-2240 ± 400	-41 ± 3
<i>SmChiC D139A</i>	33 ± 5	2,0 ± 0,5	61 ± 45	<1	-53 ± 6	-3 ± 1
D139A/wt		5,7 × 10⁻²		≈10⁻¹		7,3 × 10⁻²
<i>SpChiD wt</i>	580 ± 170	8 ± 4	377 ± 90	8 ± 2	-460 ± 130	-27 ± 9
<i>SpChiD D151A</i>	0,23 ± 0,08	0,04 ± 0,03	1,2 ± 0,1	0,4 ± 0,1	-19,5 ± 5,1	-1,1 ± 0,5
D151A/wt		5,0 × 10⁻³		5,0 × 10⁻²		4,1 × 10⁻²
<i>PfChiB wt</i>	1460 ± 460	164 ± 71	510 ± 200	94 ± 10	-3625 ± 789	-196 ± 114
<i>PfChiB D524A</i>	75 ± 15	3,7 ± 1,8	46 ± 22	1,8 ± 1,1	-91 ± 2	-7 ± 3
D524A/wt		2,3 × 10⁻²		1,9 × 10⁻²		3,6 × 10⁻²
<i>TkChiA wt</i>	3070 ± 200	125 ± 20	780 ± 80	73 ± 8	-7080 ± 500	-65 ± 8
<i>TkChiA D1022A</i>	130 ± 20	3,7 ± 0,4	90 ± 10	7 ± 2	-340 ± 50	-6 ± 2
D1022A/wt		2,9 × 10⁻²		9,6 × 10⁻²		9,2 × 10⁻²

Condicions de reacció: 2 mM (GlcNAc)₄ en Na₂HPO₄ 50 mM pH 7. ¹Mitjana d'un mínim de 3 repeticions

Per a comparar les activitats entre els diferents enzims es fan servir les velocitats de l'estat estacionari (entre 2 i 20 minuts), tot i que s'observa un comportament similar per a les velocitats de l'estat pre-estacionari (Taula 3.2). Mentre que la formació de (GlcNAc)₃ equival a la velocitat d'hidròlisi de l'enllaç, la velocitat de formació de (GlcNAc)₂ és el doble de la velocitat d'hidròlisi d'un enllaç a causa de l'alliberació de dues molècules del mateix producte per cada esdeveniment de tall. Les quitinases bacterianes *BcChiA*, *LpChiA* i *SmChiC* són els enzims més actius en relació al consum de substrat i mostren una major

velocitat d'hidròlisi de l'enllaç glicosídic central del tetrasacàrid, és a dir, mostren una preferència d'unió entre els subsetis -2 i +2, amb una alliberació de $(\text{GlcNAc})_2$ més ràpida que de $(\text{GlcNAc})_3$, aquest últim provinent de la unió entre els subsetis -3 i +1, o amb menor preferència entre -1 i +3. Per a la quitinasa *SpChiD* i les dues d'arqueus, *PfChiB* i *TkChiA*, s'observa especificitats diferents, amb afinitats similars per ambdós modes d'unió, és a dir, velocitats d'hidròlisi semblants que donen lloc al disacàrid i trisacàrid com a productes (Figura 3.12). Aquest comportament es manté per als mutants del residu assistent, excepte per *SpChiD* D151A que sembla que presenti major afinitat d'unió entre els subsetis -3 i +1 o -1 i +3, alliberant més $(\text{GlcNAc})_3$ que $(\text{GlcNAc})_2$. La formació d'ambdós productes de reacció confirma l'activitat *endo-* d'aquests enzims, atès que són capaços d'hidrolitzar diferents enllaços de la cadena de quitina.

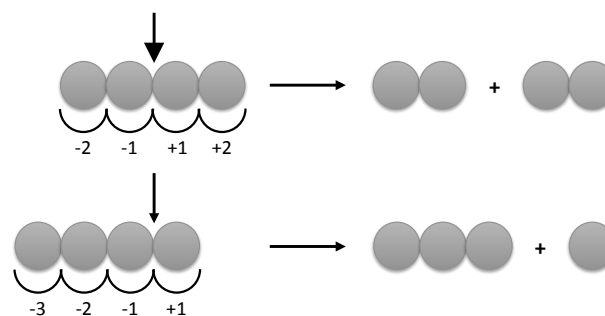


Figura 3.12. Representació esquemàtica del posicionament de $(\text{GlcNAc})_4$ en el centre actiu de les quitinases de la família GH18. Cercles gris clar: unitats d' *N*-acetilglucosamina.

Els mutants del residu assistent de *BcChiA* i *LpChiA* mostren una disminució de la velocitat de consum de $(\text{GlcNAc})_4$ d'entre 5 i 4 ordres de magnitud respecte els enzims *wt*, però en canvi, per a la resta de mutants aquesta disminució és només de 10^2 vegades. Per a la formació de $(\text{GlcNAc})_2$ i $(\text{GlcNAc})_3$ aquesta disminució de l'activitat del mutant respecte l'enzim *wt* també és més elevada per als mutants de *BcChiA* i *LpChiA* (Taula 3.2).

Els resultats indiquen diferències en la magnitud de l'efecte de la mutació del residu assistent entre les diferents quitinases que podrien explicar-se com a conseqüència de les dissimilituds estructurals entre aquestes.

Per una banda, les quitinases bacterianes de la subfamília A presenten un plegament de barril $(\beta/\alpha)_8$, un domini d'inserció $\alpha+\beta$ i diversos *loops* associats que resulten en una cavitat d'unió a substrat profunda que conté a més una quantitat considerable de residus aromàtics (Perrakis *et al.*, 1994; van Aalten *et al.*, 2000). En canvi, les quitinases del regne *Archaea*, que es classifiquen dins el tipus de quitinases de plantes, contenen també un plegament de barril $(\beta/\alpha)_8$ però no contenen el domini d'inserció $\alpha+\beta$ i conseqüentment presenten una cavitat poc profunda d'unió a substrat, amb només un triptòfan exposat en el subseti -1 (Terwisscha van Scheltinga, Hennig and Dijkstra, 1996; Nakamura *et al.*, 2007).

En relació a les quitinases caracteritzades en aquesta tesi, es troben resoltes les estructures de *BcChiA*, *SmChiC*, *SpChiD* i *PfChiB*. *BcChiA* presenta el domini $\alpha+\beta$ i una cavitat d'unió a substrat profunda (Matsumoto *et al.*, 1999), *SpChiD* també presenta aquest domini $\alpha+\beta$

però a més també presenta un *loop* addicional que ocupa part dels subetis negatius del centre catalític, característic d'aquesta quitinasa (Madhuprakash *et al.*, 2013). En canvi, *SmChiC*, tot i ser una quitinasa bacteriana no presenta aquest domini d'inserció (Payne *et al.*, 2012) i conseqüentment la cavitat d'unió a substrat és menys profunda, similar a la quitinasa d'arqueu *PfChiB* (Nakamura *et al.*, 2007). Les estructures de *LpChiA* i *TkChiA* no es troben resoltes però aquestes presenten una elevada identitat de seqüència amb *BcChiA* i *PfChiB*, respectivament. Així doncs, d'aquesta manera podria explicar-se el diferent efecte de la mutació del residu assistent, que és similar per una banda entre ambdues quitinases d'arqueus i *SmChiC* i per altra entre *BcChiA* i *LpChiA*, presentant un efecte més significatiu en aquestes últimes. L'efecte de la mutació en *SpChiD* es troba entre ambdues situacions.

Aquests resultats suggereixen una diferència en l'efecte de la mutació del residu assistent segons l'estructura del domini catalític de les quitinases de la família 18 de les glicosil hidrolases. Tot i que la mutació de l'Asp assistent provoca una disminució en l'activitat en totes les quitinases, la mutació d'aquest residu en quitinases que tenen el domini d'inserció $\alpha+\beta$ provoca un efecte més important en l'activitat hidrolasa de l'enzim, en comparació amb la mutació del mateix residu en quitinases que no contenen aquest domini d'inserció.

Ambdós mètodes d'anàlisi mostren una disminució de l'activitat dels mutants del residu assistent d'entre 10^2 i 10^4 vegades respecte els enzims *wt*, resultats que confirmen un rol important, tot i que no essencial, de l'Asp assistent en el mecanisme catalític hidrolasa de les quitinases de la família 18 de les glicosil hidrolases. Els resultats estan d'acord amb els pocs casos reportats sobre l'efecte de la mutació del residu assistent en l'activitat catalítica de quitinases GH18 entre els que es troben: *SmChiA* D313A i *SmChiB* D142A que presenten un 0,1% i 0,03% d'activitat, respectivament (Zakariassen *et al.*, 2011); el mutant de la quitinasa hevamina D125A un 2% (Bokma *et al.*, 2002) o el mutant *VhChiA* D313A que mostra una activitat $<0,1\%$ (Sirimontree *et al.*, 2014), respecte els enzims *wt* corresponents.

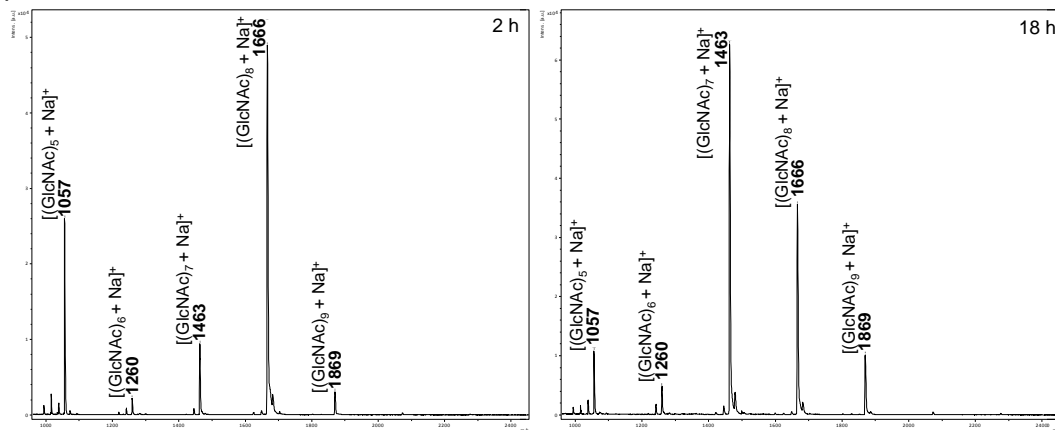
3.4. Anàlisi de l'activitat de transglicosidació amb (GlcNAc)₅ com a substrat

Amb el coneixement previ que els mutants del residu assistent mantenen certa activitat hidrolítica residual, s'ha volgut analitzar si mantenen la capacitat de dur a terme reaccions de TG a partir d'un quitooligosacàrid natural, concretament (GlcNAc)₅. L'activitat s'ha analitzat utilitzant $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ d'enzim i 24 mM de (GlcNAc)₅ en tampó fosfat 50 mM pH 7 a 37°C en agitació. A causa de l'elevada insolubilitat dels oligòmers de quitina amb DP>6 se segueix la formació de precipitat al llarg de la reacció. Al cap de 2 i 18 hores de reacció s'analitza el precipitat format per MALDI-TOF-MS (Figura 3.13, Taula 3.3).

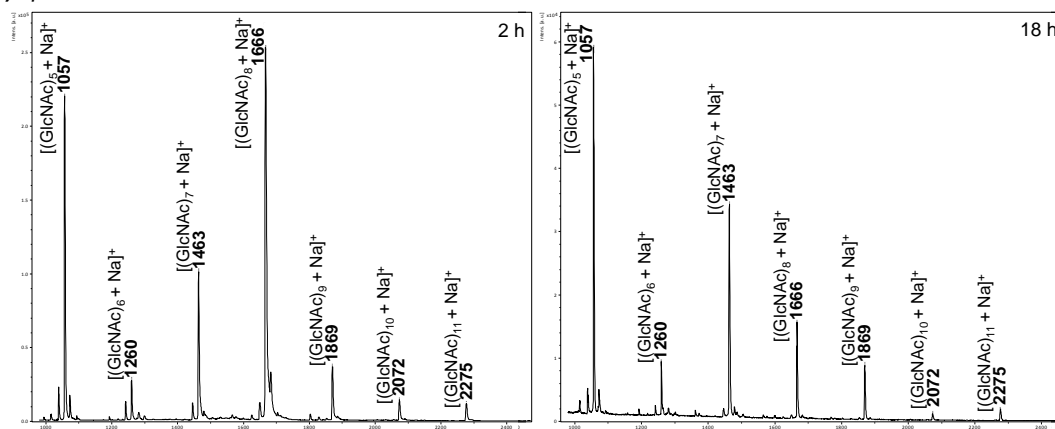
Tots els mutants mantenen la capacitat de formar nous enllaços glicosídics a partir de (GlcNAc)₅ com a substrat, donant lloc a una mescla de COS amb DPs entre 5 i 10. Al cap de 2 hores de reacció (GlcNAc)₈ és el producte majoritari seguit de (GlcNAc)₇, excepte per a *SmChiC* D139A en que aquest últim és el producte més abundant. En aquest temps de reacció els rendiments en polímer (p/p) són pràcticament negligibles (Taula 3.3). Al cap de 18 hores de reacció hi ha un increment del rendiment fins aproximadament un 30% per als

mutants d'*SmChiC*, *SpChiD*, *PfChiB* i *TkChiA*. En canvi, per al mutant *LpChiA* D316A el rendiment segueix essent insignificant i per a *BcChiA* D202A incrementa fins a un 12%. Aquests dos mutants són els que presenten una major disminució de l'activitat hidrolítica respecte l'enzim *wt* parental, que podria explicar una activitat de TG menor. En aquest temps de reacció, el producte majoritari passa a ser (GlcNAc)₇ seguit de (GlcNAc)₈ per a totes les quitinases.

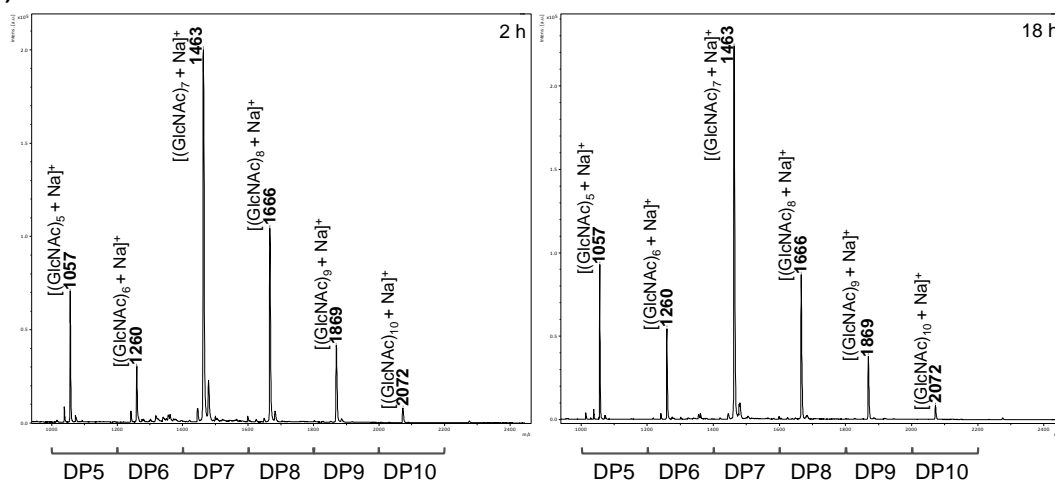
A) *BcChiA* D202A



B) *LpChiA* D316A



C) *SmChiC* D139A



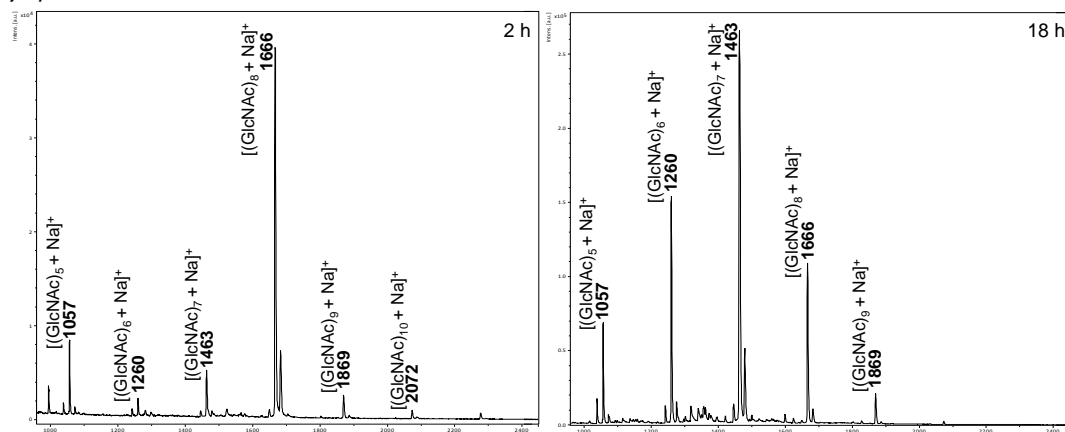
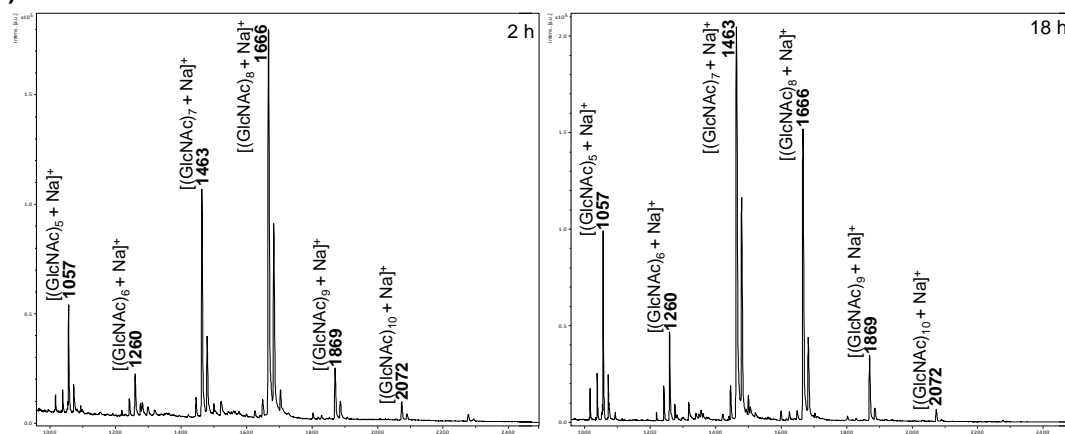
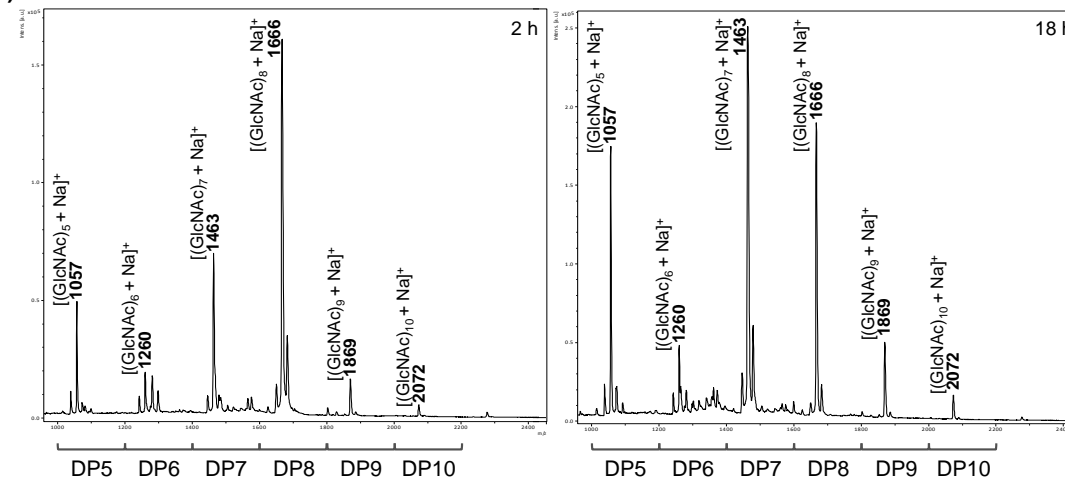
D) *SpChiD* D151AE) *PfChiB* D524AF) *TkChiA* D1022A

Figura 3.13. Espectre de masses dels productes de la fracció insoluble de la reacció de transglucosidació de $(\text{GlcNAc})_5$ catalitzada pels mutants del residu assistent de quitinases GH18. Productes obtinguts al cap de 2 h de reacció (esquerra) i 18 h de reacció (dreta). A) *BcChiA* D202A, B) *LpChiA* D316A, C) *SmChiC* D139A, D) *SpChiD* D151A, E) *PfChiB* D524A, F) *TkChiA* D1022A.

Taula 3.3. Productes de TG a partir de (GlcNAc)₅ com a substrat obtinguts pels mutants del residu assistent

Mutants del residu assistent	2 h de reacció			18 h de reacció		
	Pics (% Àrea)	Rendiment precipitat (p/p)	Rendiment aparent DP6-DP9 DP≥10	Pics (% Àrea)	Rendiment precipitat (p/p)	Rendiment aparent DP6-DP9 DP≥10
<i>BcChiA</i> D202A	DP8 (69,5%), DP5 (15,9%), DP7 (9,2%), DP9 (3,1%), DP6 (2,1%), DP10 (0,2%)	<2,5%	2,10%	DP7 (38,0%), DP8 (30,3%), DP5 (13,9%), DP9 (8,8%), DP6 (8,0%), DP10 (0,7%), DP11 (0,3%)	12%	10,21%
<i>LpChiA</i> D316A	DP8 (48,2%), DP5 (24,5%), DP7 (13,9%), DP9 (5,5%), DP6 (4,4%), DP10 (1,8%), DP11 (1,6%)	<2,5%	1,80%	DP5 (38,5%), DP7 (32,6%), DP8 (12,0%), DP9 (7,3%), DP6 (7,1%), DP11 (1,5%), DP10 (0,9%)	<2,5%	1,47%
<i>SmChiC</i> D139A	DP7 (61,2%), DP8 (26,6%), DP5 (4,5%), DP9 (4,2%), DP6 (2,1%), DP10 (1,3%)	<2,5%	2,36%	DP7 (75,8%), DP8 (8,7%), DP5 (6,5%), DP6 (4,4%), DP9 (3,8%), DP10 (0,8%), DP11 (0,1%)	38%	35,12%
<i>SpChiD</i> D151A	DP8 (78,9%), DP5 (10,5%), DP7 (3,8%), DP9 (3,5%), DP6 (1,7%), DP10 (1,2%), DP11 (<0,5%)	<2,5%	2,20%	DP7 (66,5%), DP8 (19,5%), DP6 (8,8%), DP5 (3,5%), DP9 (1,6%)	30%	28,95%
<i>PfChiB</i> D524A	DP8 (66,5%), DP7 (24,1%), DP5 (3,6%), DP9 (2,9%), DP10 (1,6%), DP6 (1,2%), DP11 (0,2%)	<2,5%	2,37%	DP7 (44,1%), DP8 (27,6%), DP5 (13,0%), DP6 (7,1%), DP9 (7,0%), DP10 (1,1%)	30%	25,77%
<i>TkChiA</i> D1022A	DP8 (68,6%), DP7 (20,7%), DP6 (4,2%), DP5 (3,8%), DP9 (2,0%), DP10 (0,4%), DP11 (0,2%)	<2,5%	2,39%	DP8 (50,9%), DP7 (24,7%), DP5 (12,2%), DP6 (6,8%), DP9 (4,1%), DP10 (1,3%)	35%	30,28%

Resultats obtinguts a partir dels espectres de MALDI-MS de les reaccions de transglicosidació de (GlcNAc)₅. Condicions de reacció: 24 mM de substrat, 1 mg·mL⁻¹ d'enzim en

50 mM Na₂HPO₄ pH 7 a 37°C. DPn fa referència a (GlcNAc)_n

El rendiment aparent (DP6-DP9) és l'abundància de COS d'entre DP6 i DP9 (productes de TG) calculat com el producte del percentatge d'àrea dels pics pel rendiment de precipitat.

El rendiment aparent (DP≥10) és l'abundància de COS ≥ DP10 (producte de condensació de dues molècules de (GlcNAc)₅) calculat com el producte del percentatge de l'àrea dels pics pel rendiment de precipitat.

Tot i la mutació del residu Asp per Ala, els mutants segueixen presentant activitat de TG que dona lloc a una mescla de COS amb DPs entre 5 i 10, però amb rendiments de producte molt baixos. La formació de (GlcNAc)₈ i (GlcNAc)₇ com a productes majoritaris suggereix una preferència de posicionament de (GlcNAc)₅ entre els subetis -3 i +2 o -2 i +3, resultats que coincideixen amb l'activitat *endo*- dels enzims. A més, la presència de (GlcNAc)₆ i (GlcNAc)₉ no és gaire notòria, el que indica una baixa hidròlisi dels enllaços dels extrems.

Tot i que els enzims mantenen l'activitat transglicosidasa amb (GlcNAc)₅ com a substrat, amb l'objectiu d'afavorir la reacció de condensació cap a la formació de polímer (DP>10) s'aplica l'estratègia glicosintasa amb l'ús d'un COS activat, (GlcNAc)₅-ox, com a donador. Amb l'ús del derivat oxazolina es pretén accelerar la segona etapa de reacció (desglicosidació) i afavorir així la reacció de polimerització.

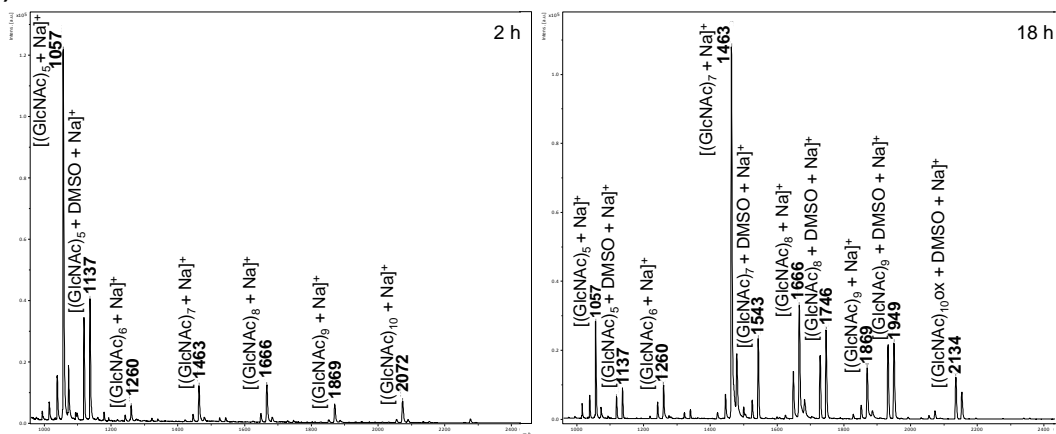
3.5. Anàlisi de l'activitat glicosintasa dels mutants del residu assistent amb (GlcNAc)₅-ox com a substrat

Per a l'anàlisi de l'activitat glicosintasa dels mutants del residu assistent s'ha utilitzat el derivat oxazolina de pentaacetilquitopentaosa, (GlcNAc)₅-ox, com a donador per a la reacció d'auto-condensació per a la obtenció de (GlcNAc)₁₀.

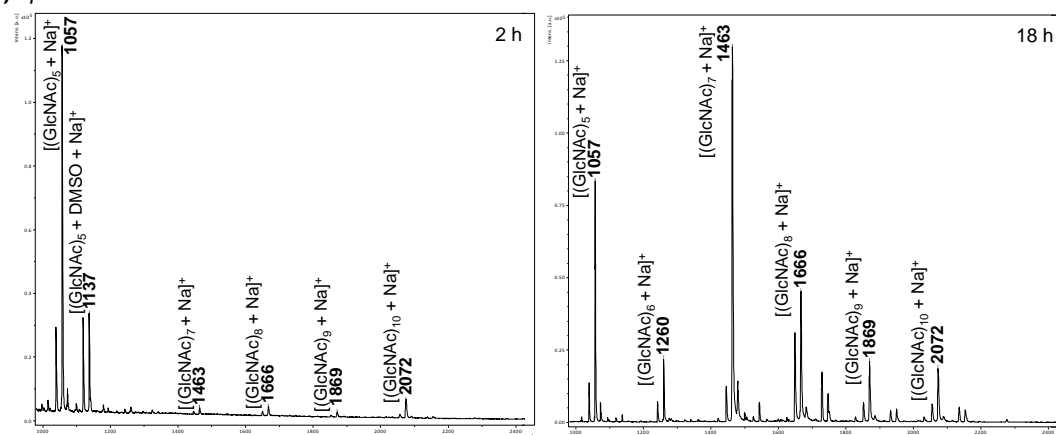
L'activitat s'ha analitzat utilitzant 1 mg·mL⁻¹ d'enzim i 24 mM de (GlcNAc)₅-ox en tampó fosfat 50 mM pH 7 a 37°C en agitació. A causa de l'elevada insolubilitat dels oligòmers de quitina (>DP6), se segueix la formació de precipitat al llarg de la reacció, indicador de que ha tingut lloc la reacció de polimerització. Al cap de 2 i 18 hores s'atura la reacció per centrifugació, es liofilitza el precipitat format i s'analitza per MALDI-TOF-MS (Figura 3.14).

La Taula 3.4 mostra l'anàlisi dels resultats extrets dels espectres de MALDI-TOF-MS en els que es mostra el percentatge (en àrea) de cadascun dels productes que formen part del precipitat format (procediment d'anàlisi descrit al capítol 2).

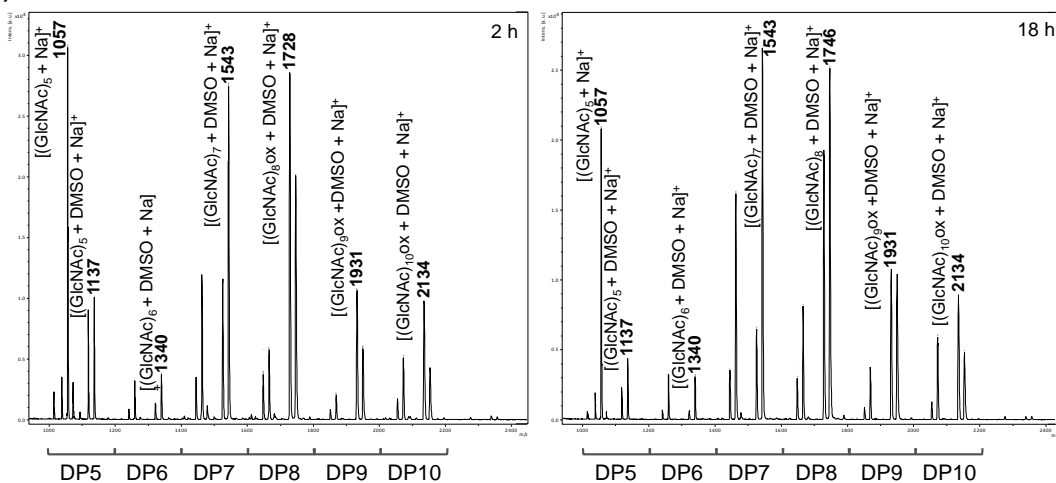
A) BcChiA D202A



B) LpChiA D316A



C) SmChiC D139A



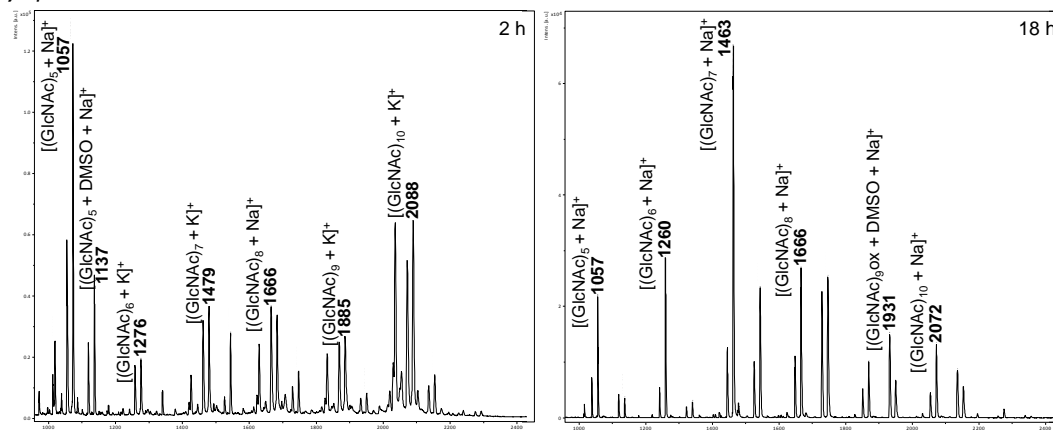
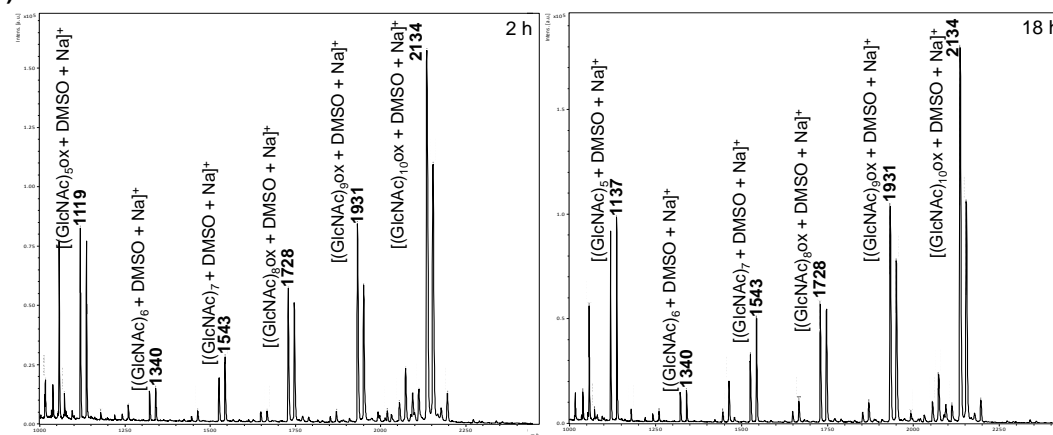
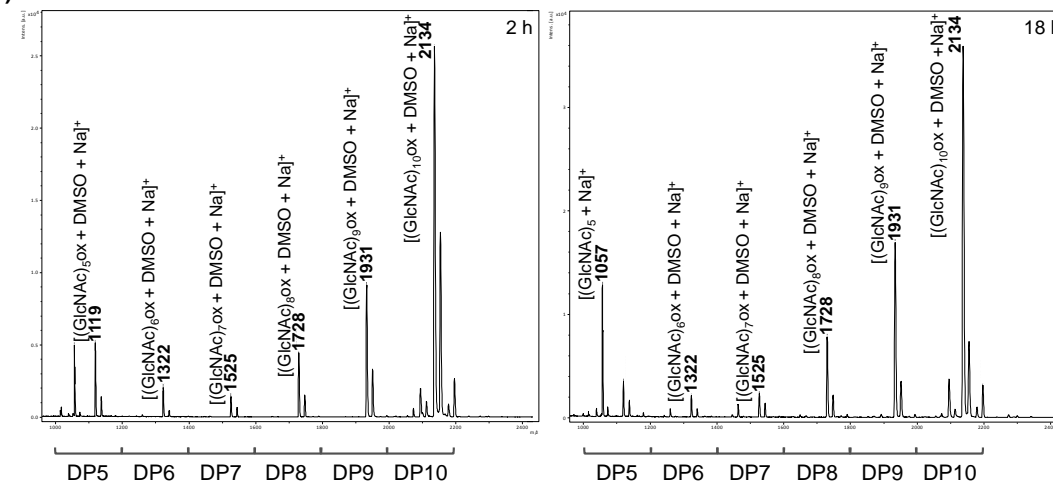
D) *SpChiD* D151AE) *PfChiB* D524AF) *TkChiA* D1022A

Figura 3.14. Espectre de masses dels productes de la fracció insoluble de la reacció de polimerització de (GlcNAc)₅-ox catalitzada pels mutants del residu assistent de les quitinases GH18. Productes obtinguts al cap de 2 h de reacció (esquerra) i 18 h de reacció (dreta). A) *BcChiA* D202A, B) *LpChiA* D316A, C) *SmChiC* D139A, D) *SpChiD* D151A, E) *PfChiB* D524A, F) *TkChiA* D1022A.

Taula 3.4. Productes glicosintasa de la reacció de polimerització de (GlcNAc)₅-ox catalitzada pels mutants del residu assistent

Mutant del residu assistent	2 h de reacció			18 h de reacció		
	Pics (% Àrea)	Rendiment precipitat (p/p)	Rendiment aparent DP6-DP9 DP≥10	Pics (% Àrea)	Rendiment precipitat (p/p)	Rendiment aparent DP6-DP9 DP≥10
<i>BcChiA</i> D202A	DP5 (76,8%), DP8 (6,9%), DP7 (6,3%), DP10 (4,0%), DP9 (2,8%), DP6 (2,4%), DP11-12 (<0,8%)	<2,5%	0,46%	DP7 (40,0%), DP8 (26,6%), DP9 (16,2%), DP5 (8,3%), DP10 (5,5%), DP6 (3,4%)	10,7%	9,22%
<i>LpChiA</i> D316A	DP5 (91,3%), DP10 (4,3%), DP8 (1,9%), DP7 (1,3%), DP9 (1,1%)	<2,5%	0,11%	DP7 (37,1%), DP8 (27,4%), DP5 (12,0%), DP9 (9,5%), DP10 (9,3%), DP6 (4,4%), DP11-15 (<0,3%)	<2,5%	1,96%
<i>SmChiC</i> D139A	DP8 (34,3%), DP7 (26,9%), DP10 (11,9%), DP5 (11,8%), DP9 (11,6%), DP6 (2,9%), DP11-12 (<0,6%)	33,6%	25,44%	DP8 (34,1%), DP7 (27,9%), DP9 (15,5%), DP10 (12,0%), DP5 (7,2%), DP6 (2,8%), DP11-12 (<0,5%)	47,5%	38,14%
<i>SpChiD</i> D151A	DP10 (42,2%), DP5 (27,2%), DP7 (11,4%), DP8 (9,8%), DP9 (7,6%), DP6 (1,7%), DP15 (<0,1%)	2,5%	0,76%	DP7 (33,8%), DP8 (29,5%), DP9 (12,8%), DP10 (10,7%), DP6 (7,1%), DP5 (5,4%), DP11-13 (<0,8%)	47,9%	39,85%
<i>PfChiB</i> D524A	DP10 (50,9%), DP9 (17,6%), DP5 (12,6%), DP8 (12,0%), DP7 (4,4%), DP6 (2,2%), DP15 (0,3%)	8,2%	2,97%	DP10 (42,9%), DP9 (21,8%), DP5 (12,2%), DP8 (11,8%), DP7 (8,8%), DP6 (2,3%), DP15 (0,2%)	36,9%	16,49%
<i>TkChiA</i> D1022A	DP10 (64,8%), DP9 (16,6%), DP5 (7,5%), DP8 (6,9%), DP6 (2,1%), DP7 (1,9%), DP15 (0,1%)	20,9%	5,75%	DP10 (55,0%), DP9 (20,6%), DP5 (9,5%), DP8 (9,0%), DP7 (3,5%), DP6 (2,2%), DP11 (0,2%)	44,7%	15,78%

Resultats obtinguts a partir dels espectres de MALDI-MS de les reaccions de polimerització de (GlcNAc)₅-ox. Condicions de reacció: 24 mM de substrat, 1 mg·mL⁻¹ d'enzim en 50 mM Na₂HPO₄ pH 7 a 37°C. DPn fa referència a (GlcNAc)_n.

El rendiment aparent (DP6-DP9) és l'abundància de COS d'entre DP6 i DP9 (productes d'hidròlisi o TG) calculat com el producte del percentatge d'àrea dels pics pel rendiment de precipitat.

El rendiment aparent (DP≥10) és l'abundància de COS ≥ DP10 (productes glicosintasa) calculat com el producte del percentatge de l'àrea dels pics pel rendiment de precipitat.

Al cap de 2 hores d'incubació es comença a formar precipitat en totes les reaccions catalitzades pels diferents mutants. L'anàlisi per MALDI-TOF-MS revela que el precipitat format és una barreja de COS, entre el que es troba $(\text{GlcNAc})_{10}$, producte resultant de la reacció de condensació de dues molècules de $(\text{GlcNAc})_5\text{-ox}$, corresponent a la reacció tipus glicosintasa.

$(\text{GlcNAc})_{10}$ és el producte majoritari en les reaccions catalitzades per *SpChiD* D151A, *PfChiB* D524A i *TkChiA* D1022A (amb una proporció del 42,2%, 50,9% i 64,8%, respectivament). En les tres reaccions, el precipitat format consta d'una mescla de COS entre $(\text{GlcNAc})_5$ i $(\text{GlcNAc})_{15}$, aquest últim resultant de la unió de 3 molècules del donador inicial. En la reacció catalitzada per *LpChiA* D316A, el sòlid analitzat és una barreja de COS d'entre $(\text{GlcNAc})_5$ i $(\text{GlcNAc})_{10}$, essent $(\text{GlcNAc})_5$ el producte majoritari (més del 90%), seguit de $(\text{GlcNAc})_{10}$. *BcChiA* D202A i *SmChiC* D139A donen lloc a un patró de polimerització similar, que resulta en una barreja de COS amb graus de polimerització entre 5 i 12, essent $(\text{GlcNAc})_7$ i $(\text{GlcNAc})_8$ els productes majoritaris provinents de TG. En el cas de *BcChiA* D202A, també hi ha una presència notòria de $(\text{GlcNAc})_5$, de la mateixa manera que en el cas de *LpChiA* D316A.

La presència de $(\text{GlcNAc})_5$, producte soluble en aigua, pot explicar-se bé a causa de romanents de la fracció soluble o bé, com a producte que ha quedat atrapat durant la precipitació dels polímers insolubles.

Els rendiments en polímer són realment baixos, <2,5% (p/p), per als mutants de les quitinases bacterianes, excepte per a *SmChiC* D139A amb el que s'obté un rendiment del 34%, però $(\text{GlcNAc})_{10}$ no és el producte majoritari. En canvi, per als mutants de les quitinases d'arqueus, *PfChiB* D524A i *TkChiA* D1022A, els rendiments en polímer són 8,2% i 20,9%, respectivament. Aquests resultats indiquen una baixa activitat de transglicosidació/glicosintasa, utilitzant el derivat oxazolina de $(\text{GlcNAc})_5$ com a donador, en temps de reacció curts (fins a 2 h). A més, suggereixen que, en aquestes condicions, aquesta activitat és més elevada en quitinases d'arqueus que no en quitinases bacterianes. De la mateixa manera que succeeix amb l'activitat d'hidròlisi, el mutant *SmChiC* D139A té un comportament diferent a la resta de quitinases bacterianes, i més similar al de quitinases d'arqueus, donant lloc a la obtenció d'un major rendiment en polímer al cap de 2 h de reacció.

Al cap de 18 h de reacció, tot i que s'observa un increment en el rendiment en polímer, $(\text{GlcNAc})_{10}$ és hidrolitzat donant lloc a un increment dels productes intermedis $(\text{GlcNAc})_5\text{-}(\text{GlcNAc})_9$. En el cas dels mutants de les quitinases bacterianes, els productes majoritaris esdevenen $(\text{GlcNAc})_7$ i $(\text{GlcNAc})_8$. En canvi, en el cas dels mutants de les quitinases d'arqueus, *PfChiB* D524A i *TkChiA* D1022A, tot i que augmenta la presència de COS amb DPs entre 5 i 9, $(\text{GlcNAc})_{10}$ es manté com el producte majoritari, amb un increment del rendiment en polímer fins al 40% aproximadament. Les quitinases d'arqueus són hipertermòfiles, i sota les condicions de reacció assajades (37°C) es troben molt per sota de la seva temperatura òptima, el que pot ser la causa de que hi hagi menor activitat d'hidròlisi i per tant presentin rendiments de TG més elevats.

L'increment dels COS intermedis amb graus de polimerització entre DP6 i DP9 pot provenir tant de reaccions de TG, activitat que s'ha vist que presenten aquests enzims quan s'utilitza $(\text{GlcNAc})_5$ com a substrat, com de la hidròlisi de $(\text{GlcNAc})_{10}$, a causa de l'activitat hidrolítica residual (Figura 3.15). Cal destacar que en totes les reaccions analitzades $(\text{GlcNAc})_6$ és el COS menys abundant fet que indica una baixa hidròlisi del primer enllaç des de l'extrem no-reductor de $(\text{GlcNAc})_5$ -ox.

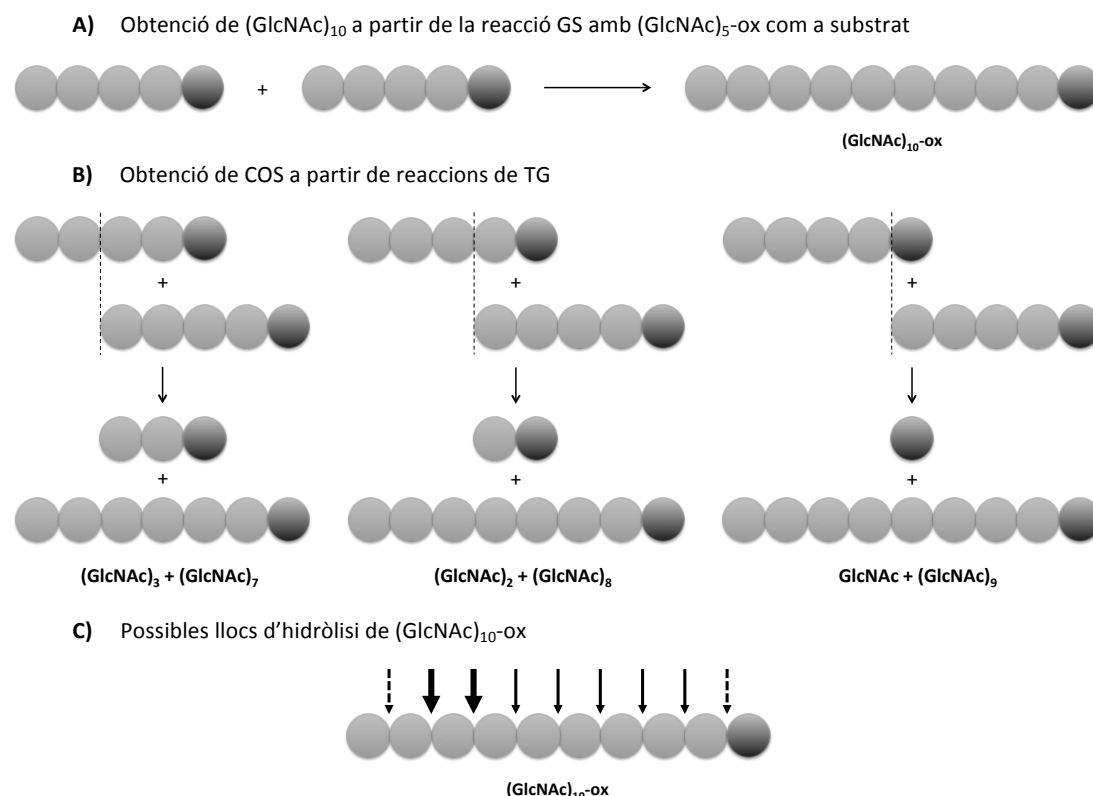


Figura 3.15. Representació esquemàtica dels COS obtinguts en la reacció de polimerització de $(\text{GlcNAc})_5$ -ox. A) Representació de la reacció GS en la que es dona la condensació de dues molècules de $(\text{GlcNAc})_5$ -ox. B) Representació de la reacció de TG. Hidròlisi i transferència d'un oligòmer de quitina a un substrat acceptor ($(\text{GlcNAc})_5$ -ox). C) Possibles llocs d'hydròlisi de $(\text{GlcNAc})_{10}$ -ox, producte resultant de la unió de dues molècules de $(\text{GlcNAc})_5$ -ox. Cercles gris clar: unitats d' *N*-acetilglucosamina; cercles gris fosc: derivat oxazolina d' *N*-acetilglucosamina.

En efecte, l'ús del derivat oxazolina $(\text{GlcNAc})_5$ -ox afavoreix que es doni directament l'etapa de desglicosidació donant lloc a la reacció de condensació amb la obtenció de $(\text{GlcNAc})_{10}$ com a producte majoritari, a diferència de la reacció amb $(\text{GlcNAc})_5$ que dona lloc a $(\text{GlcNAc})_8$ i $(\text{GlcNAc})_7$ principalment. Conseqüentment, el rendiment en precipitat incrementa per als mutants de les quitinases d'arqueus i d'*SmChiC* en temps de reacció curts (2 h). Al cap de 18 hores de reacció els rendiments en precipitat són lleugerament superiors per als mutants d'*SmChiC*, *SpChiD*, *PfChiB*, *TkChiA*, amb l'ús de $(\text{GlcNAc})_5$ -ox, però en canvi no hi ha diferències per als mutants de *BcChiA* i *LpChiA* en comparació amb la reacció de TG amb $(\text{GlcNAc})_5$ com a substrat. El perfil de COS obtinguts amb ambdós substrats és diferent en temps de reacció curts, donant lloc a la formació de COS amb DPs superiors amb l'ús del derivat oxazolina. En canvi, a causa de l'activitat hidrolítica residual

dels mutants, en temps de reacció llargs el perfil de COS de les quitinases bacterianes és semblant per als dos substrats però no per a les quitinases d'arqueus, amb les que (GlcNAc)₁₀ es manté com a producte majoritari amb l'ús de (GlcNAc)₅-ox.

Els sis mutants aquí estudiats donen lloc a la polimerització enzimàtica de (GlcNAc)₅-ox que resulta en una mescla de COS fins a (GlcNAc)₁₅. Els oligòmers insolubles formats inicialment són hidrolitzats al cap de temps de reacció més llargs, el que resulta en un increment dels COS amb graus de polimerització entre 5 i 9, com a conseqüència de l'activitat hidrolítica residual dels mutants. Aquests resultats coincideixen amb les observacions reportades per Martínez *et al.* amb els mutants del residu assistent de les quitinases A de *B. circulans* i *T. harzanium* (Martinez *et al.*, 2012) on observen que l'oligomerització de (GlcNAc)₂-ox resulta en una mescla de COS amb DPs parells i senars, aquests últims explicats com a resultat d'esdeveniments de transglicosidació a partir d'oligòmers inicialment formats. Es conclou que la mutació del residu assistent no elimina l'activitat de TG dels enzims *wt*.

En aquesta tesi s'utilitza un donador més llarg, (GlcNAc)₅-ox, amb l'objectiu d'obtenir oligòmers més llargs que, a causa de la seva insolubilitat, precipitaran i suposadament haurien de ser menys accessibles per aquestes reaccions de TG posteriors. Tot i així, s'ha obtingut una mescla de COS amb DPs intermedis. Pel fet que l'activitat hidrolítica dels mutants segueix essent significant (només ha disminuït entre 10² i 10⁴ vegades respecte els enzims *wt*), es donen reaccions tant d'hidròlisi com de TG dels productes glicosintasa inicials, aquestes últimes demostrades també amb l'ús de (GlcNAc)₅ com a substrat, que resulten en una mescla de productes complexa. En efecte, (GlcNAc)₁₀ és el producte majoritari en temps de reacció curts per 4 de les quitinases estudiades, però aquest decreix al llarg de la reacció. El perfil de productes varia entre les quitinases estudiades, però en totes s'observa esdeveniments d'hidròlisi i/o TG.

3.6. Conclusions

L'estratègia glicosintasa convencional, aplicada en glicosil hidrolases amb retenció de configuració, basada en la generació d'un enzim glicosintasa per eliminació del residu nucleofílic (Mackenzie *et al.*, 1998; Malet and Planas, 1998; Planas, Fajés and Codera, 2015) no es pot aplicar directament en glicosidases que operen per catàlisi assistida per substrat. En el seu lloc, l'estratègia es basa en la mutació del residu assistent per a reduir (i idealment eliminar) l'activitat hidrolasa i subministrar un derivat oxazolina com a donador per a la reacció de condensació amb un acceptor. Mentre que aquesta estratègia tipus glicosintasa ha estat aplicada amb èxit en les endo-β-N-acetilglucosaminidases GH85 (Umekawa *et al.*, 2008; Yang and Wang, 2017), la seva aplicació en d'altres famílies GH amb mecanisme assistit per substrat (quitinases GH18, hexosaminidases GH20, hialuronidases GH56) es troba menys explorada. Amb l'objectiu de desenvolupar una glicosintasa per a la obtenció d'oligòmers/polímers de quitina estructuralment definits, en aquesta tesi s'ha aplicat l'estratègia glicosintasa en 6 quitinases GH18, per mitjà de la substitució del residu assistent.

La mutació del Asp assistent per una Ala en quitinases GH18 que operen per catàlisi assistida per substrat té un efecte important, però no essencial, en l'activitat hidrolítica de quitooligosacàrids, donant lloc a una disminució de l'activitat d'entre 10^2 i 10^4 vegades respecte l'enzim *wt*. Amb l'ús d'un derivat oxazolina com a substrat, (GlcNAc)₅-ox, té lloc la reacció de condensació que resulta en la formació de (GlcNAc)₁₀, però també tenen lloc d'altres reaccions d'hidròlisi i TG. Per aquest motiu, l'activitat hidrolítica residual dels mutants és massa elevada com per a conferir-lis una activitat glicosintasa pràctica. Aquests resultats concorden amb les observacions prèviament reportades en les quitinases de *B. circulans* i *T. harzanium* amb el derivat oxazolina de quitobiosa. En aquesta tesi s'ha estudiat la reacció GS amb un donador més llarg, (GlcNAc)₅-ox, amb l'objectiu d'obtenir oligòmers/polímers insolubles que poguessin ser resistents a posteriors reaccions pels mutants hidrolíticament compromesos. Tot i així, el balanç entre l'activitat hidrolítica residual i la relació solubilitat/precipitació segueix conduint a reaccions d'hidròlisi i TG sobre els productes formats.

Es conclou que la mutació puntual del residu assistent en quitinases GH18 no és suficient per a introduir una activitat glicosintasa eficient. La incorporació de mutacions addicionals sobre aquest mutant simple, amb l'objectiu de disminuir l'activitat hidrolítica però mantenir la capacitat d'acceptar un donador oxazolina per a la reacció de condensació, és el següent pas per al desenvolupament d'un biocatalitzador funcional per a la polimerització controlada de quitooligosacàrids.

CAPÍTOL 4

Capítol 4. Disseny d'una glicosintasa a partir de la quitinasa D de *Serratia proteamaculans* (*SpChiD*)

D'entre les diferents quitinases caracteritzades, el mutant del residu assistent d'*SpChiD* és la quitinasa bacteriana que presenta una major formació de $(\text{GlcNAc})_{10}$, tot i que aquest és hidrolitzat al llarg del temps. A més, la quitinasa *wt* és la que presenta major activitat de TG reportada i per altra banda està àmpliament estudiada, pel que es troben reportats varis mutants amb els que s'ha aconseguit disminuir l'activitat hidrolítica i/o incrementar l'activitat de TG. Per aquests motius, s'ha decidit continuar amb el disseny d'una glicosintasa a partir del mutant D151A d'*SpChiD*.

4.1. Quitinasa D de *Serratia proteamaculans*. Antecedents.

Serratia proteamaculans és un bacteri gram-negatiu endo-fagocític de plantes. La seqüència genòmica de *S. proteamaculans* 568 consta de com a mínim 11 marcs de lectura oberts (ORFs) potencialment involucrats en el processament de quitina que codifiquen per a quatre quitinases de la família GH18, tres proteïnes d'unió a quitina de la família 33, una *N*-acetilhexosaminidasa de la família 20, dues proteases (proteasa d'unió a quitina i una metaloproteasa) i una polisacàrid desacetilasa no-específica, fet que mostra que el bacteri és una font rica d'enzims involucrats en la degradació de la quitina (Purushotham and Podile, 2012).

Les quitinases *SpChiA*, *SpChiB* i *SpChiC* van ser anomenades en concordança amb la similitud de seqüència amb les quitinases *ChiA*, *ChiB* i *ChiC* de *Serratia marcescens*, respectivament. *SpChiA* comparteix un 94% d'identitat de seqüència amb *SmChiA* i consta d'un pèptid senyal seguit d'un domini PKD en l'extrem N-terminal i un domini catalític GH18. *SpChiB* comparteix un 94% d'identitat de seqüència amb *SmChiB*, i conté un domini catalític GH18 en l'extrem N-terminal i un domini d'unió a quitina (ChBD), que forma part de la família 5 dels dominis d'unió a carbohidrats (CBM5), en l'extrem C-terminal. A diferència d'*SpChiA*, no conté cap pèptid senyal. Per altra banda, *SpChiC* mostra una identitat de seqüència del 87% amb *SmChiC*, i conté el domini catalític GH18 a l'extrem N-terminal seguit d'un domini PKD i un ChBD, de la família CBM12, en l'extrem C-terminal. *SpChiC* tampoc conté cap pèptid senyal. Les tres quitinases *SpChiA*, *SpChiB* i *SpChiC* mostren l'activitat i capacitat d'unió més elevades davant β -quitina i mostren un ampli rang d'especificitat de substrat; a més, alliberen el dímer com a producte majoritari tant de substrats oligomèrics com polimèrics. *SpChiA* i *SpChiB* són enzims processius mentre que *SpChiC* és no-processiva (Purushotham, Sarma and Podile, 2012).

Fins al moment només eren descrites 3 quitinases per a *Serratia marcescens*, així doncs la quarta quitinasa de *S. proteamaculans* va ser anomenada *ChiD*. Recentment, s'ha descrit la quarta quitinasa de *S. marcescens* (*SmChiD*) i s'ha vist que mostra un 85% d'identitat amb l'estructura cristal·logràfica (PDB: 4NZC) d'*SpChiD* (Vaikuntapu *et al.*, 2016).

4.1.1 Estructura d'*SpChiD*

La quitinasa D de *S. proteamaculans* és l'única quitinasa no modular d'aquest organisme, i consta només d'un domini catalític GH18. La seqüència proteica consta de 426 aminoàcids que codifiquen per la quitinasa amb el pèptid senyal a l'extrem N-terminal, de 19 aminoàcids, i el domini catalític GH18 (Ser29-Asp406). L'enzim sense el pèptid senyal té una massa molecular de 44,7 kDa.

SpChiD té un 78% de similitud de seqüència proteica amb la quitinasa II de *K. pneumoniae*, i només un 26% amb la ChiB de *S. marcescens*. Conté els dos motius DxExE i SxGG, altament conservats en quitinases de la família GH18. Els tres residus àcids que formen part del motiu DxExE corresponen a l'Asp149, Asp151 i Glu153, mentre que el motiu SxGG està format pels residus Ser110-Gly113.

El domini catalític està format per 14 cadenes β i 10 hèlix- α de les quals 8 cadenes β i 8 α formen part del *TIM barrel*. L'estructura adopta el plegament $(\alpha/\beta)_8$ típic de quitinases GH18 i presenta el domini d'inserció $\alpha+\beta$ entre les cadenes $\beta 7$ i $\beta 8$, pel que forma part de la subfamília A de quitinases bacterianes. A més, l'accés a la cavitat d'unió a substrat es troba parcialment bloquejat per un *loop* format pels residus Asn30-Asp42, amb els residus Val35 i Thr36 situats a la part frontal. La presència d'aquest *loop* disminueix la grandària de la cavitat d'unió a substrat, en comparació amb d'altres quitinases (Figura 4.1).

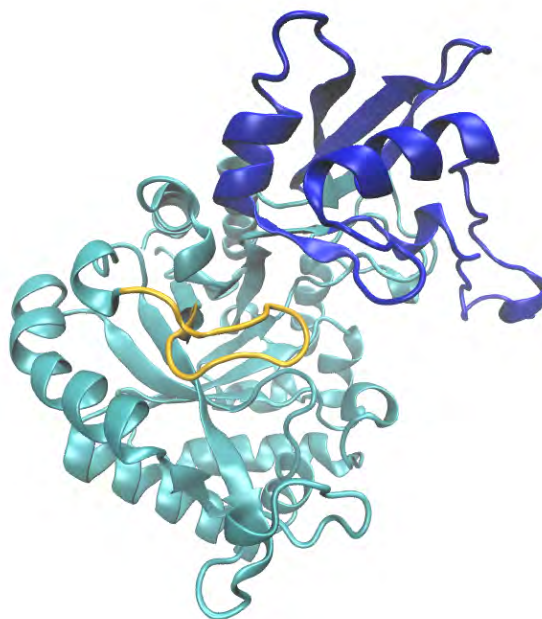


Figura 4.1. Estructura de la quitinasa *SpChiD* (PDB: 4NZC)

En blau es mostra el domini d'inserció $\alpha + \beta$ i en groc el *loop* Asn30-Asp42, que ocupa part de la cavitat d'unió a substrat.

El *loop* es troba altament estabilitzat per la presència d'interaccions d'hidrogen intra-*loop*. A més, la presència i posicionament d'aquest *loop* sembla ser responsable de l'activitat de TG de l'enzim. El *loop* contribueix a estabilitzar el residu GlcNAc situat en el subseti -1

mitjançant un important nombre d'interaccions. A conseqüència d'aquestes interaccions addicionals, un cop es dona la hidròlisi del substrat, l'oligòmer es manté unit en aquesta posició de tal manera que quan entra un nou oligòmer de quitina es dona lloc a la formació de l'enllaç glicosídic (Madhuprakash *et al.*, 2013).

A més, també cal destacar que la cavitat d'unió a substrat d'*SpChiD* conté 4 triptòfans (Trp114, Trp160, Trp290 i Trp395), dels quals Trp160 i Trp290 se situen a l'entrada i Trp114 i Trp395 se situen en la cavitat catalítica. La presència de residus aromàtics en el centre actiu incrementa l'afinitat d'unió pel substrat, fet que implica un paper important d'aquests en l'activitat de TG (Madhuprakash, Bobbili, *et al.*, 2015).

La cadena polipeptídica es troba plegada en dues parts entre les quals es forma la cavitat d'unió a substrat. D'entre les dues parts emergeix el *loop* Asn30-Asp42 i s'introdueix dins la cavitat. La regió N-terminal, que forma la part inferior, conté els tres residus àcids catalítics (Asp149, Asp151 i Glu153), amb la cadena lateral del Glu153 que sobresurt cap a la cavitat. A causa de la presència del *loop*, el nombre de subetis que conté *SpChiD* és inferior respecte la resta de quitinases (Figura 4.2).

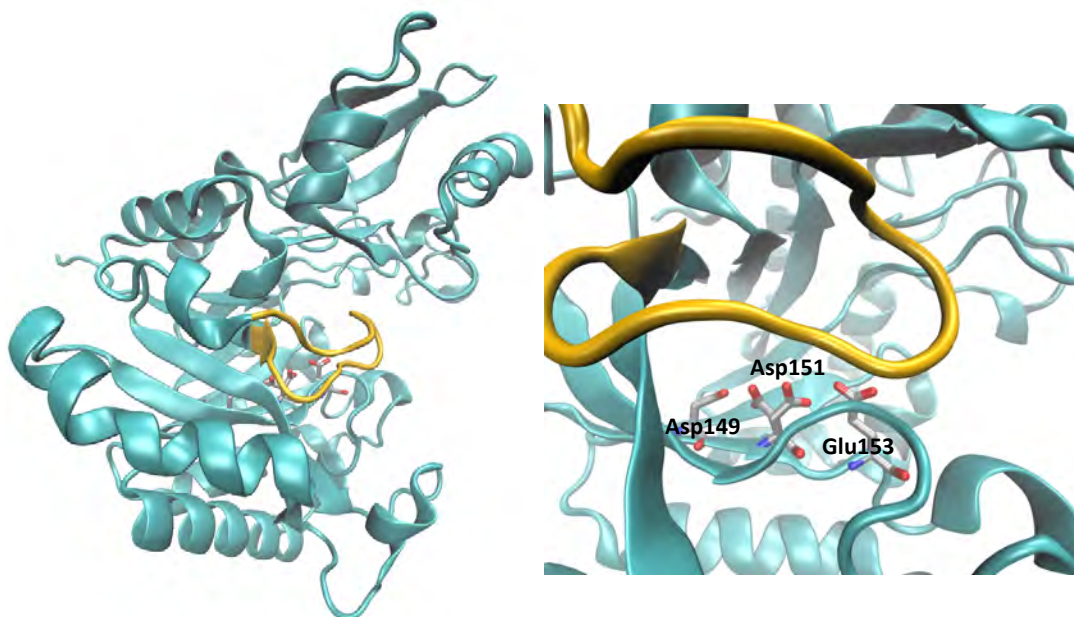


Figura 4.2. Estructura d'*SpChiD* on es mostra els residus del motiu DxDxE (PDB: 4NZC)

Esquerra: Estructura en la que s'observa el plegament independent de les regions N- i C- de la proteïna. Dreta: Ampliació de la cavitat d'unió a substrat en la que es mostra els 3 residus catalítics que formen part del motiu DxDxE, en la que s'observa les dues conformacions de l'Asp assistent (Asp151). En groc es representa el *loop* Asn30-Asp42, característic de la quitinasa *SpChiD*.

La resolució de les estructures d'*SpChiD* ha permès identificar diferents residus que presenten dues conformacions, fet que s'ha relacionat amb el rol que tenen aquests residus en la catàlisi. Els residus catalítics es troben posicionats de tal manera que el Glu153 està orientat apropiadament per a interaccionar amb l'enllaç glicosídic entre els residus situats en els subetis -1 i +1. El residu Asp151 mostra dues conformacions diferents en

l'estructura de l'enzim lliure amb les mateixes ocupacions cristal·logràfiques (PDB: 4NZC) (Figura 4.2). En una primera conformació, es troba orientat cap a l'Asp149 i formen pont d'hidrogen, i alhora la Ser110 forma un pont d'hidrogen amb un dels àtoms oxigen carboxílics. En canvi, en l'altra conformació, l'Asp151 es troba girat cap al Glu153 i formen pont d'hidrogen, essent aquesta la orientació adequada del Glu153 per a interaccionar amb el substrat i donar lloc a la hidròlisi. La Ser110 també mostra dues conformacions diferents. En l'estat de repòs, la Ser110 es troba girada cap a l'Asp149, en canvi, en l'altra conformació la Ser110 es gira cap a l'Asp151, el que es considera com a estat intermedi. Sembla ser que l'ambient al voltant de la Ser110 és el que indueix la doble conformació de l'Asp151, ja que la Ser110 es troba envoltada per dos residus aromàtics, Tyr28 i Phe58, amb els quals forma interaccions de van der Waals en l'estat de repòs o en l'estat intermedi, respectivament. Cal tenir en compte que la Ser110 forma ponts d'hidrogen amb l'Asp149 en ambdós estats, tant en el de repòs com en l'estat intermedi. Quan la Ser110 es troba en l'estat intermedi, es donen restriccions estèriques severes que provoquen el canvi de posició de l'Asp151. L'estructura indica que la Ser110 protona l'Asp151, que consegüentment protona el Glu153 (Madhuprakash *et al.*, 2013).

SpChiD és considerada un enzim processiu, a causa de la presència de la inserció $\alpha\beta$ entre les cadenes $\beta 7$ i $\beta 8$ del *TIM barrel*, i també per la presència d'un triptòfan adjacent al motiu SxGG (Trp114). Tot i així, la cavitat d'unió a substrat és més oberta que en el cas d'*SmChiA* i *SmChiB*, el que suggereix una activitat *endo-* de l'enzim. Aquests fets estructurals, juntament amb l'activitat hidrolítica de l'enzim, fan que *SpChiD* sigui considerada una endoquitinasa processiva.

4.1.2. Caracterització bioquímica d'*SpChiD*

SpChiD presenta màxima activitat hidrolítica amb tampó acetat de sodi 50 mM a pH 6, i manté una activitat relativa de >60% a pH 5 i 9. En relació a la temperatura òptima, l'enzim mostra la màxima activitat a 40°C (Figura 4.3).

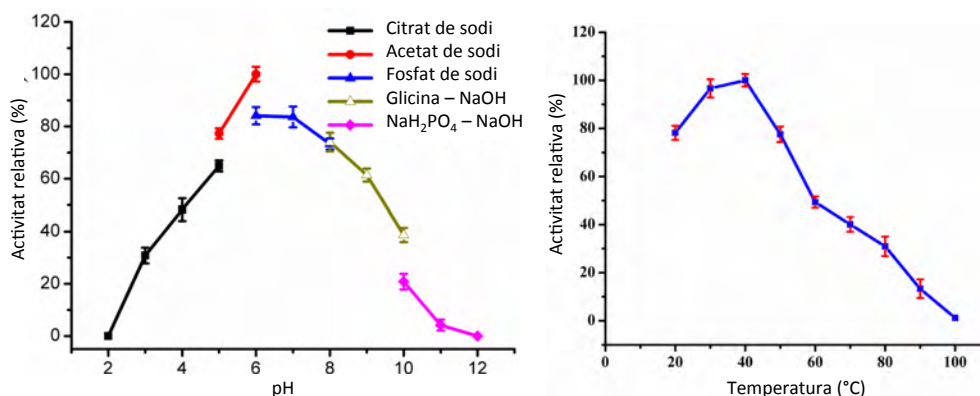


Figura 4.3. Perfils de pH i temperatura d'*SpChiD*

Imatge adaptada de Purushotham *et al.* (Purushotham and Podile, 2012).

SpChiD mostra activitat davant varis substrats polimèrics. Presenta l'activitat més elevada amb quitosà clorhidrat seguida de glicolquitina, quitina col·loïdal, β -quitina, quitosà DA=10% i α -quitina. A més, és actiu hidrolíticament davant diferents COS ((GlcNAc)₂-(GlcNAc)₆), i dona lloc a GlcNAc, majoritàriament, i quitobiosa com a productes finals d'hidròlisi. Hidrolitza ràpidament (GlcNAc)₃ i (GlcNAc)₄, i més lentament (GlcNAc)₂, (GlcNAc)₅ i (GlcNAc)₆. L'activitat davant (GlcNAc)₂ indica que l'enzim presenta activitat quitobiosa, essent una propietat característica i única d'*SpChiD*, ja que la quitobiosa és el producte majoritari per a la majoria de quitinases bacterianes.

Per altra banda, *SpChiD* mostra una elevada activitat de transglicosidació a partir de (GlcNAc)₃-(GlcNAc)₆ com a substrats, que resulta en la formació d'una mescla de COS amb diferents graus de polimerització. A partir de (GlcNAc)₃, *SpChiD* dona lloc a GlcNAc-(GlcNAc)₆, essent (GlcNAc)₄-(GlcNAc)₆ productes provinents de TG. A partir de (GlcNAc)₄ es forma fins a (GlcNAc)₉, i també s'obté una mescla de COS amb DP fins a (GlcNAc)₁₀ a partir de (GlcNAc)₅ i (GlcNAc)₆ com a substrats. Les mateixes mostres de reacció analitzades per MALDI-TOF indiquen la formació de COS fins a (GlcNAc)₁₃ a partir de (GlcNAc)₆ com a substrat. La proporció màxima de productes de TG, que correspon a un 10,8% ((GlcNAc)₅ + (GlcNAc)₆), ja que la resta de productes no són quantificables per la manca de patrons), s'obté a partir de (GlcNAc)₄ com a substrat al cap de 45 minuts de reacció. *SpChiD* és la quitinasa amb una activitat de TG més elevada descrita fins al moment, i en la que els productes de TG es retenen durant més temps (Purushotham and Podile, 2012).

Variacions en la concentració d'enzim i substrat suggereixen que la eficiència de TG, en termes de nombre i concentració de productes de TG, depèn principalment de la ràtio de concentracions, és a dir, la formació de productes de TG és inversament proporcional a la concentració d'enzim i directament proporcional a la concentració de substrat.

Cal destacar que *SpChiD* no presenta diferència temporal entre l'activitat hidrolítica i de TG, és a dir, ambdós productes provinents d'hidròlisi i de TG apareixen simultàniament des de temps inicials de reacció.

4.1.3. Modificació de l'activitat de TG d'*SpChiD* mitjançant mutagènesi

Amb l'objectiu d'incrementar l'activitat de TG i entendre la relació d'aquesta amb l'activitat hidrolítica de l'enzim, es troben reportats diferents estudis de mutagènesi dirigida en els que s'analitza tant l'activitat hidrolítica com l'activitat de TG dels diferents mutants (Taula 4.1).

Taula 4.1. Activitat hidrolítica i de TG dels mutants de la quitinasa *SpChiD* reportats en bibliografia

Enzim	Activitat hidrolítica (Act. Esp. relativa (%))	Activitat TG	Rendiment (%) ¹	% TG ²	% conv ³	T _{opt.} ⁴	Observacions	Referències
<i>SpChiD wt</i>	100% ⁶	DP4 --> <u>DP5</u> + <u>DP6</u> + altres	10,9% (DP5+DP6)	6,3% (DP5), 4% (DP6)	62,5%	30 min		(Madhuprakash <i>et al.</i> , 2012)
<i>SpChiD wt</i>	100% ⁶	DP4 --> <u>DP5</u> + <u>DP6</u> + altres	11% (DP5+DP6)	-	83%	15 min		(Madhuprakash <i>et al.</i> , 2018)
E153D	49,8% ⁶	DP4 --> <u>DP5</u> + <u>DP6</u> + altres	2% (DP5 + DP6)	1% (DP5), 1,1% (DP6)	12,5%	6 h		(Madhuprakash <i>et al.</i> , 2012)
Y154A	151,3% ⁶	DP4 --> <u>DP5</u> + <u>DP6</u> + altres	15,4% (DP5+DP6)	8,8% (DP5), 4,6% (DP6)	65%	5 min		(Madhuprakash <i>et al.</i> , 2012)
M220A	204,9% ⁶	DP4 --> <u>DP5</u> + <u>DP6</u> + altres	19% (DP5+DP6)	12% (DP5), 5,8% (DP6)	75%	6 h		(Madhuprakash <i>et al.</i> , 2012)
Y222A	168,9% ⁶	DP4 --> <u>DP5</u> + <u>DP6</u> + altres	16,9% (DP5+DP6)	13,6% (DP5), 6,8% (DP6)	80%	6 h		(Madhuprakash <i>et al.</i> , 2012)
R278A	190,5% ⁶	DP4 --> <u>DP5</u> + <u>DP6</u> + altres	13,5% (DP5+DP6)	9,8% (DP5), 6,2% (DP6)	80%	3 h		(Madhuprakash <i>et al.</i> , 2012)
F58W	160,7% ⁶	DP4 --> <u>DP5</u> + <u>DP6</u> + altres	20,8% (DP5+DP6)	12,9% (DP5), 6,6% (DP6)	75%	1 h		(Madhuprakash <i>et al.</i> , 2012)
S110G	74,9% ⁶	DP4 --> <u>DP5</u> + <u>DP6</u> + altres	21% (DP5+DP6)	11,7% (DP5), 8,8% (DP6)	72,5%	3 h		(Madhuprakash <i>et al.</i> , 2012)
F119A	71,8% ⁶	DP4 --> <u>DP5</u> + <u>DP6</u> + altres	20,3% (DP5+DP6)	10,4% (DP5), 7,8% (DP6)	67,5%	6 h		(Madhuprakash <i>et al.</i> , 2012)
W241A	75,8% ⁶	DP4 --> <u>DP5</u> + <u>DP6</u> + altres	16,4% (DP5+DP6)	9,8% (DP5), 7,2% (DP6)	58,4%	6 h		(Madhuprakash <i>et al.</i> , 2012)
G113S	72,8% ⁶	DP4 --> <u>DP5</u> + <u>DP6</u> + altres	18,4% (DP5+DP6)	9,5% (DP5), 8,4% (DP6)	60%	6 h		(Madhuprakash <i>et al.</i> , 2012)
G113W	11,2% ⁶	DP4 --> <u>DP5</u> + <u>DP6</u> + altres	2% (DP5 + DP6)	0,8% (DP5), 1,1% (DP6)		6 h		(Madhuprakash <i>et al.</i> , 2014)
W114A	830,6% ⁶	DP4 --> <u>DP5</u> + <u>DP6</u> + altres	2,3% (DP5+DP6)	1% (DP5), 0,5% (DP6)	65%	5 min		(Madhuprakash <i>et al.</i> , 2012)
G195W	113,6% ⁶	DP4 --> <u>DP5</u> + <u>DP6</u> + altres	18,8% (DP5+DP6)	8,6% (DP5), 8,6% (DP6)	50%	90 min		(Madhuprakash <i>et al.</i> , 2014)
W290A	262,3% ⁷	DP4 --> <u>DP5</u> + <u>DP6</u> + altres	7,3% (DP5+DP6)	4,3% (DP5), 6,3% (DP6)	81,3%	30 min		(Madhuprakash, Bobbili, <i>et al.</i> , 2015)
W395A	N.A. ⁷	DP4 --> <u>DP5</u> + <u>DP6</u> + altres	7,5% (DP5+DP6)	12,4% (DP5), 4,3% (DP6)	80%	12 h		(Madhuprakash, Bobbili, <i>et al.</i> , 2015)

Enzim	Activitat hidrolítica (Act. Esp. relativa (%))	Activitat TG	Rendiment (%) ¹	% TG ²	% conv ³	T _{opt.} ⁴	Observacions	Referències
Y28A	N.A. ⁷	DP4 → DP5 + DP6 + altres	9,2% (DP5+DP6)	9,3% (DP5), 6,8% (DP6)	90%	8 h		(Madhuprakash, Bobbili, <i>et al.</i> , 2015)
T36G	77,8% ⁷	DP4 → DP5 + DP6 + altres	-	3,8% (DP5), 5,8% (DP6)			3,8% (DP5, 30 min), 5,8% (DP6, 5 min)	(Madhuprakash, Bobbili, <i>et al.</i> , 2015)
T36F	90,9% ⁷	DP4 → DP5 + DP6 + altres	-	4,3% (DP5), 9% (DP6)			4,3% (DP5, 60 min), 9% (DP6, 30 min)	(Madhuprakash, Bobbili, <i>et al.</i> , 2015)
E153D/F58W	5,7% ⁶	DP4 → DP5 + DP6 + altres	7,3% (DP5+DP6)	5,9% (DP5), 0,8% (DP6)	10%	6 h		(Madhuprakash <i>et al.</i> , 2012)
ΔAsn30-Asp42	N.A. ⁷	DP4 → DP5 + DP6 + altres	8,5% (DP5+DP6)	9,7% (DP5), 8,4% (DP6)	90%	8 h		(Madhuprakash, Bobbili, <i>et al.</i> , 2015)
Y28A	107% ⁶	DP4 → DP5 + DP6 + altres	21% (DP5+DP6)	-			[DP5] màx. a les 3 h; [DP6] màx. als 45 min. Traces DP7-DP8 per HPLC	(Madhuprakash <i>et al.</i> , 2018)
Y222A	115% ⁶	DP4 → DP5 + DP6 + altres	21% (DP5+DP6)	-			[DP5] màx. als 15 min; [DP6] màx. als 60 min. Traces DP7-DP8 per HPLC	(Madhuprakash <i>et al.</i> , 2018)
Y226W	20% ⁶	DP4 → DP5 + DP6 + altres	15% (DP5+DP6)	-			[DP5] màx. als 15 min; [DP6] màx. als 5 min. Traces DP7-DP8 per HPLC	(Madhuprakash <i>et al.</i> , 2018)
D151N ⁵	0,6% ⁶	DP4 → DP5 + DP6 + altres	19% (DP5+DP6)	-			[DP5] màx. a les 12 h; [DP6] màx. a les 6 h. Traces DP7-DP8 per HPLC	(Madhuprakash <i>et al.</i> , 2018)
D151N/Y28A	0,3% ⁶	DP4 → DP5 + DP6 + altres	15% (DP5+DP6)	-	75%	24 h	traces DP7-DP8 per HPLC	(Madhuprakash <i>et al.</i> , 2018)
D151N/Y222A	0,7% ⁶	DP4 → DP5 + DP6 + altres	22% (DP5+DP6)	-			[DP5] màx. a les 8,8 h; [DP6] màx. a les 24 h. Traces DP7-DP8 per HPLC	(Madhuprakash <i>et al.</i> , 2018)
D151N/Y226W	0,6% ⁶	DP4 → DP5 + DP6 + altres	22% (DP5+DP6)	-			[DP5] i [DP6] màx. a les 12 h. Traces DP7-DP8 per HPLC	(Madhuprakash <i>et al.</i> , 2018)
D151N/Y226W/Y28A	0,2% ⁶	DP4 → DP5 + DP6 + altres	17% (DP5+DP6)	-	57%	24 h	traces DP7-DP8 per HPLC	(Madhuprakash <i>et al.</i> , 2018)
D151N/Y226W/Y222A	0,8% ⁶	DP4 → DP5 + DP6 + altres	22% (DP5+DP6)	-			[DP5] màx. a les 6 h; [DP6] màx. a les 12 h. Traces DP7-DP8 per HPLC	(Madhuprakash <i>et al.</i> , 2018)

¹ Rendiment (%) de productes de transglucosidació; ² %TG: productes de TG en relació als productes totals a temps de reacció òptim; ³ % conversió: percentatge de substrat consumit a temps de reacció òptim; ⁴ t_{opt.}: temps de reacció òptim (quan el %TG és màxim); ⁵ mutant del residu assistent; ⁶ Activitat específica relativa respecte l'enzim wt, a partir de (GlcNAc)₄ com a substrat; ⁷ Activitat específica relativa respecte l'enzim wt, a partir de quitina col·loidal com a substrat. En negreta estan marcats els valors que es troben reportats en bibliografia.

Inicialment es va dissenyar diferents mutants simples de residus localitzats en el centre catalític (Y154A, E153D, M220A, Y222A i R284A), en el solc catalític (F58W, G113S, S110G, F119A i W114A) i en la regió accessible al solvent (W241A) (Madhuprakash *et al.*, 2012).

De les mutacions del centre catalític, la mutació del glutamat que actua d'àcid/base general per un aspartat (E153D) resulta en una disminució substancial tant de l'activitat d'hidròlisi com de TG, fet que suggereix que la longitud de la cadena lateral del Glu153 és important no només per a la hidròlisi sinó també per a l'activitat de TG. En canvi, les altres 4 mutacions mostren un increment en l'activitat hidrolítica.

Mutacions dels residus Met220 i Tyr222 per alanina han resultat en un increment de l'activitat de TG respecte l'enzim *wt*. Ambdós residus tot i que interaccionen amb el substrat, no estan implicats directament en la catàlisi. La substitució M220A provoca la disminució d'interaccions hidrofòbiques necessàries per al ritme normal de reacció, fet que causa que l'intermedi oxazolina pugui quedar-se més temps retingut en el centre catalític, i així afavorir la reacció de TG. Per la seva part, el residu Tyr222 estabilitza l'estat de transició. A més, les mutacions M220A i Y222A comporten cadenes laterals més curtes, que donen lloc a una cavitat més gran, que revela la possibilitat d'un increment en l'activitat de TG a causa d'una disminució de la velocitat de reacció d'hidròlisi. L'Arg278, localitzada en la cadena $\beta 7$ del *TIM barrel*, forma interaccions de parell iònic amb el substrat, i la mutació d'aquest residu per una alanina dona lloc a un increment gradual de la proporció dels productes de TG, que resulta en la formació d'una quantitat més elevada de (GlcNAc)₆ que (GlcNAc)₅ al cap de 30 minuts, però aquesta proporció de (GlcNAc)₅ i (GlcNAc)₆ és revertida al cap de 3 hores. En canvi, la mutació de la Tyr154 per una Ala resulta en una disminució de l'activitat de TG en relació al temps de TG (de 90 min per a l'enzim *wt* a 45 min per al mutant Y154A), resultats que indiquen que el grup hidroxil fenòlic és important per a mantenir l'activitat de TG al llarg del temps.

En relació als mutants de residus del solc catalític, l'activitat hidrolítica es veu disminuïda per a tots els mutants, excepte pel mutant F58W, en el que es veu augmentada un 60% respecte *SpChiD wt*. La mutació del residu Phe58, localitzat en la cadena $\beta 2$ del *TIM barrel*, per un Trp resulta en un increment en la síntesi de productes de TG, que perduren fins les 6 hores de reacció. Tot i que tant la Phe com el Trp són residus aromàtics, la cadena lateral del Trp, més voluminosa, facilita les interaccions amb el substrat entrant, i a més, el Trp assisteix en el posicionament correcte i guiatge de la molècula de sucre cap al centre actiu. Per altra banda, els residus Gly113 i Trp114 participen en el manteniment de l'arquitectura del solc catalític. La mutació W114A resulta en un increment de l'activitat hidrolítica i una disminució de l'activitat de TG, a causa de l'absència del residu aromàtic que duu a terme el guiatge del substrat cap al solc catalític i el consegüent increment de molècules d'aigua en el solc catalític. En canvi, l'activitat de TG es veu incrementada amb la mutació G113S, a causa de les interaccions d'apilament preexistents amb el Trp114, que es veuen augmentades per la presència del grup hidroxil de la Ser. La mutació de la Ser110, localitzada en la cadena $\beta 3$ i amb la cadena lateral situada entre els dos residus Asp de la tríada catalítica, per una Gly resulta en una disminució de l'activitat hidrolítica i un

increment simultani de l'activitat de TG. El mutant F119A també resulta en un increment de l'activitat de TG, a causa de canvis en les interaccions donats per la substitució d'un residu aromàtic per una Ala. El residu Phe119 és un residu altament conservat en les quitinases de la família 18, i interacciona mitjançant interaccions π - π i CH- π amb el Trp152, localitzat entre els residus Asp151 i Glu153 de la tríada catalítica.

Per últim, la mutació del W241A també dona lloc a una disminució de l'activitat hidrolítica i un increment de l'activitat de TG a causa de l'alteració de l'activitat inherent d'*SpChiD* per la substitució de la cadena lateral voluminosa del Trp, que interacciona amb els anells piranosos del substrat mitjançant interaccions d'apilament, per una Ala.

Modificacions de residus tant del centre catalític com del solc catalític donen lloc a enzims més actius en relació a l'activitat de TG, independentment de l'activitat hidrolítica que presenten, essent els mutants S110G i Y222A els que presenten un major increment de l'activitat de TG, amb els que s'obté fins a un 20% de productes de TG ((GlcNAc)₅ + (GlcNAc)₆) respecte el total de productes provinents de la hidròlisi de (GlcNAc)₄ (Madhuprakash *et al.*, 2012).

En un segon estudi (Madhuprakash *et al.*, 2014), amb la hipòtesi d'augmentar l'activitat de TG mitjançant l'increment del temps de retenció del substrat en el centre catalític, es generen els mutants G113S, G113W, W114A i G195W. La regió on es localitzen els residus G113 i W114 és considerada el punt d'entrada del substrat. La mutació G113S dona lloc a una disminució de l'activitat hidrolítica i un increment de l'activitat de TG, en canvi, la mutació d'aquest residu per un Trp, dona lloc a una disminució d'ambdues activitats. La substitució per un Trp provoca un augment de les interaccions amb el substrat, que se sumen a les interaccions del Trp120, a més d'un bloqueig de l'entrada al solc catalític que dificulta l'entrada de molècules al centre actiu. La mutació del residu Trp114 per una Ala dona lloc a un increment de l'activitat hidrolítica i una disminució de l'activitat de TG. El mutant W114A mostra un ampli espai en l'entrada del substrat per on poden accedir fàcilment les molècules de substrat però també les molècules d'aigua, donant lloc a un increment de l'activitat d'hidròlisi i simultàniament una disminució de l'activitat de TG. Per altra banda, el residu Gly195 es troba situat en el subseti +2, és a dir, en la sortida del solc catalític, i la mutació d'aquest per un Trp dona lloc a un increment en l'activitat de TG, a causa de la cadena lateral voluminosa que provoca un tancament parcial de la sortida del centre actiu. L'increment de l'activitat de TG pot ser a causa d'un increment de l'afinitat pel substrat com a conseqüència de l'elevat nombre d'interaccions per pont d'hidrogen; o bé, a causa de la introducció d'un pegat hidrofòbic que impedeix l'entrada de molècules d'aigua, desfavorint la reacció d'hidròlisi. Aquests fets es tradueixen en un increment en el temps de retenció de l'intermedi oxazolina o del substrat en el centre actiu, que afavoreixen la reacció de TG. Aquests resultats mostren la possibilitat d'augmentar l'activitat de TG mitjançant un bloqueig parcial de la sortida del producte de la zona activa.

A més a més, mitjançant estudis de mutagènesi s'ha demostrat que l'activitat de TG i l'activitat quitobiasa d'*SpChiD*, única i característica d'aquesta quitinasa, estan inversament relacionades (Madhuprakash, Bobbili, *et al.*, 2015).

Per una banda, s'ha dissenyat els 4 mutants resultants de substituir per una Ala els 4 triptòfans presents en la cavitat d'unió a substrat d'*SpChiD* (Trp114, Trp160, Trp290 i Trp395), i en cap dels mutants s'ha perdut l'activitat quitobiasa característica d'*SpChiD*, però sí hi ha hagut canvis en l'activitat de TG. La presència de residus Trp en la cavitat d'unió a substrat sembla augmentar l'afinitat d'unió a substrat, fet que influeix en l'activitat de TG d'*SpChiD*. Mutacions dels residus Trp114, Trp160 i Trp290 indiquen que aquests residus són necessaris per a l'activitat de TG, essent els més importants els dos primers. La baixa activitat de TG del mutant W290A es veu eliminada quan es combina amb la mutació W160A, a causa de l'increment del trànsit de molècules d'aigua conseqüència de la important disminució d'hidrofobicitat de la cavitat d'unió. En canvi, la mutació W395A afecta la velocitat inicial de catàlisi i l'enzim presenta activitat de TG màxima al cap de 12 h.

Per altra banda, la meitat de l'espai de la cavitat d'unió a substrat d'*SpChiD* es troba ocupada pel *loop* Asn30-Asp42, que conté els residus Val35 i Thr36 que afavoreixen interaccions no-covalents amb el substrat entrant. Mutacions dels residus Val35 i Thr36 (V35G, T36G i T36F) donen lloc a una disminució de l'activitat quitobiasa causada per perturbacions en el posicionament o en la unió de la molècula (GlcNAc)₂, en canvi, mantenen l'activitat de TG. La deleció del *loop* sencer provoca una pèrdua total de l'activitat quitobiasa de l'enzim, però un increment de l'activitat de TG respecte l'enzim *wt*, que es prolonga fins a les 24 h. Per últim, el mutant Y28A també mostra una pèrdua completa de l'activitat quitobiasa i una disminució en la velocitat d'hidròlisi de (GlcNAc)₄ acompanyada d'un increment en l'activitat de TG. Perturbacions en el rol d'estabilització de càrrega que duu a terme la Tyr28 prolonguen el temps de retenció del substrat o de l'intermedi oxazolina en la cavitat d'unió i conseqüentment es promou l'activitat de TG. Tant la mutació de la Tyr28 com l'eliminació del *loop* Asn30-Asp42 sencer no només eliminen l'activitat quitobiasa d'*SpChiD* sinó que també afecten l'activitat hidrolítica davant substrats polimèrics de quitina. Tot i així, aquests mutants produeixen elevades quantitats de productes de TG, sobretot (GlcNAc)₆, el que indica una relació inversa entre les activitats quitobiasa i de TG. Malgrat tot, els rendiments en TG d'aquests mutants són <10% (Madhuprakash, Bobbili, *et al.*, 2015).

Ja a la finalització de la part experimental d'aquesta tesi, Madhuprakash *et al.* reporten noves mutacions importants per a l'estabilització de l'intermedi de reacció i per a la unió a substrat situades tant en els llocs d'unió al donador com en els llocs d'unió a acceptor i identifiquen tres mutants amb efectes beneficiosos sobre l'activitat de TG: Y28A (que té un efecte en el subseti -1 i en l'intermedi de reacció), Y222A (que afecta l'intermedi de reacció) i Y226W (que té un efecte en el subseti +2) (Madhuprakash *et al.*, 2018). Amb tots els mutants s'obté una mescla de COS amb graus de polimerització entre DP1-DP8 a partir de (GlcNAc)₄ com a substrat.

Els mutants Y28A i Y222A mostren una activitat d'hidròlisi, utilitzant (GlcNAc)₄ com a substrat, similar o lleugerament superior a l'enzim *wt*. En canvi, mostren un increment en l'activitat de TG, tant en l'acumulació de productes com en la durada d'aquests. L'anell benzè de la Tyr28 interacciona amb el -CH₃ del grup *N*-acetil del monòmer GlcNAc situat en

el subseti -1 mitjançant interaccions hidrofòbiques d'apilament. A més, per similitud amb l'estructura de la quitinasa B de *S. marcescens*, en que es troba l'estructura resolta en complex amb (GlcNAc)₅ i s'ha observat un moviment d'aquesta Tyr cap al primer Asp del motiu DxDxE, es suggereix un moviment d'aquesta Tyr28 cap a l'Asp149, quan es dona la unió a substrat, per a compensar la pèrdua temporal d'interaccions d'hidrogen a causa de la rotació de l'Asp151 cap al Glu153. Per altra banda, també per similitud amb l'estructura d'*SmChiB*, en relació a la Tyr222, quan hi ha unió del substrat, el grup hidroxil d'aquesta forma un pont d'hidrogen amb l'oxigen carbonílic del grup *N*-acetil del monòmer situat en el subseti -1. Aquesta interacció ajuda al posicionament del grup *N*-acetil per a l'atac nucleofílic sobre el carboni anomèric i probablement es manté en l'intermedi oxazolina. La mutació d'aquests residus afecta les propietats de l'intermedi de reacció i influencia la susceptibilitat d'aquest de ser atacat per una molècula d'aigua o un sucre acceptor. Tot i la implicació d'aquests residus en la catàlisi, la mutació d'aquests residus en *SpChiD* no sembla variar la velocitat d'hidròlisi de (GlcNAc)₄. A diferència d'aquests dos mutants, la mutació de la Tyr226, situada en el subseti +2, per un Trp dona lloc a una disminució de l'activitat hidrolítica i una ràpida acumulació de productes de TG, que són hidrolitzats ràpidament.

A més, també s'ha substituït l'Asp151, corresponent al segon Asp del motiu DxDxE, per una asparagina i s'ha obtingut una disminució de l'activitat hidrolítica $\geq 99\%$, i un increment de l'activitat de TG amb un rendiment en (GlcNAc)₅+(GlcNAc)₆, com a productes de TG, del 19%. Aquesta mutació no només provoca una disminució en l'activitat hidrolítica de l'enzim sinó que afecta l'intermedi oxazolina. L'Asp assistent estabilitza l'estat de transició i l'intermedi oxazolina en major mesura que no un residu Asn en aquesta posició, el que explica l'efecte negatiu d'aquesta substitució en l'activitat d'hidròlisi. Considerant la important interacció d'aquest residu amb l'intermedi oxazolina, una Asn en aquesta posició estabilitza l'intermedi en un estat més susceptible a ser atacat per una molècula de sucre acceptora, en comparació amb el residu Asp propi de l'enzim.

Combinacions dels mutants de les Tyr amb el mutant D151N donen lloc a un increment en el rendiment de productes de TG, de fins el 22% amb els mutants D151N/Y222A i D151N/Y226W. El major rendiment de TG s'ha obtingut amb el triple mutant D151N/Y222A/Y226W, $\geq 22\%$, que dona lloc a una ràpida acumulació de productes de TG que es mantenen estables al llarg del temps. El triple mutant destaca per una acumulació d'elevats nivells de productes de TG des de temps curts de reacció. Per aquest mutant sembla que el consum de substrat, (GlcNAc)₄, s'aturi quan els nivells de (GlcNAc)₅ i (GlcNAc)₆ arriben al màxim, el que suggereix que la reacció arriba a una mena d'estat d'equilibri estable entre el consum i producció de (GlcNAc)₄.

Els resultats mostren clarament que *SpChiD* és un bon *scaffold* per a dissenyar enzims altament eficients en la síntesi de COS, mitjançant mutagènesi de diferents residus implicats en la catàlisi, que poden afectar l'estabilitat, la conformació i la orientació del substrat i dels intermedis de reacció. La combinació de diferents mutacions, que inclouen la

mutació de l'Asp assistent, dona lloc a un increment de l'acumulació de productes de TG encara més elevat.

En aquest capítol s'exposa el desenvolupament d'una glicosintasa per mutagènesi dirigida, a partir del mutant del residu assistent D151A. L'estratègia utilitzada es basa en la hipòtesi de disminuir (pràcticament eliminar) l'activitat hidrolítica, és a dir, impedir que es doni la primera etapa de reacció (glicosidació), per evitar la hidròlisi secundària dels productes de TG formats, i donar a l'enzim un substrat oxazolina, que mimetitza l'intermedi de reacció per afavorir la segona etapa (desglicosidació), sense que l'enzim requereixi la formació d'aquest, que teòricament no podria formar-lo.

4.2. Primera generació glicosintasa: mutació del residu assistent

La primera generació glicosintasa correspon al mutant resultant de la substitució del residu assistent per una Ala, amb l'objectiu d'intentar eliminar l'activitat hidrolítica de l'enzim *wt* (veure introducció).

L'anàlisi de l'activitat hidrolítica i de l'activitat glicosintasa, utilitzant (GlcNAc)₅-ox com a substrat, del mutant *SpChiD* D151A en comparació amb la resta de mutants de les quitinases GH18 seleccionades s'ha descrit en el capítol 3. Aquí s'amplia la caracterització d'aquest mutant que servirà de motlle per a introduir noves mutacions per avaluar el seu efecte en l'activitat glicosintasa.

4.2.1. Activitat hidrolítica d'*SpChiD* D151A

Com a resum de les propietats més rellevants d'aquest mutant (descriu al capítol 3) es destaquen:

- La mutació del residu assistent Asp151 per una Ala en l'enzim *SpChiD* ha resultat en la disminució de l'activitat hidrolítica d'unes 10^2 - 10^3 vegades respecte l'enzim salvatge (Figura 4.4).

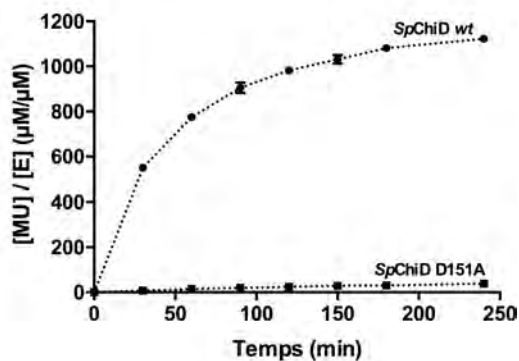


Figura 4.4. Curs de reacció de l'activitat hidrolítica d'*SpChiD wt* (40 nM) i del mutant D151A (1 µM) amb GlcNAc-MU. 50 µM GlcNAc-MU en 50 mM Na₂HPO₄ pH 7 a 37°C.

- b) Els assajos d'activitat amb substrats artificials mostren una activitat d'*SpChiD* D151A més elevada amb GlcNac-MU com a substrat, seguida de (GlcNac)₂-MU i (GlcNac)₃-MU. El mutant D151A manté l'activitat quitobiasa característica de l'enzim.
- c) La hidròlisi de (GlcNac)₄ suggereix una preferència de tall dels enllaços dels extrems, donant lloc a una major formació de (GlcNac)₃ que (GlcNac)₂.

4.2.2. Activitat glicosintasa d'*SpChiD* D151A

4.2.2.1 Polimerització de (GlcNac)₅-ox

En relació a l'activitat glicosintasa del mutant, el primer assaig amb (GlcNac)₅-ox com a donador resulta en la formació d'una mescla de COS amb DPs entre 5 i 15, essent (GlcNac)₁₀ el producte majoritari en temps de reacció curts, però aquest s'hidrolitza al llarg del temps donant lloc a (GlcNac)₇ i (GlcNac)₈ majoritàriament, a causa de l'activitat hidrolítica residual. El rendiment en polímer és del 47,9% a les 18 hores de reacció (veure capítol 3).

El mateix assaig (24 mM (GlcNac)₅-ox i 1 mg·mL⁻¹ d'enzim) amb l'enzim *wt* dona lloc també a la formació d'una mescla de (GlcNac)₅-(GlcNac)₁₅ al cap de 2 hores de reacció (Figura 4.5). Tot i ser un enzim amb elevada activitat de TG, l'activitat hidrolítica és predominant, i els productes formats són hidrolitzats ràpidament donant lloc a una mescla de COS principalment amb DPs entre 6 i 9. A més, (GlcNac)₅-ox segurament també és hidrolitzada donant lloc principalment a la formació de (GlcNac)₃ i (GlcNac)₂, i aquest últim és utilitzat per transglicosidació amb una nova molècula de (GlcNac)₅-ox donant lloc a (GlcNac)₇, el producte majoritari. Al cap de 18 h de reacció no es detecta precipitat, és a dir, el precipitat format és hidrolitzat essent el rendiment en polímer <2,5% (p/p).

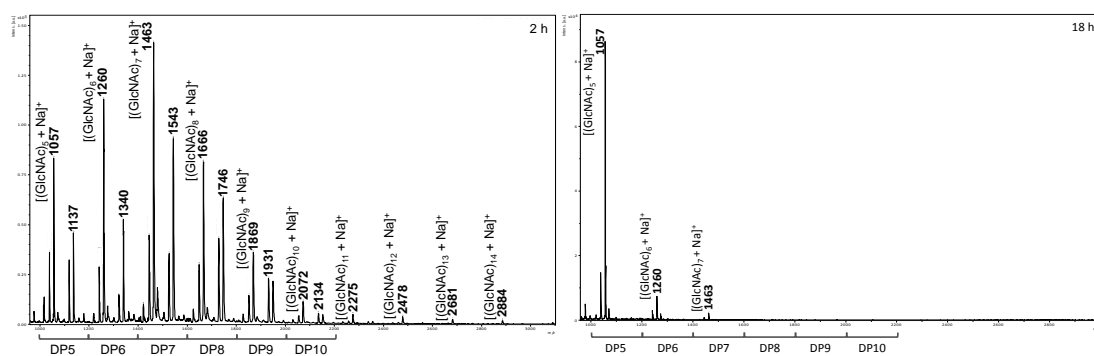


Figura 4.5. Espectre de MALDI-TOF dels productes de la fracció insoluble de la reacció de polimerització de (GlcNac)₅-ox catalitzada per l'enzim *SpChiD wt*. Productes obtinguts al cap de 2 hores (esquerra) i 18 hores (dreta) de reacció. Es detecta els adductes amb sodi, i també els adductes amb DMSO i sodi.

La comparació entre les reaccions de l'enzim salvatge i el mutant D151A, en relació al precipitat format i als productes obtinguts, analitzats per MALDI-TOF, resulta en un

increment de l'activitat de TG del mutant D151A respecte *SpChiD wt*, principalment en la durada dels productes provinents de TG o GS, a causa de la disminució de l'activitat hidrolítica del mutant D151A.

Un cop comprovada la capacitat de formar nous enllaços glicosídics del mutant *SpChiD D151A*, s'ha analitzat l'eficiència de condensació de $(\text{GlcNAc})_5\text{-ox}$ com a substrat a diferents concentracions d'enzim i substrat.

Quan es varia la concentració d'enzim, i es manté una concentració de $(\text{GlcNAc})_5\text{-ox}$ constant (24 mM), en tots els casos es dona igualment la formació de producte polimèric, $(\text{GlcNAc})_{10}$, essent aquest el producte majoritari al cap de 2 hores de reacció. Els rendiments en polímer en aquest temps de reacció són negligibles per a les diferents concentracions d'enzim assajades (<2,5% (p/p) de precipitat format). A major concentració d'enzim s'observa menor presència de productes $\geq(\text{GlcNAc})_{10}$ i un increment de $(\text{GlcNAc})_5\text{-}(\text{GlcNAc})_9$, és a dir, una hidròlisi més ràpida dels productes GS formats (Figura 4.6A).

Quan es varia la concentració de donador $(\text{GlcNAc})_5\text{-ox}$, i es manté constant la concentració d'enzim ($0,25 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), també s'obté $(\text{GlcNAc})_{10}$ com a producte majoritari, però de la mateixa manera aquest és hidrolitzat, amb una velocitat d'hidròlisi lleugerament més ràpida quan la concentració de donador és més elevada (Figura 4.6B).

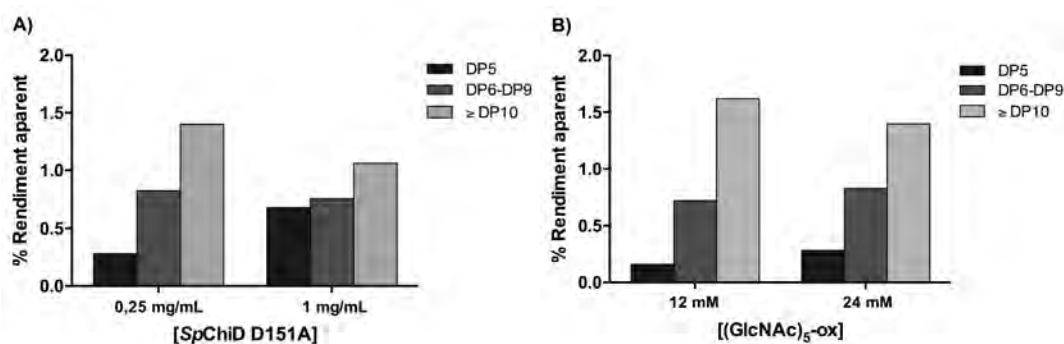


Figura 4.6. Representació dels productes de TG presents en la reacció de polimerització de $(\text{GlcNAc})_5\text{-ox}$ catalitzada per *SpChiD D151A* en funció de la concentració d'enzim (A) i de la concentració de donador (B). Productes obtinguts al cap de 2 hores de reacció.

Aquests resultats mostren que, tot i obtenir rendiments de producte polimèric baixos a temps de reacció curts (2 h), el rendiment aparent de $(\text{GlcNAc})_{10}$ obtingut respecte la resta de productes provinents de TG (amb $\text{DP}\geq 6$), és més elevat quan s'utilitza concentracions d'enzim i/o substrat menors.

Per altra banda, amb l'objectiu d'obtenir una major quantitat de producte de TG, amb $(\text{GlcNAc})_{10}$ com a producte majoritari, s'ha realitzat diferents assajos en els que s'ha incrementat el volum de reacció total i/o s'ha recollit conjuntament el precipitat obtingut de diferents rèpliques. Tot i obtenir $(\text{GlcNAc})_{10}$ com a producte majoritari, en cap cas la quantitat de producte obtingut ha estat suficient per a la caracterització d'aquest.

A causa dels resultats obtinguts, en les reaccions de polimerització dels mutants d'*SpChiD*, es treballarà a unes concentracions d'enzim i donador de $0,25 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ i 12 mM , respectivament.

4.2.2.2 Condensació donador – acceptor

Amb l'objectiu d'obtenir un ventall més ampli de productes de TG s'ha realitzat diferents reaccions de condensació donador-acceptor. Els primers assajos van ser amb $(\text{GlcNAc})_2\text{-ox}$ o $(\text{GlcNAc})_5\text{-ox}$ com a donador i GlcNAc-pNP o $(\text{GlcNAc})_3\text{-pNP}$ com acceptors, i no es va detectar productes de condensació, i al cap de temps d'incubació llargs es va detectar hidròlisi dels acceptors. Els substrats -pNP són molt poc solubles, i per tant, les concentracions d'acceptor utilitzades en els assajos van ser inferiors a 5 mM per a GlcNAc-pNP i 2 mM per $(\text{GlcNAc})_3\text{-pNP}$, a una concentració de donador d' 1 mM . Els resultats suggereixen que la reacció de TG no es dona, o no es detecta, quan s'utilitza concentracions de substrats baixes.

Per als assajos posteriors es va utilitzar quitoooligosacàrids naturals com a acceptors i $(\text{GlcNAc})_5\text{-ox}$ com a donador (12 mM). El fet d'haver d'utilitzar elevades concentracions de donador, així com la poca solubilitat dels oligòmers de quitina, dificulten la presència d'un excés gaire elevat d'acceptor en relació al donador.

La reacció d'*SpChiD* D151A amb $(\text{GlcNAc})_5\text{-ox}$ com a donador (12 mM) i $(\text{GlcNAc})_2$ (24 mM) com a acceptor resulta en la formació d'una mescla de COS amb DPs entre 5 i 12, amb $(\text{GlcNAc})_{10}$ com a producte majoritari (% àrea del 60% aproximadament), en comptes de $(\text{GlcNAc})_7$ com caldria esperar (Figura 4.7). Al cap de temps de reacció més llargs, $(\text{GlcNAc})_{10}$ és hidrolitzat i augmenta la presència de $(\text{GlcNAc})_7$, de la mateixa manera que en la reacció de polimerització de $(\text{GlcNAc})_5\text{-ox}$.

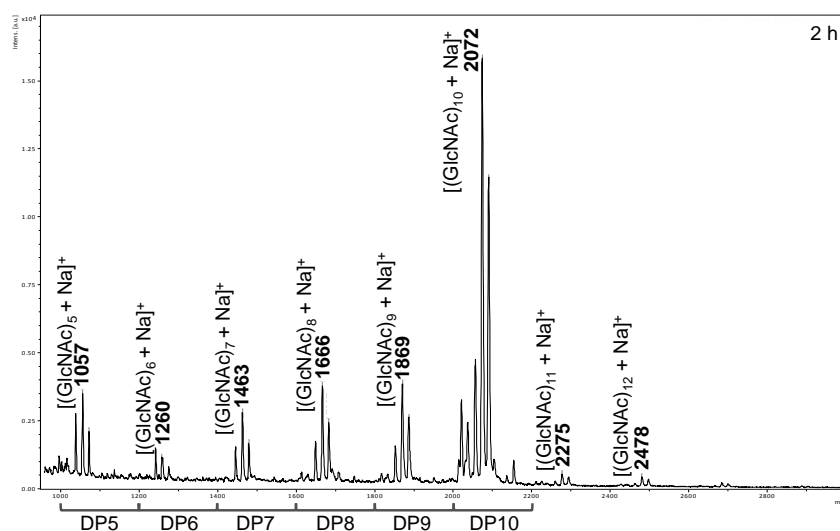


Figura 4.7. Espectre de MALDI-TOF dels productes de la fracció insoluble de la reacció de condensació de $(\text{GlcNAc})_5\text{-ox}$ com a donador i $(\text{GlcNAc})_2$ com a acceptor, catalitzada pel mutant *SpChiD* D151A. Productes obtinguts al cap de 2 hores de reacció.

En la reacció d'*SpChiD* D151A amb (GlcNAc)₅-ox com a donador (12 mM) i (GlcNAc)₅ monodesacetilat en el segon residu des de l'extrem no-reductor (ADAAA) com a acceptor (18,5 mM), el producte resultant torna a ser una mescla de COS amb DPs entre 5 i 12, i (GlcNAc)₁₀ torna a ser el producte majoritari, que és hidrolitzat en temps de reacció més llargs (Figura 4.8). També es detecta un pic amb m/z de 2030 que pot correspondre a l'adducte amb sodi de (GlcNAc)₁₀ monodesacetilat (DP10(N)), que segueix present a temps de reacció més llargs (48 hores). A les 48 hores de reacció (GlcNAc)₇ és el producte majoritari, segurament a causa de la hidròlisi dels productes GS formats així com de reaccions de TG, a causa de l'activitat hidrolítica residual del mutant, tal com succeeix en la reacció de polimerització de (GlcNAc)₅-ox.

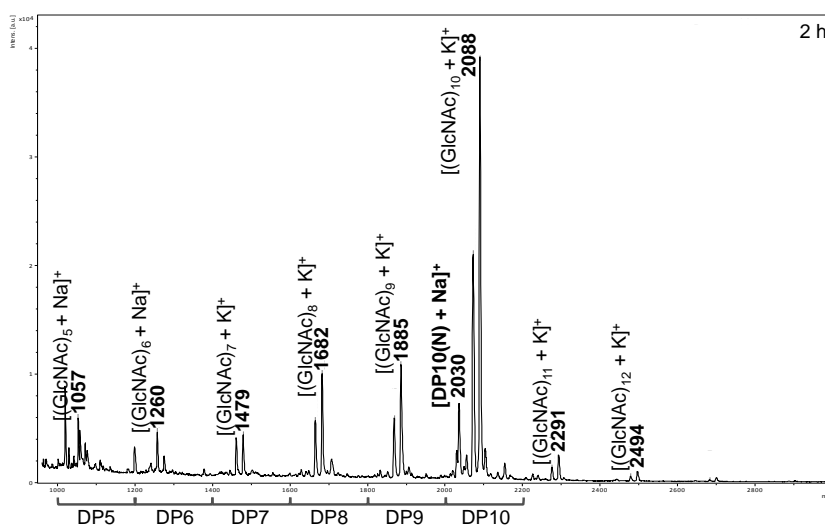


Figura 4.8. Espectre de MALDI-TOF dels productes de la fracció insoluble de la reacció de condensació de (GlcNAc)₅-ox com a donador i ADAAA com a acceptor, catalitzada pel mutant *SpChiD* D151A. Productes obtinguts al cap de 2 hores de reacció. En negreta es marca el pic corresponent a la reacció de condensació que dona lloc a DP10(N) com a producte.

Les reaccions de condensació assajades han resultat en la formació de (GlcNAc)₁₀ com a producte majoritari en lloc del producte que resultaria de la condensació del donador i acceptor utilitzats (DP10(N)). Les ràtios donador:acceptor utilitzades han estat de 1:2 i 2:3 en les reaccions amb (GlcNAc)₂ i ADAAA, respectivament. Com s'ha comentat, l'excés d'acceptor respecte el donador no ha estat gaire elevat, i com a conseqüència en ambdues reaccions predomina la reacció d'autocondensació del propi donador donant lloc a (GlcNAc)₁₀ com a producte majoritari.

4.2.2.3 Polimerització d'ADAAA-ox

Per últim, s'ha realitzat un assaig de polimerització amb l'oxazolina de DP5 monodesacetilada en el segon monòmer des de l'extrem no-reductor (ADAAA-ox) com a donador (24 mM) (Figura 4.9).

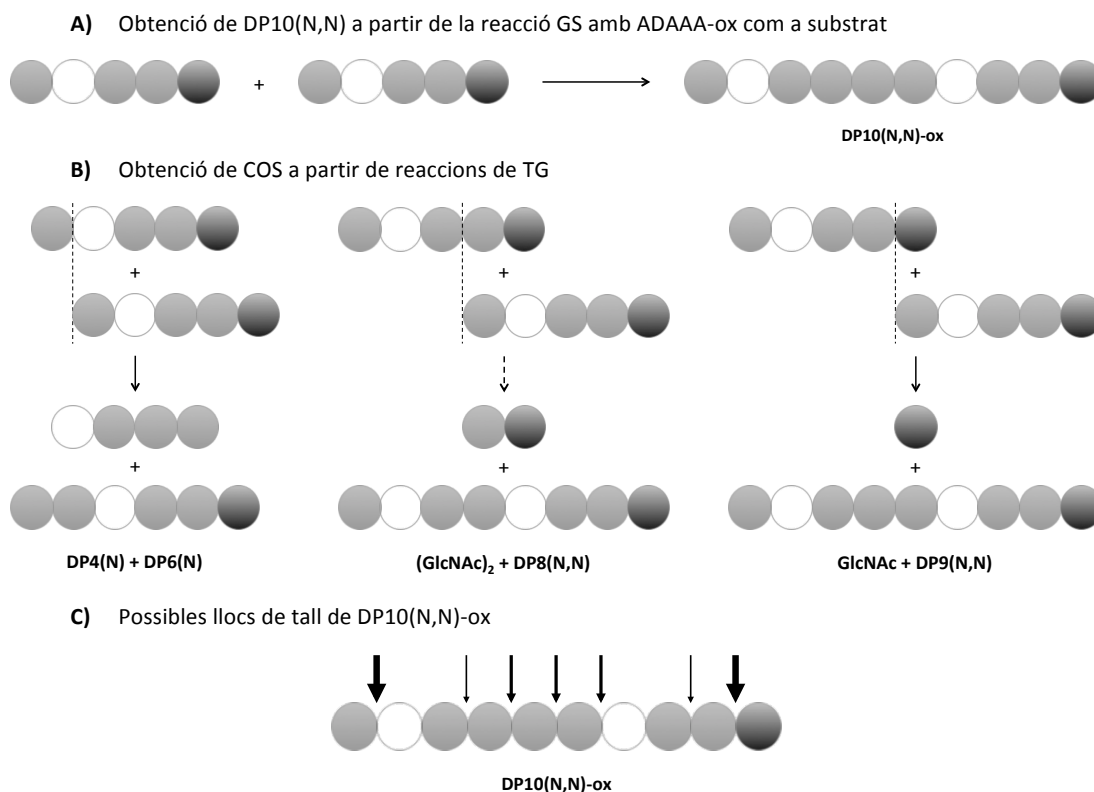


Figura 4.9. Representació esquemàtica dels possibles COS formats en la reacció de condensació d'ADAAA-ox. Representació de la reacció GS en la que es dona la condensació de dues molècules d'ADAAA-ox. B) Representació de la reacció de TG. Hidròlisi i transferència d'un oligòmer de quitosà a un substrat acceptor (ADAAA-ox). C) Possibles llocs d'hydròlisi de DP10(N,N)-ox, producte resultant de la unió de dues molècules d'ADAAA-ox. Cercles gris clar: unitats d'*N*-acetilglucosamina (GlcNAc); cercles blancs: unitats de glucosamina (GlcNH₂); cercles gris fosc: derivat oxazolina d'*N*-acetilglucosamina.

Al cap de 10 hores de reacció, tot i que no es detecta formació de precipitat, sí es detecta formació de productes de TG que són solubles. La fracció soluble de la reacció consta d'una mescla de COS amb DPs d'entre 6 i 11, entre els que es troba DP10 didesacetilat (DP10(N,N)) provinent de la reacció GS (Figura 4.10). Les ràtios *m/z* detectades per MALDI-TOF-MS corresponen als adductes amb sodi. La mescla de COS conté DP6 i DP7 monodesacetilats, i DP7-DP11 didesacetilats, provinents de reaccions de TG o d'hydròlisi de DP10(N,N). Les quitinases GH18 requereixen un monòmer d'*N*-acetilglucosamina en el subseti -1, a causa del mecanisme de catàlisi assistit per substrat, i per tant no poden hidrolitzar el substrat ADAAA-ox pel segon enllaç glicosídic des de l'extrem no-reductor. Aquest fet suggereix que el DP7 didesacetilat present en la mescla de productes de TG prové de la hydròlisi d'un producte de TG didesacetilat amb un DP més elevat.

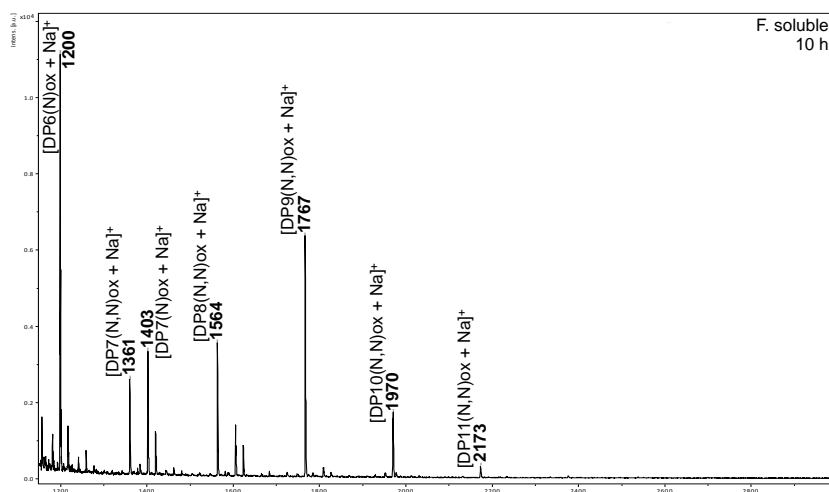


Figura 4.10. Espectre de MALDI-TOF dels productes de la fracció soluble de la reacció de polimerització d'ADAAA-ox catalitzada pel mutant *SpChiD* D151A. Productes obtinguts al cap de 10 hores de reacció. Es detecta el derivat oxazolina dels COS obtinguts per TG.

Al cap de 24 hores de reacció es detecta la formació de precipitat, que conté una mescla de COS amb DPs entre 6 i 19 provinents de reaccions de TG (Figura 4.11). La mescla consta dels oligòmers i polímers DP6-DP13 monodesacetilats, excepte DP8 i DP9 monodesacetilats que no poden donar-se per reaccions de TG directes; d'oligòmers i polímers DP9-DP18 didesacetilats i dels polímers DP13-DP19 tridesacetilats. La presència de productes desacetilats inesperats que no provenen de la reacció de polimerització directa d'ADAAA-ox, com per exemple DP10-DP13 monodesacetilats, pot explicar-se per reaccions de TG provinents de la unió de diferents productes d'hidròlisi d'ADAAA-ox i/o de la hidròlisi de productes més llargs. A més, cal destacar la poca presència d'intermedis amb DPs entre 6 i 10, excepte DP9.

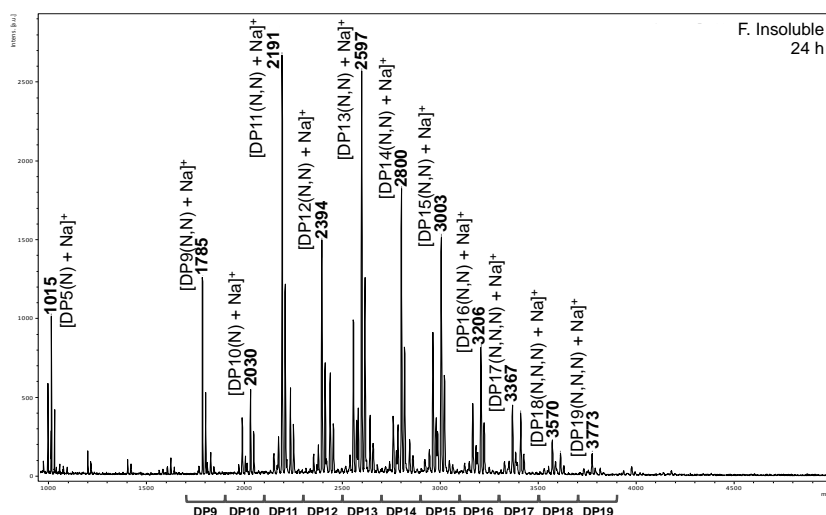


Figura 4.11. Espectre de MALDI-TOF dels productes de la fracció insoluble de la reacció de polimerització d'ADAAA-ox catalitzada pel mutant *SpChiD* D151A. Productes obtinguts al cap de 24 hores de reacció.

A partir d'un donador oxazolina monodesacetilat s'ha aconseguit obtenir una mescla d'oligòmers i polímers de quitosà solubles, però el rendiment segueix essent baix, i els productes no poden ser analitzats per altres tècniques. A més, a temps de reacció més llargs s'han obtingut polímers fins a DP19, essent aquest el polímer de quitosà més llarg produït per una quitinasa fins el moment.

La mutació D151A resulta en una important disminució de l'activitat hidrolítica d'*SpChiD*, i un increment de l'activitat de TG en relació a la durada dels productes obtinguts. Tot i així, el mutant manté certa activitat hidrolítica residual que resulta en la hidròlisi dels productes de TG formats al cap del temps. Aquests resultats suggereixen la mutació del residu assistent com a un bon punt d'inici per a desenvolupar una glicosintasa eficient, amb l'objectiu de disminuir (idealment eliminar) l'activitat hidrolítica de l'enzim amb l'objectiu d'incrementar el rendiment en polímer.

Madhuprakash *et al.* han publicat aquest últim any la caracterització del mutant simple del residu assistent D151N, que presenta una activitat hidrolítica residual del 0,6% respecte l'enzim *wt* i un increment de l'activitat de TG, amb el que han obtingut un 19% de rendiment en productes de TG ((GlcNAc)₅ + (GlcNAc)₆) a partir de (GlcNAc)₄ com a substrat. El rendiment màxim de (GlcNAc)₅ és a les 12 h mentre que per a (GlcNAc)₆ és al cap de 6 h (Madhuprakash *et al.*, 2018). La mutació del residu assistent per una Ala, resultats presentats en aquesta tesi, resulta en una disminució de l'activitat hidrolítica aproximadament del mateix ordre (entre 0,2 i un 4% respecte l'enzim *wt*, en funció del substrat utilitzat) i un increment de l'activitat de condensació i TG, amb el que els productes es mantenen encara a les 18 hores de reacció, mitjançant l'ús d'un donador oxazolina.

4.3. Segona generació glicosintasa

4.3.1. Disseny racional dels dobles mutants d'*SpChiD*

A partir del mutant simple D151A, amb l'objectiu de disminuir la hidròlisi i incrementar l'activitat glicosintasa, es dissenya una segona generació de mutants dobles. L'estratègia utilitzada és a través de mutacions puntuals de diferents residus, dissenyades racionalment, utilitzant com a base el mutant puntual D151A. Per a la selecció dels residus a substituir, es requereix una anàlisi prèvia tant de l'estructura d'*SpChiD* (PDBs: 4Q22, 4PTM, 4NZC, 4LGX) com dels resultats dels mutants publicats en bibliografia.

Primerament, l'anàlisi estructural del complex enzim-substrat, obtingut per alineament estructural d'*SpChiD* (PDB: 4Q22) amb l'estructura del mutant del residu àcid/base E153Q de la quitinasa de *Moritella marina* en complex amb (GlcNAc)₅ (PDB: 4MB5) (Figura 4.12), suggereix la possible implicació de diferents residus de la cavitat d'unió en l'activitat hidrolítica i glicosintasa.

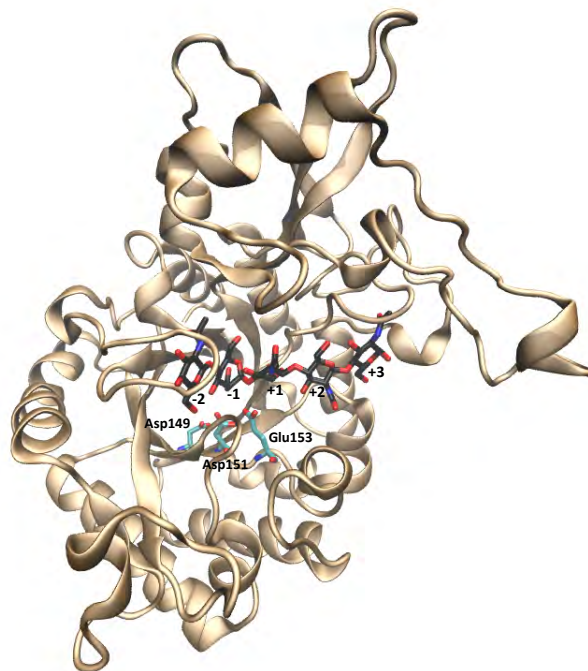


Figura 4.12. Estructura d'*SpChiD* en complex amb $(\text{GlcNAc})_5$. Es mostren els residus de la tríada catalítica (Asp149, Asp151 i Glu153). $(\text{GlcNAc})_5$ es troba posicionat entre els subsetis -2 i +3. L'estructura s'ha obtingut a partir de l'alineament estructural d'*SpChiD* (PDB 4Q22) i el mutant E153Q de la quitinasa de *Moritella marina* en complex amb $(\text{GlcNAc})_5$ (PDB 4MB5).

Per altra banda, tal com s'exposa en la introducció d'aquest capítol, Madhuprakash *et al.* reporten el disseny de varis mutants de la quitinasa *SpChiD* de residus situats en el solc catalític o al voltant d'aquest així com de residus conservats en les diferents quitinases (Madhuprakash *et al.*, 2012, 2014; Madhuprakash, Bobbili, *et al.*, 2015) amb els que s'ha modulats l'activitat hidrolítica i/o l'activitat de transglicosidació de l'enzim *wt* (veure apartat 4.1.3; Taula 4.1).

Dels mutants reportats, aquells que mostren una disminució de l'activitat d'hidròlisi i un increment de l'activitat de transglicosidació, tant en la proporció de $(\text{GlcNAc})_5$ i $(\text{GlcNAc})_6$ obtinguts a partir de $(\text{GlcNAc})_4$ com en la durada d'aquests productes de TG en la reacció, són els mutants S110G, G113S i F119A (Madhuprakash *et al.*, 2012).

Els residus Ser110 i Gly113, que formen part del motiu SxGG altament conservat en quitinases GH18, es troben en el solc catalític. La Ser110 es troba en la cadena $\beta 3$ del *TIM barrel* amb la cadena lateral situada entre els dos residus Asp de la tríada catalítica, i participa en la cascada de moviment de l'Asp151 i conseqüentment de l'àcid-base Glu153 per a la catàlisi. La Gly113 té un rol de manteniment de l'arquitectura del solc catalític i es localitza en la zona d'entrada del substrat. Per altra banda, el residu Phe119 es troba proper a la tríada catalítica, amb la cadena lateral situada en la part inferior del domini DxDxE, i interacciona mitjançant interaccions π - π i CH- π amb el Trp152, localitzat entre els residus Asp151 i Glu153 de la tríada catalítica.

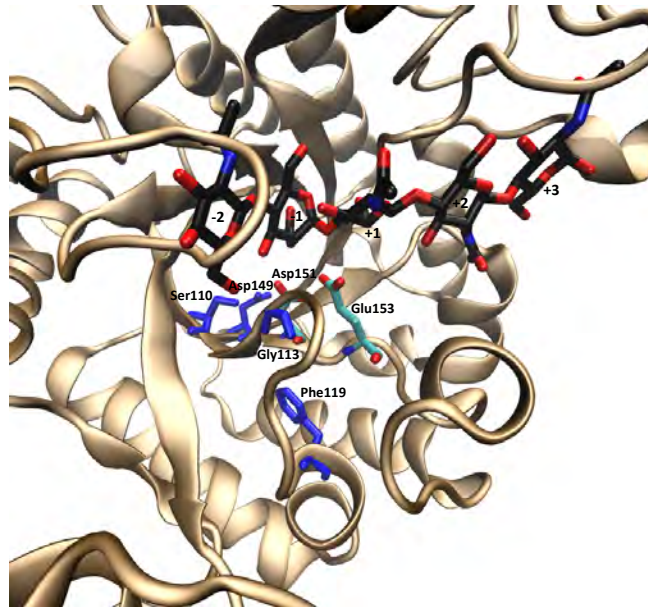


Figura 4.13. Estructura d'*SpChiD* on es mostra els residus proposats a ser substituïts en la 2a generació GS. Es mostren els residus Asp151 i Glu153 de la tríada catalítica en blau cel, i els residus proposats a ser substituïts per a la 2a generació GS en blau fosc (Ser110, Gly113, Phe119 i Asp149). (GlcNAc)₅ es troba posicionat entre els subetis -2 i +3. L'estructura s'ha obtingut a partir de l'alineament estructural d'*SpChiD* (PDB 4Q22) i el mutant E153Q de la quitinasa de *Moritella marina* en complex amb (GlcNAc)₅ (PDB 4MB5).

Considerant tant l'anàlisi estructural com els resultats de les diferents mutacions puntuals reportades s'han dissenyat els mutants dobles S110G/D151A, G113S/D151A, F119A/D151A i D149A/D151A (Figura 4.13 i Figura 4.14).

S'han decidit substituir els residus Ser110, Gly113 i Phe119 per Gly, Ser i Ala, respectivament, seguint l'estratègia reportada per Madhuprakash *et al.* La incorporació d'una Gly en la posició de la Ser110 dificulta la formació de ponts d'hidrogen, de tal manera que disminuiria la capacitat de protonar l'Asp151 necessari per a la protonació del Glu153 en el mecanisme catalític, el que explica la disminució de l'activitat hidrolítica del mutant puntual S110G. Per altra banda, els autors proposen que la substitució de la Gly113 per una Ser dona lloc a un augment de les interaccions d'apilament preexistents amb el Trp114, a causa de la presència del grup hidroxil de la Ser. I per últim, la substitució de la Phe119 per una Ala, provoca la pèrdua d'interaccions π - π i CH- π amb el Trp152, a causa de la substitució del residu aromàtic, i els conseqüents canvis en les interaccions amb la tríada catalítica, que tenen un impacte en les activitats d'hidròlisi i TG respecte l'enzim *wt*.

A més, també s'ha dissenyat el doble mutant D149A/D151A, corresponent a la substitució dels dos residus Asp de la tríada catalítica (DxDxE) per Ala. La mutació del residu Asp149 d'*SpChiD* no es troba reportada, però la substitució del mateix Asp en altres quitinases de la família GH18 resulta en un enzim amb una important disminució de l'activitat hidrolítica respecte l'enzim *wt* amb capacitat de dur a terme reaccions de TG (Zakariassen *et al.*, 2011; Martinez *et al.*, 2012). El primer Asp del motiu DxDxE actua de modulador del segon Asp, corresponent al residu assistent, és a dir, participa en la cadena de protonació del residu Glu àcid/base necessària en el mecanisme catalític.

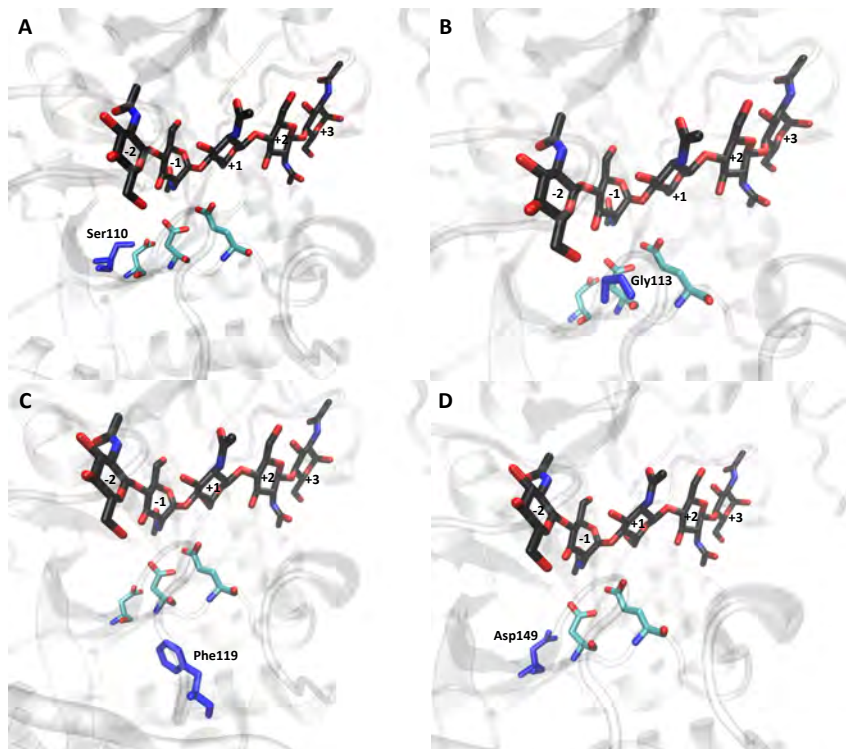


Figura 4.14. Residus proposats a ser substituïts en la 2a generació GS

Es mostren els residus Asp149, Asp151 i Glu153 de la tríada catalítica en blau cel i els residus proposats a ser substituïts per a la 2a generació GS en blau fosc. A) Ser110, B) Gly113, C) Phe119 i D) Asp149. El (GlcNAc)₅ es troba posicionat entre els subestis -2 i +3. L'estructura s'ha obtingut a partir de l'alineament estructural d'*SpChiD* (PDB 4Q22) i el mutant E153Q de la quitinasa de *Moritella marina* en complex amb (GlcNAc)₅ (PDB 4MB5).

4.3.2. Expressió i purificació dels dobles mutants

Els dobles mutants s'han obtingut per mutagènesi dirigida seguint el protocol de *QuickChange*[®] (veure part experimental) a partir de la seqüència d'ADN del mutant simple D151A i s'ha confirmat la mutació per seqüenciació. S'han expressat seguint el mateix protocol que l'enzim wt i el mutant simple. Per a la purificació també s'ha seguit el mateix protocol que per a l'enzim salvatge, i s'han analitzat les diferents fraccions recol·lectades de les proteïnes recombinants purificades mitjançant un gel d' SDS-PAGE (Figura 4.15). Les proteïnes purificades migren segons el pes molecular corresponent. S'obté un rendiment mitjà de proteïna d'uns 35 mg·L⁻¹ per als mutants F119A/D151A i S110G/D151A i d'uns 55 mg·L⁻¹ per als mutants G113S/D151A i D149A/D151A, rendiments entre 3 i 5 vegades inferiors que els obtinguts per la proteïna wt (160 mg·L⁻¹ cultiu). Un cop expressats i purificats els quatre doble mutants es realitza l'anàlisi de les activitats hidrolítica i glicosintasa.

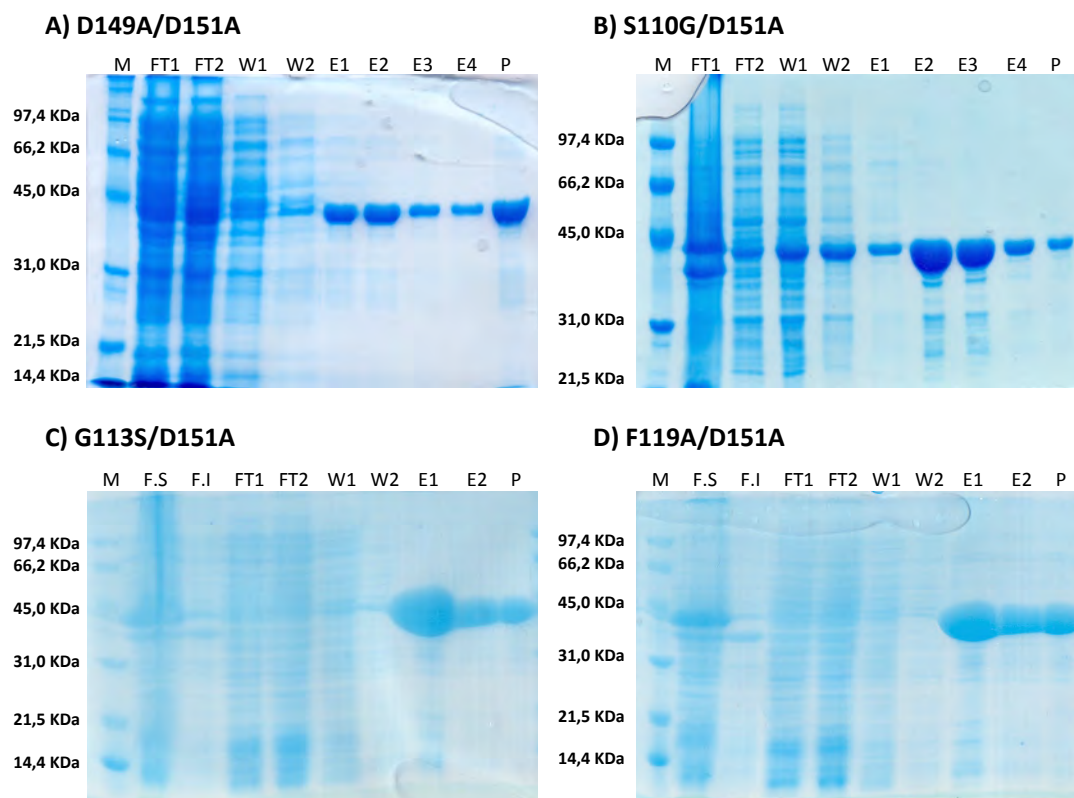


Figura 4.15. SDS-PAGE dels mutants dobles d'*SpChiD*
 Gels SDS-PAGE del procés de purificació dels mutants dobles amb les columnes *His SpinTrap columns* (GE Healthcare) A) *SpChiD* D149A/D151A; B) *SpChiD* S110G/D151A; C) *SpChiD* G113S/D151A; D) *SpChiD* F119A/D151A. M: *Marker Low Range*, F.S: Fracció soluble, F.I: Fracció insoluble, FT1-FT2: *Flow through* de la columna, W1-W2: Rentats, E1-E4: Elucions de la proteïna, P: Proteïna final, un cop juntades les elucions i canviat el tampó.

4.3.3. Activitat hidrolítica dels dobles mutants

Primerament s'analitza l'activitat davant els compostos GlcNAc-MU, (GlcNAc)₂-MU i (GlcNAc)₃-MU per fluorescència (Taula 4.2). L'activitat específica dels dobles mutants només s'ha determinat a una concentració d'enzim (5 μM).

Taula 4.2. Activitat hidrolítica dels dobles mutants d'*SpChiD* amb substrats fluorogènics

	GlcNAc-MU		(GlcNAc) ₂ -MU		(GlcNAc) ₃ -MU	
	$V_0/[E]$ (min^{-1})	MUT/WT	$V_0/[E]$ (min^{-1})	MUT/WT	$V_0/[E]$ (min^{-1})	MUT/WT
<i>SpChiD wt</i>	14,7 ± 5,6	1	13,5 ± 6,7	1	7,1 ± 1,7	1
D151A	0,17 ± 0,04	$1,15 \times 10^{-2}$	0,022 ± 0,004	$1,63 \times 10^{-3}$	0,016 ± 0,002	$2,25 \times 10^{-3}$
D149A/D151A	$1,14 \times 10^{-3}$	$7,74 \times 10^{-5}$	$<6,2 \times 10^{-4}$	$<4,65 \times 10^{-5}$	$<6,2 \times 10^{-4}$	$<8,74 \times 10^{-5}$
S110G/D151A	$8,36 \times 10^{-2}$	$5,68 \times 10^{-3}$	$1,61 \times 10^{-2}$	$1,20 \times 10^{-3}$	$<6,2 \times 10^{-4}$	$<8,74 \times 10^{-5}$
G113S/D151A	$6,11 \times 10^{-4}$	$4,15 \times 10^{-5}$	$<6,2 \times 10^{-4}$	$<4,65 \times 10^{-5}$	$<6,2 \times 10^{-4}$	$<8,74 \times 10^{-5}$
F119A/D151A	$1,07 \times 10^{-3}$	$7,27 \times 10^{-5}$	$<6,2 \times 10^{-4}$	$<4,65 \times 10^{-5}$	$<6,2 \times 10^{-4}$	$<8,74 \times 10^{-5}$

El valor $V_0/[E] <6,2 \times 10^{-4}$ correspon al límit de detecció de l'assaig sota les condicions assajades, per 5 μM d'enzim, i 240 min de reacció. Condicions de reacció: 50 μM de substrat en 50 mM Na₂HPO₄ pH 7 a 37°C

Sota les condicions assajades, cap dels mutants dobles mostra activitat amb el substrat més llarg ((GlcNAc)₃-MU), el que suposa una disminució de l'activitat de com a mínim 4-5 ordres de magnitud respecte l'enzim *wt*. Amb (GlcNAc)₂-MU com a substrat només mostra activitat el mutant S110G/D151A, que presenta una disminució de l'activitat de 3 ordres de magnitud respecte l'enzim *wt*, que correspon aproximadament a la mateixa activitat que el mutant simple D151A per aquest substrat. En canvi, amb el substrat GlcNAc-MU tots els mutants presenten activitat a les condicions de reacció assajades, tot i que mostren una disminució de l'activitat de 5 ordres de magnitud respecte l'enzim salvatge, excepte el mutant S110G/D151A que mostra la disminució d'activitat més petita, de només 3 ordres de magnitud.

Els resultats suggereixen una pèrdua de l'activitat hidrolítica dels mutants dobles davant substrats oligomèrics amb DP≥3, si es considera el grup 4-metilumbeliferona com a unitat que mimetitzava un monòmer. L'activitat davant GlcNAc-MU es veu també disminuïda, però no es veu eliminada, el que suggereix que mantenen certa activitat quitobiasa residual. La presència del grup fluorogènic pot potenciar aquesta activitat present.

Per altra banda també s'ha analitzat l'activitat hidrolítica dels mutants dobles davant (GlcNAc)₄ (Taula 4.3). La concentració d'enzim més elevada utilitzada per aquest assaig és de 10 μM. Com cal esperar, tots els mutants mostren una disminució de l'activitat hidrolítica respecte l'enzim *wt*. A diferència de l'enzim salvatge i el mutant simple D151A, els mutants dobles no presenten el comportament bifàsic sota les condicions assajades, segurament a causa de la disminució de l'activitat hidrolítica, excepte el mutant S110G/D151A que sí presenta aquest comportament bifàsic amb una primera etapa més ràpida, considerada com a estat pre-estacionari i una segona etapa més lenta, l'estat estacionari.

Taula 4.3. Activitat hidrolítica dels dobles mutants d'*SpChiD* amb (GlcNAc)₄ com a substrat

	Formació				Consum	
	(GlcNAc) ₂		(GlcNAc) ₃		(GlcNAc) ₄	
	V ₀ /[E] (min ⁻¹)	MUT/WT	V ₀ /[E] (min ⁻¹)	MUT/WT	V ₀ /[E] (min ⁻¹)	MUT/WT
<i>SpChiD wt</i>	8 ± 4	1	8 ± 2	1	-27 ± 9	1
D151A	0,04 ± 0,03	5,00 × 10⁻³	0,4 ± 0,1	5,00 × 10⁻²	-1,1 ± 0,5	4,07 × 10⁻²
D149A/D151A	4,70 × 10 ⁻²	6,20 × 10⁻³	1,56 × 10 ⁻¹	1,84 × 10⁻²	-1,54 × 10 ⁻¹	5,61 × 10⁻³
S110G/D151A	1,93 × 10 ⁻²	2,55 × 10⁻³	2,76 × 10 ⁻¹	3,26 × 10⁻²	-2,07 × 10 ⁻¹	7,53 × 10⁻³
G113S/D151A	6,02 × 10 ⁻²	7,95 × 10⁻³	4,62 × 10 ⁻¹	5,46 × 10⁻²	-1,04	3,78 × 10⁻²
F119A/D151A	2,01 × 10 ⁻²	2,65 × 10⁻³	3,87 × 10 ⁻¹	4,57 × 10⁻²	-8,85 × 10 ⁻¹	3,22 × 10⁻²

Condicions de reacció: 2 mM (GlcNAc)₄ en 50 mM Na₂HPO₄ pH 7 a 37°C

En relació al consum de (GlcNAc)₄, l'activitat dels mutants G113S/D151A i F119A/D151A es veu disminuïda 2 ordres de magnitud respecte l'enzim *wt* i presenten essencialment la mateixa activitat que el mutant senzill D151A, mentre que els mutants D149A/D151A i S110G/D151A mostren una disminució d'activitat de 3 ordres de magnitud. En canvi, en relació a la formació de productes d'hidròlisi, tots els mutants presenten una disminució de l'activitat de 3 i 2 ordres de magnitud per a la formació de (GlcNAc)₂ i (GlcNAc)₃,

respectivament, però essencialment la mateixa activitat que el mutant senzill D151A. La diferència en la disminució de formació dels productes d'hidròlisi respecte el *wt* suggereix una preferència de tall dels mutants dobles per a l'enllaç dels extrems, més que no pas per l'enllaç entre el segon i tercer monòmer del substrat (GlcNAc)₄.

Per a l'activitat amb (GlcNAc)₄ els mutants dobles G113S/D151A i F119A/D151A presenten aproximadament la mateixa activitat que el mutant simple D151A, tant en relació al consum de substrat com a la formació de productes d'hidròlisi. En canvi, els mutants D149A/D151A i S110G/D151A resulten aproximadament unes 10 vegades menys actius que el mutant simple D151A en relació al consum de (GlcNAc)₄.

En conclusió:

a) les mutacions puntuals dels residus Ser110, Gly113 i Phe119 donen lloc a enzims amb una activitat hidrolítica residual d'aproximadament un 70% respecte l'enzim *wt* (Madhuprakash *et al.*, 2012). La combinació d'aquesta mutació amb la mutació del residu assistent per una Ala dona lloc a enzims amb una activitat hidrolítica residual d'entre <0,01% i el 3% respecte l'enzim *wt*, en funció del substrat utilitzat.

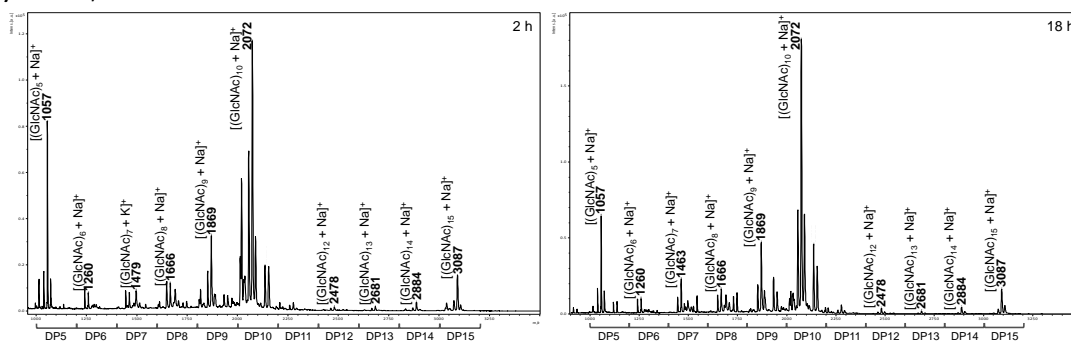
b) La incorporació d'aquestes mutacions al mutant del residu assistent ha donat lloc a una disminució de l'activitat hidrolítica respecte aquest mutant simple, reflectida en una disminució d'entre 2 i 3 ordres de magnitud respecte aquest amb els substrats amb 4-metilumbeliferona, i en una eliminació de l'estat considerat pre-estacionari amb (GlcNAc)₄ com a substrat. Tot i així, els valors d'activitat $V_0/[E]$ dels mutants G113S/D151A, F119A/D151A i S110G/D151A davant (GlcNAc)₄ són del mateix ordre que els de la fase estacionària del mutant D151A.

c) En el cas del mutant doble D149A/D151A l'activitat hidrolítica també es veu disminuïda entre 2 i 3 ordres de magnitud amb els substrats artificials respecte el mutant simple D151A, i en aquest cas també disminueix 1 ordre de magnitud en el consum de (GlcNAc)₄, tot i que no es veu reflectit en una disminució en la formació de productes d'hidròlisi.

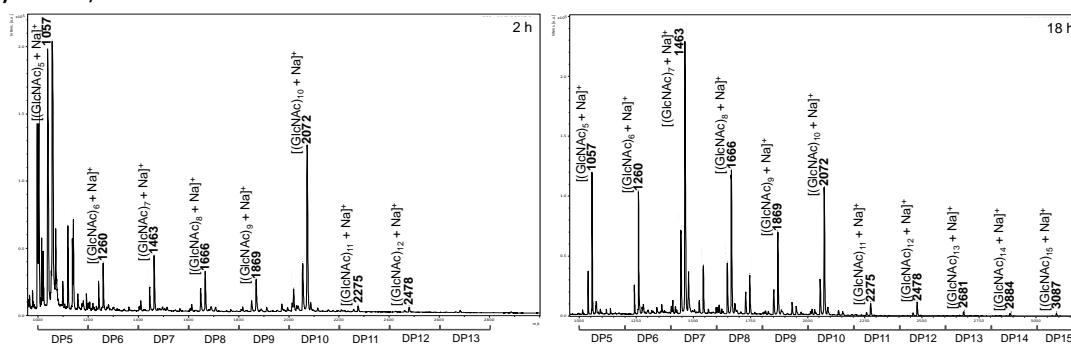
4.3.4. Activitat glicosintasa dels dobles mutants, polimerització de (GlcNAc)₅-ox

S'ha analitzat l'activitat glicosintasa dels mutants dobles utilitzant (GlcNAc)₅-ox com a substrat per a la reacció de polimerització. S'utilitza una concentració de substrat de 12 mM i de 0,25 mg·mL⁻¹ d'enzim i s'incuba la reacció durant 2 i 18 hores.

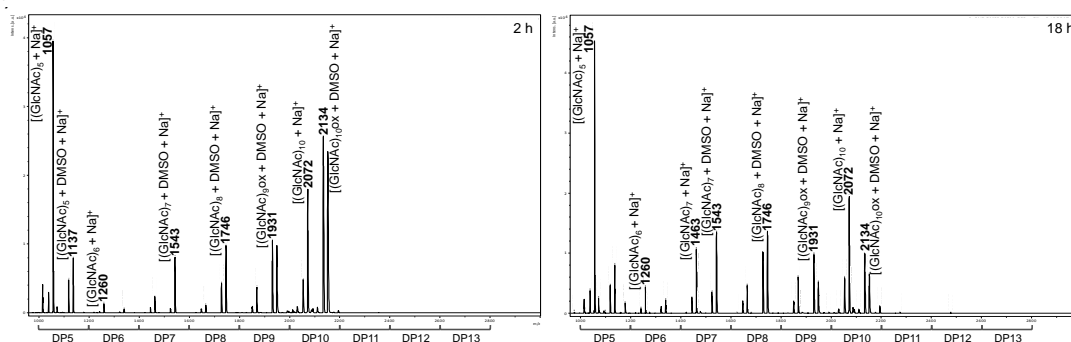
A) D149A/D151A



B) S110G/D151A



C) G113S/D151A



D) F119A/D151A

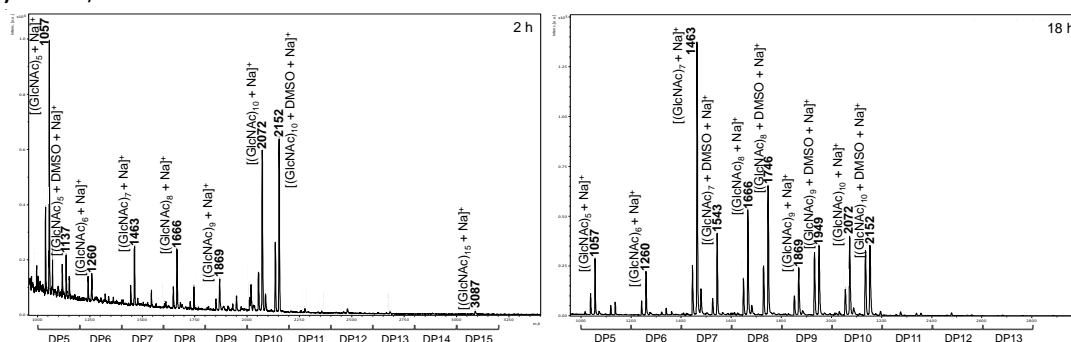


Figura 4.16. Espectre de MALDI-TOF dels productes de la fracció insoluble de la reacció de polimerització de (GlcNAc)₅-ox catalitzada pels mutants dobles d'*SpChiD*. A) D149A/D151A; B) S110G/D151A; C) G113S/D151A; D) F119A/D151A. Productes obtinguts al cap de 2 hores (esquerra) i 18 hores (dreta) de reacció.

De la mateixa manera que amb el mutant simple D151A, al cap de 2 hores de reacció es detecta formació de precipitat en les reaccions catalitzades pels 4 mutants dobles. El precipitat format pels diferents mutants consta d'una mescla de COS amb diferents graus de polimerització, entre els que es troba $(\text{GlcNAc})_{10}$ com a producte majoritari (Figura 4.16, Taula 4.4). Els rendiments en polímer obtinguts al cap de 2 h de reacció pels mutants S110G/D151A i F119A/D151A no milloren respecte el rendiment obtingut pel mutant simple D151A, essent el precipitat format pràcticament negligible. Aquests rendiments en polímer augmenten al cap de 18 hores de reacció per ambdós mutants, però el producte majoritari esdevé $(\text{GlcNAc})_7$.

En canvi, per als mutants D149A/D151A i G113S/D151A els rendiments en polímer obtinguts al cap de 2 hores de reacció són del 13% i 50% respectivament. En el cas del mutant D149A/D151A el rendiment aparent de $(\text{GlcNAc})_{10}$ és del 8,7% amb una ràtio COS $\text{DP}_{\geq 10}/\text{DP}_6\text{-DP}_9$ del 2,7; mentre que per al mutant G113S/D151A el rendiment aparent de $(\text{GlcNAc})_{10}$ és del 27,8%, amb una ràtio respecte els productes intermedis de 1,7. Aquests resultats indiquen que tot i obtenir un rendiment aparent de $(\text{GlcNAc})_{10}$ més elevat amb el mutant G113S/D151A, a causa també del major rendiment en polímer obtingut, el precipitat conté més proporció de productes intermedis, segurament a causa de l'activitat hidrolítica residual més elevada que no pas el mutant D149A/D151A.

Al cap de 18 h de reacció els rendiments en polímer (p/p) augmenten fins a un 30% i un 68%, respectivament, i $(\text{GlcNAc})_{10}$ segueix essent el producte majoritari en ambdues reaccions. En el cas del mutant D149A/D151A, $(\text{GlcNAc})_{10}$ representa el 58% del total de productes del precipitat. La proporció de productes intermedis no incrementa quasi i la ràtio COS $\text{DP}_{\geq 10}/\text{DP}_6\text{-DP}_9$ segueix essent superior a 2. El rendiment aparent de $(\text{GlcNAc})_{10}$ incrementa fins a un 19%, a causa de l'increment en rendiment en polímer. En canvi, amb el mutant G113S/D151A, tot i l'increment del rendiment en polímer, el rendiment aparent de $(\text{GlcNAc})_{10}$ disminueix fins a un 21% a causa de l'increment en la proporció de productes intermedis $(\text{GlcNAc})_6\text{-(GlcNAc)}_9$, i l'increment de $(\text{GlcNAc})_5$. Tot i seguir sent $(\text{GlcNAc})_{10}$ el producte majoritari, la ràtio $\text{DP}_{\geq 10}/\text{DP}_6\text{-DP}_9$ és aproximadament 0,6.

Taula 4.4. Productes glicosintasa de la reacció de polimerització de (GlcNAc)₅-ox catalitzada pels mutants de la 2a generació GS d'SpChiD. S'inclou el mutant senzill D151A utilitzat com a base per a la segona generació GS a efectes de comparació.

Mutant	2 h de reacció				18 h de reacció			
	Pics (% Àrea)	Rendiment precipitat (p/p)	Rendiment aparent		Pics (% Àrea)	Rendiment precipitat (p/p)	Rendiment aparent	
			DP6-DP9	DP≥10			DP6-DP9	DP≥10
D151A	DP10 (63,5%), DP9 (13,2%), DP8 (9,5%), DP5 (6,4%), DP7 (4,1%), DP6 (1,8%), DP11-12 (1,4%)	<2,5% (<2,5%) ¹	0,72% (0,76%) ¹	1,62% (1,06%) ¹	DP7 (27,6%), DP10 (24,8%), DP8 (18,3%), DP9 (14,7%), DP5 (7,7%), DP6 (6,3%), DP11 (<0,6%)	N.D. ² (47,9%) ¹	N.D. (39,85%) ¹	N.D. (5,51%) ¹
D149A/D151A	DP10 (61,2%), DP9 (14,0%), DP5 (8,3%), DP8 (5,8%), DP15 (3,6%), DP7 (3,6%), DP11-14 (2,3%), DP6 (1,2%)	13%	3,2%	8,7%	DP10 (58,2%), DP9 (15,1%), DP8 (7,9%), DP5 (6,4%), DP7 (6,2%), DP15 (2,7%), DP11-14 (2,2%), DP6 (1,2%)	30%	9,1%	18,9%
S110G/D151A	DP5 (71,6%), DP10 (14,7%), DP7 (3,9%), DP8 (3,5%), DP9 (3,2%), DP6 (2,5%), DP11-13 (0,7%)	- (F.S + F.I) ³			DP7 (36,7%), DP8 (20,4%), DP10 (15,0%), DP9 (9,7%), DP6 (8,7%), DP5 (6,6%), DP11-14 (2,7%), DP15 (>0,1%)	<2,5%	1,9%	0,4%
G113S/D151A	DP10 (55,6%), DP9 (16,3%), DP5 (12,0%), DP8 (8,8%), DP7 (4,9%), DP6 (2,4%)	50%	16,2%	27,8%	DP10 (31,2%), DP8 (19,9%), DP5 (17,8%), DP9 (15,3%), DP7 (13,5%), DP6 (2,2%)	68%	34,6%	21,3%
F119A/D151A	DP10 (49,0%), DP5 (26,3%), DP8 (9,1%), DP7 (7,4%), DP9 (4,6%), DP6 (3,7%), DP15 (<0,1%)	<2,5%	0,6%	1,2%	DP7 (30,0%), DP8 (25,6%), DP10 (20,2%), DP9 (16,6%), DP5 (3,9%), DP6 (3,3%), DP11-12 (0,4%)	16%	12,1%	3,3%

Resultats obtinguts a partir dels espectres de MALDI-MS de les reaccions de polimerització de (GlcNAc)₅-ox, 0,25 mg·mL⁻¹ d'enzim, 12 mM de substrat en 50 mM Na₂HPO₄ pH 7 a 37°C. DPn fa referència a (GlcNAc)_n

El rendiment aparent (DP6-DP9) és l'abundància de COS d'entre DP6 i DP9 (productes d'hidròlisi o TG) calculat com el producte del percentatge d'àrea dels pics pel rendiment de precipitat.

El rendiment aparent (DP≥10) és l'abundància de COS ≥ DP10 (productes glicosintasa) calculat com el producte del percentatge de l'àrea dels pics pel rendiment de precipitat.

¹ Dades a 24 mM de substrat i 1 mg·mL⁻¹ d'enzim, presentades a la Taula 3.4, capítol 3.

² N.D. no determinat

³ L'espectre de MALDI-MS correspon a la mescla de reacció, i no a la fracció insoluble corresponent al precipitat format, per aquest motiu l'àrea de DP5 és tant abundant.

Amb la incorporació d'una segona mutació a la mutació del residu assistent s'ha aconseguit disminuir l'activitat hidrolítica entre 2-3 ordres de magnitud respecte el mutant simple, és a dir, entre 4-5 ordres de magnitud respecte *SpChiD wt* amb els substrats amb 4-metilumbeliferona. Els mutants segueixen mantenint certa activitat residual amb GlcNAC-MU com a substrat, essent el mutant G113S/D151A el que presenta una major disminució de l'activitat. En canvi, amb (GlcNAC)₄ com a substrat, substrat natural de quitinases, la disminució de l'activitat es reflecteix en una pèrdua de la primera etapa ràpida (estat pre-estacionari), però en canvi, els valors $V_0/[E]$ són del mateix ordre que per al mutant simple D151A, és a dir, 10^2 vegades menys actius que *SpChiD wt*. Amb (GlcNAC)₄, el mutant D149A/D151A és el que presenta una major disminució de l'activitat en relació al consum de substrat. Tot i aquesta disminució de l'activitat hidrolítica de tots els mutants dobles, els enzims mantenen la capacitat de formar nous enllaços glicosídics, donant lloc a la formació de productes amb DP>5 quan s'utilitza (GlcNAC)₅-ox com a substrat. En temps de reacció curts tots els enzims formen (GlcNAC)₁₀ a partir de la polimerització de dues molècules de (GlcNAC)₅-ox, però a causa de l'activitat hidrolítica residual que mantenen els mutants S110G/D151A i F119S/D151A en temps de reacció llargs (GlcNAC)₁₀ és hidrolitzat, de la mateixa manera que amb el mutant simple D151A. En canvi, s'han aconseguit rendiments en polímer més elevats amb els mutants G113S/D151A i D149A/D151A, que alhora són els mutants que presenten menor activitat hidrolítica. Amb ambdós mutants s'ha aconseguit un rendiment aparent de (GlcNAC)₁₀ del 20% aproximadament. Malgrat el mutant G113S/D151A dona lloc a un rendiment de precipitat superior, del 68%, aquest conté més productes intermedis d'hidròlisi, essent més abundants aquests que els productes provinents de la reacció GS ((GlcNAC)₁₀/(GlcNAC)₆-(GlcNAC)₉ ≈ 0,6), el que pot dificultar la purificació del polímer. En canvi, amb el mutant D149A/D151A, un 60% del precipitat format és (GlcNAC)₁₀, amb una proporció d'aquest respecte els productes de TG intermedis de més del doble, al cap de 18 hores de reacció.

En base als resultats obtinguts, s'ha seleccionat el mutant D149A/D151A, corresponent al mutant dels dos residus Asp del motiu DxDxE, que presenta una disminució en l'activitat hidrolítica i un increment en rendiment en polímer respecte el mutant simple D151A, per a seguir amb la optimització de la glicosintasa.

4.3.5. Mutant *SpChiD* D149A/D151A

Tal com s'ha exposat, la incorporació de la mutació D149A al mutant del residu assistent D151A dona lloc a un enzim hidrolíticament menys actiu (Figura 4.17), i a un increment de l'activitat de condensació de (GlcNAC)₅-ox, tant en rendiment en polímer com en un increment de la durada dels productes GS i de TG.

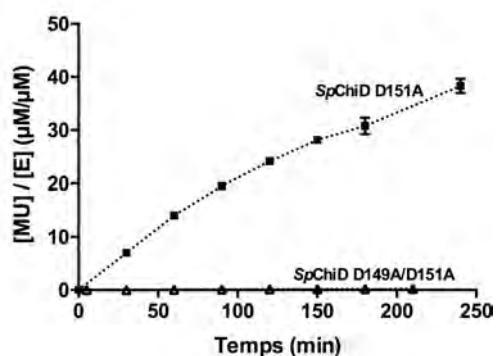


Figura 4.17. Comparació del curs de reacció de l'activitat hidrolítica dels mutants D151A (1 μM) i D149A/D151A (5 μM) amb GlcNAc-MU. 50 μM GlcNAc-MU en 50 mM Na_2HPO_4 pH 7 a 37°C.

A més, per a comprovar l'estabilitat dels productes GS i de TG formats, s'ha incubat una reacció amb $(\text{GlcNAc})_5\text{-ox}$ durant 48 hores, en la que s'ha obtingut un increment en rendiment en polímer de fins el 48% (p/p). Cal destacar que, tot i que hi ha un augment dels productes intermedis amb DPs entre 6 i 9, $(\text{GlcNAc})_{10}$ segueix essent el producte majoritari (45% respecte el total de productes del precipitat), el que indica una important estabilitat del producte GS.

De la mateixa manera que s'ha realitzat amb el mutant simple D151A, també s'han variat les concentracions d'enzim i substrat en la reacció de polimerització de $(\text{GlcNAc})_5\text{-ox}$. En totes les reaccions $(\text{GlcNAc})_{10}$ segueix essent el producte majoritari. Quan s'incrementa la concentració d'enzim fins a $0,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ s'aconsegueix augmentar el rendiment en polímer fins al 41% al cap de 18 h de reacció, i tot i que el rendiment aparent de $(\text{GlcNAc})_{10}$ augmenta lleugerament, també incrementa la presència de COS intermedis amb DP6-DP9 i de $(\text{GlcNAc})_5$, de tal manera que la ràtio COS amb $\text{DP}\geq 10/\text{COS DP6-DP9}$ disminueix fins a un 1,4% (Figura 4.18A). Per altra banda, quan s'incrementa la concentració de substrat fins a 24 mM el rendiment en polímer es manté (30%), i tot i que també es manté la ràtio $\text{DP}\geq 10/\text{DP6-DP9}$, la presència de $(\text{GlcNAc})_5$ augmenta fins a un 8,4% en rendiment aparent (Figura 4.18B). Aquests resultats suggereixen que tant un increment en la concentració d'enzim com en la concentració de donador donen lloc a una més ràpida hidròlisi dels productes de TG, o a un increment de l'activitat de TG, tal com succeeix amb el mutant simple D151A.

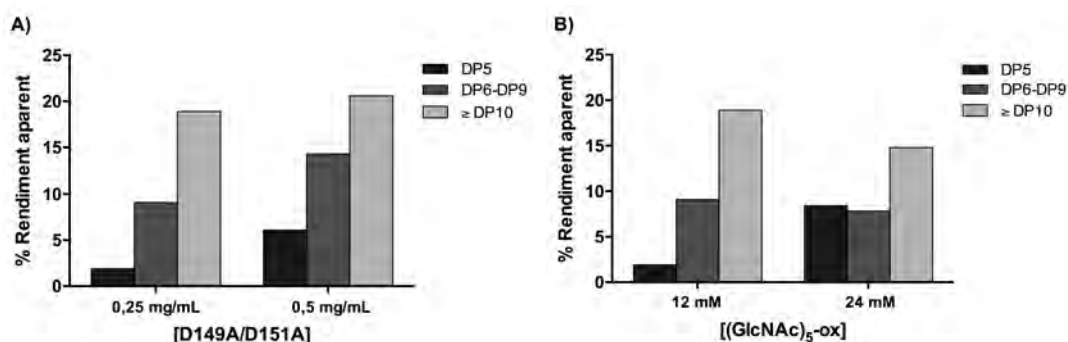


Figura 4.18. Representació dels productes de TG presents en la reacció de polimerització de $(\text{GlcNAc})_5\text{-ox}$ catalitzada per *SpChiD* D149A/D151A en funció de la concentració d'enzim (A) i de la concentració de donador (B). Productes obtinguts al cap de 18 hores de reacció.

Per altra banda, també s'ha realitzat una reacció de polimerització amb el derivat oxazolina de DP5 monodesacetilat en el segon residu des de l'extrem no-reductor (ADAAA-ox) (12 mM). Tot i que al cap de 24 h de reacció no es detecta formació de precipitat, l'anàlisi de la mescla de reacció per MALDI-TOF-MS revela la presència d'una mescla de COS solubles amb DPs entre 5 i 15, essent DP9 didesacetilat el producte majoritari, en lloc de DP10(N,N) provinent de dues molècules d'ADAAA-ox, tal com caldria esperar (Figura 4.19). La mescla de COS formada conté DP6-DP8 i DP10 monodesacetilats, DP7-DP13 didesacetilats i DP13-DP15 tridesacetilats. L'espectre de MALDI-TOF també revela la presència de $(\text{GlcNAc})_5$, el que pot explicar la presència de DP8 i DP10 monodesacetilats. A diferència del mutant simple D151A, amb el mutant doble s'obté fins a DP15 (tridesacetilat) soluble, però en canvi, no es dona la formació de precipitat.

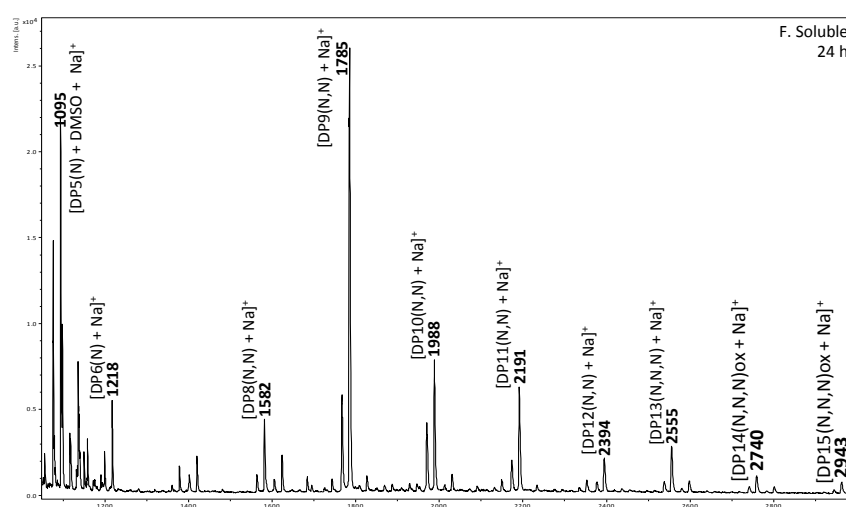


Figura 4.19. Espectre de MALDI-TOF dels productes de la fracció soluble de la reacció de polimerització d'ADAAA-ox (12 mM) catalitzada pel mutant *SpChiD* D149A/D151A ($0,25 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). Productes obtinguts al cap de 24 hores de reacció.

Per últim, també s'ha analitzat la reacció de condensació donador-acceptor, utilitzant $(\text{GlcNAc})_5\text{-ox}$ com a donador (12 mM) i $(\text{GlcNAc})_2$ com acceptor (24 mM). De la mateixa manera que amb el mutant simple D151A, el producte majoritari és $(\text{GlcNAc})_{10}$ (Figura 4.20), en lloc de $(\text{GlcNAc})_7$ com caldria esperar de la condensació d'ambdós COS, tot i que en comparació amb la reacció de polimerització de $(\text{GlcNAc})_5\text{-ox}$, hi ha un increment en la proporció de $(\text{GlcNAc})_7$ present en el precipitat, segurament a causa de la reacció de condensació donador-acceptor. Els resultats segurament són conseqüència de que l'acceptor no es troba en excés respecte el donador, donant lloc preferentment a la condensació de dues molècules de donador.

En conclusió, *SpChiD* D149A/D151A presenta una activitat hidrolítica molt reduïda, tot i que manté una baixa activitat hidrolítica residual, i dona lloc a la formació de polímer (principalment $(\text{GlcNAc})_{10}$), que incrementa al llarg del temps i no és hidrolitzat, donant lloc a un rendiment de fins al 30% al cap de 18 h de reacció. A més, amb aquest mutant s'ha obtingut $(\text{GlcNAc})_{15}$ com a producte de TG a causa de la formació de dos enllaços glicosídics nous.

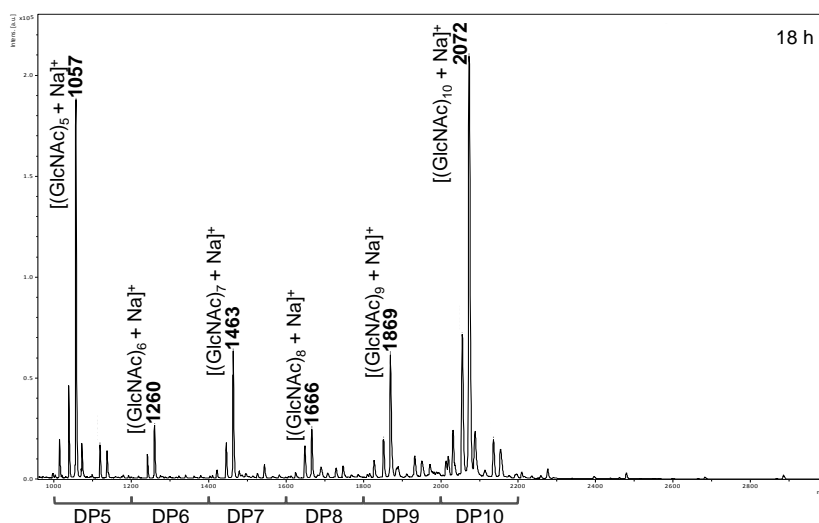


Figura 4.20. Espectre de MALDI-TOF dels productes de la fracció insoluble de la reacció de condensació de (GlcNAc)₅-ox com a donador (12 mM) i (GlcNAc)₂ com a acceptor (24 mM), catalitzada pel mutant *SpChiD* D149A/D151A. Productes obtinguts al cap de 18 hores de reacció.

4.4. Tercera generació glicosintasa

Amb la segona generació de mutants s'ha aconseguit disminuir l'activitat hidrolítica respecte el mutant simple D151A, i com a conseqüència els rendiments en polímer han incrementat. El mutant D149A/D151A és el que presenta una menor activitat hidrolítica davant (GlcNAc)₄ i una major proporció de (GlcNAc)₁₀ (60% aproximadament) en el precipitat format amb una relació de productes GS respecte productes d'hidròlisi i/o TG >2 al cap de 18 hores de reacció, però tot i així, encara presenta certa activitat hidrolítica residual. Per aquest motiu, s'ha decidit dissenyar una tercera generació de mutants.

4.4.1. Disseny racional dels triples mutants d'*SpChiD*

L'anàlisi de diferents mutants de residus de la quitinasa D de *S. proteamaculans*, com de mutants d'altres quitinases de la família GH18 suggereix: i) l'eliminació de residus aromàtics en els subsetis positius incrementa la hidròlisi, per tant, la presència d'aquests residus aromàtics en els subsetis positius influeix negativament l'activitat hidrolítica i conseqüentment l'activitat de TG podria veure's afavorida i, ii) l'eliminació de residus aromàtics en els subsetis negatius incrementa l'activitat de TG, és a dir, una disminució de la rigidesa de la cadena en aquesta zona sembla afavorir la transglicosidació.

Alguns exemples d'aquestes observacions són els mutants W114A, W160A, W290A i Y154A de la quitinasa D de *S. proteamaculans*, residus localitzats en els subsetis positius, en els que la substitució per una Ala resulta en un increment de l'activitat hidrolítica (Madhuprakash *et al.*, 2012, 2014; Madhuprakash, Bobbili, *et al.*, 2015) i també es troben

exemples d'altres quitinases com el mutant W197A de *CrChiA* que dona lloc a un enzim més actiu hidrolíticament (Taira *et al.*, 2010). A més, la introducció d'un Trp en el subseti +1 de *CrChiA* resulta en un increment de l'activitat de TG (Umemoto *et al.*, 2015). També el mutant doble D313N/F396W d'*SmChiA*, corresponent al mutant del residu assistent juntament amb la substitució de la Phe396 localitzada al subseti +2 per un Trp, residu més aromàtic, resulta en un enzim amb major activitat de TG (Zakariassen *et al.*, 2011).

Per altra banda, en relació als subsetis negatius, la substitució dels residus Tyr222 i Tyr28 per Ala en *SpChiD*, situats en el subseti -1, resulta en un increment de l'activitat de TG (Madhuprakash *et al.*, 2012; Madhuprakash, Bobbili, *et al.*, 2015). Un altre exemple és el mutant W167A d'*SmChiA*, residu situat en el subseti -3, en el que també es dona un increment de l'activitat de TG (Aronson Jr. *et al.*, 2006).

Tenint en consideració els estudis reportats, s'han dissenyat els següents mutants triples (Figura 4.21):

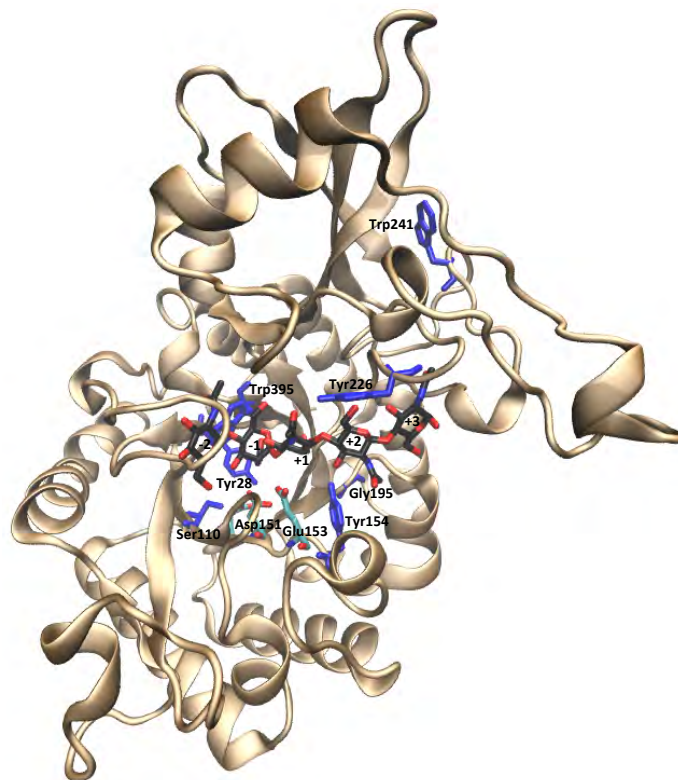


Figura 4.21. Estructura d'*SpChiD* on es mostra els residus proposats a ser substituïts en la 3a generació GS. Es mostren els residus Asp149, Asp151 i Glu153 de la tríada catalítica en blau cel, i els residus proposats a ser substituïts per a la 3a generació GS en blau fosc (Tyr28, Ser110, Tyr154, Gly195, Tyr226, Trp241 i Trp395). (GlcNAc)₅ es troba posicionat entre els subsetis -2 i +3. L'estructura s'ha obtingut a partir de l'alineament estructural d'*SpChiD* (PDB 4Q22) i el mutant E153Q de la quitinasa de *Moritella marina* en complex amb (GlcNAc)₅ (PDB 4MB5).

- Y28A/D149A/D151A

La Tyr28 es troba propera al *loop* Asn30-Asp42, característic d'*SpChiD*. L'anell aromàtic d'aquest residu interacciona amb el grup metil de l'*N*-acetil del monòmer de GlcNAc situat en el subseti -1 mitjançant interaccions hidrofòbiques d'apilament. Quan s'uneix el substrat, la Tyr28 es mou cap a l'Asp149 per a compensar la pèrdua d'interaccions que aquest pateix a causa de la rotació del residu assistent cap al residu àcid/base general. La mutació puntual d'aquesta Tyr per una Ala dona lloc a un enzim amb aproximadament la mateixa activitat hidrolítica que l'enzim salvatge, però una pèrdua total de l'activitat quitobiasa, acompanyada d'un increment de l'activitat de TG. La mutació provoca un canvi en les interaccions que resulta en un increment del temps de retenció del substrat o intermedi oxazolina en la cavitat d'unió, que conseqüentment afavoreix l'activitat de TG (Madhuprakash, Bobbili, *et al.*, 2015). La combinació d'aquesta mutació amb el mutant doble D149A/D151A, que mostra una important disminució de l'activitat hidrolítica, pot resultar en un increment important de l'activitat de TG (Figura 4.22A).

- S110G/D149A/D151A

La cadena lateral de la Ser110 es troba situada entre els dos Asp del motiu DxDe, i participa en la cascada de posicionament de l'Asp151. La substitució d'aquest residu per una Gly dificulta la formació de ponts d'hidrogen de tal manera que disminueix la capacitat de protonar l'Asp151, i conseqüentment aquest no pot protonar el Glu catalític. El mutant puntual S110G presenta una disminució de l'activitat hidrolítica d'aproximadament un 25% (Madhuprakash *et al.*, 2012). Tot i que la combinació d'aquesta mutació amb el mutant simple D151A no ha donat lloc a una disminució de l'activitat hidrolítica respecte el mutant D151A ni a un increment de l'activitat de TG, la combinació d'aquesta mutació amb el doble mutant D149A/D151A pot donar lloc a un canvi de comportament d'aquest, a causa de la implicació d'aquest residu en la cadena de protonació (Figura 4.22B).

- D149A/D151A/Y154W

La Tyr154 es troba al costat de la tríada catalítica, després del Glu que actua d'àcid/base general. La substitució puntual d'aquesta per una Ala resulta en un increment de l'activitat hidrolítica, però reté l'activitat de TG de l'enzim *wt*, tot i que els productes de TG són hidrolitzats més ràpidament (Madhuprakash *et al.*, 2012). Aquest fet suggereix la importància de la presència del grup hidroxil fenòlic, en els subsetis positius, per al manteniment de l'activitat de TG. Per aquest motiu, es decideix substituir la Tyr154 per un Trp, amb el propòsit d'incrementar l'activitat de TG sense incrementar l'activitat hidrolítica, que alhora es veurà disminuïda per la mutació dels dos Asp de la tríada catalítica per Ala (Figura 4.22C).

- D149A/D151A/G195W

El residu Gly195 es troba en el subseti +2, en la sortida del solc catalític. La mutació puntual d'aquesta per un Trp no modifica l'activitat hidrolítica de l'enzim però l'activitat de TG es veu incrementada. La presència d'un residu més voluminós provoca un bloqueig parcial de

la sortida del centre actiu, que dona lloc a un increment en el temps de retenció del substrat o l'intermedi en el centre actiu que afavoreix la reacció de TG (Madhuprakash *et al.*, 2014). Aquest increment de l'activitat de TG pot ser a causa d'un increment en el nombre d'interaccions enzim-substrat, o bé a causa de la introducció d'un pegat hidrofòbic que desfavoreix l'entrada de molècules d'aigua. Afegir aquesta mutació al mutant doble D149A/D151A, amb el que s'ha reduït significativament l'activitat hidrolítica de l'enzim, podria afavorir un increment en la formació de productes de TG (Figura 4.22D).

- D149A/D151A/Y226W

La Tyr226 es troba en el subseti +2. Aquest residu correspon al residu Phe396 de la quitinasa A de *Serratia marcescens*. La mutació d'aquesta Phe per un Trp juntament amb la mutació del residu Asp assistent per una Asn dona lloc a un enzim amb una elevada activitat de TG (Zakariassen *et al.*, 2011). Per aquest motiu, es va decidir substituir la Tyr226 d'*SpChiD* per un Trp, amb la intenció d'incrementar l'activitat de TG de l'enzim. Recentment, s'ha descrit la mutació d'aquesta Tyr226 per un Trp, donant lloc a un enzim que presenta una disminució del 80% de l'activitat hidrolítica respecte l'enzim *wt* i un manteniment de l'activitat de TG. La combinació d'aquesta mutació amb la substitució de l'Asp assistent per una Asn dona lloc al mutant amb l'activitat de TG més elevada descrita fins al moment, amb el que s'obté un rendiment del 22% (Madhuprakash *et al.*, 2018), pel que és un bon candidat per assajar la seva activitat glicosintasa amb substrats oxazolina (Figura 4.22E).

- D149A/D151A/W241A

El residu Trp241 es troba a la superfície de la proteïna, en la regió accessible al solvent. El Trp241 interacciona mitjançant interaccions d'apilament amb el substrat i es creu que pot tenir un paper de guia de les molècules de quitina cap al centre catalític. La mutació puntual W241A dona lloc a una disminució de l'activitat hidrolítica amb un increment de l'activitat de TG (Madhuprakash *et al.*, 2012). La mutació d'aquest residu per una Ala, juntament amb les mutacions dels residus Asp de la tríada catalítica, pot resultar en un enzim amb una elevada activitat de TG (Figura 4.22F).

- D149A/D151A/W395A

El residu Trp395 es troba en el solc catalític, en la zona propera on es localitza l'extrem no-reductor del substrat. La substitució d'aquest residu aromàtic per una Ala resulta en un efecte negatiu en la velocitat de catàlisi, que dona lloc a una disminució de l'eficiència catalítica davant (GlcNAc)₄ com a substrat i a un increment en la durada dels productes de TG amb una acumulació màxima al cap de 12 hores de reacció (Madhuprakash, Bobbili, *et al.*, 2015). La combinació d'aquesta mutació amb el mutant doble D149A/D151A pot resultar en l'acumulació de productes de TG en temps de reacció més llargs (Figura 4.22G).

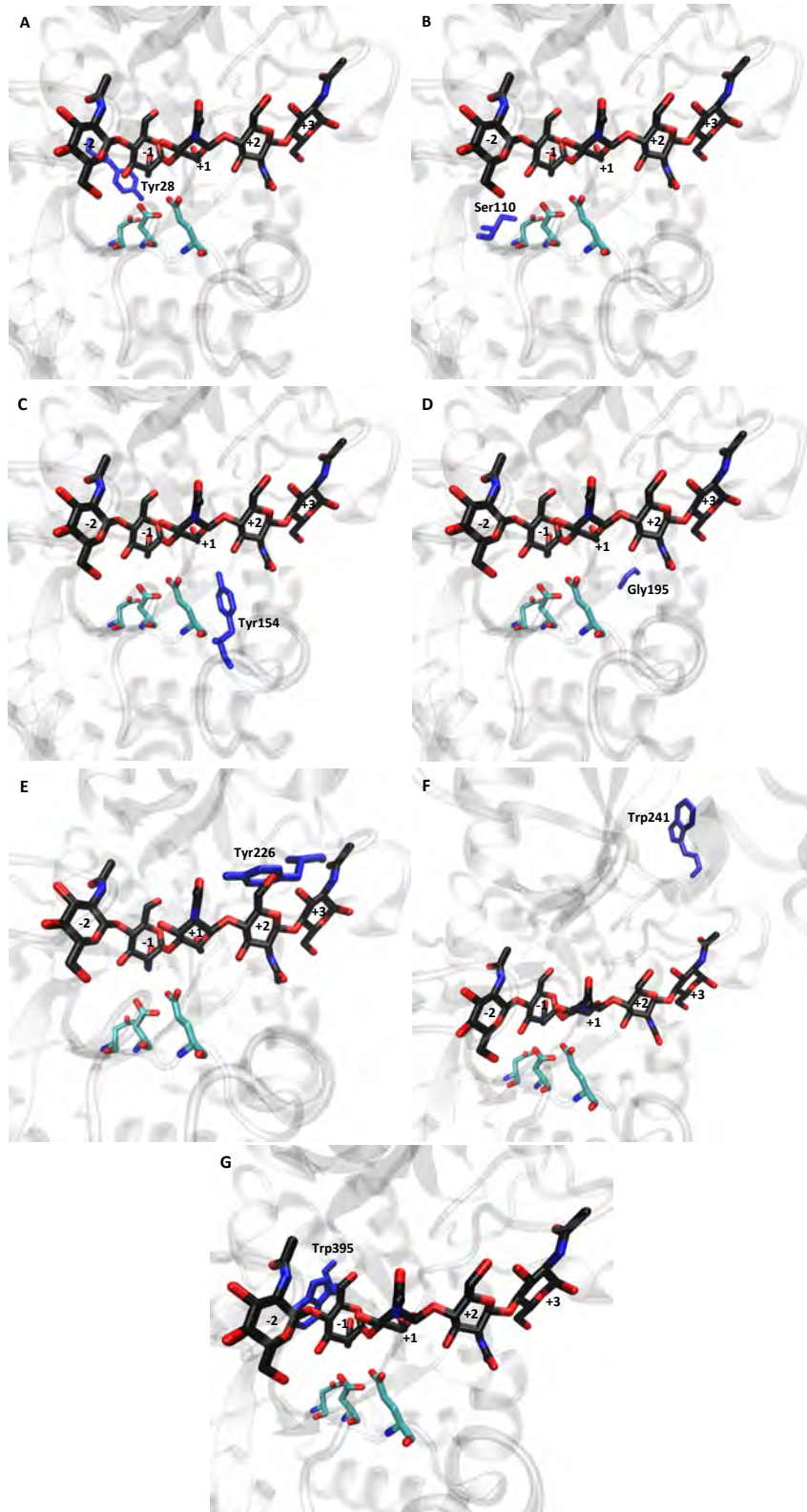


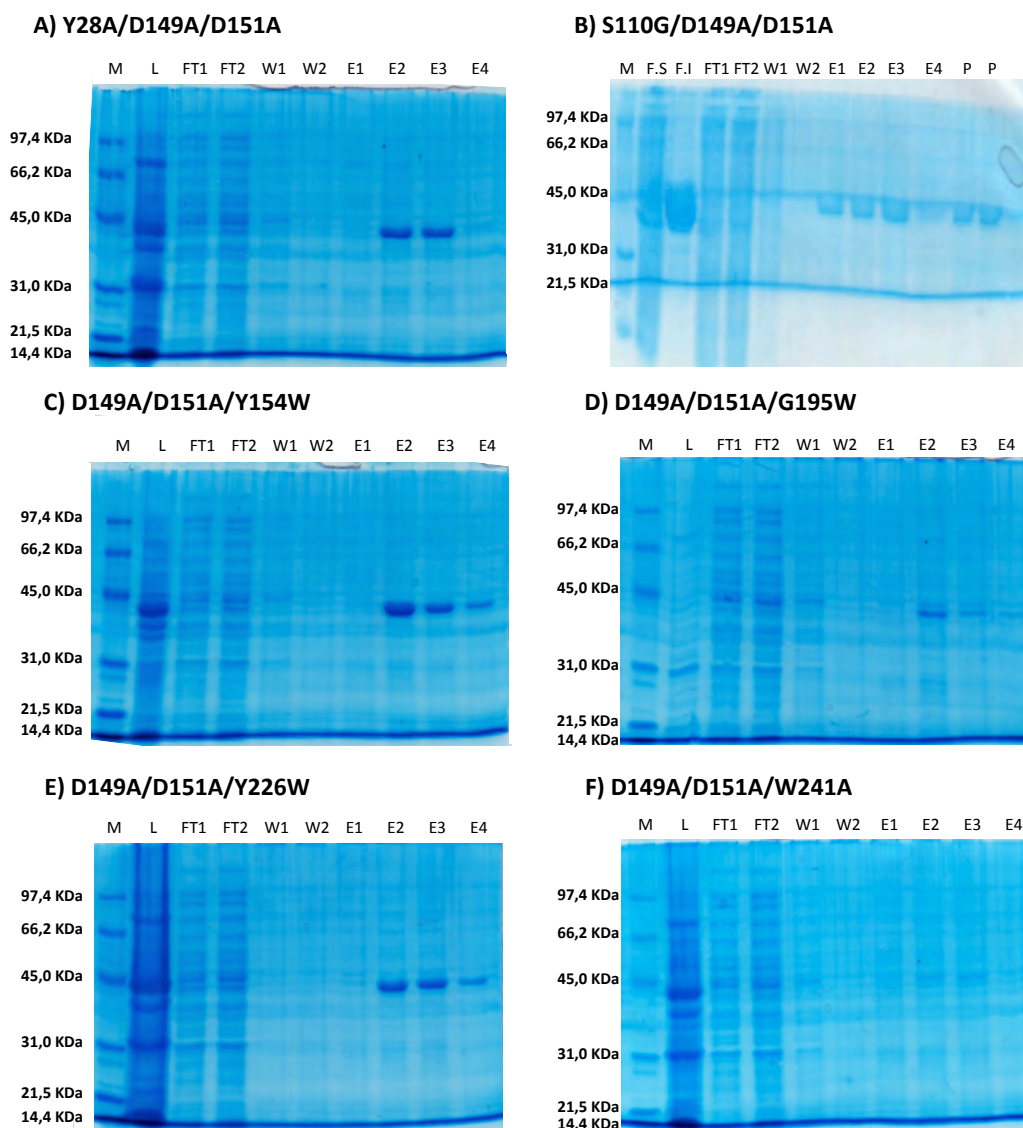
Figura 4.22. Residus proposats a ser substituïts en la 3a generació GS.

Es mostren els residus Asp149, Asp151 i Glu153 de la tríada catalítica en blau cel i els residus proposats a ser substituïts per a la 3a generació GS en blau fosc. A) Tyr28, B) Ser110, C) Tyr154, D) Gly195, E) Tyr226, F) Trp241 i G) Trp395. (GlcNAc)₅ es troba posicionat entre els subsetis -2 i +3. L'estructura s'ha obtingut a partir de l'alineament estructural d'*SpChiD* (PDB 4Q22) i el mutant E153Q de la quitinasa de *Moritella marina* en complex amb (GlcNAc)₅ (PDB 4MB5).

4.4.2. Expressió i purificació dels triples mutants

Els mutants triples també s'han obtingut per mutagènesi dirigida seguint el protocol de *Quickchange*[®] (veure part experimental) a partir de la seqüència d'ADN del mutant doble D149A/D151A i s'han confirmat les mutacions per seqüenciació.

Un cop expressats els mutants, seguint el mateix protocol que per a l'enzim *wt*, s'han purificat per cromatografia d'afinitat (veure part experimental) i s'han analitzat en un gel d' SDS-PAGE (Figura 4.23). Els rendiments de proteïna obtinguts són aproximadament els mateixos que els obtinguts amb els dobles mutants (entre 30 i 50 mg proteïna·L⁻¹ cultiu), excepte pels mutants D149A/D151A/W241A i D149A/D151A/W395A pels que el rendiment és d'aproximadament 15 mg·L⁻¹, el que suposa una disminució d'unes 10 vegades en comparació amb l'enzim *wt* (160 mg proteïna·L⁻¹ cultiu).



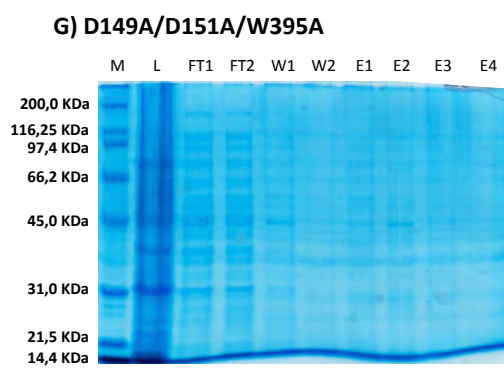


Figura 4.23. SDS-PAGE dels mutants triples d'*SpChiD*.

Gels SDS-PAGE del procés de purificació dels mutants triples amb les columnes *His SpinTrap columns* (GE Healthcare) A) *SpChiD* Y28A/D149A/D151A; B) *SpChiD* S110G/D149A/D151A; C) *SpChiD* D149A/D151A/Y154W; D) *SpChiD* D149A/D151A/G195W; E) *SpChiD* D149A/D151A/Y226W; F) *SpChiD* D149A/D151A/W241A; G) *SpChiD* D149A/D151A/W395A. M: *Marker Low Range*, L: Lisat cel·lular, FT1-FT2: *Flow through* de la columna, W1-W2: Rentats, E1-E4: Elucions de la proteïna, P: Proteïna final, un cop canviat el tampó.

4.4.3. Activitat hidrolítica dels triples mutants

S'analitza l'activitat hidrolítica davant GlcNAc-MU, (GlcNAc)₂-MU i (GlcNAc)₃-MU mitjançant l'assaig fluorimètric, a 3 concentracions d'enzim diferents (Taula 4.5).

Cap dels mutants triples mostra activitat davant els substrats (GlcNAc)₃-MU i (GlcNAc)₂-MU al cap de 24 hores. En canvi, tots mostren certa activitat hidrolítica residual davant el substrat més curt GlcNAc-MU, aproximadament la mateixa activitat que el mutant doble "parental", D149A/D151A, tot i que aquesta és pràcticament negligible en comparació amb l'enzim *wt* (entre 4 i 5 ordres de magnitud menys actius que aquest). La nova generació de mutants segueix mantenint certa activitat quitobiasa, que segurament es veu potenciada per la presència del grup 4-metilumbeliferona.

Taula 4.5. Activitat hidrolítica dels triples mutants d'*SpChiD* amb substrats fluorogènics

	GlcNAc-MU		(GlcNAc) ₂ -MU		(GlcNAc) ₃ -MU	
	$V_0/[E]$ (min^{-1})	MUT/WT	$V_0/[E]$ (min^{-1})	MUT/WT	$V_0/[E]$ (min^{-1})	MUT/WT
<i>SpChiD wt</i>	14,73	1	13,45	1	7,15	1
D151A	$1,68 \times 10^{-1}$	$1,14 \times 10^{-2}$	$2,24 \times 10^{-2}$	$1,66 \times 10^{-3}$	$1,63 \times 10^{-2}$	$2,29 \times 10^{-3}$
D149A/D151A	$1,14 \times 10^{-3}$	$7,74 \times 10^{-5}$	$<6,2 \times 10^{-4}$	$<4,65 \times 10^{-5}$	≈ 0	$<8,74 \times 10^{-5}$
Y28A/D149A/D151A	$8,28 \times 10^{-4}$	$5,62 \times 10^{-5}$	≈ 0	$<3,87 \times 10^{-6}$	≈ 0	$<7,28 \times 10^{-6}$
S110G/D149A/D151A	$1,01 \times 10^{-3}$	$6,83 \times 10^{-5}$	$<6,2 \times 10^{-4}$	$<4,65 \times 10^{-5}$	$<6,2 \times 10^{-4}$	$<8,74 \times 10^{-5}$
D149A/D151A/Y154W	$8,95 \times 10^{-4}$	$6,08 \times 10^{-5}$	≈ 0	$<3,87 \times 10^{-6}$	≈ 0	$<7,28 \times 10^{-6}$
D149A/D151A/G195W	$2,74 \times 10^{-3}$	$1,86 \times 10^{-4}$	$<5,2 \times 10^{-5}$	$<3,87 \times 10^{-6}$	≈ 0	$<7,28 \times 10^{-6}$
D149A/D151A/Y226W	$6,56 \times 10^{-4}$	$4,45 \times 10^{-5}$	$7,29 \times 10^{-4}$	$5,42 \times 10^{-5}$	$<5,2 \times 10^{-5}$	$<7,28 \times 10^{-6}$
D149A/D151A/W241A	$1,03 \times 10^{-3}$	$7,00 \times 10^{-5}$	$<5,2 \times 10^{-5}$	$<3,87 \times 10^{-6}$	≈ 0	$<7,28 \times 10^{-6}$
D149A/D151A/W345A	$2,38 \times 10^{-3}$	$1,61 \times 10^{-4}$	$<5,2 \times 10^{-5}$	$<3,87 \times 10^{-6}$	$<5,2 \times 10^{-5}$	$<7,28 \times 10^{-6}$

El valors $V_0/[E]$ $<6,2 \times 10^{-4}$ i $<5,2 \times 10^{-5}$ corresponen als límit de quantificació de l'assaig sota les condicions assajades. $<6,2 \times 10^{-4}$ per a 5 μM d'enzim, i 240 min de reacció, i $<5,2 \times 10^{-5}$ per a 10 μM d'enzim i 1440 min de reacció. Condicions de reacció: 50 μM de substrat en 50 mM Na_2HPO_4 pH 7 a 37°C.

En relació a l'activitat hidrolítica amb (GlcNAc)₄ com a substrat (Taula 4.6), tots els mutants presenten una disminució de l'activitat hidrolítica respecte el mutant doble D149A/D151A, excepte el mutant S110G/D149A/D151A que presenta la mateixa activitat hidrolítica que aquest i que el mutant doble S110G/D151A (veure apartat 4.3.3).

Els mutants Y28A/D149A/D151A, D149A/D151A/G195W, D149A/D151A/W241A i D149A/D151A/W395A són els que presenten una disminució més gran d'activitat, de més de 4 ordres de magnitud respecte l'enzim *wt*, en relació al consum de (GlcNAc)₄, i no es detecta formació de (GlcNAc)₂ ni pràcticament (GlcNAc)₃. En canvi, en els mutants D149A/D151A/Y154W i D149A/D151A/Y226W la velocitat de consum del substrat s'ha vist disminuïda de l'ordre de 10³ vegades respecte el *wt*, i tot i que no es detecta formació de (GlcNAc)₂, la formació de (GlcNAc)₃ és evident.

Taula 4.6. Activitat hidrolítica dels triples mutants d'*SpChiD* amb (GlcNAc)₄ com a substrat

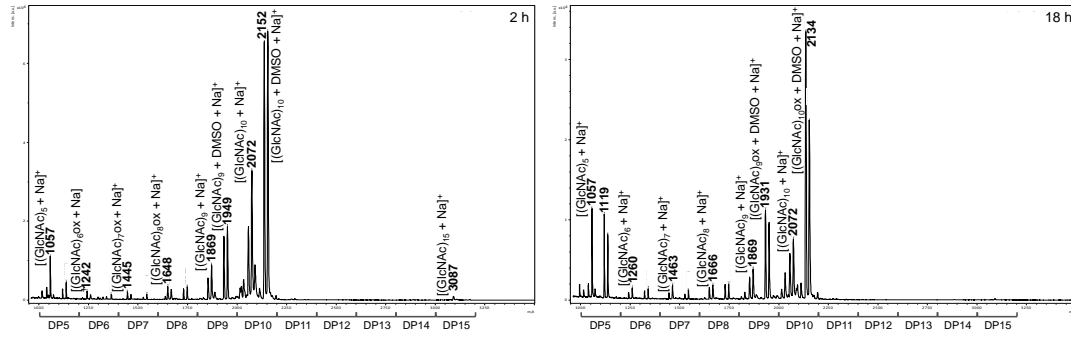
	Formació				Consum	
	(GlcNAc) ₂		(GlcNAc) ₃		(GlcNAc) ₄	
	V ₀ /[E] (min ⁻¹)	MUT/WT	V ₀ /[E] (min ⁻¹)	MUT/WT	V ₀ /[E] (min ⁻¹)	MUT/WT
<i>SpChiD wt</i>	7,58	1	8,47	1	-27,45	1
D151A	4,00 x 10 ⁻²	5,28 x 10 ⁻³	4,00 x 10 ⁻¹	4,72 x 10 ⁻²	-1,01	3,68 x 10 ⁻²
D149A/D151A	4,70 x 10 ⁻²	6,20 x 10 ⁻³	1,56 x 10 ⁻¹	1,84 x 10 ⁻²	-1,54 x 10 ⁻¹	5,61 x 10 ⁻³
Y28A/D149A/D151A	≈0	≈10 ⁻⁵	6,09 x 10 ⁻³	7,19 x 10 ⁻⁴	-8,54 x 10 ⁻³	3,11 x 10 ⁻⁴
S110G/D149A/D151A	2,37 x 10 ⁻²	3,12 x 10 ⁻³	2,01 x 10 ⁻¹	2,37 x 10 ⁻²	-1,80 x 10 ⁻¹	6,55 x 10 ⁻³
D149A/D151A/Y154W	3,61 x 10 ⁻³	4,76 x 10 ⁻⁴	8,65 x 10 ⁻²	1,02 x 10 ⁻²	-5,97 x 10 ⁻²	2,17 x 10 ⁻³
D149A/D151A/G195W	≈0	≈10 ⁻⁵	5,07 x 10 ⁻³	5,99 x 10 ⁻⁴	≈0	≈10 ⁻⁴
D149A/D151A/Y226W	≈0	≈10 ⁻⁵	3,96 x 10 ⁻²	4,67 x 10 ⁻³	-4,56 x 10 ⁻²	1,66 x 10 ⁻³
D149A/D151A/W241A	≈0	≈10 ⁻⁵	3,15 x 10 ⁻³	3,72 x 10 ⁻⁴	≈0	≈10 ⁻⁴
D149A/D151A/W395A	≈0	≈10 ⁻⁵	≈0	≈10 ⁻⁵	≈0	≈10 ⁻⁴

Condicions de reacció: 2 mM (GlcNAc)₄ en 50 mM Na₂HPO₄ pH 7 a 37°C

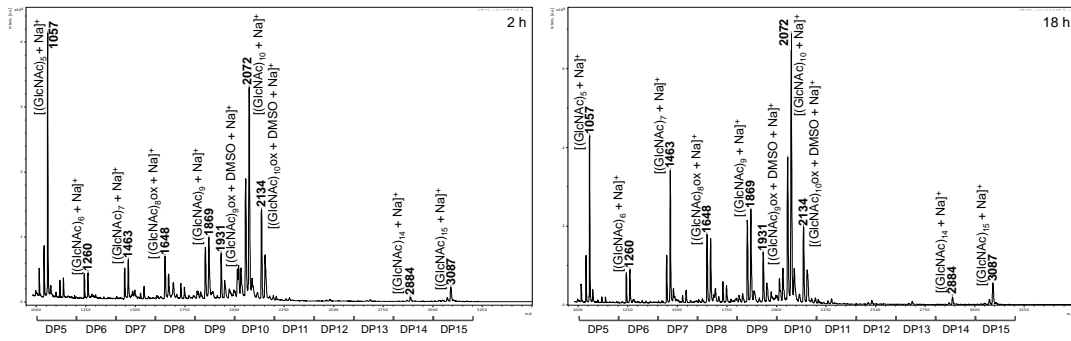
4.4.4. Activitat glicosintasa dels triples mutants, polimerització de (GlcNAc)₅-ox

En relació a l'activitat de polimerització amb (GlcNAc)₅-ox (12 mM), al cap de 2 hores de reacció es detecta formació de precipitat en totes les reaccions catalitzades pels diferents mutants, amb rendiments variables d'entre un 2,5% i un 60%. En les reaccions dels mutants D149A/D151A/W241A i D149A/D151A/W395A aquest és molt insignificant (rendiments 4% i <2,5%, respectivament) i l'espectre de MALDI-TOF presenta un patró diferent (Figura 4.24E i F), en el que es detecta principalment (GlcNAc)₅ i un pic principal no identificat amb una relació m/z≈2601, corresponent a una m/z d'entre (GlcNAc)₁₂ i (GlcNAc)₁₃. Es detecta també altres pics amb m/z no identificades, que podrien correspondre a COS amb DPs d'entre 13 i 20. Amb el mutant S110G/D149A/D151A no es detecta formació de precipitat i no es realitza l'anàlisi per MALDI-TOF.

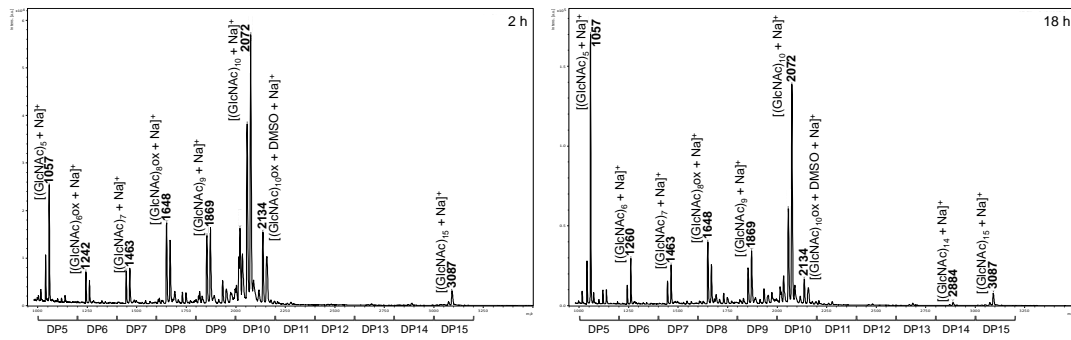
A) Y28A/D149A/D151A



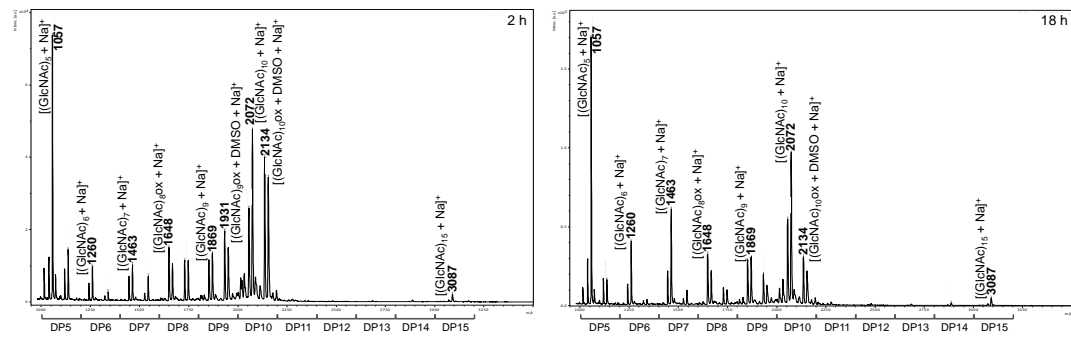
B) D149A/D151A/Y154W



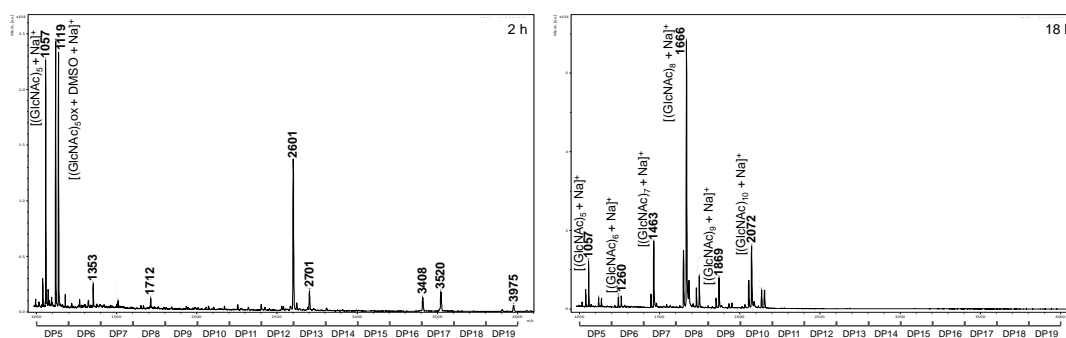
C) D149A/D151A/G195W



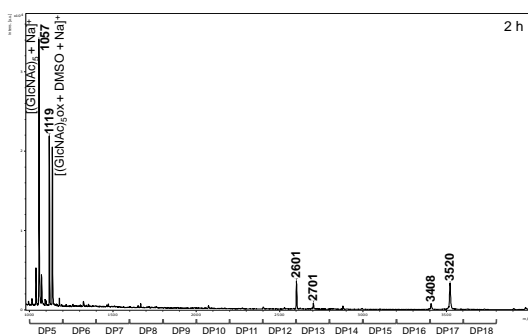
D) D149A/D151A/Y226W



E) D149A/D151A/W241A



F) D149A/D151A/W395A



G) S110G/D149A/D151A

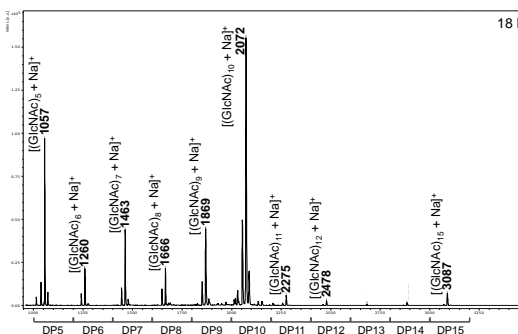


Figura 4.24. Espectre de MALDI-TOF dels productes de la fracció insoluble de la reacció de polimerització de $(\text{GlcNAc})_5\text{-ox}$ catalitzada pels mutants triples d'*SpChiD*. A) Y28A/D149A/D151A; B) D149A/D151A/Y154W; C) D149A/D151A/G195W; D) D149A/D151A/Y226W; E) D149A/D151A/W241A; F) D149A/D151A/W395A i G) S110G/D149A/D151A. Productes obtinguts al cap de 2 hores (esquerra) i 18 hores (dreta) de reacció.

El precipitat format pels altres 4 mutants consta d'una mescla de COS amb graus de polimerització entre 5 i 10, i en tots ells també es detecta $(\text{GlcNAc})_{15}$, provinent de la reacció de condensació de 3 molècules de $(\text{GlcNAc})_5\text{-ox}$ (Figura 4.24A-D). Del precipitat format, el pic majoritari correspon a $(\text{GlcNAc})_{10}$ per als 4 mutants. En el cas dels mutants D149A/D151A/Y154W i D149A/D151A/Y226W la proporció de $(\text{GlcNAc})_{10}$ obtinguda és d'aproximadament un 45%, a causa de la important presència de COS amb DPs entre 6 i 9, essent resultats esperables com a conseqüència de l'activitat hidrolítica residual que presenten ambdós mutants. En el cas del mutant D149A/D151A/G195W, també es detecten COS amb DPs entre 6 i 9, tot i que la proporció de $(\text{GlcNAc})_{10}$ és d'un 58%. En canvi, amb el mutant Y28A/D149A/D151A la proporció de $(\text{GlcNAc})_{10}$ és d'aproximadament un 75%, i pràcticament no es detecten productes intermedis, excepte $(\text{GlcNAc})_9$ que es troba en un 16%.

Els rendiments en producte (p/p) tot i seguir essent baixos, han incrementat respecte el rendiment del mutant doble parental (13% de rendiment) fins a un 20% i un 58% amb els mutants Y28A/D149A/D151A i D149A/D151A/Y154W, respectivament (Taula 4.7). El rendiment aparent de $(\text{GlcNAc})_{10}$ és del 29% per a aquest últim però a causa de la important presència de COS intermedis, la ràtio COS DP \geq 10/COS DP6-DP9 és d'1,5; en canvi,

per al mutant Y28A/D149A/D151A el rendiment aparent de $(\text{GlcNAc})_{10}$ és d'un 15%, però la ràtio és de 3,6, ja que quasi no es troba productes intermedis, excepte $(\text{GlcNAc})_9$.

Al cap de 18 hores de reacció el rendiment en precipitat dels mutants D149A/D151A/W241A i D149A/D151A/W395A no incrementa, i $(\text{GlcNAc})_8$ passa a ser el producte majoritari, fet que indica una hidròlisi dels possibles COS més llargs presents en temps més curts de reacció. Per a la resta de mutants hi ha un increment en rendiment de polímer (p/p) i $(\text{GlcNAc})_{10}$ segueix essent el producte majoritari, tot i que per als mutants D149A/D151A/Y154W i D149A/D151A/Y226W també incrementa la presència de COS intermedis amb DPs 6-9. En canvi, en els mutants Y28A/D149A/D151A i D149A/D151A/G195W, la proporció de COS intermedis es manté respecte a les 2 hores de reacció, tot i que hi ha un increment de $(\text{GlcNAc})_5$, que pot indicar la hidròlisi de $(\text{GlcNAc})_{10}$ en dues molècules de $(\text{GlcNAc})_5$, que justifica la disminució de la proporció de $(\text{GlcNAc})_{10}$ respecte les 2 hores de reacció. Per al mutant Y28A/D149A/D151A el rendiment aparent de $(\text{GlcNAc})_{10}$ incrementa fins a un 34%, i tot i que la ràtio $\text{DP} \geq 10 / \text{COS DP6-DP9}$ disminueix fins a un 2,1, aquest segueix predominant respecte els productes intermedis. El rendiment aparent de $(\text{GlcNAc})_{10}$ per al mutant D149A/D151A/Y154W també és d'un 30%, però en canvi hi ha una important presència de productes intermedis que predominen sobre aquest, amb una ràtio $\text{DP} \geq 10 / \text{COS DP6-DP9}$ de ≈ 1 . Per últim, amb el mutant S110G/D149A/D151A també s'obté $(\text{GlcNAc})_{10}$ com a producte majoritari (Figura 4.24G), amb una proporció del 55%, i tot i que la ràtio $\text{DP} \geq 10 / \text{COS DP6-DP9}$ és aproximadament 2, igual que amb el mutant Y28A/D149A/D151A, el rendiment en polímer és inferior (47% (p/p)).

Amb la incorporació d'una tercera mutació s'ha aconseguit disminuir l'activitat hidrolítica residual respecte el mutant doble parental D149A/D151A. Per una banda, els mutants triples D149A/D151A/W241A i D149A/D151A/W395A han resultat en enzims pràcticament inactius, tant hidrolíticament com GS. Per altra banda, la incorporació de les mutacions Y154W i Y226W dona lloc a enzims que mantenen certa activitat hidrolítica residual, en canvi, amb els mutants Y28A/D149A/D151A i D149A/D151A/G195W s'ha aconseguit eliminar quasi totalment l'activitat hidrolítica. Els mutants mantenen la capacitat de formar nous enllaços glicosídics a partir de $(\text{GlcNAc})_5\text{-ox}$ amb els que s'obté una mescla de COS amb DPs entre 5 i 15. Malgrat el rendiment més elevat en polímer s'obté amb el triple mutant D149A/D151A/Y154W, la proporció de productes intermedis (amb DPs entre 6 i 9) és aproximadament la mateixa que la de $(\text{GlcNAc})_{10}$, en canvi, amb la incorporació de la mutació Y28A al doble mutant dels dos residus Asp de la tríada catalítica s'ha aconseguit obtenir $(\text{GlcNAc})_{10}$ amb un rendiment aparent del 34%, i pràcticament l'únic COS intermedi que es forma és $(\text{GlcNAc})_9$, és a dir, quasi no es donen reaccions de TG. El rendiment en polímer (60%) obtingut amb el triple mutant Y28A/D149A/D151A, és el rendiment (p/p) més elevat descrit fins al moment per a quitinases GH18 (amb una proporció superior de productes GS respecte productes de TG i/o hidròlisi).

Taula 4.7. Productes glicosintasa de la reacció de polimerització de (GlcNAc)₅-ox catalitzada pels mutants de la 3a generació GS d'SpChiD. S'inclouen el mutant senzill D151A i el mutant doble D149A/D151A utilitzat com a base per a la tercera generació GS a efectes de comparació.

Mutant	2 h de reacció			18 h de reacció		
	Pics (% Àrea)	Rendiment precipitat (p/p)	Rendiment aparent DP6-DP9 DP≥10	Pics (% Àrea)	Rendiment precipitat (p/p)	Rendiment aparent DP6-DP9 DP≥10
D151A	DP10 (63,5%), DP9 (13,2%), DP8 (9,5%), DP5 (6,4%), DP7 (4,1%), DP6 (1,8%), DP11-12 (1,4%)	<2,5% (<2,5%) ¹	0,72% (0,76%) ¹	DP7 (27,6%), DP10 (24,8%), DP8 (18,3%), DP9 (14,7%), DP5 (7,7%), DP6 (6,3%), DP11 (<0,6%)	N.D. ³ (47,9%) ¹	N.D. (39,85%) ¹
D149A/D151A ³	DP10 (61,2%), DP9 (14,0%), DP5 (8,3%), DP8 (5,8%), DP15 (3,6%), DP7 (3,6%), DP11-14 (2,3%), DP6 (1,2%)	13%	3,2% 8,7%	DP10 (58,2%), DP9 (15,1%), DP8 (7,9%), DP5 (6,4%), DP7 (6,2%), DP15 (2,7%), DP11-14 (2,2%), DP6 (1,2%)	30%	9,1% 18,9%
Y28A/D149A/ D151A	DP10 (74,4%), DP9 (16,4%), DP5 (4,4%), DP8 (3,2%), DP7 (0,7%), DP6 (0,7%), DP15 (0,3%)	19,7%	4,1% 14,7%	DP10 (58,0%), DP9 (19,0%), DP5 (15,0%), DP8 (4,2%), DP7 (1,9%), DP6 (1,9%)	58,2%	15,7% 33,7%
S110G/D149A/ D151A	N.D. ³	N.D.	N.D.	DP10 (54,8%), DP9 (12,9%), DP5 (11,7%), DP7 (8,6%), DP8 (5,4%), DP6 (3,1%), DP11-14 (2,2%), DP15 (1,2%)	46,7%	14,0% 27,2%
D149A/D151A/ Y154W	DP10 (47,8%), DP5 (18,5%), DP9 (15,1%), DP8 (9,2%), DP7 (5,3%), DP6 (2,7%), DP15 (1,0%), DP11-14 (0,4%)	58,2%	18,8% 28,6%	DP10 (43,2%), DP9 (19,4%), DP8 (12,1%), DP7 (11,3%), DP5 (9,1%), DP6 (2,9%), DP15 (1,6%), DP11-14 (0,4%)	68,0%	31,1% 30,7%

Resultats obtinguts a partir dels espectres de MALDI-TOF de les reaccions de polimerització de (GlcNAc)₅-ox, 0,25 mg·mL⁻¹ d'enzim, 12 mM de substrat en 50 mM Na₂HPO₄ pH 7 a 37°C. DPn fa referència a (GlcNAc)_n.

El rendiment aparent (DP6-DP9) és l'abundància de COS d'entre DP6 i DP9 (productes d'hidròlisi o TG) calculat com el producte del percentatge d'àrea dels pics pel rendiment de precipitat. El rendiment aparent (DP≥10) és l'abundància de COS ≥ DP10 (productes glicosintasa) calculat com el producte del percentatge de l'àrea dels pics pel rendiment de precipitat.¹ Dades a 24 mM de substrat i 1 mg·mL⁻¹ d'enzim, presentades a la Taula 3.4, capítol 3.² Dades presentades a la Taula 4.4.³ N.D. no determinat.⁴ Espectres de MALDI-TOF amb un patró diferent, pics amb m/z >1200 no identificats. El DP al que corresponen els pics no identificats és aproximat.

Mutant	2 h de reacció				18 h de reacció			
	Pics (% Àrea)	Rendiment precipitat (p/p)	Rendiment aparent DP6-DP9	Rendiment aparent DP≥10	Pics (% Àrea)	Rendiment precipitat (p/p)	Rendiment aparent DP6-DP9	Rendiment aparent DP≥10
D149A/D151A/ G195W	DP10 (58,0%), DP9 (15,4%), DP8 (12,0%), DP5 (7,1%), DP7 (3,8%), DP6 (2,5%), DP15 (1,1%)	6,6%	2,2%	3,9%	DP10 (43,0%), DP5 (21,8%), DP9 (12,9%), DP8 (11,5%), DP7 (4,6%), DP6 (4,2%), DP15 (1,3%), DP11-14 (0,6%)	22,1%	7,3%	9,9%
D149A/D151A/ Y226W	DP10 (46,5%), DP5 (19,0%), DP9 (15,2%), DP8 (11,3%), DP7 (4,6%), DP6 (2,9%), DP15 (0,4%), DP11-14 (0,1%)	13,9%	4,7%	6,5%	DP10 (36,7%), DP5 (21,0%), DP9 (14,6%), DP8 (10,2%), DP7 (11,1%), DP6 (5,4%), DP15 (0,7%), DP11-14 (0,2%)	43,4%	17,9%	16,4%
D149A/D151A/ W241A	⁴ DP5 (67,7%), DP8 (1,4%), DP11-14 (23,9%), DP15-DP19 (4,8%)	4,1%	0,1%	1,2%	DP8 (58,0%), DP10 (18,8%), DP7 (8,7%), DP9 (6,7%), DP5 (5,7%), DP6 (2,1%)	4,1%	3,1%	0,8%
D149A/D151A/ W395A	⁴ DP5 (86,3%), DP6 (1,2%), DP11-14 (6,3%), DP15-DP18 (6,2%)	<2,5%	0,0%	0,3%	N.D. ³	N.D.	N.D.	N.D.

Resultats obtinguts a partir dels espectres de MALDI-TOF de les reaccions de polimerització de (GlcNAc)_s-ox, 0,25 mg·mL⁻¹ d'enzim, 12 mM de substrat en 50 mM Na₂HPO₄ pH 7 a 37°C. DPn fa referència a (GlcNAc)_n.

El rendiment aparent (DP6-DP9) és l'abundància de COS d'entre DP6 i DP9 (productes d'hidròlisi o TG) calculat com el producte del percentatge d'àrea dels pics pel rendiment de precipitat. El rendiment aparent (DP≥10) és l'abundància de COS ≥ DP10 (productes glicosintasa) calculat com el producte del percentatge de l'àrea dels pics pel rendiment de precipitat. ¹ Dades a 24 mM de substrat i 1 mg·mL⁻¹ d'enzim, presentades a la Taula 3.4, capítol 3. ² Dades presentades a la Taula 4.4. ³ N.D. no determinat. ⁴ Espectres de MALDI-TOF amb un patró diferent, pics amb m/z >1200 no identificats. El DP al que corresponen els pics no identificats és aproximatiu.

4.4.5. Mutant *SpChiD* Y28A/D149A/D151A

Tal com s'ha exposat, la incorporació de la mutació Y28A al mutant dels dos Asp del motiu DxExE altament conservat en quitinases dona lloc a un enzim amb activitat hidrolítica pràcticament negligible, amb una disminució d'aproximadament 10 vegades respecte D149A/D151A en el consum de $(\text{GlcNAc})_4$ que significa una disminució de 10^4 vegades respecte l'enzim *wt*. En relació als substrats amb 4-metilumbeliferona l'enzim és inactiu davant $(\text{GlcNAc})_3$ -MU i $(\text{GlcNAc})_2$ -MU però presenta certa activitat hidrolítica residual davant GlcNAc -MU, aproximadament la mateixa que el mutant doble parental D149A/D151A (Figura 4.25).

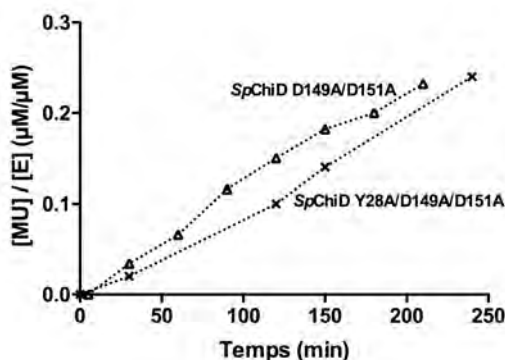


Figura 4.25. Comparació del curs de reacció de l'activitat hidrolítica dels mutants D149A/D151A (5 µM) i Y28A/D149A/D151A (5 µM) amb GlcNAc -MU. 50 µM GlcNAc -MU en 50 mM Na_2HPO_4 pH 7 a 37°C.

4.4.5.1. Reacció de polimerització de $(\text{GlcNAc})_5$ -ox

Tal com s'ha comentat en l'apartat anterior, la reacció de polimerització de $(\text{GlcNAc})_5$ -ox dona lloc a la formació de $(\text{GlcNAc})_{10}$ com a producte quasi únic (74% del total de productes del precipitat), i aquesta proporció disminueix una mica al cap de 18 h de reacció (58%), a causa d'un increment de $(\text{GlcNAc})_5$, però augmenta el rendiment en polímer (fins a un 60%), fet que dona lloc a un rendiment aparent de $(\text{GlcNAc})_{10}$ d'aproximadament un 34%.

L'anàlisi d'enllaç per metilació dels productes de TG de la reacció de condensació de $(\text{GlcNAc})_5$ -ox (18 hores) indica un grau de polimerització d'entre 22 i 24, valor superior a l'observat per MALDI-TOF, que manifesta una important activitat de TG d'aquest mutant. Aquesta anàlisi indica una subestimació dels rendiments dels productes d'alt pes molecular calculats per MALDI-TOF, a causa d'una diferència de vol d'aquests respecte les molècules de baix pes molecular.

Per avaluar l'estabilitat del producte GS format al llarg del temps, s'incuba una reacció fins a les 72 hores. Passat aquest temps de reacció encara es detecta precipitat, i tot i que el rendiment en polímer no incrementa, el polímer $(\text{GlcNAc})_{10}$, producte de la condensació de dues molècules de $(\text{GlcNAc})_5$ -ox, es manté com a producte majoritari, amb una proporció del 55% respecte el total de productes del precipitat (Figura 4.26). Els resultats mostren una

elevada estabilitat en la durada dels productes GS i de TG formats amb el triple mutant Y28A/D149A/D151A.

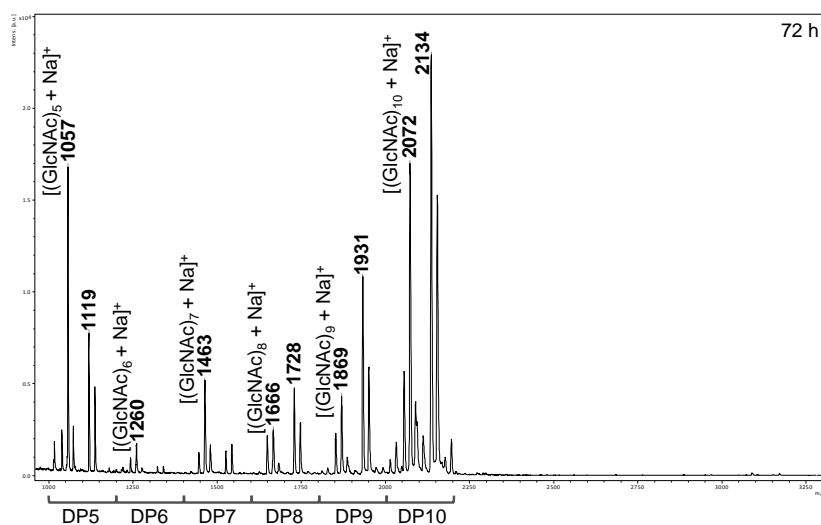


Figura 4.26. Espectre de MALDI-TOF dels productes de la fracció insoluble de la reacció de polimerització de (GlcNAc)₅-ox (12 mM), catalitzada pel mutant *SpChiD* Y28A/D149A/D151A. Es detecta les m/z corresponents als adductes [M+Na]⁺ i [M+DMSO+Na]⁺. Productes obtinguts al cap de 72 hores de reacció.

4.4.5.2. Polimerització de COS parcialment desacetilats

Amb el triple mutant Y28A/D149A/D151A s'ha aconseguit obtenir el polímer de quitina (GlcNAc)₁₀ amb una proporció del 74% respecte el total de productes presents en el precipitat de reacció, format a causa de l'elevada insolubilitat d'aquests compostos. La quitina i els seus derivats tenen un elevat interès biològic, dins dels quals es troba els quitosans, obtinguts per desacetilacions parcials d'aquesta. Amb l'objectiu d'ampliar el ventall de polímers obtinguts enzimàticament, i a causa de l'elevat interès biològic dels quitosans, s'ha ampliat l'estratègia per a obtenir quitooligòmers de quitosà amb patró definit a partir del triple mutant *SpChiD* Y28A/D149A/D151A. A més, aquestes desacetilacions parcials donen lloc a compostos més solubles, el que permetrà obtenir polímers de quitosà més solubles. Per altra banda, els quitosans no són substrats naturals de les quitinases, ja que aquestes requereixen un monòmer de GlcNAc en el subseu -1 per a la catàlisi, per tant, en funció del patró d'acetilació del quitooligòmer que actua de donador, la quitinasa no serà capaç d'hidrolitzar-lo o només podrà hidrolitzar-lo per algun enllaç determinat, el que permetrà evitar algunes de les reaccions de TG i algunes de les reaccions d'hidròlisi del producte GS format, idealment donant lloc a l'acumulació del producte directe de condensació, pur, sense obtenir una mescla de COS.

Per a la obtenció dels derivats oxazolina utilitzats en aquest apartat primerament s'ha dut a terme la desacetilació dels COS totalment acetilats mitjançant la desacetilasa de *VcCDA*, altament específica, i seguidament s'ha realitzat l'activació del substrat (veure capítol 2).

Reacció GS amb ADAAA-ox com a substrat

Per a la reacció GS de COS parcialment desacetilats s'utilitza primerament ADAAA-ox com a substrat (12 mM), el qual no pot ser hidrolitzat pel segon enllaç des de l'extrem no-reductor, amb la hipòtesi d'evitar així la formació de COS amb DP7, un dels COS intermedis que en les reaccions amb (GlcNAc)₅-ox més incrementa en temps de reacció llargs.

La reacció de polimerització del derivat oxazolina de DP5 monodesacetilat en el segon residu des de l'extrem no-reductor (ADAAA-ox), dona lloc a una mescla de COS amb DPs entre 5 i 12, solubles (Figura 4.27). Per MALDI-TOF les m/z detectades corresponen als adductes amb sodi de DP7 i DP8 monodesacetilats i DP9-DP12 didesacetilats. La presència de DP7 i DP8 monodesacetilats només podria explicar-se per la hidròlisi de productes de TG més llargs, tot i la quasi inexistent activitat hidrolítica del mutant. Tot i així, l'espectre de MALDI-TOF també revela la presència de (GlcNAc)₅ totalment acetilat, també present en el producte de partida, i que podria explicar la presència de DP7 i DP8 monodesacetilats en la mescla de productes de TG. És important remarcar que el producte majoritari al cap de 24 hores de reacció és DP9 didesacetilat en lloc de DP10 didesacetilat com caldria esperar de la condensació de dues molècules d'ADAAA-ox. Al cap de 72 hores de reacció el producte majoritari segueix essent DP9 didesacetilat, seguit de DP10 didesacetilat, i quasi no es detecta altres productes intermedis. Cal destacar que, de la mateixa manera que amb el mutant doble parental D149A/D151A, els productes GS i de TG obtinguts amb aquest substrat són solubles, ja que aquests són parcialment desacetilats.

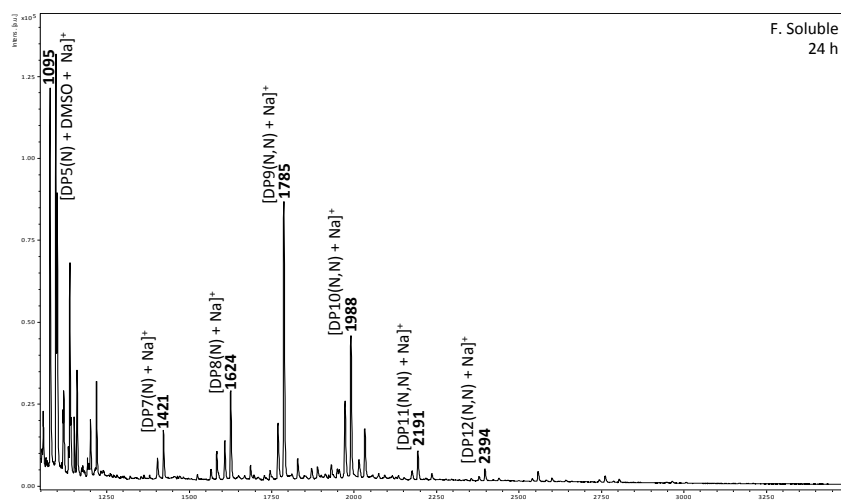


Figura 4.27. Espectre de MALDI-TOF dels productes de la fracció soluble de la reacció de polimerització d'ADAAA-ox catalitzada pel mutant *SpChiD* Y28A/D149A/D151A. Productes obtinguts al cap de 24 hores de reacció.

Reacció GS amb ADA-ox com a substrat

Tenint en compte el fet del requeriment d'un monòmer GlcNAc en el subseti -1 de les quitinases per a la hidròlisi, s'ha sintetitzat el derivat oxazolina de DP3 monodesacetilat en el monòmer central (ADA-ox). Aquest quitoooligòmer només podrà ser hidrolitzat pel primer

enllaç des de l'extrem no-reductor, i aquest enllaç és poc susceptible a ser hidrolitzat per endoquitinases GH18.

Teòricament, a partir de la oxazolina ADA-ox s'hauria d'obtenir polímers amb un grau d'acetilació del 66% (Figura 4.28), polímers teòricament bastant solubles en aigua. Els productes de TG resultants només podrien ser hidrolitzats per la pròpia glicosintasa dissenyada donant lloc altra vegada al substrat de partida, o a quitooligòmers amb un DP múltiple al d'aquest.

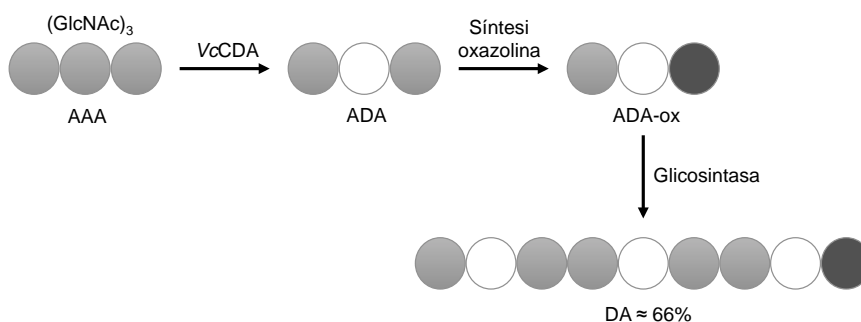


Figura 4.28. Esquema de l'estratègia seguida per a la obtenció de polímers de quitosà amb patró d'acetilació definit a partir de $(\text{GlcNAc})_3$. Cercles gris clar: *N*-acetilglucosamina (GlcNAc; A); Cercles blancs: glucosamina (GlcNH_2 ; D); Cercles gris fosc: derivat oxazolina d'*N*-acetilglucosamina.

Tot i no obtenir l'activació de tot el producte ADA en el procés de síntesi (veure capítol 2), s'han utilitzat les fraccions 3-9 per a un primer assaig d'activitat glicosintasa amb el triple mutant *SpChiD* Y28A/D149A/D151A.

S'incuba 12 mM del producte obtingut de la síntesi (ADA-ox) amb $0,25 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ d'*SpChiD* Y28A/D149A/D151A i s'analitza la mescla de reacció per MALDI-TOF-MS. La reacció de polimerització resulta en la formació de DP6 didesacetilat (DP6(N,N)) al cap de 2 hores de reacció (Figura 4.29). El producte GS correspon a la condensació de dues molècules d'ADA-ox i per tant, tot i que no es pot confirmar el patró d'acetilació, aquest hauria de ser ADAADA. Per altra banda cal destacar que no es detecta cap altre producte de TG, el que suggereix que l'enzim és capaç d'unir dues molècules d'ADA-ox però no es dona la formació de cap altre enllaç glicosídic, essent DP6(N,N) l'únic producte obtingut a partir d'ADA-ox. Al cap de 96 hores de reacció apareixen nous pics amb m/z entre 800 i 950, però que no corresponen a cap m/z de COS identificats. Tot i la formació de DP6(N,N) com a producte de TG, aquest és molt poc intens respecte els pics corresponents al substrat, i no augmenta al llarg de la reacció.

Aquests resultats preliminars suggereixen que *SpChiD* Y28A/D149A/D151A és capaç d'utilitzar ADA-ox com a substrat donant lloc a la formació de DP6(N,N), però no de formar posteriors enllaços glicosídics, essent aquest l'únic producte resultant de la condensació d'ADA-ox, tot i el baix grau de conversió.

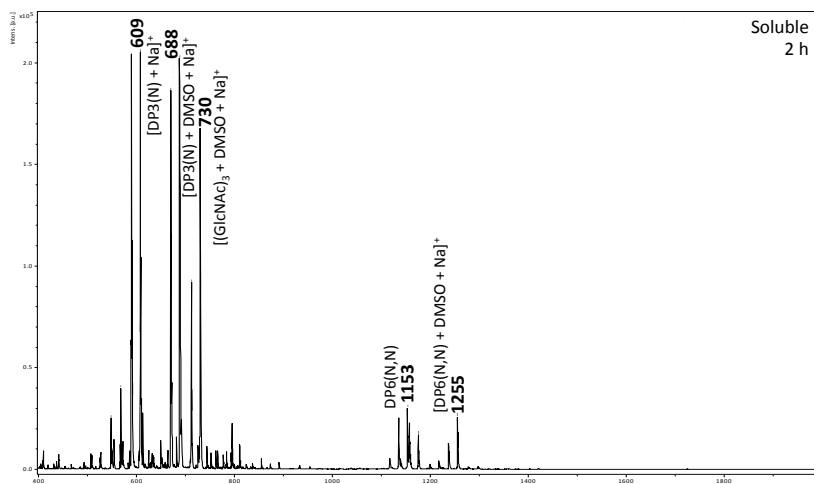


Figura 4.29. Espectre de MALDI-TOF dels productes de la mescla de reacció de polimerització d'ADA-ox, catalitzada pel mutant *SpChiD* Y28A/D149A/D151A. Productes obtinguts al cap de 2 hores de reacció.

4.4.5.3. Condensació donador-acceptor

Per altra banda també s'ha analitzat l'activitat de condensació donador-acceptor. Per una banda s'ha utilitzat (GlcNAc)₅-ox com a donador (12 mM) i (GlcNAc)₂ o DP5 monodesacetilat en el segon residu des de l'extrem no-reductor (ADAAA) com a acceptors.

La reacció amb (GlcNAc)₂ com a acceptor (24 mM) dona lloc a la formació de precipitat que consta d'una mescla de COS amb DPs entre 6 i 10, essent (GlcNAc)₁₀ el producte majoritari, en lloc de (GlcNAc)₇ com caldria esperar (Figura 4.30). La ràtio de COS DP_{≥10}/DP6-DP9 en comparació amb la reacció de polimerització de (GlcNAc)₅-ox es manté, essent aproximadament 2 al cap de 18 hores de reacció. A més, (GlcNAc)₁₀ segueix essent el producte majoritari al cap de 48 hores de reacció, i la proporció de (GlcNAc)₇ no incrementa, és a dir, no hi ha indicis de que es doni la reacció de condensació donador-acceptor.

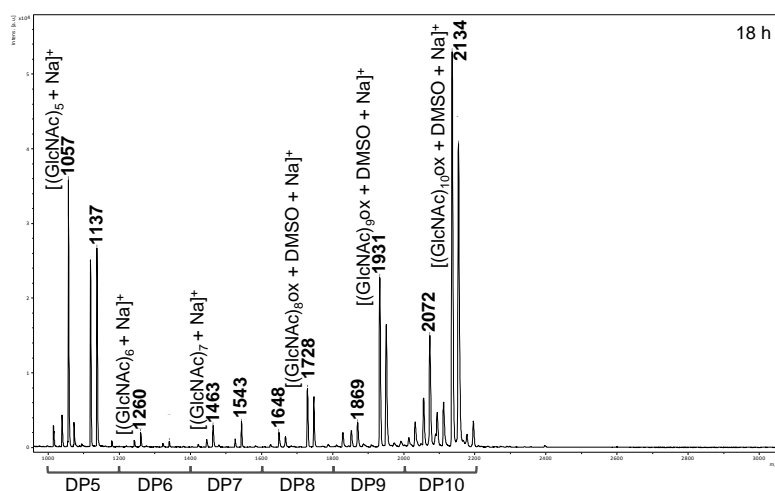


Figura 4.30. Espectre de MALDI-TOF dels productes de la fracció insoluble de la reacció de condensació de (GlcNAc)₅-ox com a donador (12 mM) i (GlcNAc)₂ com a acceptor (24 mM), catalitzada pel mutant *SpChiD* Y28A/D149A/D151A. Es detecta les m/z corresponents als adductes [M+Na]⁺ i [M+DMSO+Na]⁺. Productes obtinguts al cap de 18 hores de reacció.

La reacció amb ADAAA com a acceptor (18,5 mM) també dona lloc a la formació de $(\text{GlcNAc})_{10}$ com a producte majoritari, amb una proporció del 60% respecte el total de COS del precipitat al cap de 2 hores de reacció, que consta d'una mescla de $(\text{GlcNAc})_5$ - $(\text{GlcNAc})_{10}$. En l'anàlisi per MALDI-TOF no es detecta cap pic amb una m/z que pugui correspondre a DP10 monodesacetilat, corresponent al producte teòric de la condensació donador-acceptor, en cap dels diferents temps de reacció assajats (de 2 a 48 hores) (Figura 4.31), en canvi, es detecta una petita senyal corresponent a DP8 monodesacetilat al cap de 2 h de reacció, únic producte monodesacetilat detectat al llarg de la reacció. $(\text{GlcNAc})_{10}$ es manté com a producte majoritari amb aproximadament la mateixa proporció al llarg de tota la reacció.

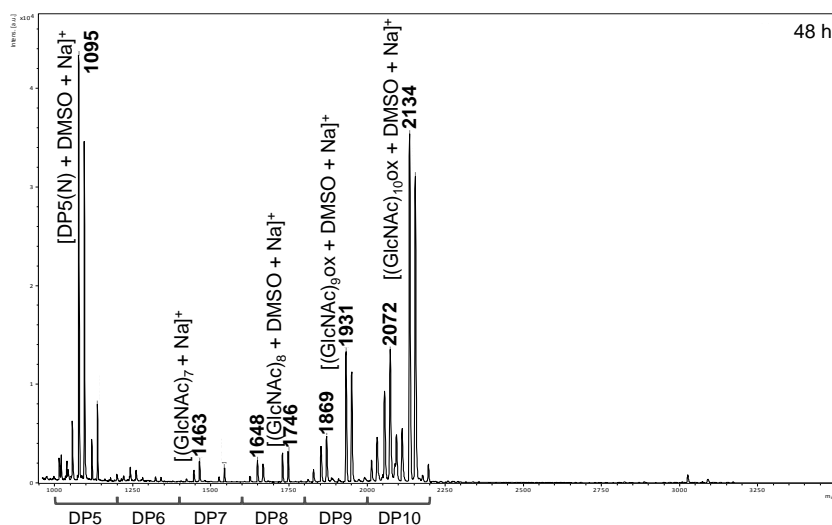


Figura 4.31. Espectre de MALDI-TOF dels productes de la fracció insoluble de la reacció de condensació de $(\text{GlcNAc})_5$ -ox com a donador (12 mM) i ADAAA com a acceptor (18,5 mM), catalitzada pel mutant *SpChiD* Y28A/D149A/D151A. Es detecta les m/z corresponents als adductes $[\text{M}+\text{Na}]^+$ i $[\text{M}+\text{DMSO}+\text{Na}]^+$. Productes obtinguts al cap de 48 hores de reacció.

El fet de no obtenir els productes directes de condensació, $(\text{GlcNAc})_7$ i DP10 monodesacetilat respectivament, segurament és a causa del poc excés d'acceptor respecte donador (ràtios 1:2 i 2:3, respectivament), però també pot ser conseqüència d'una preferència per $(\text{GlcNAc})_5$ -ox com a substrat.

Per altra banda, també s'ha analitzat l'activitat de condensació donador-acceptor a partir del derivat oxazolina ADAAA-ox com a donador (12 mM) i $(\text{GlcNAc})_5$ com a acceptor (18,5 mM). En aquest cas, tal com caldria esperar, DP10 monodesacetilat és el producte majoritari, amb una proporció aproximada del 40% respecte el total de productes del precipitat, resultant de la condensació donador-acceptor, i aquest segueix essent majoritari al cap de 48 hores de reacció. Els rendiments en polímer no són gaire elevats (fins a 18% al cap de 48 hores de reacció), però pràcticament no hi ha quasi productes intermedis provinents de reaccions de TG. Al cap de 18 hores de reacció aquests intermedis tenen una proporció del 16%, d'entre els quals destaca $(\text{GlcNAc})_9$ i DP9 monodesacetilat (Figura 4.32). La presència de $(\text{GlcNAc})_9$ no pot explicar-se per hidròlisi de DP10(N), però cal recordar que

el producte de partida també conté $(\text{GlcNAc})_5\text{-ox}$, el que pot explicar la presència d'aquest. També cal destacar la important presència de $(\text{GlcNAc})_{10}$, i la presència de COS intermedis totalment acetilats $(\text{GlcNAc})_6\text{-(GlcNAc)}_{10}$, que poden explicar-se de la mateixa manera. En aquesta reacció, tot i la baixa ràtio donador:acceptor (2:3), es dona preferentment la reacció de condensació donador-acceptor, respecte la reacció de polimerització d'ADAAA-ox, tot i que també es detecta un petit pic amb m/z 1988 corresponent a l'adducte amb sodi de DP10(N,N).

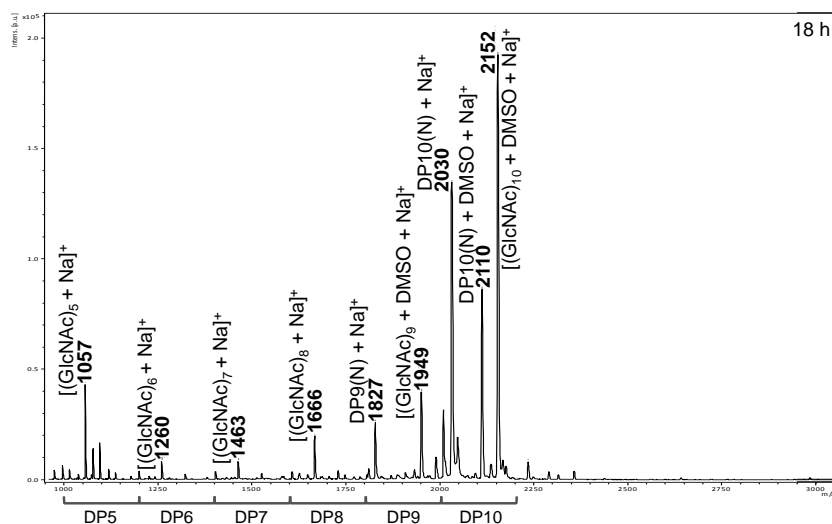


Figura 4.32. Espectre de MALDI-TOF dels productes de la fracció insoluble de la reacció de condensació d'ADAAA-ox (12 mM) com a donador i $(\text{GlcNAc})_5$ com a acceptor (18,5 mM), catalitzada pel mutant *SpChiD* Y28A/D149A/D151A. Productes obtinguts al cap de 18 hores de reacció.

En conclusió, *SpChiD* Y28A/D149A/D151A és pràcticament inactiu hidrolíticament tot i que manté una baixa activitat hidrolítica residual amb GlcNAc-MU , el que suggereix que no s'ha eliminat completament l'activitat quitobiasa de l'enzim. El triple mutant presenta una elevada activitat de TG, que ha incrementat tant en rendiment de polímer obtingut com en la durada dels productes de TG al llarg del temps. En relació al rendiment de TG en polímer, amb el mutant Y28A/D149A/D151A s'ha aconseguit un rendiment d'aproximadament un 60% amb l'ús del derivat oxazolina de $(\text{GlcNAc})_5$, essent el rendiment en polímer de quitina més elevat descrit fins al moment per una quitinasa de la família GH18. A més, el mutant és actiu davant quitoooligòmers de quitina parcialment desacetilats, com són ADAAA-ox i ADA-ox, amb els que s'obté la formació d'un nou enllaç *O*-glicosídic.

4.5. Relació efecte-funció dels residus d'*SpChiD*

La incorporació de noves mutacions al mutant dels residus assistents resulta en una disminució de l'activitat hidrolítica així com en un increment de l'activitat GS, donant lloc a nous biocatalitzadors més eficients.

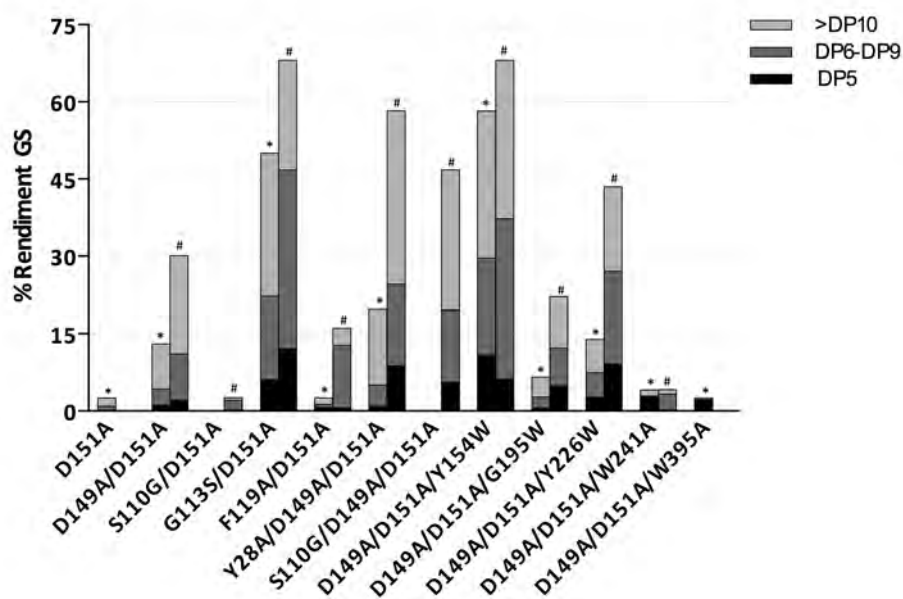


Figura 4.33. Rendiment de l'activitat GS amb (GlcNAc)₅-ox com a donador
Rendiment de polímer (p/p) de la reacció de polimerització de (GlcNAc)₅-ox al cap de 2 h (*) i 18 hores (#) de reacció. Es mostra el rendiment aparent dels COS presents en el precipitat. Condicions de reacció: 12 mM (GlcNAc)₅-ox, 0,25 mg·mL⁻¹ enzim en 50 mM Na₂HPO₄ pH 7.

La combinació d'una segona mutació amb el mutant del residu assistent ha donat lloc a una important disminució de l'activitat hidrolítica respecte el mutant D151A. El reemplaçament de l'Asp149, corresponent al residu estabilitzador de l'Asp assistent, per una Ala, juntament amb la mutació del residu assistent, ha resultat en el mutant doble amb menor activitat hidrolítica i major activitat GS. El residu Asp149 participa en la cadena de protonació de l'àcid/base general i és el responsable de mantenir l'estat de protonació de l'Asp assistent en absència de substrat. En presència de substrat, l'Asp149 es troba interaccionant per pont d'hidrogen amb d'altres residus (com per exemple la Tyr28 o la Ser110). En el cas de la doble mutació, en que l'Asp149 es troba substituït per una Ala, hi ha una pèrdua d'aquestes interaccions que pot donar lloc a una desestabilització del substrat que resulta en una pèrdua d'activitat hidrolítica, que conseqüentment esdevé en un increment en la durada dels productes GS formats. Per altra banda, la substitució de la Gly113 per una Ser, dona lloc a una disminució de l'activitat d'hidrolasa però sobretot a un important increment de l'activitat GS, que resulta en una acumulació de productes GS i de TG ràpida. La incorporació d'un grup -OH pot incrementar les interaccions enzim-substrat preexistents donant lloc a un increment de l'activitat de polimerització. Contràriament, amb el triple mutant F119A/D149A/D151A, tot i la disminució de l'activitat hidrolítica, no hi ha cap increment en l'activitat GS en comparació amb el mutant simple D151A. Tot i la pèrdua d'interaccions π-π i CH-π d'aquest residu amb el Trp152 a causa de la substitució per Ala, observades amb el mutant simple F119A (Madhuprakash *et al.*, 2012), i que resulten en canvis en les interaccions amb els residus de la tríada catalítica amb un impacte en l'activitat, aquests canvis no tenen cap efecte sobre l'activitat GS quan es combina aquesta mutació amb el mutant D151A. Altrament, la substitució de la Ser110 per una Gly, resulta

en una disminució de l'activitat d'hidròlisi, però l'activitat GS pràcticament no varia en comparació amb el mutant D151A. La pèrdua del grup –OH dificulta les interaccions per pont d'hidrogen amb l'Asp149, estabilitzador de l'assistent, i l'Asp assistent (que en aquest cas és una Ala), dificultant la protonació del Glu153, que té un efecte negatiu en la primera etapa de reacció (glicosidació), el que explica la disminució de l'activitat hidrolítica. En canvi, l'addició d'aquesta mutació al mutant D151A no mostra cap increment en l'activitat GS, en que s'utilitza un donador oxazolina, el que confirma una baixa implicació d'aquest residu en la segona etapa de reacció. L'addició d'aquesta mutació al mutant doble dels dos Asp catalítics (D149A/D151A) tampoc resulta en una glicosintasa més eficient, el que pot explicar-se pel fet que aquest residu està implicat en el mecanisme catalític únicament formant pont d'hidrogen amb l'Asp149 i l'Asp151, que en aquest mutant corresponen a una Ala, el que explica que no hi hagi cap efecte sobre l'activitat amb aquest triple mutant en comparació amb els dobles mutants D149A/D151A i S110G/D151A.

Contràriament, la incorporació de la resta de mutacions al mutant doble D149A/D151A sí té un efecte sobre ambdues activitats. La substitució de la Tyr28 per una Ala, provoca una pèrdua d'interaccions amb el GlcNAc situat al subseti -1, que resulta principalment en un increment de l'activitat GS, tot i que també en una disminució de l'activitat d'hidròlisi, que dona lloc a un augment de l'acumulació dels productes GS, i aquests són molt estables en el temps. Aquest increment de l'activitat GS pot explicar-se per un increment del temps de retenció del substrat o de l'intermedi de reacció a la cavitat d'unió conseqüència de la pèrdua de les interaccions d'apilament, per la substitució de l'anell aromàtic, així com per un increment en l'espai a causa de la substitució de la Tyr per un residu menys voluminós. La substitució de la Tyr154, situada als subsetis positius, per un Trp, residu més aromàtic, dona lloc a un important increment de l'activitat GS en temps de reacció curts (2 h), que pot ser explicat per l'increment en el nombre d'interaccions amb el sucre acceptor. Al cap de temps de reacció més llargs, segueix incrementant l'acumulació de productes GS i de TG tot i que també es dona certa hidròlisi d'aquests. En canvi, el mutant triple D149A/D151A/Y226W presenta aproximadament la mateixa activitat GS que el mutant doble parental, el que indica que tot i la substitució de la Tyr226, localitzada en el subseti +2, per un residu més aromàtic i més voluminós, no hi ha canvis importants en les interaccions en aquest mutant. Cal destacar però, que el mutant simple Y226W, reportat per Madhuprakash *et al.*, presenta una important disminució de l'activitat hidrolítica respecte l'enzim *wt*, que podria explicar-se per un ambient més hidrofòbic a causa de la cadena lateral del Trp (Madhuprakash *et al.*, 2018), aquesta disminució de l'activitat no és notòria en el cas del mutant triple, a causa de la baixa activitat hidrolasa per la substitució dels dos Asp catalítics. La substitució de la Gly195 per un Trp en combinació amb el mutant doble també dona lloc a una disminució de l'activitat hidrolítica, que pot ser explicada a causa de la introducció d'un pegat hidrofòbic en la sortida del centre catalític que dificulta l'entrada de molècules d'aigua. A diferència del mutant puntual G195W, amb el que l'activitat de TG es veu incrementada (Madhuprakash *et al.*, 2014), el mutant triple D149A/D151A/G195W no presenta millores en l'activitat GS en comparació amb el mutant parental. Per últim, les mutacions dels residus Trp241 i Trp395 per Ala, en combinació amb

el doble mutant D149A/D151A, resulta en una disminució de l'activitat hidrolítica així com una eliminació quasi total de l'activitat de TG. Aquesta eliminació de l'activitat indica un rol important de la cadena lateral dels Trp en aquestes dues posicions. El Trp241 es localitza en la superfície de l'enzim i té un rol en el procés de guiatge del substrat cap al centre actiu, els resultats observats poden explicar-se a causa de la pèrdua d'interaccions per una Ala i la conseqüent pèrdua del guiatge de la molècula cap al centre catalític. Per altra banda, el Trp395 es troba en el solc catalític, en els subetis negatius. La pèrdua d'activitat amb aquest mutant pot explicar-se per una pèrdua d'interaccions que resulten en una disminució de la velocitat de catàlisi.

Els resultats indiquen que la combinació del mutant del residu assistent amb d'altres mutacions que poden afectar la conformació, estabilitat i orientació del substrat i/o l'intermedi així com modificar l'afinitat per una molècula de sucre acceptora, poden donar lloc a un increment de l'activitat GS o de TG. D'entre els mutants generats, el mutant Y28A/D149A/D151A és amb el que s'ha obtingut els millors resultats, amb un rendiment de precipitat del 60% (p/p), que conté aproximadament un 60% de (GlcNAc)₁₀, producte directe de la reacció GS.

4.6. Aplicació de l'estratègia glicosintasa d'*SpChiD* a *TkChiA*

D'entre els mutants del residu assistent de les quitinases inicialment seleccionades en aquesta tesi, el mutant de la quitinasa de l'arqueu *Thermococcus kodakaraensis* també sembla ser un bon candidat per al desenvolupament d'un enzim glicosintasa, ja que presenta una elevada activitat de TG a partir de la reacció de condensació de (GlcNAc)₅-ox, amb un elevat rendiment en polímer (45%) i una llarga durada d'aquest al llarg de la reacció. Per aquest motiu, s'ha decidit aplicar la mateixa estratègia seguida en la quitinasa *SpChiD* a *TkChiA*, amb l'objectiu de desenvolupar una nova glicosintasa.

4.6.1. Mutant del residu assistent *TkChiA* D1022A

La mutació del residu Asp assistent per una Ala, D1022A, en la quitinasa *TkChiA* ha resultat en una disminució de l'activitat hidrolítica d'aproximadament 10² vegades respecte l'enzim *wt* (Figura 4.34), a més el mutant resultant presenta una elevada activitat de TG, donant lloc a la formació d'una mescla de COS amb DPs entre 6 i 15, d'entre els quals (GlcNAc)₁₀ és el producte majoritari. Amb aquest mutant s'ha aconseguit un rendiment en polímer del 45% al cap de 18 hores de reacció, amb una proporció de (GlcNAc)₁₀ del 55% (veure capítol 3).

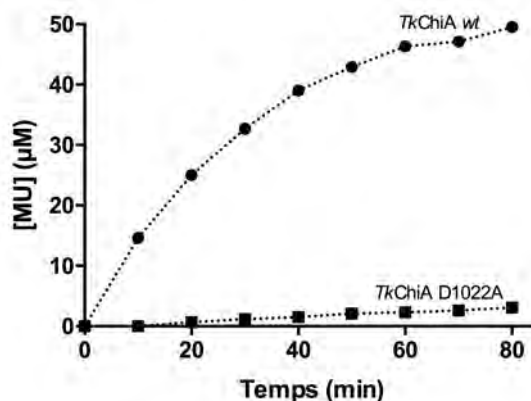


Figura 4.34. Curs de reacció de l'activitat hidrolítica de *TkChiA wt* i del mutant D1022A amb $(\text{GlcNAc})_2\text{-MU}$. 2,3 μM d'enzim, 50 μM $(\text{GlcNAc})_2\text{-MU}$ en 50 mM Na_2HPO_4 pH 7 a 37°C.

4.6.2. Mutant doble *TkChiA D1020A/D1022A*

A causa de l'elevada activitat de TG, no només pel rendiment en polímer obtingut sinó també per la durada dels productes, principalment $(\text{GlcNAc})_{10}$, al llarg del temps, s'ha dissenyat el doble mutant D1020A/D1022A, corresponent a la substitució dels dos Asp del motiu DxExE per Ala, amb l'objectiu de disminuir l'activitat d'hidròlisi i conseqüentment augmentar l'activitat de transglicosidació.

L'activitat hidrolítica del doble mutant davant $(\text{GlcNAc})_2\text{-MU}$ s'ha vist disminuïda aproximadament unes 4 vegades respecte el mutant puntual D1022A (Figura 4.35), mentre que davant $(\text{GlcNAc})_3\text{-MU}$ i $(\text{GlcNAc})_4$, substrat natural de quitinases, l'activitat del mutant doble és aproximadament la meitat que l'activitat del mutant D1022A (Taula 4.8 i Taula 4.9).

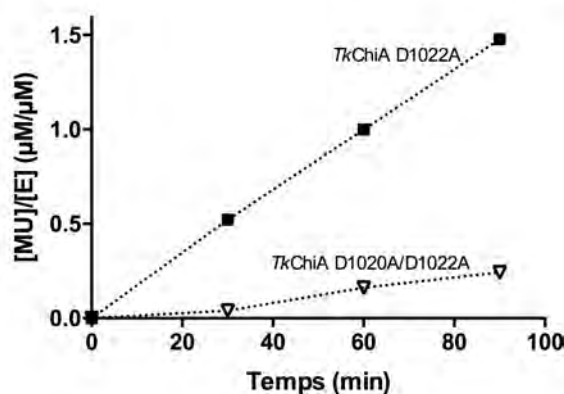


Figura 4.35. Curs de reacció de l'activitat hidrolítica dels mutants *TkChiA D1022A* (2,3 μM) i *D1020A/D1022A* (4,9 μM) amb $(\text{GlcNAc})_2\text{-MU}$. 50 μM $(\text{GlcNAc})_2\text{-MU}$ en 50 mM Na_2HPO_4 pH 7 a 37°C.

Taula 4.8. Activitat hidrolítica dels mutants de *TkChiA* amb substrats fluorogènics

	GlcNAc-MU		$(\text{GlcNAc})_2\text{-MU}$		$(\text{GlcNAc})_3\text{-MU}$	
	$V_0/[E]$ (min^{-1})	MUT/WT	$V_0/[E]$ (min^{-1})	MUT/WT	$V_0/[E]$ (min^{-1})	MUT/WT
<i>TkChiA wt</i>	$(3,2 \pm 0,2) \times 10^{-4}$	1	$0,58 \pm 0,05$	1	$0,15 \pm 0,01$	1
D1022A	$(5 \pm 1) \times 10^{-5}$	$1,6 \times 10^{-1}$	$0,012 \pm 0,001$	$2,1 \times 10^{-2}$	$0,010 \pm 0,002$	$6,7 \times 10^{-2}$
D1020A/D1022A	$<5 \times 10^{-5}$	$1,6 \times 10^{-1}$	0,003	$5,2 \times 10^{-3}$	0,004	$2,7 \times 10^{-2}$

Condicions de l'assaig: 50 μM de substrat en 50 mM Na_2HPO_4 pH 7 a 37°C.

Taula 4.9. Activitat hidrolítica dels mutants de *TkChiA* amb $(\text{GlcNAc})_4$ com a substrat

	Formació				Consum	
	$(\text{GlcNAc})_2$		$(\text{GlcNAc})_3$		$(\text{GlcNAc})_4$	
	$V_0/[E]$ (min^{-1})	MUT/WT	$V_0/[E]$ (min^{-1})	MUT/WT	$V_0/[E]$ (min^{-1})	MUT/WT
<i>TkChiA wt</i>	125 \pm 20	1	73 \pm 8	1	-65 \pm 8	1
D1022A	3,7 \pm 0,4	2,9 $\times 10^{-2}$	7 \pm 2	9,6 $\times 10^{-2}$	-6 \pm 2	9,2 $\times 10^{-2}$
D1020A/D1022A	1,8	1,4 $\times 10^{-2}$	3,8	5,2 $\times 10^{-2}$	-3,1	4,8 $\times 10^{-2}$

Els valors $V_0/[E]$ corresponen a l'estat estacionari. Condicions de l'assaig: 2 mM $(\text{GlcNAc})_4$ en 50 mM Na_2HPO_4 pH 7 a 37°C.

La incorporació de la mutació D1020A al mutant del residu assistent quasi no ha afectat l'activitat hidrolítica de l'enzim, essent només 2 ordres de magnitud menys actiu que l'enzim *wt*, de la mateixa manera que el mutant simple D1022A. Cal esmentar també, que el mutant doble D1020A/D1022A, de la mateixa manera que l'enzim *wt* i el mutant simple D1022A, també presenta dues fases en la hidròlisi de $(\text{GlcNAc})_4$, considerades com a estat pre-estacionari i estat estacionari, a diferència dels mutants dobles d'*SpChiD*, pels que no es detecta aquestes dues fases.

En relació a l'activitat de TG, la reacció de polimerització de 24 mM $(\text{GlcNAc})_5\text{-ox}$ amb 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ del mutant D1020A/D1022A dona lloc a la formació de $(\text{GlcNAc})_{10}$ com a producte majoritari tant a les 2 hores de reacció com al cap de 18 hores (Figura 4.36). Passat aquest temps de reacció el rendiment en polímer obtingut és del 49%, i el rendiment aparent de $(\text{GlcNAc})_{10}$ és del 20% aproximadament. Aquests rendiments són aproximadament idèntics als obtinguts amb el mutant del residu assistent, el que indica que amb la introducció de la mutació del primer Asp del motiu DxDxE en el mutant del residu assistent no s'ha incrementat l'activitat de TG de l'enzim, fet que es correlaciona amb que aquesta mutació tampoc no ha tingut un gran efecte sobre l'activitat d'hidròlisi.

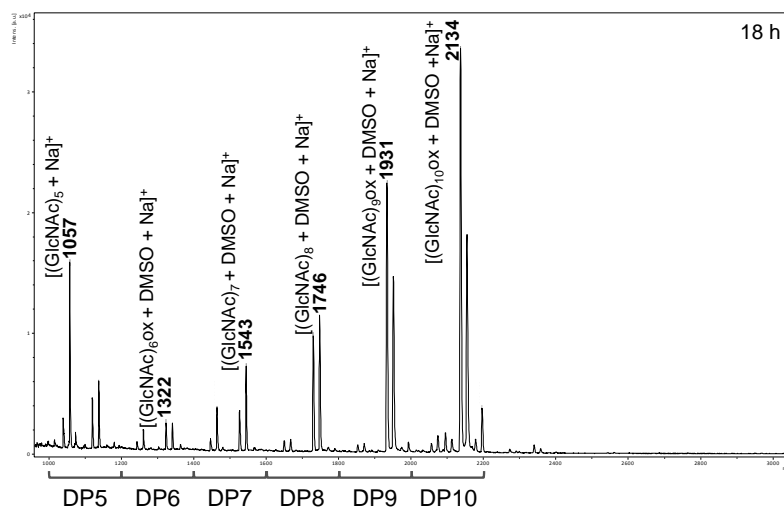


Figura 4.36. Espectre de MALDI-TOF dels productes de la fracció insoluble de la reacció de polimerització de $(\text{GlcNAc})_5\text{-ox}$, catalitzada pel mutant *TkChiA* D1020A/D1022A. Es detecta les m/z corresponents als adductes $[M+\text{DMSO}+\text{Na}]^+$. Productes obtinguts al cap de 18 hores de reacció.

Per altra banda, també s'ha analitzat l'activitat de polimerització amb ADAAA-ox (24 mM) com a substrat i la conseqüent formació de productes solubles (Figura 4.9).

Al cap de 2 hores de reacció es detecta la formació de DP10 didesacetilat, DP10(N,N), provinent de la condensació de dues molècules d'ADAAA-ox, com a producte majoritari, seguit de DP9 i DP11 didesacetilats i DP6 monodesacetilat (Figura 4.37). Aquest perfil indica una preferència de tall pels enllaços dels extrems amb aquest substrat. Al cap de 18 hores de reacció DP10(N,N) segueix essent el producte majoritari però apareixen també altres pics, entre els quals es troben DP15 tridesacetilat i DP20 tetradesacetilat, provinents de la condensació de 3 i 4 molècules de donador respectivament, i DP14 i DP16 tridesacetilats i DP19 i DP21 tetradesacetilats, que també indiquen la hidròlisi preferent dels enllaços dels extrems (Figura 4.37). A més, la poca presència de COS amb DPs 7 i 8 indica que ADAAA-ox quasi no s'hidrolitza pels enllaços intermedis, en el cas del 2n enllaç des de l'extrem no-reductor és esperable a causa de que les quitinases GH18 requereixen un monòmer GlcNAc en el subseti -1, però els resultats indiquen que tampoc s'hidrolitza gaire pel 3r enllaç. L'absència de COS amb DPs 13 i 18 també recolza aquesta hipòtesi. Per últim, en la mescla de COS també es troba DP12(N,N) i DP17(N,N,N) provinents segurament a partir de la hidròlisi de productes més llargs ja que és difícil la seva explicació directament per reaccions de TG, a causa de que el producte de partida no és hidrolitzable pel 2n enllaç, ni tampoc sembla que es doni la hidròlisi del 3r enllaç, des de l'extrem no-reductor. La mescla de productes obtinguts és parcialment soluble i consta de COS amb graus d'acetilació entre 78% i 83%. Amb el mutant doble s'ha obtingut una mescla de COS solubles fins a DP21, a diferència de amb el mateix mutant doble d'*SpChiD*, amb el que només s'obté una mescla de COS soluble fins a DP13. Aquestes diferències poden ser causa d'una diferent implicació del primer Asp del motiu DxDxE en la catàlisi, que també explicaria les diferències en l'activitat hidrolítica residual d'ambdós mutants respecte els enzims *wt* corresponents.

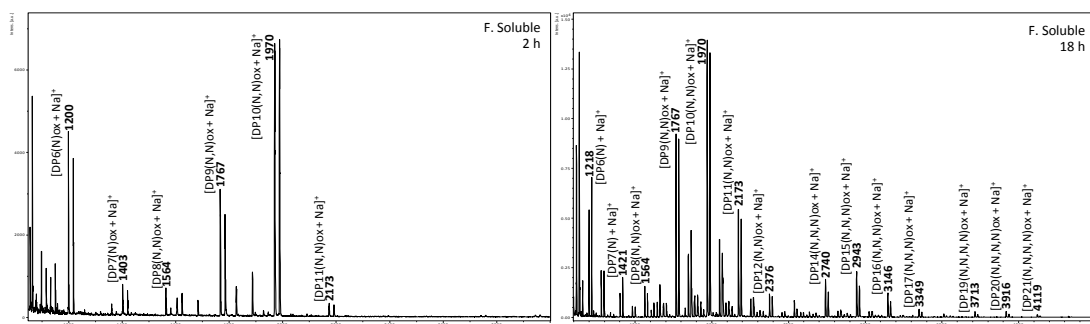


Figura 4.37. Espectre de MALDI-TOF dels productes de la fracció soluble de la reacció de polimerització d'ADAAA-ox catalitzada pel mutant *TkChiA* D1020A/D1022A. Productes obtinguts al cap de 2 i 18 hores de reacció.

Els resultats tant d'activitat hidrolítica com de l'activitat de TG, així com les activitats reportades davant diferents COS (Tanaka, Fukui and Imanaka, 2001), suggereixen que *TkChiA* necessita la ocupació del subseti -2 per a la catàlisi. A més, l'activitat de TG amb ADAAA-ox com a substrat proposa una preferència d'unió per una unitat GlcNAc en aquest subseti.

La introducció de la mutació del primer Asp del motiu DxDxE al mutant del residu assistent només ha disminuït l'activitat unes 2 vegades respecte el mutant D1022A parental, el que indica que aquest residu en la quitinasa *TkChiA* no té un paper gaire important en la catàlisi. A causa del poc efecte en l'activitat hidrolítica, el mutant D1020A/D1022A presenta aproximadament la mateixa activitat de TG que el mutant simple. La mateixa mutació en l'enzim *SpChiD* sí mostra un efecte tant en una disminució de l'activitat hidrolítica com un increment de l'activitat de TG de l'enzim respecte el mutant simple del residu assistent (D151A), el que indica una implicació relativament important del residu Asp149, corresponent al primer Asp del motiu DxDxE, en la catàlisi. Aquestes dissimilituds indiquen diferències en el mecanisme catalític d'ambdós enzims, amb diferents graus d'implicació dels residus de la tríada catalítica.

En base a l'estructura, les quitinases es troben subclassificades en quitinases bacterianes o tipus plantes. Les bacterianes presenten el domini d'inserció $\alpha+\beta$ i una sèrie de *loops* que donen lloc a una cavitat d'unió a substrat més profunda, mentre que les tipus plantes no contenen aquest domini d'inserció ni tants *loops* i conseqüentment la cavitat és menys profunda. A més, l'estructura cristal·logràfica del mutant del residu assistent del domini catalític AD2 en complex amb $(\text{GlcNAc})_5$ de *Pyrococcus furiosus*, quitinasa d'arqueu classificada com a tipus planta, ha permès identificar importants diferències en el mecanisme entre ambdós tipus de quitinases (Tsuji *et al.*, 2010). Les quitinases bacterianes, d'entre les quals es troba la quitinasa *SpChiD*, presenten un canvi conformacional del residu assistent que interacciona amb el Glu catalític o amb el primer Asp del motiu DxDxE en presència o absència de substrat, respectivament. En canvi, en les quitinases de tipus planta, el residu assistent sempre es troba encarat cap al Glu catalític, independentment de la presència o absència del substrat i per tant aquest no interacciona directament amb el primer Asp del motiu DxDxE. Així doncs, les diferències entre els dobles mutants dels dos residus Asp del motiu DxDxE d'*SpChiD* i *TkChiA* poden ser conseqüència d'aquestes petites diferències en l'estructura del centre actiu d'ambdós tipus de quitinases.

En conclusió, les diferències observades en l'entorn del motiu DxDxE de la quitinasa *TkChiA* suggereix seguir el disseny de la GS a partir del mutant simple D1022A i no a partir del mutant doble, com en el cas d'*SpChiD*. Així doncs, pel disseny d'una glicosintasa efectiva derivada de *TkChiA*, s'han de buscar altres residus que puguin tenir una major implicació en el mecanisme catalític o en la unió a substrat, amb l'objectiu de disminuir l'activitat hidrolítica i conseqüentment incrementar l'activitat de TG.

El mutant simple es considera un bon punt per a continuar el disseny, que no es realitza en aquesta tesi, però es proposen diferents residus candidats a ser mutats per a la continuació del desenvolupament de la glicosintasa.

4.6.3. Propostes de futur per al disseny d'una glicosintasa a partir de *TkChiA*

Primerament cal realitzar una anàlisi estructural de *TkChiA* per a identificar aquells residus que poden participar en la catàlisi. L'estructura 3D d'aquesta quitinasa no es troba resolta

ni tampoc es troba reportat el disseny de cap mutant, pel que no hi ha informació de residus importants en el mecanisme catalític. Per aquest motiu, s'ha realitzat un model estructural del domini catalític de l'extrem C-terminal de *TkChiA* a partir del domini catalític AD2 de *P.furiosus*, amb el qual presenta una identitat de seqüència del 80% (veure part experimental) (Figura 4.38).

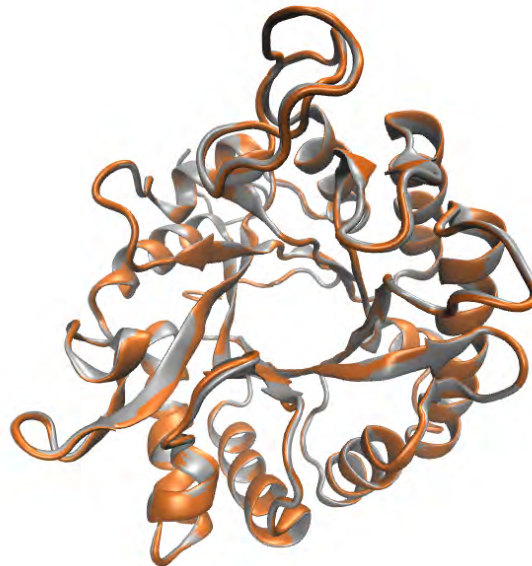


Figura 4.38. Model estructural del segon domini catalític de la quitinasa *TkChiA*. Superposició del model estructural amb el domini catalític AD2 de la quitinasa *PfChiB*, a partir del qual s'ha obtingut el model. Es representa el model de *TkChiA* en gris, i en taronja la quitinasa *PfChiB*.

Un cop obtingut el model estructural de *TkChiA* s'ha realitzat un alineament estructural amb l'estructura del mutant E526A del domini AD2 de *PfChiB* en complex amb $(\text{GlcNAc})_5$ (PDB: 3A4W). El $(\text{GlcNAc})_5$ ocupa els subsetis -3, -2, -1, +1 i +2, i el residu situat en el subseti -1 mostra una distorsió respecte als altres, presentant una conformació de nau (Tsuji *et al.*, 2010). L'estructura resolta mostra gran quantitat d'interaccions enzim-substrat, principalment amb el monòmer situat al subseti -1.

A partir de l'anàlisi estructural del model de *TkChiA* amb la superposició del substrat $(\text{GlcNAc})_5$ de l'estructura d'AD2 de *PfChiB*, es proposa els següents residus com a possibles dianes per a mutació amb l'objectiu de disminuir l'activitat hidrolítica i/o incrementar l'activitat de TG.

Amb l'objectiu de provocar una alteració de les interaccions en el subseti -1 es proposa les següents mutacions (Figura 4.39):

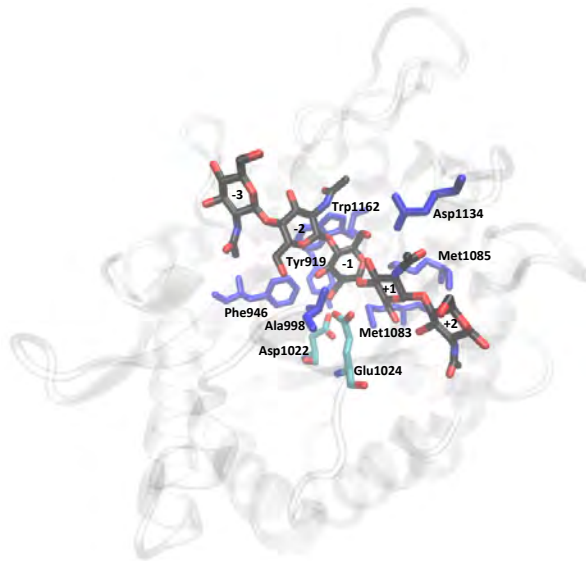


Figura 4.39. Model estructural de *TkChiA* en complex amb (GlcNAc)₅, residus subseti -1.

En blau es mostra els residus proposats a ser substituïts per alterar les interaccions del subseti -1.

- Trp1162: Es troba localitzat al subseti -1, i es coneix que en les quitinases tipus planta aquest triptòfan interacciona mitjançant interaccions d'apilament amb l'anell piranosa del GlcNAc situat en aquest subseti, interaccions crucials per a la unió i catàlisi. En el cas del domini catalític AD2 de *PfChiB*, aquest residu correspon al Trp664, i la seva mutació per Ala dona lloc a una disminució de l'activitat hidrolítica de 4 vegades respecte l'enzim *wt* (Tsuji *et al.*, 2010). Per aquest motiu, la mutació d'aquest residu per una Ala en *TkChiA* pot donar lloc a un enzim hidrolíticament menys actiu, i conseqüentment a un increment de l'activitat de TG.
- Tyr919: Correspon a la Tyr28 d'*SpChiD*. L'anell benzè de la Tyr interacciona amb el grup metil de l'*N*-acetil del monòmer situat al subseti -1 mitjançant interaccions hidrofòbiques d'apilament. El mutant Y28A d'*SpChiD* dona lloc a un increment de l'activitat de TG, quasi sense modificar l'activitat d'hidròlisi (Madhuprakash, Bobbili, *et al.*, 2015; Madhuprakash *et al.*, 2018). Es proposa la mutació d'aquesta Tyr919 per una Ala, amb l'objectiu d'incrementar l'activitat de TG.
- Met1083: Forma interaccions hidrofòbiques amb els monòmers situats als subsetis -1 i +1. Correspon al residu Met220 en *SpChiD*, en el que la substitució per una Ala, i conseqüentment la pèrdua d'aquestes interaccions hidrofòbiques, provoca un increment del temps de retenció de l'intermedi oxazolina al centre catalític que resulta en un increment de l'activitat de TG (Madhuprakash *et al.*, 2012). Es proposa la mutació M1083A.
- Met1085: També forma interaccions hidrofòbiques amb el GlcNAc del subseti -1, i correspon a la Tyr222 en *SpChiD*. La substitució de la Tyr222 per una Ala també resulta en un increment de l'activitat de TG, a causa de la substitució per una Ala

que, de la mateixa manera que en el cas anterior, comporta una cadena lateral més curta que dona lloc a un increment de la grandària de la cavitat, que alhora provoca una disminució de la velocitat de reacció d'hidròlisi i consegüentment un increment de l'activitat de TG (Madhuprakash *et al.*, 2012, 2018). També es proposa la substitució d'aquesta Met1085 per una Ala.

- Asp1134: En *PfChiB* interacciona amb el O6 del GlcNAc situat en el subseti -1. La substitució del residu corresponent d'*SpChiD* (Arg278) per una Ala dona lloc a un increment tant de l'activitat hidrolítica com de l'activitat de TG. Es proposa la substitució Asp per una Ala per incrementar l'activitat de TG, amb la hipòtesi de que la mutació del residu assistent mantindrà l'activitat hidrolítica baixa.
- Phe946: Situat en el solc catalític prop del subseti -1, on forma interaccions hidrofòbiques amb el GlcNAc. La substitució per un Trp en *SpChiD* (F58W) dona lloc a un increment de l'activitat de TG important (fins a un 20% dels productes provenen de TG en relació al total de productes). La cadena lateral del Trp és més voluminosa i facilita les interaccions amb el substrat entrant, per aquest motiu es proposa la mutació F946W.
- Ala998: Es troba entre els subsetis -1 i -2. En AD2 el grup -NH forma ponts d'hidrogen amb el O6 i el O3 dels monòmers situats en els subsetis -2 i -1, respectivament, i també interacciona hidrofòbicaament amb el monòmer del subseti +1. Per altra banda, en la quitinasa *SpChiD* correspon al Trp114, i la seva substitució per Ala dona lloc a un increment de l'activitat hidrolítica i una disminució de l'activitat TG (Madhuprakash, Bobbili, *et al.*, 2015). Per aquest motiu, es proposa la mutació A998W, amb l'objectiu d'alterar les interaccions en aquests subsetis i a més dificultar l'entrada de molècules d'aigua, a causa de l'ocupació de més espai per la cadena voluminosa del Trp.

Per altra banda, amb l'estratègia de modificar els residus dels subsetis positius, per a principalment incrementar l'afinitat per a la molècula acceptora es proposa els següents residus com a possibles diana de mutació (Figura 4.40):

- Tyr1088: Es troba en el subseti +2 i el residu corresponent en *PfChiB* forma interaccions hidrofòbiques amb el monòmer situat en aquest subseti. En *SpChiD* correspon a la Tyr226, en que la substitució per un Trp dona lloc a una disminució de l'activitat hidrolítica i una ràpida acumulació de productes de TG. A més, la combinació d'aquest mutant amb el mutant del residu assistent D151N dona lloc a un increment de l'activitat de TG amb el que s'obté un rendiment de fins el 22% en $(\text{GlcNAc})_5 + (\text{GlcNAc})_6$ (Madhuprakash *et al.*, 2018). Es proposa la mutació per un Trp, amb l'objectiu de disminuir l'activitat hidrolítica.

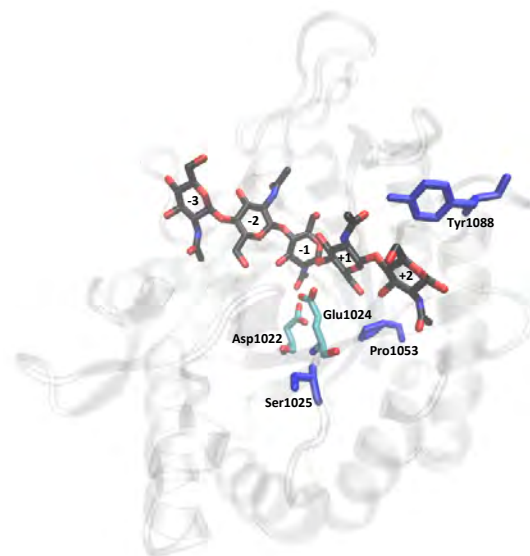


Figura 4.40. Model estructural de *TkChiA* en complex amb (GlcNAc)₅, residus subetis positius
En blau es mostra els residus dels subetis positius proposats per a ser substituïts.

- Pro1053: Es troba en el subeti +2 i forma interaccions hidrofòbiques amb el monòmer situat en aquest subeti. En *SpChiD* correspon a la Gly195, i la seva substitució per un Trp dona lloc a un increment de l'activitat de TG a causa de la incorporació de la cadena lateral voluminosa que provoca un tancament parcial de la sortida del centre actiu (Madhuprakash *et al.*, 2014). Amb l'estratègia de bloquejar parcialment la sortida i incrementar el temps de retenció de l'intermedi oxazolina, i així afavorir la reacció de TG, es proposa la substitució de la Pro1053 per un Trp.
- Ser1025: És el residu continu al Glu àcid/base i es troba entre els subetis +1 i +2, tot i que no gaire a prop del centre catalític. En *SpChiD* hi ha una Tyr en aquesta posició, encarada cap al solc catalític. La mutació d'aquesta Tyr154 per Ala dona lloc a una disminució del temps de retenció dels productes de TG, el que suggereix la importància del grup hidroxil fenòlic per al manteniment de l'activitat de TG al llarg del temps (Madhuprakash *et al.*, 2012). Es proposa la substitució de la Ser1025 per una Tyr per intentar allargar la durada dels productes obtinguts per TG.

A més, també hi ha d'altres residus que interaccionen amb el substrat, que poden tenir un rol important en la unió d'aquest o bé en el mecanisme catalític (Tsuji *et al.*, 2010), que podrien ser considerats a ser substituïts (Figura 4.41):

- Met1129, que interaccionaria mitjançant pont d'hidrogen amb el O6 del GlcNAc situat en el subeti -1.
- Val989, Val1175 i Ser1176, que formarien interaccions hidrofòbiques amb el monòmer localitzat al subeti -2.

- Asp921 i Ser923, situats en el subseti -3, que interaccionarien mitjançant pont d'hidrogen amb el grup *N*-acetil del GlcNAc situat en aquest subseti.

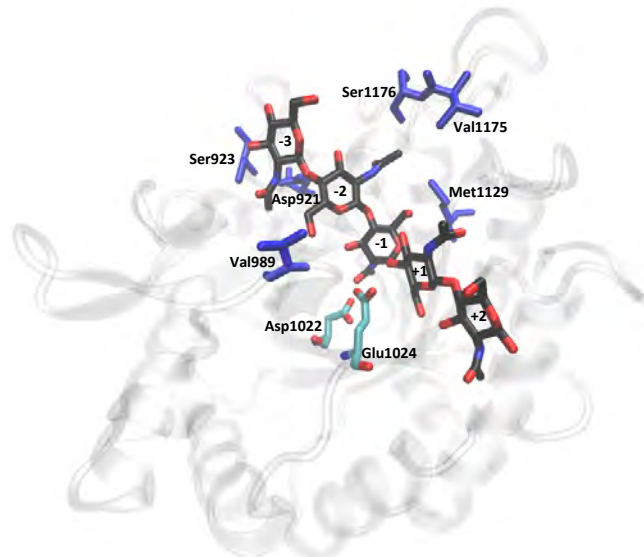


Figura 4.41. Model estructural de *TkChiA* en complex amb (GlcNAc)₅, altres residus.

En blau es mostra d'altres residus que interaccionen amb el substrat i poden ser d'interès per a ser substituïts.

TkChiA és una quitinasa arqueu, i com a tal presenta certes diferències en el mecanisme catalític respecte les quitinases GH18 bacterianes. La principal dissimilitud és el moviment del Asp assistent, el qual en aquest tipus de quitinases es troba sempre encarat cap al Glu àcid/base general, i conseqüentment el primer Asp del motiu altament conservat DxDxE presenta una menor implicació en el mecanisme catalític. Aquesta baixa implicació del primer Asp ha estat demostrada a partir del doble mutant D1020A/D1022A, el qual presenta la mateixa activitat hidrolítica i de TG que el mutant simple D1022A, a diferència del doble mutant corresponent d'*SpChiD*, el qual sí mostra una important disminució de l'activitat hidrolítica i un increment de l'activitat de TG respecte el mutant puntual del residu assistent.

A causa d'aquestes petites diferències entre ambdós mecanismes catalítics, en aquesta tesi es proposa continuar amb el disseny de la glicosintasa a partir del mutant puntual del residu assistent D1022A, el qual presenta una elevada activitat de TG, i es suggereixen diferents residus susceptibles a ser substituïts amb aquesta finalitat, a partir del disseny del model estructural de *TkChiA* en complex amb (GlcNAc)₅.

CONCLUSIONS

Conclusions

1. A partir de l'anàlisi bibliogràfica i bioinformàtica de quitinases de la família GH18, s'han seleccionat 9 quitinases (7 bacterianes i 2 d'arqueus) com a potencials candidates per a generar una glicosintasa per a la síntesi de COS definits i s'han generat els corresponents mutants del residu assistent (Asp per Ala). S'han expressat, purificat i caracteritzat sis de les nou quitinases.
2. La mutació de l'Asp assistent per una Ala en quitinases GH18 que operen per catàlisi assistida per substrat resulta en una important disminució de l'activitat hidrolítica (d'entre 10^2 i 10^4 vegades respecte els enzims *wt* corresponents), fet que confirma que aquest residu té un rol important, però no essencial, en el mecanisme catalític. Per altra banda, tots els mutants del residu assistent estudiats presenten activitat de TG amb (GlcNAc)₅ com a donador, que dona lloc a una mescla de COS amb DPs entre 5 i 10, essent (GlcNAc)₇ i (GlcNAc)₈ els productes majoritaris.
3. Amb l'ús del mimètic de l'intermedi de reacció (GlcNAc)₅-ox com a donador s'afavoreix la reacció de condensació que dona lloc a (GlcNAc)₁₀ però també tenen lloc d'altres reaccions de TG i/o hidròlisi del producte GS que resulten en una mescla de COS amb DPs entre 5 i 15. Els productes obtinguts són hidrolitzats al llarg del temps a causa de l'activitat hidrolítica residual dels mutants. D'entre els enzims seleccionats, *SpChiD* D151A i *TkChiA* D1022A són els millors candidats per a continuar amb el disseny d'una glicosintasa.
4. Amb l'objectiu de generar una glicosintasa efectiva per a la obtenció de COS definits s'ha introduït quatre mutacions puntuals al mutant simple D151A de la quitinasa D de *Serratia proteamaculans*. D'entre els mutants de la segona generació s'ha aconseguit incrementar l'activitat de TG al llarg del temps, i conseqüentment augmentar el rendiment en polímer (p/p) fins al 30%, amb el mutant D149A/D151A, que correspon a la mutació dels dos residus Asp del motiu conservat Dx Dx E. Amb la introducció d'una tercera mutació (Y28A) s'ha aconseguit incrementar el rendiment en polímer (p/p) fins a un 60%. A més, aquest triple mutant és actiu davant COS parcialment desacetilats amb els que s'ha obtingut oligòmers/polímers solubles.
5. La combinació d'altres mutacions amb la mutació del residu assistent en *SpChiD* ha donat lloc a una important disminució de l'activitat d'hidròlisi i un elevat increment de l'activitat de TG, que resulta en un augment del rendiment en polímer. Tot i així, els productes obtinguts són una mescla de COS amb diferents DPs.
6. De la sèrie de mutants estudiats s'ha aconseguit un triple mutant (*SpChiD* Y28A/D149A/D151A) amb el que s'ha obtingut el rendiment en polímer (p/p) més elevat descrit fins al moment per una quitinasa.

PART EXPERIMENTAL

Part experimental

Disseny dels gens sintètics

Les seqüències proteiques de les diferents quitinases han estat extretes de la bases de dades Uniprot (<http://www.uniprot.org>). A partir d'aquestes seqüències s'han dissenyat els gens sintètics afegint les dianes de restricció NdeI i HindIII en els extrems 5'- i 3'- respectivament, i les seqüències han estat optimitzades per a l'expressió en *E.coli*. Els gens han estat produïts per *GeneArt Gene Synthesis* (ThermoFisher Scientific). Les seqüències inclouen el ORF de cadascun dels gens en un plasmidi pMK-RQ o pMA-T. Ambdues dianes de restricció s'utilitzaran per al subclonatge dels gens en un vector pET22b(+) en marc de lectura amb el fragment de 6-His inclòs en el vector, per afegir la cua d'histidines en l'extrem C-terminal.

Manipulació de l'ADN i subclonatge

S'han transformat cèl·lules d'*E.coli* DH5 α amb els plasmidis pMK-RQ o pMA-T que contenen cadascun dels gens sintètics, s'han seleccionat les cèl·lules transformades mitjançant medi LB suplementat amb 0,1 mg·mL⁻¹ de kanamicina (per als constructes pMK-RQ) o ampil·lina (per als constructes pMA-T) i s'han fet créixer les cèl·lules en 5 mL del mateix medi durant la nit a 37°C (200 rpm). S'han purificat els plasmidis mitjançant el kit *High Purity Plasmid Miniprep Kit* (NeoBiotech). Un cop purificats els gens de les quitinases han estat subclonats en el vector pET22b(+) entre les dianes de restricció NdeI i HindIII, mitjançant el procediment estàndard: digestió dels gens amb els enzims de restricció, purificació dels fragments (*Gel extraction kit*, Sigma Aldrich) i lligació mitjançant la lligasa d'ADN T4 (Bio-rad). S'han transformat cèl·lules DH5 α , competents per CaCl₂, amb els plasmidis resultants i les cèl·lules positives han estat seleccionades mitjançant plaques d'LB amb ampil·lina. Un cop verificada la seqüència dels gens per seqüenciació d'ADN, s'han transformat cèl·lules d'*E.coli* BL21(DE3)star amb els plasmidis resultants per a l'expressió de les proteïnes.

Obtenció dels mutants

Mutants del residu assistent

Els mutants del residu assistent s'han obtingut per mutagènesi dirigida mitjançant PCR. Per a cadascun dels mutants s'ha dissenyat una parella d'encebadors (*sense* (FW) i *antisense* (RV)) que conté una regió no-solapant en els extrems 3' i una regió complementària solapant corresponent als extrems 5' en el centre de la qual es localitza els nucleòtids corresponents a la mutació (Taula E. 1). S'han utilitzat els constructes pET22b(+) amb les corresponents quitinases *wt* com a ADN motlle.

Taula E. 1. Seqüència dels oligonucleòtids dels mutants puntuals per a mutagènesi dirigida

MUTANT		OLIGONUCLEÒTIDS
<i>BcChiA</i> D202A	FW	5'-TGATCTGGG CGT GGGAATATCCGG-3'
	RV	5'-TTCCAC CGCC AGATCAACGCCATC-3'
<i>LpChiA</i> D316A	FW	5'-TGATCTGGG CGT GGGAATATCCGG-3'
	RV	5'-TCCCA CGCC AGATCAACACCATC-3'
<i>RmChiA</i> D133A	FW	5'-GATATTG CGT GGGAATATCCGGG-3'
	RV	5'-TCCCA CGCA ATATCCAGACCATC-3'
<i>StmChiA</i> D464A	FW	5'-TGATATCG CGT GGGAATATCCGG-3'
	RV	5'-TCCCA CGCG ATATCAATACCATC-3'
<i>SmChiC</i> D139A	FW	5'-GATATTG CGCT GGAACAGGCAGC-3'
	RV	5'-TCCAG CGCA ATATCCAGACCATC-3'
<i>SpChiD</i> D151A	FW	5'-TGATCTGGG CGT GGGAATATCCGG-3'
	RV	5'-TCCCA CGCC AGATCAATACCATC-3'
<i>VhChiA</i> D313A	FW	5'-GATATCG CGT GGGAATTTCCGG-3'
	RV	5'-TTCCAC CGCG ATATCAACGCCGTC-3'
<i>PfChiB</i> D524A	FW	5'-GATTTT CGATT GAAAGCAGGTATC-3'
	RV	5'-CTTCAAT CGCAA AATCCAGATAGG-3'
<i>TkChiA</i> D1022A	FW	5'-ATTTT CGATT GAAAGCGGTGTG-3'
	RV	5'-CAAT CGCAA AATCCAGATAGGTG-3'

L'amplificació per PCR s'ha dut a terme mitjançant l'ús del kit *iProof High-Fidelity Master Mix* (Bio-rad). Per a la reacció s'utilitza 5 ng d'ADN i 0,5 µM de cadascun dels encebadors en un volum final de 40 µL. Les condicions de la reacció de PCR consisteixen en una desnaturalització inicial de 3 minuts a 98°C seguida de 30 cicles de desnaturalització (95°C, 30 s), hibridació (30 s a la temperatura d'hibridació corresponent), extensió (72°C, 2,5 min) i una extensió final de 3 minuts a 72°C. Per a la obtenció del mutant *TkChiA* D1022A s'ha afegit un 3% de DMSO en la mescla de PCR i s'ha incrementat el temps de l'etapa d'extensió de cadascun dels cicles fins a 4 minuts. Un cop finalitzada la reacció de PCR, les mostres s'han digerit amb DpnI durant 3 hores a 37°C i s'han transformat en cèl·lules *E.coli* DH5α. S'ha comprovat la presència de la mutació per seqüenciació d'ADN i s'ha transformat cèl·lules d'*E.coli* BL21(DE3)star amb els plasmidis finals.

Mutants de la segona generació glicosintasa

Per a la obtenció dels mutants dobles d'*SpChiD* se segueix el mateix protocol que per als mutants simples, però s'utilitza com a ADN motlle el constructe pET22b(+) amb el gen codificant per al mutant simple D151A. Els encebadors han estat dissenyats seguint la mateixa estratègia (Taula E. 2).

Taula E. 2. Seqüència dels oligonucleòtids dels mutants dobles d'*SpChiD*

MUTANT		OLIGONUCLEÒTIDS
D149A/D151A	FW	5'-GGATGGTATTG CGCT GGCGTGGG-3'
	RV	5'-CGCCAG CGCA ATACCATCCAGATG-3'
S110G/D151A	FW	5'-GAAAGTTCTGCTG GGCGT GGGTGGTTGGG-3'
	RV	5'-CAACCACCCACG CCAGC AGAACTTTTCAG-3'
G113S/D151A	FW	5'-GAGCGTGGGT AGTT GGGGTGCAC-3'
	RV	5'-CACCCAACT ACCC ACGCTCAGC-3'
F119A/D151A	FW	5'-GTGCACGTGGT GCT AGCGGTGCAGCAGC-3'
	RV	5'-GCTGCACCG CTAGC ACCACGTGCACCC-3'

Per al mutant doble de *TkChiA* s'utilitza les mateixes condicions que per al mutant simple *TkChiA* D1022A, i s'utilitza el constructe corresponent al mutant puntual com a ADN motlle. Els encebadors també han estat dissenyats seguint la mateixa estratègia (Taula E. 3).

Taula E. 3. Seqüència dels oligonucleòtids del mutant doble de *TkChiA*

MUTANT		OLIGONUCLEÒTIDS
D1020A/D1022A	FW	5'-TATCTGG CG TTTGGCGATTGAAAGC-3'
	RV	5'-ATCGCAA ACG CCAGATAGGTGG-3'

Mutants de la tercera generació glicosintasa

Per a la obtenció dels mutants triples d'*SpChiD* se segueix el mateix protocol que per a la resta de mutants, però s'utilitza com a ADN motlle el constructe pET22b(+) amb el gen codificant per al mutant doble D149A/D151A. Els encebadors han estat dissenyats seguint la mateixa estratègia (Taula E. 4).

Taula E. 4. Seqüència dels oligonucleòtids dels mutants triples d'*SpChiD*

MUTANT		OLIGONUCLEÒTIDS
Y28A/D149A/D151A	FW	5'-GTTGG CG CTTCAATGGTGGTG-3'
	RV	5'-AA CG CGCCAACGCTCAGATAGC-3'
S110G/D149A/D151A	FW	5'-GAAAGTTCTGCTGG CG GTGGGTGGTTGGG-3'
	RV	5'-CAACCACCCAC CG CCAGCAGAACTTTCAG-3'
D149A/D151A/Y154W	FW	5'-GTGGGAAT GG CCGGTTAATGGTGCATG-3'
	RV	5'-ACCG GC ATTCCCACGCCAGCGCAA-3'
D149A/D151A/G195W	FW	5'-TGCAGTT GG GCCAATGTTAAAAG-3'
	RV	5'-TTGG CC AAACTGCAATGGTCAGC-3'
D149A/D151A/Y226W	FW	5'-TATGGCCT GG GGCACCCAGTATTTAAC-3'
	RV	5'-CC CC AGGCCATATCATAGGTCATC-3'
D149A/D151A/W241A	FW	5'-AAACAG GC GCCGACCGTTGCAG-3'
	RV	5'-TCGG GC CTGTTTGCTATCATAC-3'
D149A/D151A/W395A	FW	5'-CAATGTTT GC GGAGTATGGTGCAG-3'
	RV	5'-ATACTCC GC AAACATTGCGCCACC-3'

Expressió i purificació de proteïnes

Proves d'expressió de les quitinases

Per a l'expressió de quitinases es realitza una primera prova d'expressió per IPTG. S'inocula cèl·lules d'*E.coli* BL21(DE3)star recent transformades en LB amb 100 mg·mL⁻¹ d'ampicil·lina i es deixen créixer a 37°C durant 16 hores (250 rpm). Es realitza una dilució 1:40 d'aquestes cèl·lules en 30 mL d'LB amb ampil·lina per al cultiu d'expressió. Es deixa créixer el cultiu fins a una OD₆₀₀ 1,5 i s'indueix amb 0,5 mM d'IPTG a 25°C durant 16 hores (250 rpm). Es centrifuga les cèl·lules (10000 rpm, 15 min, 4°C), es dissolen en tampó PBS (Na₂HPO₄ 50 mM, NaCl 300 mM pH 7) i es lisen per sonicació (2 minuts, 10 segons *ON*/25 segons *OFF*, amplitud del 50%). Un cop centrifugat el lisat (12000 rpm, 60 min, 4°C) s'analitza les fraccions soluble i insoluble per SDS-PAGE.

En el cas de les quitinases *RmChiA*, *StmChiA* i *VhChiA* s'han realitzat diferents proves d'expressió en les que s'ha variat el temps d'inducció (4 h i 24 h), la temperatura d'inducció

(20°C), la concentració d'IPTG (0,1 mM i 1 mM), s'ha afegit glucosa al medi (1%) i s'ha realitzat un xoc tèrmic de 30 minuts a 42°C abans de la inducció amb 0,5 mM IPTG a 25°C. També s'ha provat l'expressió amb medi d'autoinducció LB amb Na₂HPO₄ 25 mM, K₂HPO₄ 25 mM, NH₄Cl 50 mM, Na₂SO₄ 5 mM, MgSO₄ 2 mM, 0,5% glicerol, 0,05% glucosa i 0,2% lactosa, suplementat amb 100 mg·mL⁻¹ d'ampicil·lina, a 25°C (200 rpm), en que s'han deixat créixer les cèl·lules 18, 24, 42 i 48 hores.

Expressió i purificació de quitinases

S'inocula cèl·lules d'*E.coli* BL21(DE3)star recent transformades en 4 mL d'LB amb 100 mg·mL⁻¹ d'ampicil·lina i es deixen créixer a 37°C durant 16 hores (250 rpm). Es realitza una dilució 1:40 d'aquestes cèl·lules en 30 mL d'LB amb ampicil·lina per al cultiu d'expressió. Es deixa créixer el cultiu fins a una OD₆₀₀ 1,5 i s'indueix amb 0,5 mM d'IPTG a 25°C durant 16 hores (250 rpm). Se centrifuguen les cèl·lules (10000 rpm, 15 min, 4°C) i s'emmagatzemen a -20°C fins a la seva utilització.

Per a la purificació, es dissolen les cèl·lules en 0,8 mL de tampó PBS (Na₂HPO₄ 50 mM, NaCl 300 mM pH 7) i s'afegeix 1 mM de PMSF i es procedeix a la lisi cel·lular per sonicació. La sonicació es realitza a 4°C, durant 5 minuts (10 segons *ON*/25 segons *OFF*, amplitud del 50%) i s'utilitza la sonda de 2 mm de diàmetre. Se separa la fracció soluble per centrifugació a 12000 rpm durant 60 minuts a 4°C. La purificació es realitza mitjançant l'ús de les columnes comercials de 0,1 mL *His SpinTrap* (GE Healthcare). Es realitza dues càrregues de proteïna, dos rentats amb PBS 40 mM d'imidazole i 4 elucions amb PBS 0,5 mM d'imidazole. Es combina les fraccions que contenen proteïna i es canvia el tampó a Na₂HPO₄ 50 mM pH 7 mitjançant les columnes comercials *PD SpinTrap G-25* (GE Healthcare) seguint les instruccions del comercial. Si és necessari es concentra la proteïna mitjançant l'ús d'un filtre Amicon® Ultra de 0,5 mL (Merck™). Les fraccions recol·lectades de la purificació i la mostra de proteïna final, un cop canviat el tampó, són analitzades en un gel d'acrilamida (12-14%) SDS-PAGE. La concentració de proteïna es determina mitjançant l'ús del kit *BCA Protein Assay Kit* (ThermoFisher).

Expressió i purificació de VcCDA

S'inocula cèl·lules d'*E.coli* BL21(DE3)star recent transformades en 10 mL d'LB amb 100 mg·mL⁻¹ d'ampicil·lina i es deixen créixer a 37°C durant 16 hores (250 rpm). Es realitza una dilució 1:120 d'aquestes cèl·lules en 600 mL de medi d'autoinducció (LB amb Na₂HPO₄ 25 mM, K₂HPO₄ 25 mM, NH₄Cl 50 mM, Na₂SO₄ 5 mM, MgSO₄ 2 mM, 0,5% glicerol, 0,05% glucosa i 0,2% lactosa) suplementat amb ampicil·lina i es deixa créixer el cultiu 48 hores a 25°C (180 rpm). Es realitza dos cultius de 600 mL. Se centrifuguen les cèl·lules (4000 rpm, 15 min, 4°C) i s'emmagatzemen els pellets a -20°C fins a la seva utilització.

Per a la purificació, es dissolen ambdós pellets de cèl·lules conjuntament en 40 mL de tampó PBS (Na₂HPO₄ 50 mM, NaCl 300 mM pH 8,5) i s'afegeix 1 mM de PMSF i es procedeix a la lisi cel·lular per sonicació. La sonicació es realitza a 4°C, durant 8 minuts (5 segons *ON*/15 segons *OFF*, amplitud del 50%) i s'utilitza la sonda de 6 mm de diàmetre. Se separa la fracció soluble per centrifugació a 12000 rpm durant 60 minuts, a 4°C. Abans de la purificació, es filtra el

sobrenedant amb un filtre de 0,45 μm . La purificació es realitza per cromatografia d'afinitat mitjançant l'ús d'una columna *StrepTrap* de 5 mL (GE Healthcare), seguint les instruccions de la casa comercial i es monitoritza l'absorbància en UV amb un sistema FPLC Äkta (Abersham Biosciences). S'acondiciona la columna amb PBS i HABA 1 mM i es comença amb el procés de purificació. Es realitzen 6 càrregues de proteïna, cadascuna de les quals consta de 3 etapes: càrrega de proteïna, elució amb destiobiotina 2,5 mM en tampó PBS, i regeneració de la columna amb HABA 1 mM per al següent cicle. Entre cadascuna de les etapes es realitza un rentat amb tampó PBS fins a recuperar la línia d'absorbància basal. Durant el procés de purificació es recullen les diferents fraccions que contenen la proteïna, i s'analitzen per SDS-PAGE. Es canvia el tampó a bicarbonat amoni 25 mM pH 8,5 amb un Amicon® Ultra de 15 mL 10 KDa (Merck™). La concentració de proteïna es determina mitjançant l'ús del kit *BCA Protein Assay Kit* (ThermoFisher).

Caracterització de l'activitat enzimàtica de les quitinases i els seus mutants

Activitat hidrolítica

Mètode fluorimètric per a substrats fluorogènics

L'activitat hidrolítica de les quitinases s'ha mesurat mitjançant un assaig fluorimètric amb 4-metilumbeliferil *N*-acetil- β -D-glucosamina (GlcNAc-MU), 4-metilumbeliferil β -*N*-diacetilquitobiosa ((GlcNAc)₂-MU) i 4-metilumbeliferil β -*N*-triacetilquitotriosa ((GlcNAc)₃-MU) com a substrats. Es realitza diferents reaccions a diferents concentracions d'enzim. Les reaccions es preparen a una concentració de substrat de 50 μM en tampó Na₂HPO₄ 50 mM pH 7 en un volum final de 200 μL i s'incuben a 37°C. Cada 30 minuts es prenen 20 μL de mostra i s'atura la reacció amb Glicina 0,3 M pH 10 (dilució 1:5), en una microplaca negra. Es mesura la fluorescència de la 4-metilumbeliferona alliberada en un lector de microplaques FLX800 Biotek ($\lambda_{\text{em}}=360\text{nm}$; $\lambda_{\text{ex}}=460\text{nm}$). Per a la quantificació de l'aglicó fluorogènic alliberat es realitza una recta patró a diferents concentracions de 4-metilumbeliferona en tampó Na₂HPO₄ 50 mM pH 7 i es dilueixen 1:5 amb Glicina 0,3 M pH 10, de la mateixa manera que les mostres de reacció. L'activitat específica ($V_0/[E]$) es calcula com el pendent de la velocitat inicial ($\mu\text{M MU alliberada}\cdot\text{min}^{-1}$) vs. la concentració d'enzim (μM).

Mètode cromatogràfic per a substrats naturals (HPLC-MS)

Per a l'assaig d'activitat hidrolítica amb substrats naturals s'ha utilitzat 2 mM de (GlcNAc)₄ com a substrat i diferents concentracions d'enzim en tampó Na₂HPO₄ 50 mM pH 7 en un volum final de 100 μL a 37°C, en una microplaca de 96 pous. A diferents temps de reacció (7 temps) s'agafen 10 μL de mostra i es mesclen amb 90 μL d'una barreja d'*n*-propanol:H₂O (1:1) en una altra microplaca, mitjançant l'ús de la plataforma robòtica *Bravo Automated Liquid Handling Platform* (Agilent) per aturar la reacció. Les mostres de reacció s'analitzen per HPLC-MS (HPLC 1200, ESI-MS 6100 series SQ, Agilent Technologies) utilitzant una columna *XBridge BEH Amide XP column* 130Å, 2,5 μm , 3 x 100 mm (Waters) en combinació amb una pre-columna *XBridge BEH Amide VanGuard Cartridge* (2,5 μm , 2,1 x 5 mm, Waters). S'injecten 5 μL de mostra i es realitza una elució isocràtica a 60°C amb acetonitril:H₂O (70:30, v/v) amb 0,1% d'àcid fòrmic, a un flux de 0,7 mL·min⁻¹. Per a la detecció de MS (Taula E. 5) es monitoritza les corresponents

masses iòniques dels adductes $[M+H]^+$ i $[M+Na]^+$ de $(GlcNAc)_2$, $(GlcNAc)_3$ i $(GlcNAc)_4$. Les dades s'analitzen amb el programari *ChemStation Software* (Agilent Technologies).

Taula E. 5. Condicions finals del mètode de detecció MS

Mètode de ionització	API-ES positiu
Flux del gas de desolvatació	13 L·min ⁻¹
Temperatura	300°C
<i>Fragmentor</i>	80
Pressió del nebulitzador	40 psig
Voltatge del capil·lar	4 kV
Mètode de detecció	$(GlcNAc)_2$: m/z 425,30 $[M+H]^+$ + 447,30 $[M+Na]^+$, 25% $(GlcNAc)_3$: m/z 628,30 $[M+H]^+$ + 650,30 $[M+Na]^+$, 25% $(GlcNAc)_4$: m/z 831,30 $[M+H]^+$ + 853,30 $[M+Na]^+$, 25% Scan: 100-900 m/z, 25%

Per a la quantificació dels productes de reacció s'utilitza com a patrons externs $(GlcNAc)_n$, n=2-4. Es preparen 7 mesclades de patrons que contenen diferents concentracions de $(GlcNAc)_2$, $(GlcNAc)_3$ i $(GlcNAc)_4$, en H₂O (Taula E. 6).

Taula E. 6. Preparació estocs dels patrons d'HPLC-MS

	$(GlcNAc)_2$ (mM)	$(GlcNAc)_3$ (mM)	$(GlcNAc)_4$ (mM)
ST 1	0,5	0,5	2
ST 2	0,3	0,3	1,75
ST 3	0,1	0,1	1,5
ST 4	0,08	0,08	1,25
ST 5	0,06	0,06	1
ST 6	0,04	0,04	0,75
ST 7	0,02	0,02	0,5

Els patrons es dilueixen 1:10 en la mescla d'n-propanol:H₂O (1:1) de la mateixa manera que les mostres de reacció, en la mateixa placa de la reacció, abans d'injectar els 5 µL per a l'anàlisi. Els patrons s'injecten entre 4 i 6 vegades al llarg de l'anàlisi de mostres, en funció de la durada de l'anàlisi. Per a la quantificació, es realitza la mitjana dels pendents obtinguts de les injeccions 2 a 6, i no es considera la primera injecció de patrons.

L'anàlisi sempre comença amb injeccions de tampó per a estabilitzar el detector de MS, seguida de dues injeccions consecutives de patrons abans de les injeccions de mostra.

L'activitat específica ($V_0/[E]$) es calcula com el pendent de la velocitat ($\mu\text{M producte format/substrat restant}\cdot\text{min}^{-1}$) vs. la concentració d'enzim (μM), per a cadascun dels productes. Es calcula la velocitat entre temps 0 i 2 minuts de reacció, temps considerat com estat pre-estacionari i la velocitat entre 2 i 20 minuts, com estat estacionari. Per als mutants dobles i triples es calcula la velocitat entre temps 0 i 60 minuts. Els valors d'activitat específica finals corresponen a la mitjana dels valors obtinguts en diferents lots d'enzim ($n\geq 3$). Com a concentració inicial de $(GlcNAc)_4$ es considera la mitjana de concentració de $(GlcNAc)_4$ d'un blanc de reacció sense enzim i es resta les concentracions de $(GlcNAc)_2$ i $(GlcNAc)_3$ presents en el blanc a les mostres de reacció.

Activitat glicosintasa

Mètode de cribratge en placa per a la detecció d'activitat glicosintasa

El mètode es basa en un assaig enzimàtic acoblat compost per dues reaccions: una primera reacció glicosintasa en la que s'utilitza el derivat oxazolina de diacetilquitobiosa com a donador i GlcNAc-MU com a acceptor, en la que un mutant glicosintasa actiu donarà lloc a la formació del producte de condensació (GlcNAc)₃-MU; i una segona reacció en la que (GlcNAc)₃-MU és substrat per la endoquitinasa d'*Streptomyces griseus* (Sigma Aldrich) que alliberarà l'aglicó fluorogènic del substrat (però no del GlcNAc-MU inicial) donant lloc a (GlcNAc)₂.

Per a la comprovació de la funcionalitat de l'assaig s'ha utilitzat la quitinasa A de *Bacillus circulans* (BcChiA) per a la primera reacció. Es mesclen 0,5 mM de (GlcNAc)₂-ox i 2,5 mM de GlcNAc-MU amb 100 nM de BcChiA en tampó Na₂HPO₄ 50 mM pH 7, en un volum final de reacció de 180 µL i s'incuba la reacció a 30°C durant 1 hora. Passat el temps de reacció s'afegeixen 20 µL de la quitinasa d'*S. griseus* a una concentració final de 40 µg·mL⁻¹ i s'incuba la reacció durant 5 minuts més a 30°C. Finalitzat el temps d'incubació, s'atura la reacció mitjançant una dilució 1:9 en una solució de glicina 0,3 M pH 10,3 i es llegeix la fluorescència (λexcitació 360 nm, λemissió 460 nm). De la mateixa manera, es realitza una reacció en la que no s'afegeix la quitinasa d'*S. griseus* i una en la que no s'afegeix la quitinasa de *B. circulans* com a controls. A més, també es realitza una reacció control d'activitat hidrolítica de BcChiA amb GlcNAc-MU, una reacció control d'activitat hidrolítica de la quitinasa d'*S. griseus* amb GlcNAc-MU, i una reacció sense cap dels dos enzims, a les mateixes concentracions i volums que l'assaig.

Anàlisi de l'activitat de polimerització de COS per MALDI-TOF-MS

Per a l'anàlisi de l'activitat glicosintasa principalment s'ha utilitzat (GlcNAc)₅-ox com a donador. Es mescla 1 mg·mL⁻¹ d'enzim amb 24 mM de (GlcNAc)₅-ox en tampó 50 mM Na₂HPO₄ pH 7 en un volum final de 100 µL, i s'incuba la reacció en un agitador orbital a 37°C (200 rpm). Per a les reaccions dels mutants d'*SpChiD* (capítol 4) s'utilitza una concentració de 0,25 mg·mL⁻¹ d'enzim, a causa dels resultats obtinguts. Passat el temps de reacció (generalment 2 hores i 18 hores de reacció) la suspensió resultant es centrifuga a 12000 rpm i se separa el sobrenedant i el precipitat format. Es realitzen dos rentats del precipitat dissolent-lo en 100 µL d'H₂O (4°C) en un bany d'ultrasons durant 2 minuts i finalment es liofilitza. Es pesa el precipitat format liofilitzat per a calcular el rendiment de reacció (mg precipitat/mg oxazolina inicial). Els productes GS obtinguts es dissolen en DMSO:H₂O (1:70000) i es mesclen amb el mateix volum de la matriu, àcid 2,5-dihidroxibenzoic (DHB), preparada a una concentració de 50 g·L⁻¹ en aigua. S'apliquen 0,5 µL de mostra en una placa *MTP AnchorChip*, per duplicat, i es deixa assecar la mostra a temperatura ambient abans de l'anàlisi per MALDI-TOF-MS. L'espectre de MALDI-TOF es duu a terme en un espectrofotòmetre *Bruker Daltonik microflex* (Bremen, Alemanya) equipat amb un làser de nitrogen pulsat (337 nm), i amb mode de ionització amb reflector positiu, utilitzant un voltatge reflector de 20 kV. Per al calibratge de l'aparell s'utilitza la mescla de pèptids comercial *Peptide Calibration Standard* (Bruker). L'àrea de cadascun dels productes detectats, (GlcNAc)_n, es calcula com el sumatori de les àrees dels diferents pics corresponents als diferents adductes (amb Na⁺, K⁺, i DMSO).

Les activitats de TG amb (GlcNAc)₅ com a substrat, les activitats de polimerització amb diferents COS parcialment desacetilats (ADAAA-ox, ADA-ox) i les reaccions de condensació donador-acceptor (12mM (GlcNAc)₅-ox com a donador i 24mM (GlcNAc)₂, 18,5 mM (GlcNAc)₅ o ADAAA com a acceptors, o bé 12 mM ADAAA-ox com a donador i 18,5 mM (GlcNAc)₅ com acceptor) han estat analitzades seguint la mateixa metodologia. En el cas de la utilització de COS desacetilats com a donador, quan no es dona formació de precipitat, s'ha liofilitzat la totalitat de la mescla de reacció i s'ha analitzat per MALDI-TOF seguint el mateix procediment.

Desacetilació parcial de COS amb VcCDA

Per a la obtenció d'ADAAA i ADA, per a la posterior síntesi d'oxazolina, es procedeix a la desacetilació de (GlcNAc)₅ i (GlcNAc)₃, respectivament, amb la desacetilasa específica de *Vibrio cholerae* (VcCDA).

Per a la obtenció d'ADAAA: S'incuben 100 mg de (GlcNAc)₅ amb 28 µM de VcCDA en tampó Na₂HPO₄ 50 mM pH 8,5 en un volum final de 15 mL a 37°C fins a la conversió total de (GlcNAc)₅ a ADAAA, al cap de 48 hores. Es prenen mostres de reacció al llarg del temps i s'analitzen per HPLC-MS per al seguiment. Un cop finalitzada la reacció s'elimina l'enzim amb la columna d'afinitat *Strep-Trap* de 5 mL (GE Healthcare) fent recircular la mostra a 3 mL·min⁻¹. Per a la purificació del producte monodesacetilat de salts i possible (GlcNAc)₅ restant, s'utilitza una resina d'intercanvi catiónic DOWEX 50WX8-200 (2,5 g de resina per cada 5 mg de producte). Per a l'activació de la resina s'utilitza HCl 2N seguit d'un rentat amb H₂O, i per a la regeneració d'aquesta s'utilitza H₂SO₄ 0,25 N. S'han seguit dos procediments diferents: a) s'afegeix la resina a la mostra i s'agita durant 2 hores. Passat el temps d'incubació es filtra la mescla i es realitza un rentat amb H₂O i b) s'empaqueta una columna amb la resina i es carrega la mostra a 1 mL·min⁻¹, seguit d'un rentat amb H₂O. Per a l'elució del producte d'interès s'utilitza un gradient d'NH₃ (1,33, 3, 6 i 10% NH₃). Finalment s'ajunten les fraccions que contenen el producte d'interès, s'evapora l'NH₃ amb un rotavapor, i es liofilitza la mostra. Es recullen mostres al llarg del procés per a l'anàlisi per HPLC-MS. El rendiment d'ADAAA obtingut amb ambdós procediments és del 44%. S'ha escalat la reacció a 250 mg i 500 mg de (GlcNAc)₅ inicials amb els que s'han obtingut rendiments del 44% i 28%, respectivament.

Per a la obtenció d'ADA: Es realitzen 3 reaccions preparatives en les que es mesclen 11 µM del domini catalític d'VcCDA amb 100 mg de (GlcNAc)₃ en 50 mM NH₄HCO₃ pH 8,5, en un volum final de 15 mL i s'incuben a 37°C en agitació. Passades 2 hores de reacció s'afegeixen 81 nmols d'enzim a cadascuna de les reaccions, i s'incuben fins a la conversió total de (GlcNAc)₃ a ADA, que es dona aproximadament al cap de 48 hores totals de reacció. Es prenen diferents mostres al llarg de la reacció i s'analitzen per HPLC-MS per al seguiment d'aquesta. S'elimina la proteïna, VcCDA, amb la columna *Strep-Trap* (GE Healthcare) fent recircular la mostra. Un cop eliminada la proteïna es comprova la presència d'ADA per TLC.

Mètode HPLC-MS per a l'anàlisi dels COS parcialment desacetilats

El producte de la reacció de desacetilació s'analitza per HPLC-MS. Les mostres es preparen fent una dilució 1:9 amb n-propanol:H₂O (1:1) (10 µL de mostra en 90 µL de solució d'aturada) i

s'analitzen per HPLC-MS (HPLC 1200, ESI-MS 6100 series SQ, Agilent Technologies) utilitzant una columna *XBridge BEH Amide XP 130Å*, 2,5 µm, 2.1 x 100 mm (Waters) en combinació amb una pre-columna *XBridge BEH Amide VanGuard Cartridge* (2,5 µm, 2,1 x 5 mm, Waters). S'injecten 5 µL de mostra i es realitza una elució isocràtica a 60°C amb acetonitril:H₂O (65:35, v/v) amb 0,1% d'àcid fòrmic, a un flux de 0,4 mL·min⁻¹. Per a la detecció de MS es monitoritza les corresponents masses iòniques dels adductes [M+H]⁺. Les condicions del detector MS són les mateixes que les del mètode HPLC-MS per a substrats naturals de quitinases, a excepció del *dwell time*: 20% per al producte acetilat i 80% per al producte monodesacetilat. Les dades s'analitzen amb el programari *ChemStation Software* (Agilent Technologies). Per a l'anàlisi de les mostres de desacetilació de (GlcNAc)₅ se segueixen les m/z 1035 i 993, corresponents a (GlcNAc)₅ i DP5(N), respectivament; i per a les mostres de desacetilació de (GlcNAc)₃ les m/z 629 i 587 per a (GlcNAc)₃ i DP3(N), respectivament.

Anàlisi per cromatografia en capa fina (TLC)

Per a l'anàlisi dels productes en cromatografia de capa fina s'analitzen alíquotes de reacció (1 µL) en una placa d'alumini recoberta amb gel de sílice (TLC Silicagel 60 F₂₅₄; Merck™) i s'utilitza com a fase mòbil una mescla d'acetonitril:H₂O (7:3, (v/v)). Per al revelat de la placa s'utilitza una mescla d'H₂O:MeOH:H₂SO₄ (4:5:1, (v/v)), i s'escalfa la placa a 180°C durant 2-3 minuts.

Síntesi química d'oxazolines

Anàlisi d'RMN dels productes oxazolina

L'espectre d'¹H-RMN s'enregistra en un espectrofotòmetre Varian Gemini 300 MHz que opera a 298 K. Com a estàndard intern per a l'assignació dels desplaçaments químics s'utilitza TMS (δ_H= 0 ppm) per a mostres en D₂O (δ_H= 4,79 ppm) o DMSO (δ_H= 2,5 ppm). S'indica els desplaçaments químics (δ_H, ppm) seguit del tipus de senyal (d= doblet), l'acoblament *spin-spin* (*J*, Hz) i el nombre de protons.

Mètode HPLC-MS per a l'anàlisi d'oxazolines

Per a l'anàlisi de l'oxazolina per HPLC-MS s'utilitza una columna de carboni grafit porós *Hypercarb™* 3 µm, 4,6 x 100 mm (Thermo Scientific™). S'injecten 10 µL de mostra i es realitza una elució en gradient a 25°C amb acetonitril (fase A) i NH₄HCOO (fase B), a un flux de 1 mL·min⁻¹. Per al gradient, es programa: inici amb una mescla 10:90 (A:B); 20 minuts 30:70 (A:B); i 5 minuts 100:0 (A:B). Per a la detecció de MS es monitoritzen les corresponents masses iòniques dels adductes [M+H]⁺ i [M+Na]⁺ de (GlcNAc)₅-ox (m/z 1017 i 1039), (GlcNAc)₅ (m/z 1035 i 1057), (GlcNAc)₄-ox (m/z 813 i 835) i (GlcNAc)₄ (m/z 831 i 853).

En el cas de les oxazolines de COS parcialment desacetilats les masses iòniques monitoritzades són:

- Per ADAAA-ox: DP5(N)-ox (m/z 975 i 997), DP5(N) (m/z 993 i 1015).

- Per ADA-ox: DP3(N)-ox (m/z 569 i 591), DP3(N) (m/z 587 i 609), (GlcNAc)₃-ox (m/z 611 i 633) i (GlcNAc)₃ (m/z 629 i 651)

Síntesi de (GlcNAc)₂-ox

Per a la síntesi de (GlcNAc)₂-ox s'incuben 20,9 mg de (GlcNAc)₂ (a una concentració final de 150 mM) amb 1 M de Et₃N en D₂O. S'afegeix CDMBI a una concentració final de 0,45 M i s'agita la reacció durant 1 h a 0°C. Seguidament s'elimina el precipitat de DMBI format per filtració i s'elimina l'excés de Et₃N per destil·lació. Per a eliminar les salts de clorur de trietilamoni formades durant la reacció s'incuba la mescla de reacció amb 150 mg de resina d'intercanvi aniònic Amberlyst A21 durant 1 hora. Finalment el producte es liofilitza i s'analitza per ¹H-RMN en D₂O. S'obtenen 27,9 mg de (GlcNAc)₂-ox, que corresponen a un rendiment >100%, a causa de la presència de salts de Et₃N en la mostra.

(GlcNAc)₂-ox: ¹H-RMN (300 MHz, D₂O) δ 6,09 (d, J= 5,5 Hz, 1H, H-C1_{ox})

Síntesi de (GlcNAc)₅-ox

Per a la síntesi química de (GlcNAc)₅-ox s'afegeixen 0,5 g de (GlcNAc)₅ (s'ha provat fins a 3 g) en un baló en el que prèviament s'ha afegit Et₃N (18 eq, 2,42 mL·g⁻¹) en 30 mL·g⁻¹ d'H₂O i s'agita la mostra a temperatura ambient fins que el producte es dissol completament. Un cop s'ha dissolt el producte, es refreda la solució en un bany de gel fins a 0-5°C i es comprova el pH. Si el pH no és bàsic (> pH 12), s'atura la reacció i es recupera el producte. Si el pH és bàsic, s'afegeixen 6 eq. (1,26 g·g⁻¹) de clorur de 2-clor-1,3-dimetil-1H-benzimidazole-3-oni (CDMBI) en un sol pas i s'agita la reacció a 0-5°C durant 2-3 hores. Passat el temps de reacció, s'atura l'agitació i es filtra el sòlid amb un filtre de porus #3 per eliminar el DMBI (producte de la reacció amb CDMBI). Es renta dues vegades el sòlid amb H₂O milli Q freda (1-2 mL·g⁻¹), s'ajunta tots els filtrats i es liofilitzen. S'analitza el cru de reacció per HPLC-MS (15 mg cru·mL⁻¹ H₂O milli Q) o per ¹H RMN (15-20 mg·0,6 mL⁻¹ D₂O).

Per eliminar les salts de Et₃NH⁺ es realitza una etapa de cromatografia de bescanvi iònic. Primerament s'empaqueta la columna amb reïna Amberlyst A21 dissolta en H₂O, considerant una ràtio 50:1 entre resina i cru de reacció. S'activa la resina amb NaOH 1 N (2 mL·g⁻¹ resina) tres vegades, i es comprova el pH bàsic abans de continuar. Per eliminar les salts es realitzen dos rentats amb H₂O freda (2 x 2 mL·g⁻¹ resina) prèviament a la càrrega de la mostra. La mostra es dissol en H₂O (10 mL·g⁻¹ de cru) i es carrega a la columna, i s'elueix amb H₂O, mentre es recullen fraccions de 20 mL·g⁻¹ de cru. Les fraccions es liofilitzen prèviament a l'anàlisi del producte purificat per HPLC-MS (5 mg·mL⁻¹ d'H₂O) i per ¹H RMN (8-10 mg/0,6 mL D₂O). Es poden combinar les fraccions abans de l'anàlisi per HPLC-MS i RMN dissolent-les en acetona en agitació durant 1 hora, es filtra el sòlid i es deixa assecat al buit a temperatura ambient.

(GlcNAc)₅-ox: ¹H-RMN (400 MHz, DMSO) δ 5,9 (d, J= 7,4 Hz, 1H, H-C1_{ox})

Síntesi d'ADAAA-ox

Per a la síntesi d'ADAAA-ox s'ha seguit el mateix protocol que per a (GlcNAc)₅-ox, en que s'han mantingut els equivalents d'Et₃N i CDMBI.

Es dissol el producte de partida ADAAA (340 mg) en 14 mL d'H₂O i s'afegeix la Et₃N (0,86 mL, 18 eq). Seguidament s'afegeix el CDMBI (447 mg, 6 eq) i s'agita la reacció durant 7 hores a 0-5°C. S'elimina el producte DMBI per precipitació i filtració, es fa un rentat amb H₂O (1 mL) i es liofilitza la mostra. Per a l'eliminació de les salts de Et₃N es ressuspen la mostra en H₂O (10 mL·g cru⁻¹) i s'utilitza la columna de reina Amberlyst A21. Les fraccions recol·lectades es combinen, es dissolen en acetona (5 mL) i s'agiten a temperatura ambient durant 1 hora. Es filtra el sòlid i es liofilitza la mostra. S'han obtingut 280 mg d'ADAAA-ox, que corresponen a un rendiment del 82%. S'analitza el producte per HPLC-MS i per ¹H-RMN.

ADAAA-ox: ¹H-RMN (400 MHz, DMSO) δ 5,9 (d, J= 7,4 Hz, 1H, H-C1_{ox})

Síntesi d'ADA-ox

Per a la síntesi d'ADA-ox s'ha seguit el mateix protocol que per a (GlcNAc)₅-ox, en que s'ha mantingut els equivalents d'Et₃N i CDMBI.

Es dissol el producte de partida ADA (368 mg) en 9 mL d'H₂O i s'afegeix la Et₃N (18 eq, 1,6 mL). Seguidament s'afegeix el CDMBI (6 eq, 817 mg) i s'agita la reacció durant 2 hores a 0-5°C. S'elimina el producte DMBI per precipitació i filtració i es liofilitza la mostra. Per a l'eliminació de les salts de Et₃N es ressuspen la mostra en H₂O (10 mL·g cru⁻¹, 45 mL) i s'utilitza la columna de reina Amberlyst A21. Les fraccions recol·lectades són liofilitzades i analitzades per HPLC-MS.

Assaig d'estabilitat del derivat oxazolina d'*N*-acetil-β-D-glucosamina

S'analitzen diferents solucions d'*N*-acetil-β-D-glucosamina en tampó fosfat-citrat 50 mM amb un 10% de D₂O en un interval de pHs entre 3,5 i 9. En condicions d'RMN WET_1D, se segueixen tres senyals per a determinar l'evolució de la hidròlisi de l'anell oxazolina. L'oxazolina GlcNAc-ox se segueix amb la senyal a 5,95 ppm (J= 7,4 Hz), i l'α-GlcNAc i β-GlcNAc formats per hidròlisi se segueixen a 5,05 ppm (J= 3,7 Hz) i 4,50 ppm (J= 8,9 Hz), respectivament.

Procediments bioinformàtics

Procediments generals

Els alineaments de seqüència s'han realitzat amb el programa *Jalview*. Per a la visualització d'estructures s'ha utilitzat el programa de gràfics moleculars VMD.

Obtenció estructura *SpChiD* en complex amb (GlcNAc)₅

Les imatges de l'estructura d'*SpChiD* en complex amb (GlcNAc)₅ s'han obtingut a partir d'un alineament estructural entre l'estructura d'*SpChiD* (PDB 4Q22) i el domini catalític del mutant E153Q (corresponent al mutant del residu àcid/base general) en complex amb (GlcNAc)₅ de la quitinasa de *Moritella marina* (PDB 4MB5) amb l'eina *Matchmaker* del programa Chimera.

Disseny del model estructural de *TkChiA*

El model estructural de *TkChiA* ha estat dissenyat amb el servidor HHPRED (toolkit.tuebingen.mpg.de/#/tools/hhpred). L'elevada identitat de seqüència (80%) entre el domini catalític AD2 de la quitinasa B de *P. furiosus* i el domini catalític de l'extrem C-terminal de *T. kodakaraensis* ha permès utilitzar l'estructura d'AD2 com a motlle. S'ha utilitzat l'estructura amb PDB 2DSK per a la construcció del model.

Per a la obtenció de l'estructura en complex amb (GlcNAc)₅ s'ha realitzat un alineament estructural entre el model de *TkChiA* obtingut i l'estructura del mutant E526A de *PfChiB* (corresponent al mutant del residu àcid/base general) resolta en complex amb (GlcNAc)₅ (PDB 3A4W) amb l'eina *MultiSeq* del programa VMD.

BIBLIOGRAFIA

Bibliografia

- van Aalten, D. M. F., Komander, D., Synstad, B., Gåseidnes, S., Peter, M. G. and Eijsink, V. G. H. (2001) 'Structural insights into the catalytic mechanism of a family 18 exo-chitinase', *PNAS*, 98(16), pp. 8979–8984.
- van Aalten, D. M. F., Synstad, B., Brurberg, M. B., Hough, E., Riise, B. W., Eijsink, V. G. H. and Wierenga, R. K. (2000) 'Structure of a two-domain chitotriosidase from *Serratia marcescens* at 1.9-Å resolution', *PNAS*, 97(11), pp. 5842–5847.
- Adamczyk, B., Tharmalingam, T. and Rudd, P. M. (2012) 'Glycans as cancer biomarkers', *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*. Elsevier B.V., 1820(9), pp. 1347–1353.
- Aguilera, B., Ghauharali-van der Vlugt, K., Helmond, M. T. J., Out, J. M. M., Donker-Koopman, W. E., Groener, J. E. M., Boot, R. G., Renkema, G. H., van der Marel, G. A., van Boom, J. H., Overkleeft, H. S. and Aerts, J. M. F. G. (2003) 'Transglycosidase Activity of Chitotriosidase: Improved enzymatic assay for the human macrophage chitinase', *Journal of Biological Chemistry*, 278(42), pp. 40911–40916.
- Ahmed, T. A. and 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, pp. 483–507.
- Andrés, E., Albesa-Jové, D., Biarnés, X., Moerschbacher, B. M., Guerin, M. E. and Planas, A. (2014) 'Structural Basis of Chitin Oligosaccharide Deacetylation', *Angew. Chem.*, 53(27), pp. 6882–6887.
- Armstrong, Z. and Withers, S. G. (2013) 'Synthesis of Glycans and Glycopolymers Through Engineered Enzymes', *Biopolymers*, 99(10), pp. 666–674.
- Aronson Jr., N. N., Halloran, B. A., Alexeyev, M. F., Zhou, X. E., Wang, Y., Meehan, E. J. and Chen, L. (2006) 'Mutation of a conserved tryptophan in the chitin-binding cleft of *Serratia marcescens* chitinase A enhances transglycosylation', *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 70(1), pp. 243–251.
- Azuma, K., Ifuku, S., Osaki, T., Okamoto, Y. and Minami, S. (2014) 'Preparation and Biomedical Applications of Chitin and Chitosan Nanofibers', *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 10, pp. 2891–2920.
- Ben-Shalom, N., Ardi, R., Pinto, R., Aki, C. and Fallik, E. (2003) 'Controlling gray mould caused by *Botrytis cinerea* in cucumber plants by means of chitosan', *Crop Protection*, 22, pp. 285–290.
- Bhuvanachandra, B., Madhuprakash, J. and Podile, A. R. (2018) 'Active-site mutations improved the transglycosylation activity of *Stenotrophomonas maltophilia* chitinase A', *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*. Elsevier, 1866(3), pp. 407–414.
- Bissaro, B., Monsan, P., Fauré, R. and O'Donohue, M. J. (2015) 'Glycosynthesis in a waterworld: new insight into the molecular basis of transglycosylation in retaining glycoside hydrolases', *Biochemical Journal*, 467(1), pp. 17–35.
- Bokma, E., Rozeboom, H. J., Sibbald, M., Dijkstra, B. W. and Beintema, J. J. (2002) 'Expression and characterization of active site mutants of hevamine, a chitinase from the rubber tree *Hevea brasiliensis*', *Eur. J. Biochem*, 269, pp. 893–901.

- Braconnot, H. (1811) 'Sur la nature des champignons', *Ann. Chim. Phys.*, 79, pp. 265–304.
- Campbell, F. L. (1929) '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, pp. 401–426.
- Chamnanmanoontham, N., Pongprayoon, W., Pichayangkura, R., Roytrakul, S. and Chadchawan, S. (2015) 'Chitosan enhances rice seedling growth via gene expression network between nucleus and chloroplast', *Plant Growth Regulation*, 75(1), pp. 101–114.
- Chung, M. J., Park, J. K. and Park, Y. I. (2012) 'Anti-inflammatory effects of low-molecular weight chitosan oligosaccharides in IgE – antigen complex-stimulated RBL-2H3 cells and asthma model mice', *International Immunopharmacology*. Elsevier B.V., 12, pp. 453–459.
- Chung, Y., Su, Y., Chen, C., Jia, G., Wang, H., Wu, J. C. G. and Lin, J. (2004) 'Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall', *Acta Pharmacol Sin*, 25(7), pp. 932–936.
- Coines, J., Alfonso-Prieto, M., Biarnés, X., Planas, A. and Rovira, C. (2018) 'Oxazoline or Oxazolinium Ion? The Protonation State and Conformation of the Reaction Intermediate of Chitinase Enzymes Revisited', *Chem. Eur. J.*, 24, pp. 19258–19265.
- Croisier, F. and Jérôme, C. (2013) 'Chitosan-based biomaterials for tissue engineering', *European Polymer Journal*, 49, pp. 780–792.
- Davies, G. and Henrissat, B. (1995) 'Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases', *Current Biology-Structure*, 3(9), pp. 853–859.
- Demchenko, A. V (2008) *Handbook of Chemical Glycosylation: Advances in Stereoselectivity and Therapeutic Relevance*, Wiley-VCH. Edited by Alexei V. Demchenko; Wiley-VCH.
- Dhillon, G. S., Kaur, S., Brar, S. K. and Verma, M. (2013) 'Green synthesis approach: extraction of chitosan from fungus mycelia', *Critical Reviews in Biotechnology*, 33(4), pp. 379–403.
- Einbu, A., Grasdalen, H. and Va, K. M. (2007) 'Kinetics of hydrolysis of chitin/chitosan oligomers in concentrated hydrochloric acid', *Carbohydrate Research*, 342, pp. 1055–1062.
- Faijes, M. and Planas, A. (2007) 'In vitro synthesis of artificial polysaccharides by glycosidases and glycosynthases', *Carbohydrate Research*, 342, pp. 1581–1594.
- Feng, J., Zhao, L. and Yu, Q. (2004) 'Receptor-mediated stimulatory effect of oligochitosan in macrophages', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 317, pp. 414–420.
- Frederiksen, R. F., Yoshimura, Y., Storgaard, B. G., Paspaliari, D. K., Petersen, B. O., Chen, K., Larsen, T., Duus, J. Ø., Ingmer, H., Bovin, N. V, Westerlind, U., Blixt, O., Palcic, M. M. and Leisner, J. J. (2015) 'A Diverse Range of Bacterial and Eukaryotic Chitinases Hydrolyzes the LacNAc (Gal β 1–4GlcNAc) and LacdiNAc (GalNAc β 1–4GlcNAc) Motifs Found on Vertebrate and Insect Cells', *Journal of Biological Chemistry*, 290(9), pp. 5354–5366.
- Fukamizo, T., Sasaki, C., Schelp, E., Bortone, K. and Robertus, J. D. (2001) 'Kinetic properties of Chitinase-1 from the fungal pathogen *Coccidioides immitis*', *Biochemistry*, 40(8), pp. 2448–2454.

- Gao, J., Bauer, M. W., Shockley, K. R., Pysz, M. A. and Kelly, R. M. (2003) 'Growth of Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus* on Chitin Involves Two Family 18 Chitinases', *Applied and Environmental Microbiology*, 69(6), pp. 3119–3128.
- El Gueddari, N. E., Schaaf, A., Kohlhoff, M., Gorzelanny, C. and Moers (2007) 'Substrates and products of chitin and chitosan modifying enzymes', *Adv Chitin Sci.*, 10, pp. 119–126.
- Hadwiger, L. A. (2013) 'Plant science review: Multiple effects of chitosan on plant systems: Solid science or hype', *Plant Science*. Elsevier Ireland Ltd, 208, pp. 42–49.
- Hamid, R., Khan, M. A., Ahmad, M., Ahmad, M. M., Abdin, M. Z., Musarrat, J. and Javed, S. (2013) 'Chitinases: An update', *Journal of Pharmacy and BioAllied Sciences*, 5(1), pp. 21–29.
- Henrissat, B. and Davies, G. (1997) 'Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases', *Current Opinion in Structural Biology*, 7, pp. 637–644.
- Hobel, C. F. V., Hreggvidsson, G. O., Marteinson, V. T., Bahrani-Mougeot, F., Einarsson, J. M. and Kristjánsson, J. K. (2005) 'Cloning, expression, and characterization of a highly thermostable family 18 chitinase from *Rhodothermus marinus*', *Extremophiles*, 9(1), pp. 53–64.
- Honda, Y., Tanimori, S., Kirihata, M., Kaneko, S., Tokuyasu, K., Hashimoto, M., Watanabe, T. and Fukamizo, T. (2000) 'Kinetic analysis of the reaction catalyzed by chitinase A1 from *Bacillus circulans* WL-12 toward the novel substrates, partially N-deacetylated 4-methylumbelliferyl chitobiosides', *FEBS Letters*, 476, pp. 194–197.
- Hoppe-Seyler, F. (1894) 'Ueber Chitin und Cellulose', *European Journal of Inorganic Chemistry*, 27(3), pp. 3329–3331.
- Horn, S. J., Sikorski, P., Cederkvist, J. B., Vaaje-kolstad, G., Sørli, M., Synstad, B., Vriend, G., Vårum, K. M. and Eijsink, V. G. H. (2006) 'Costs and benefits of processivity in enzymatic degradation of recalcitrant polysaccharides', *PNAS*, 103(48), pp. 18089–18094.
- Horn, S. J., Sørbotten, A., Synstad, B., Sikorski, P., Sørli, M., Vårum, K. M. and Eijsink, V. G. H. (2006) 'Endo/exo mechanism and processivity of family 18 chitinases produced by *Serratia marcescens*.', *The FEBS journal*, 273(3), pp. 491–503.
- Horn, S. J., Sørli, M., Vaaje-Kolstad, G., Norberg, A. L., Synstad, B., Varum, K. M. and Eijsink, V. G. H. (2006) 'Comparative studies of chitinases A, B and C from *Serratia marcescens*', *Biocatalysis and Biotransformation*, 24, pp. 39–53.
- Horton, D. and Lineback, D. R. (1965) 'N-deacetylation chitosan from chitin', in Whistler, R. L. and Wolfson, M. L. (eds) *Methods in carb chemistry*. New York: Academic Press.
- Hosseinnejad, M. and Jafari, S. M. (2016) 'Evaluation of different factors affecting antimicrobial properties of chitosan', *International Journal of Biological Macromolecules*. Elsevier B.V., 85, pp. 467–475.
- Huang, C. J. and Chen, C. Y. (2005) 'High-level expression and characterization of two chitinases, ChiCH and ChiCW, of *Bacillus cereus* 28-9 in *Escherichia coli*', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 327(1), pp. 8–17.

- Huang, W., Giddens, J., Fan, S.-Q., Toonstra, C. and Wang, L. X. (2012) 'Chemoenzymatic Glycoengineering of Intact IgG Antibodies for Gain of Functions', *Journal of the American Chemical Society*, 134, pp. 12308–12318.
- Jaques, A. K., Fukamizo, T., Hall, D., Barton, R. C., Escott, G. M., Parkinson, T., Hitchcock, C. A. and Adams, D. J. (2003) 'Disruption of the gene encoding the ChiB1 chitinase of *Aspergillus fumigatus* and characterization of a recombinant gene product', *Microbiology*, 149(10), pp. 2931–2939.
- Jeon, Y.-J., Park, P.-J. and Kim, S.-K. (2001) 'Antimicrobial effect of chitooligosaccharides produced by bioreactor', *Carbohydrate Polymers*, 44, pp. 71–76.
- Jung, W. J. and Park, R. D. (2014) 'Bioproduction of chitooligosaccharides: Present and perspectives', *Marine Drugs*, 12(11), pp. 5328–5356.
- Kapaun, E. and Reisser, W. (1995) 'A chitin-like glycan in the cell wall of a *Chlorella* sp. (*Chlorococcales, Chlorophyceae*)', *Planta*, 197, pp. 577–582.
- Karlsson, M. and Stenlid, J. (2009) 'Evolution of Family 18 Glycoside Hydrolases: Diversity, Domain Structures and Phylogenetic Relationships', *J Mol Microbiol Biotechnol*, 16, pp. 208–223.
- Karrer, P. and Hofmann, A. (1929) 'Über den enzymatischen Abbau von Chitin und Chitosan I.', *Helvetica Chimica Acta*, 12(1), pp. 616–637.
- Katiyar, D., Hemantaranjan, A., Singh, B. and Bhanu, A. N. (2014) 'A future perspective in crop protection: Chitosan and its Oligosaccharides', *Advances in Plants & Agriculture Research*, 1(1), pp. 23–30.
- Keller, B. O., Sui, J., Young, A. B. and Whittall, R. M. (2008) 'Interferences and contaminants encountered in modern mass spectrometry', *Analytica Chimica Acta*, 627(1), pp. 71–81.
- Kendra, D. F. and 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, pp. 276–281.
- Kobayashi, S., Kiyosada, T. and Shoda, S. (1996) 'Synthesis of Artificial Chitin: Irreversible Catalytic Behavior of a Glycosyl Hydrolase through a Transition State Analogue Substrate', *Journal of the American Chemical Society*, 118, pp. 13113–13114.
- Kobayashi, S., Kiyosada, T. and Shoda, S. (1997) 'A Novel Method for Synthesis of Chitobiose via Enzymatic Glycosylation Using a Sugar Oxazoline as Glycosyl Donor', *Tetrahedron Letters*, 38(12), pp. 2111–2112.
- Kondo, Y., Nakatani, A., Hayashi, K. and Ito, M. (2000) 'Low Molecular Weight Chitosan Prevents the Progression of Low Dose Streptozotocin-Induced Slowly Progressive Diabetes Mellitus in Mice', *Biol. Pharm. Bull.*, 23(12), pp. 1458–1464.
- Kreger, D. R. (1954) 'Observations on cell walls of yeasts and some other fungi by X-ray diffraction and solubility tests', *BBA - Biochimica et Biophysica Acta*, 13, pp. 1–9.
- Kulikov, S. N., Chirkov, S. N., Il'ina, A. V., Lopatin, S. A. and Varlamov, V. P. (2006) 'Effect of the Molecular Weight of Chitosan on Its Antiviral Activity in Plants', *Applied Biochemistry and Microbiology*, 42(2), pp. 200–203.

- Kumar, M. N. V. R. (2000) 'A review of chitin and chitosan applications', *Reactive & Functional Polymers*, 46, pp. 1–27.
- Kurita, K. (2001) 'Controlled functionalization of the polysaccharide chitin', *Prog. Polym. Sci.*, 26, pp. 1921–1971.
- Latil de Ros, D. (2017) *Microalgae As a New Source of Chitosans*.
- Lee, H.-W., Park, Y.-S., Choi, J.-W., Yi, S. and Shin, W.-S. (2003) 'Antidiabetic Effects of Chitosan Oligosaccharides in Neonatal Streptozotocin-Induced Noninsulin-Dependent Diabetes Mellitus in Rats', *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 26(8), pp. 1100–1103.
- Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P. M. and Henrissat, B. (2014) 'The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013', *Nucleic Acids Research*, 42(D1), pp. 490–495.
- Lü, Y., Yang, H., Hongyan, H., Wang, Y., Rao, Z. and Jin, C. (2009) 'Mutation of Trp137 to glutamate completely removes transglycosyl activity associated with the *Aspergillus fumigatus* AfChiB1', *Glycoconj J*, 26, pp. 525–534.
- Mackenzie, L. F., Wang, Q., Warren, R. A. J. and Withers, S. G. (1998) 'Glycosynthases: Mutant Glycosidases for Oligosaccharide Synthesis', *Journal of the American Chemical Society*, 120, pp. 5583–5584.
- Maclaughlin, F. C., Mumper, R. J., Wang, J., Tagliaferri, J. M., Gill, I., Hinchcliffe, M. and Rolland, A. P. (1998) 'Chitosan and depolymerized chitosan oligomers as condensing carriers for *in vivo* plasmid delivery', *Journal of Controlled Release*, 56, pp. 259–272.
- Madhuprakash, J., Bobbili, K. B., Moerschbacher, B. M., Singh, T. P., Swamy, M. J. and Podile, A. R. (2015) 'Inverse relationship between chitinase and transglycosylation activities of chitinase-D from *Serratia proteamaculans* revealed by mutational and biophysical analyses', *Scientific Reports*, 5, p. 15657.
- Madhuprakash, J., Dalhus, B., Rani, T. S., Podile, A. R., Eijsink, V. G. H. and Sørli, M. (2018) 'Key Residues Affecting Transglycosylation Activity in Family 18 Chitinases: Insights into Donor and Acceptor Subsites', *Biochemistry*. American Chemical Society, 57(29), pp. 4325–4337.
- Madhuprakash, J., El Gueddari, N. E., Moerschbacher, B. M. and Podile, A. R. (2015) 'Catalytic Efficiency of Chitinase-D on Insoluble Chitinous Substrates Was Improved by Fusing Auxiliary Domains', *PloS one*, 10, pp. 1–14.
- Madhuprakash, J., Singh, A., Kumar, S., Sinha, M., Kaur, P., Sharma, S., Podile, A. R. and Singh, T. P. (2013) 'Structure of chitinase D from *Serratia proteamaculans* reveals the structural basis of its dual action of hydrolysis and transglycosylation', *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 4(4), pp. 166–178.
- Madhuprakash, J., Tanneeru, K., Karlapudi, B., Guruprasad, L. and Podile, A. R. (2014) 'Mutagenesis and molecular dynamics simulations revealed the chitoooligosaccharide entry and exit points for chitinase D from *Serratia proteamaculans*', *Biochimica et Biophysica Acta*. Elsevier B.V., 1840, pp. 2685–2694.
- Madhuprakash, J., Tanneeru, K., Purushotham, P., Guruprasad, L. and Podile, A. R. (2012) 'Transglycosylation by chitinase D from *Serratia proteamaculans* improved through altered substrate interactions', *The Journal of Biological Chemistry*, 287, pp. 44619–44627.

- Makino, A., Kurosaki, K., Ohmae, M. and Kobayashi, S. (2006) 'Chitinase-catalyzed synthesis of alternately N-deacetylated chitin: a chitin-chitosan hybrid polysaccharide', *Biomacromolecules*, 7, pp. 950–957.
- 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 Letters*, 440, pp. 208–212.
- Mallakuntla, M. K., Vaikuntapu, P. R., Bhuvanachandra, B., Das, S. N. and Podile, A. R. (2017) 'Transglycosylation by a chitinase from *Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae* generates longer chitin oligosaccharides', *Scientific Reports*. Springer US, 7(1), p. 5113.
- Mansouri, S., Lavigne, P., Corsi, K., Benderdour, M., Beaumont, E. and 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, pp. 1–8.
- Martinez, E. A., Boer, H., Koivula, A., Samain, E., Driguez, H., Armand, S. and Cottaz, S. (2012) 'Engineering chitinases for the synthesis of chitin oligosaccharides: Catalytic amino acid mutations convert the GH-18 family glycoside hydrolases into transglycosylases', *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. Elsevier B.V., 74, pp. 89–96.
- Matsumoto, T., Nonaka, T., Hashimoto, M., Watanabe, T. and Mitsui, Y. (1999) 'Three-dimensional structure of the catalytic domain of chitinase A1 from *Bacillus circulans* WL-12 at a very high resolution', *Proc. Japan Acad.*, 75(9), pp. 269–274.
- Mccarter, J. D. and Withers, S. G. (1994) 'Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis', *Current Opinion in Structural Biology*, 4, pp. 885–892.
- Mondal, M. M. A., Malek, M. A., Puteh, A. B., Ismail, M. R., Ashrafuzzaman, M. and Naher, L. (2012) 'Effect of foliar application of chitosan on growth and yield in okra', *Australian Journal of Crop Science*, 6(5), pp. 918–921.
- Nakamura, T., Mine, S., Hagihara, Y., Ishikawa, K. and Uegaki, K. (2007) 'Structure of the catalytic domain of the hyperthermophilic chitinase from *Pyrococcus furiosus*', *Acta crystallographica*, 63, pp. 7–11.
- Nanjo, F., Sakai, K., Ishikawa, M., Isobe, K. and Usui, T. (1989) 'Properties and Transglycosylation Reaction of a Chitinase from *Nocardia orientalis*', *Agric. Biol. Chem.*, 53(8), pp. 2189–2195.
- Naqvi, S. and Moerschbacher, B. M. (2017) 'The cell factory approach toward biotechnological production of high-value chitosan oligomers and their derivatives: an update', *Critical Reviews in Biotechnology*, 37(1), pp. 11–25.
- Nge, K. L., Nwe, N., Chandkrachang, S. and Stevens, W. F. (2006) 'Chitosan as a growth stimulator in orchid tissue culture', *Plant Science*, 170, pp. 1185–1190.
- Noguchi, M., Fujieda, T., Huang, W. C., Ishihara, M., Kobayashi, A. and Shoda, S. I. (2012) 'A practical one-step synthesis of 1,2-oxazoline derivatives from unprotected sugars and its application to chemoenzymatic β -N-acetylglucosaminidation of disialo-oligosaccharide', *Helvetica Chimica Acta*, 95(10), pp. 1928–1936.

- Noguchi, M., Tanaka, T., Gyakushi, H., Kobayashi, A. and Shoda, S. I. (2009) 'Efficient synthesis of sugar oxazolines from unprotected N-acetyl-2-amino sugars by using chloroformamidinium reagent in water', *Journal of Organic Chemistry*, 74(5), pp. 2210–2212.
- Odier, A. (1823) 'Mémoire sur la composition chimique des parties cornées des insectes', *Mem. Soc. Hist. Nat. Paris*, 1, pp. 29–42.
- Ogawa, K., Yoshida, N., Kariya, K., Ohnishi, C. and Ikeda, R. (2002) 'Purification and characterization of a novel chitinase from *Burkholderia cepacia* strain KH2 isolated from the bed log of *Lentinus edodes*, Shiitake mushroom.', *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 48(1), pp. 25–33.
- Ohnuma, T., Numata, T., Osawa, T., Mizuhara, M., Lampela, O., Juffer, A. H., Skriver, K. and Fukamizo, T. (2011) 'A class V chitinase from *Arabidopsis thaliana*: Gene responses, enzymatic properties, and crystallographic analysis', *Planta*, 234(1), pp. 123–137.
- Ohnuma, T., Numata, T., Osawa, T., Mizuhara, M., Vårum, K. M. and Fukamizo, T. (2011) 'Crystal structure and mode of action of a class V chitinase from *Nicotiana tabacum*', *Plant Molecular Biology*, 75(3), pp. 291–304.
- Oku, T. and Ishikawa, K. (2006) 'Analysis of the hyperthermophilic chitinase from *Pyrococcus furiosus*: activity toward crystalline chitin', *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 70(7), pp. 1696–701.
- Pantaleone, D., Yalpani, M. and Scollar, M. (1992) 'Unusual susceptibility of chitosan to enzymic hydrolysis', *Carbohydrate Research*, 237, pp. 325–332.
- Pantoom, S., Songsiriritthigul, C. and Suginta, W. (2008) 'The effects of the surface-exposed residues on the binding and hydrolytic activities of *Vibrio carchariae* chitinase A', *BMC Biochemistry*, 9, p. 2.
- Papanikolaou, Y., Prag, G., Tavlas, G., Vorgias, C. E., Oppenheim, A. B. and Petratos, K. (2001) 'High resolution structural analyses of mutant Chitinase A complexes with substrates provide new insight into the mechanism of catalysis', *Biochemistry*, 40(38), pp. 11338–11343.
- Park, J. K., Chung, M. J., Choi, H. N. and Park, Y. Il (2011) 'Effects of the Molecular Weight and the Degree of Deacetylation of Chitosan Oligosaccharides on Antitumor Activity', *International Journal of Molecular Sciences*, 12, pp. 266–277.
- Passarinho, P. A. and Vries, S. C. (2002) '*Arabidopsis* chitinases: a genomic survey', in *The Arabidopsis Book*. Rockville: Somerville, C. Meyerowitz, E. (Ed) American Society of Plant Biologists, pp. 1–25.
- Patrulea, V., Ostafe, V., Borchard, G. and Jordan, O. (2015) 'Chitosan as a starting material for wound healing applications', *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. Elsevier B.V., 97, pp. 417–426.
- Payne, C. M., Baban, J., Horn, S. J., Backe, P. H., Arvai, A. S., Dalhus, B., Bjørås, M., Eijsink, V. G. H., Sørli, M., Beckham, G. T. and Vaaje-Kolstad, G. (2012) 'Hallmarks of processivity in glycoside hydrolases from crystallographic and computational studies of the *Serratia marcescens* chitinases.', *The Journal of biological chemistry*, 287(43), pp. 36322–36330.

- Perrakis, A., Tews, I., Dauter, Z., Oppenheim, A. B., Chet, I., Wilson, K. S. and Vorgiasl, C. E. (1994) 'Crystal structure of a bacterial chitinase at 2.3 Å resolution', *Current Opinion in Structural Biology*, 2(12), pp. 1169–1180.
- Pestov, A. and Bratskaya, S. (2016) 'Chitosan and Its Derivatives as Highly Efficient Polymer Ligands', *MDPI*, 21(330).
- Philibert, T., Lee, B. H. and Fabien, N. (2016) 'Current Status and New Perspectives on Chitin and Chitosan as Functional Biopolymers', *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 181, pp. 1314–1337.
- Planas, A., Faijes, M. and Codera, V. (2015) 'When enzymes do it better: enzymatic glycosylation methods.', in *Carbohydrates Chemistry: State-of-the-art and challenges for drug development: An overview on Structure, Biological Roles, Synthetic Methods and Application as Therapeutics*.
- Pokhis, K., Bitterlich, N., Cornelli, U. and Cassano, G. (2015) 'Efficacy of polyglucosamine for weight loss — confirmed in a randomized double-blind, placebo-controlled clinical investigation', *BMC Obesity*. *BMC Obesity*, 2:25.
- Purushotham, P. and Podile, A. R. (2012) 'Synthesis of Long-Chain Chitoooligosaccharides by a Hypertransglycosylating Processive Endochitinase of *Serratia proteamaculans* 568', *Journal of Bacteriology*, 194(16), pp. 4260–4271.
- Purushotham, P., Sarma, P. V. S. R. N. and Podile, A. R. (2012) 'Multiple chitinases of an endophytic *Serratia proteamaculans* 568 generate chitin oligomers', *Bioresource Technology*. Elsevier Ltd, 112, pp. 261–269.
- Rinaudo, M. (2006) 'Chitin and chitosan: Properties and applications', *Prog. Polym. Sci.*, 31, pp. 603–632.
- Rouget, C. (1859) 'Des substances amylicées dans les tissus des animaux, spécialement des Articulés (chitine)', *Comp. Rend.*, 48, pp. 792–795.
- Sakamoto, J., Watanabe, T., Ariga, Y. and Kobayashi, S. (2001) 'Ring-opening glycosylation of a chitobiose oxazoline catalyzed by a non-chitinolytic mutant of chitinase', *Chemistry Letters*, 30(11), pp. 1180–1181.
- Sasaki, C., Yokoyama, A., Itoh, Y., Hashimoto, M., Watanabe, T. and Fukamizo, T. (2002) 'Comparative Study of the Reaction Mechanism of Family 18 Chitinases from Plants and Microbes', *The Journal of Biochemistry*, 131(4), pp. 557–564.
- Schnaar, R. L. (2016) 'Glycobiology simplified: diverse roles of glycan recognition in inflammation', *Journal of Leukocyte Biology*, 99(6), pp. 825–838.
- Se-Kwon, K. (Ed. . (2010) *Chitin, Chitosan, Oligosaccharides and Their Derivatives - Biological Activities and Applications*, CRC Press.
- Seidl, V., Huemer, B., Seiboth, B. and Kubicek, C. P. (2005) 'A complete survey of *Trichoderma* chitinases reveals three distinct subgroups of family 18 chitinases', *FEBS Journal*, 272, pp. 5923–5939.
- 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, pp. 169–177.

- Shen, K.-T., Chen, M.-H., Chan, H., Jeng, J. and Wang, Y. (2009) 'Inhibitory effects of chitooligosaccharides on tumor growth and metastasis', *Food and Chemical Toxicology*. Elsevier Ltd, 47, pp. 1864–1871.
- Shibasaki, H., Uchimura, K., Miura, T., Kobayashi, T., Usami, R. and Horikoshi, K. (2014) 'Highly thermostable and surfactant-activated chitinase from a subseafloor bacterium, *Laceyella putida*', *Applied microbiology and biotechnology*, 98(18), pp. 7845–7853.
- Shoda, S. ichiro, Fujita, M., Lohavisavapanichi, C., Misawa, Y., Ushizaki, K., Tawata, Y., Kuriyama, M., Kohri, M. and Kuwata, H. (2002) 'Efficient method for the elongation of the N-acetylglucosamine unit by combined use of chitinase and β -galactosidase', *Helvetica Chimica Acta*, 85(11), pp. 3919–3936.
- Sirimontree, P., Suginta, W., Sritho, N., Kanda, Y., Shinya, S., Ohnuma, T. and Fukamizo, T. (2014) 'Mutation strategies for obtaining chitooligosaccharides with longer chains by transglycosylation reaction of family GH18 chitinase', *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 78(12), pp. 2014–2021.
- Songsiriritthigul, C., Pantoom, S., Aguda, A. H., Robinson, R. C. and Suginta, W. (2008) 'Crystal structures of *Vibrio harveyi* chitinase A complexed with chitooligosaccharides: Implications for the catalytic mechanism', *Journal of Structural Biology*, 162, pp. 491–499.
- Sørbotten, A., Horn, S. J., Eijsink, V. G. H. and Varum, K. M. (2005) 'Degradation of chitosans with chitinase B from *Serratia marcescens* - Production of chito-oligosaccharides and insight into enzyme processivity', *FEBS journal*, 272, pp. 538–549.
- Suginta, W., Songsiriritthigul, C., Kobdaj, A., Opassiri, R. and Svasti, J. (2007) 'Mutations of Trp275 and Trp397 altered the binding selectivity of *Vibrio carchariae* chitinase A', *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1770(8), pp. 1151–1160.
- Suginta, W., Vongsuwan, A., Songsiriritthigul, C., Svasti, J. and Prinz, H. (2005) 'Enzymatic properties of wild-type and active site mutants of chitinase A from *Vibrio carchariae*, as revealed by HPLC-MS', *The FEBS journal*, 272, pp. 3376–3386.
- Sugiyama, J., Boisset, C., Hashimoto, M. and Watanabe, T. (1999) 'Molecular Directionality of β -Chitin Biosynthesis', *J. Mol. Biol.*, 286, pp. 247–255.
- Suma, K. and Podile, A. R. (2013) 'Chitinase A from *Stenotrophomonas maltophilia* shows transglycosylation and antifungal activities', *Bioresource technology*. Elsevier Ltd, 133, pp. 213–220.
- Suzuki, K., Taiyoji, M., Sugawara, N., Nikaidou, N., Henrissat, B. and Watanabe, T. (1999) 'The third chitinase gene (*chiC*) of *Serratia marcescens* 2170 and the relationship of its product to other bacterial chitinases', *Biochemical Journal*, 343, pp. 587–596.
- Synstad, B., Gaseidnes, S., van Aalten, D. M. F., Vriend, G., Nielsen, J. E. and Eijsink, V. G. H. (2004) 'Mutational and computational analysis of the role of conserved residues in the active site of a family 18 chitinase', *Eur. J. Biochem*, 271, pp. 253–262.
- Taira, T., Fujiwara, M., Denhart, N., Hayashi, H., Onaga, S., Ohnuma, T., Letzel, T., Sakuda, S. and Fukamizo, T. (2010) 'Transglycosylation reaction catalyzed by a class V chitinase from cycad, *Cycas revoluta*: A study involving site-directed mutagenesis, HPLC, and real-time ESI-MS', *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1804(4), pp. 668–675.

- Taira, T., Hayashi, H., Tajiri, Y., Onaga, S., Uechi, G. I., Iwasaki, H., Ohnuma, T. and Fukamizo, T. (2009) 'A plant class V chitinase from a cycad (*Cycas revoluta*): Biochemical characterization, cDNA isolation, and posttranslational modification', *Glycobiology*, 19(12), pp. 1452–1461.
- Tanaka, T., Fujiwara, S., Nishikori, S., Fukui, T., Takagi, M. and Imanaka, T. (1999) 'A unique chitinase with dual active sites and triple substrate binding sites from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus kodakaraensis* KOD1', *Applied and Environmental Microbiology*, 65(12), pp. 5338–5344.
- Tanaka, T., Fukui, T. and Imanaka, T. (2001) 'Different cleavage specificities of the dual catalytic domains in chitinase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1', *The Journal of biological chemistry*, 276(38), pp. 35629–35635.
- Terwisscha van Scheltinga, A. C., Hennig, M. and Dijkstra, B. W. (1996) 'The 1.8 Å Resolution Structure of Hevamine, a Plant Chitinase/Lysozyme, and Analysis of the Conserved Sequence and Structure Motifs of Glycosyl Hydrolase Family 18', *J. Mol. Biol.*, 262, pp. 243–257.
- Terwisscha van Sheltinga, A. C., Kalk, K. H., Beintema, J. J. and Dijkstra, B. W. (1994) 'Crystal structures of hevamine, a plant defence protein with chitinase and lysozyme activity, and its complex with an inhibitor', *Current Biology-Structure*, 2(12), pp. 1181–1189.
- Tews, I., van Scheltinga, A. C. T., Perrakis, A., Wilson, K. S. and Dijkstra, B. W. (1997) 'Substrate-Assisted Catalysis Unifies Two Families of Chitinolytic Enzymes', *Journal of the American Chemical Society*, 119, pp. 7954–7959.
- Trivedi, V. R., Satia, M. C., Deschamps, A., Maquet, V., Shah, R. B., Zinzuwadia, P. H. and Trivedi, J. V (2016) 'Single-blind, placebo controlled randomised clinical study of chitosan for body weight reduction', *Nutrition Journal*. Nutrition Journal, 15:3.
- Tsuji, H., Nishimura, S., Inui, T., Kado, Y., Ishikawa, K., Nakamura, T. and Uegaki, K. (2010) 'Kinetic and crystallographic analyses of the catalytic domain of chitinase from *Pyrococcus furiosus* - the role of conserved residues in the active site', *FEBS Journal*, 277(12), pp. 2683–2695.
- Uchiyama, T., Katouno, F., Nikaidou, N., Nonaka, T., Sugiyama, J. and Watanabe, T. (2001) 'Roles of the Exposed Aromatic Residues in Crystalline Chitin Hydrolysis by Chitinase A from *Serratia marcescens* 2170', *Journal of Biological Chemistry*, 276(44), pp. 41343–41349.
- Ueno, H., Mori, T. and Fujinaga, T. (2001) 'Topical formulations and wound healing applications of chitosan', *Advanced Drug Delivery Reviews*, 52, pp. 105–115.
- Ueno, H., Yamada, H., Tanaka, I., Kaba, N., Matsuura, M., Okumura, M., Kadosawa, T. and Fujinaga, T. (1999) 'Accelerating effects of chitosan for healing at early phase of experimental open wound in dogs', *Biomaterials*, 20, pp. 1407–1414.
- Umekawa, M., Huang, W., Li, B., Fujita, K., Ashida, H., Wang, L. and Yamamoto, K. (2008) 'Mutants of *Mucor hiemalis* Endo-β-N-acetylglucosaminidase Show Enhanced Transglycosylation and Glycosynthase-like Activities', *The Journal of Biological Chemistry*, 283(8), pp. 4469–4479.

- Umemoto, N., Ohnuma, T., Mizuhara, M., Sato, H., Skriver, K. and Fukamizo, T. (2013) 'Introduction of a tryptophan side chain into subsite +1 enhances transglycosylation activity of a GH-18 chitinase from *Arabidopsis thaliana*, AtChiC', *Glycobiology*, 23(1), pp. 81–90.
- Umemoto, N., Ohnuma, T., Osawa, T., Numata, T. and Fukamizo, T. (2015) 'Modulation of the transglycosylation activity of plant family GH18 chitinase by removing or introducing a tryptophan side chain', *FEBS Letters*. Federation of European Biochemical Societies, 589(18), pp. 2327–2333.
- Usui, T., Hayashi, Y., Nanjo, F., Sakai, K. and Ishido, Y. (1987) 'Transglycosylation reaction of a chitinase purified from *Nocardia orientalis*', *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 923(2), pp. 302–309.
- Usui, T., Matsui, H. and Isobe, K. (1990) 'Enzymic synthesis of useful chito-oligosaccharides utilizing transglycosylation by chitinolytic enzymes in a buffer containing ammonium sulfate', *Carbohydrate Research*, 203(1), pp. 65–77.
- Vaaje-Kolstad, G., Horn, S. J., Sørli, M. and Eijsink, V. G. H. (2013) 'The chitinolytic machinery of *Serratia marcescens* - a model system for enzymatic degradation of recalcitrant polysaccharides', *The FEBS journal*, 280(13), pp. 3028–3049.
- Vaikuntapu, P. R., Mallakuntla, M. K., Das, S. N., Bhuvanachandra, B., Ramakrishna, B., Nadendla, S. R. and Podile, A. R. (2018) 'Applicability of endochitinase of *Flavobacterium johnsoniae* with transglycosylation activity in generating long-chain chitooligosaccharides', *International Journal of Biological Macromolecules*, 117, pp. 62–71.
- Vaikuntapu, P. R., Rambabu, S., Madhuprakash, J. and Podile, A. R. (2016) 'A new chitinase-D from a plant growth promoting *Serratia marcescens* GPS5 for enzymatic conversion of chitin', *Bioresource Technology*, 220, pp. 200–207.
- Val-Cid, C. (2016) *Structural-functional analysis of Lacto-N-biosidase from Bifidobacterium bifidum: A potential biocatalyst for the production of Human Milk Oligosaccharides*.
- Wang, L. X. and Huang, W. (2009) 'Enzymatic transglycosylation for glycoconjugate synthesis', *Current Opinion in Chemical Biology*, 13(5–6), pp. 592–600.
- Watanabe, T., Ariga, Y., Sato, U., Toratani, T., Hashimoto, M., Nikaidou, N., Kezuka, Y., Nonaka, T. and Sugiyama, J. (2003) 'Aromatic residues within the substrate-binding cleft of *Bacillus circulans* chitinase A1 are essential for hydrolysis of crystalline chitin', *The Biochemical Journal*, 376, pp. 237–244.
- Watanabe, T., Ishibashi, A., Ariga, Y., Hashimoto, M., Nikaidou, N., Sugiyama, J., Matsumoto, T. and Nonaka, T. (2001) 'Trp122 and Trp134 on the surface of the catalytic domain are essential for crystalline chitin hydrolysis by *Bacillus circulans* chitinase A1', *FEBS Letters*, 494, pp. 74–78.
- Watanabe, T., Kobori, K., Miyashita, K., Fujii, T., Sakai, H., Uchida, M. and Tanaka, H. (1993) 'Identification of Glutamic Acid 204 and Aspartic Acid 200 in Chitinase A1 of *Bacillus circulans* WL-12 as Essential Residues for Chitinase Activity', *The Journal of Biological Chemistry*, 268(25), pp. 18567–18572.
- Watanabe, T., Uchida, M., Kobori, K. and Tanaka, H. (1994) 'Site-directed Mutagenesis of the Asp-197 and Asp-202 Residues in Chitinase A1 of *Bacillus circulans* WL-12', *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 58(12), pp. 2283–2285.

- Whitelock, J. M. and Iozzo, R. V. (2005) 'Heparan Sulfate: A Complex Polymer Charged with Biological Activity', *Chemical Reviews*, 105(7), pp. 2745–2764.
- Xia, W., Liu, P., Zhang, J. and Chen, J. (2011) 'Biological activities of chitosan and chitooligosaccharides', *Food hydrocolloids*. Elsevier Ltd, 25, pp. 170–179.
- Yamamoto, K. (2013) 'Recent advances in glycochemistry for glycoconjugate synthesis using microbial endoglycosidases', *Biotechnology Letters*, 35(11), pp. 1733–1743.
- Yang, Q. and Wang, L. (2017) 'Chemoenzymatic glycan remodeling of natural and recombinant glycoproteins', *Methods Enzymol.*, 597, pp. 265–281.
- Yoon, H. J., Moon, M. E., Park, H. S., Im, S. Y. and Kim, Y. H. (2007) 'Chitosan oligosaccharide (COS) inhibits LPS-induced inflammatory effects in RAW 264.7 macrophage cells', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 358, pp. 954–959.
- Yousef, M., Pichyangkura, R., Soodvilai, S., Chatsudthipong, V. and Muanprasat, C. (2012) 'Chitosan oligosaccharide as potential therapy of inflammatory bowel disease: Therapeutic efficacy and possible mechanisms of action', *Pharmacological Research*, 66, pp. 66–79.
- Zakariassen, H., Aam, B. B., Horn, S. J., Varum, K. M., Sorlie, M. and Eijsink, V. G. H. (2009) 'Aromatic Residues in the Catalytic Center of Chitinase A from *Serratia marcescens* Affect Processivity, Enzyme Activity, and Biomass Converting Efficiency', *The Journal of Biological Chemistry*, 284(16), pp. 10610–10617.
- Zakariassen, H., Hansen, M. C., Jøranli, M., Eijsink, V. G. H. and Sørli, M. (2011) 'Mutational Effects on Transglycosylating Activity of Family 18 Chitinases and Construction of a Hypertransglycosylating Mutant', *Biochemistry*, 50, pp. 5693–5703.
- Zhang, P., Liu, W., Peng, Y., Han, B. and Yang, Y. (2014) 'Toll like receptor 4 (TLR4) mediates the stimulating activities of chitosan oligosaccharide on macrophages', *International Immunopharmacology*, 23, pp. 254–261.
- Zikakis, J. P. (2012) *Chitin, Chitosan and Related Enzymes*. Burlington, M.A.: Elsevier Science.

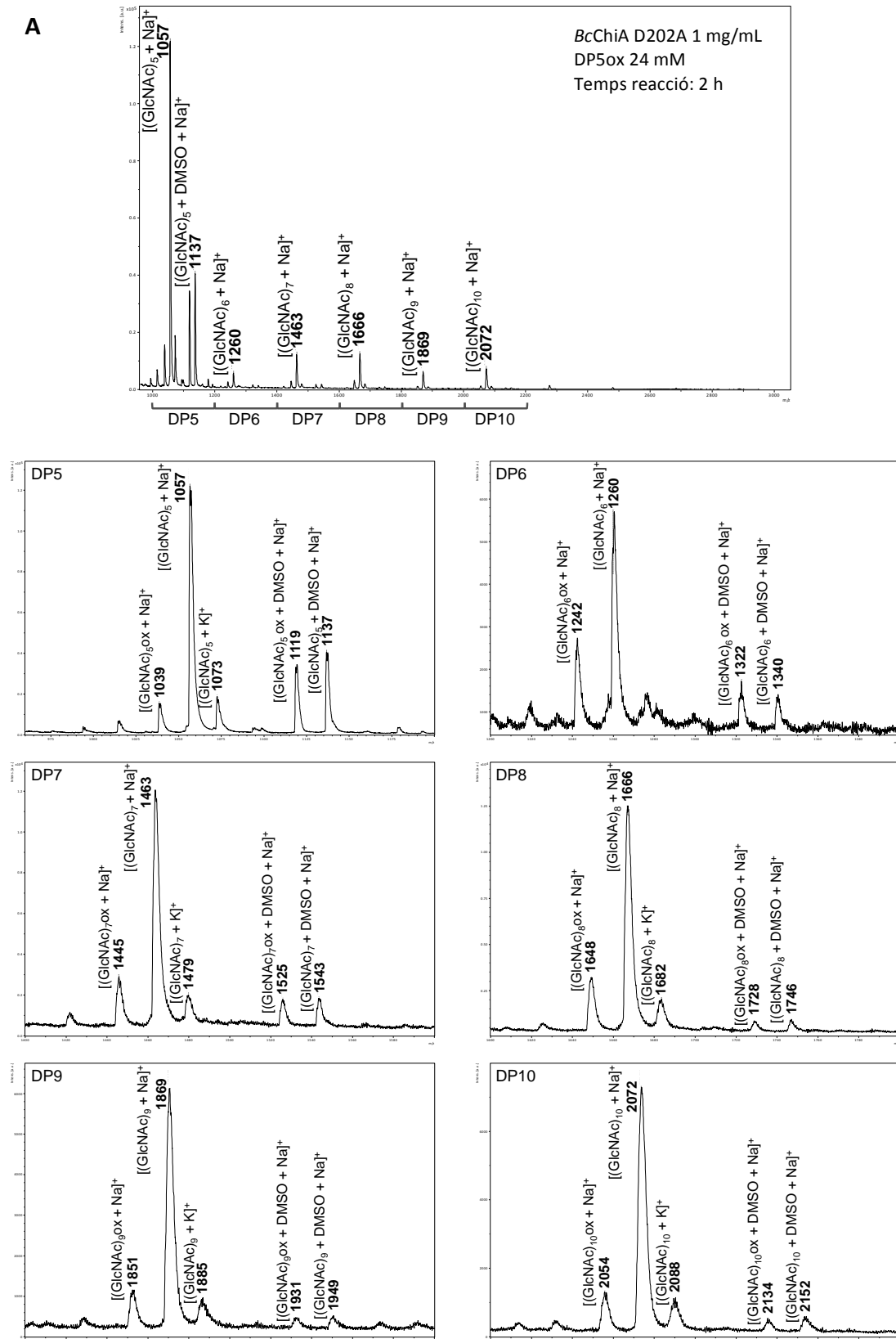
ANNEXES

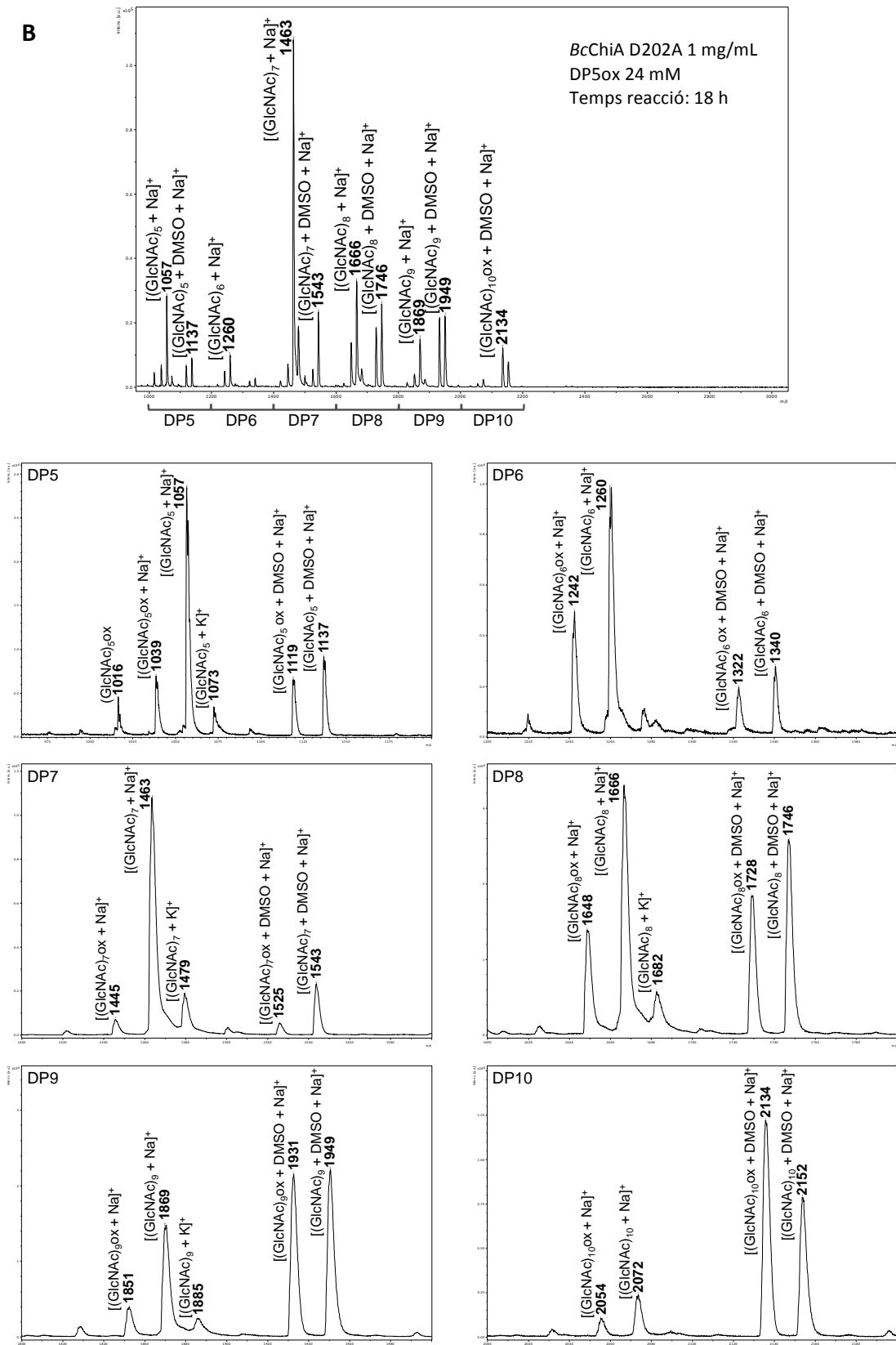
Annexes

Annex 1. Primera generació glicosintasa	227
A1.1. Espectre de MALDI-TOF-MS dels productes del precipitat de les reaccions catalitzades per <i>BcChiA</i> D202A amb (GlcNAc) ₅ -ox.	227
A1.2. Espectre de MALDI-TOF-MS dels productes del precipitat de les reaccions catalitzades per <i>LpChiA</i> D316A amb (GlcNAc) ₅ -ox.	229
A1.3. Espectre de MALDI-TOF-MS dels productes del precipitat de les reaccions catalitzades per <i>SmChiC</i> D139A amb (GlcNAc) ₅ -ox.	231
A1.4. Espectre de MALDI-TOF-MS dels productes del precipitat de les reaccions catalitzades per <i>SpChiD</i> D151A amb (GlcNAc) ₅ -ox.	233
A1.5. Espectre de MALDI-TOF-MS dels productes del precipitat de les reaccions catalitzades per <i>PfChiB</i> D524A amb (GlcNAc) ₅ -ox.	235
A1.6. Espectre de MALDI-TOF-MS dels productes del precipitat de les reaccions catalitzades per <i>TkChiA</i> D1022A amb (GlcNAc) ₅ -ox.	237
Annex 2. Segona generació glicosintasa	239
A2.1. Espectre de MALDI-TOF-MS dels productes del precipitat de les reaccions catalitzades per <i>SpChiD</i> D149A/D151A amb (GlcNAc) ₅ -ox.	239
A2.2. Espectre de MALDI-TOF-MS dels productes del precipitat de les reaccions catalitzades per <i>SpChiD</i> S110G/D151A amb (GlcNAc) ₅ -ox.	241
A2.3. Espectre de MALDI-TOF-MS dels productes del precipitat de les reaccions catalitzades per <i>SpChiD</i> G113S/D151A amb (GlcNAc) ₅ -ox.	243
A2.4. Espectre de MALDI-TOF-MS dels productes del precipitat de les reaccions catalitzades per <i>SpChiD</i> F119A/D151A amb (GlcNAc) ₅ -ox.	245
Annex 3. Tercera generació glicosintasa.....	247
A3.1. Espectre de MALDI-TOF-MS dels productes del precipitat de les reaccions catalitzades per <i>SpChiD</i> Y28A/D149A/D151A amb (GlcNAc) ₅ -ox.	247
A3.2. Espectre de MALDI-TOF-MS dels productes del precipitat de les reaccions catalitzades per <i>SpChiD</i> S110G/D149A/D151A amb (GlcNAc) ₅ -ox.	249
A3.3. Espectre de MALDI-TOF-MS dels productes del precipitat de les reaccions catalitzades per <i>SpChiD</i> D149A/D151A/Y154W amb (GlcNAc) ₅ -ox.	251
A3.4. Espectre de MALDI-TOF-MS dels productes del precipitat de les reaccions catalitzades per <i>SpChiD</i> D149A/D151A/G195W amb (GlcNAc) ₅ -ox.	253
A3.5. Espectre de MALDI-TOF-MS dels productes del precipitat de les reaccions catalitzades per <i>SpChiD</i> D149A/D151A/Y226W amb (GlcNAc) ₅ -ox.	255
A3.6. Espectre de MALDI-TOF-MS dels productes del precipitat de les reaccions catalitzades per <i>SpChiD</i> D149A/D151A/W241A amb (GlcNAc) ₅ -ox.	257
A3.7. Espectre de MALDI-TOF-MS dels productes del precipitat de les reaccions catalitzades per <i>SpChiD</i> D149A/D151A/W395A amb (GlcNAc) ₅ -ox.	259
Annex 4. Article	261

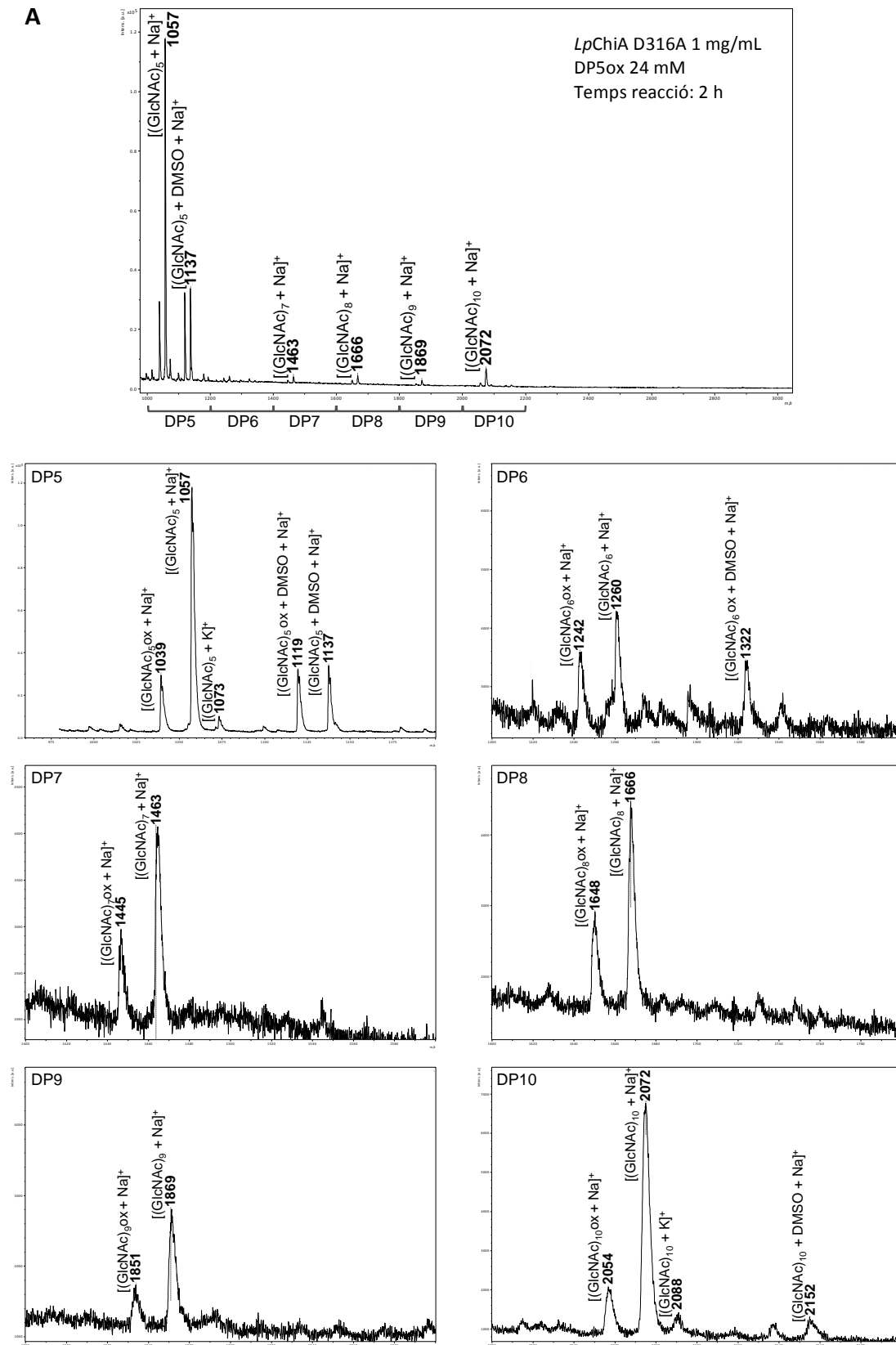
Annex 1. Primera generació glicosintasa

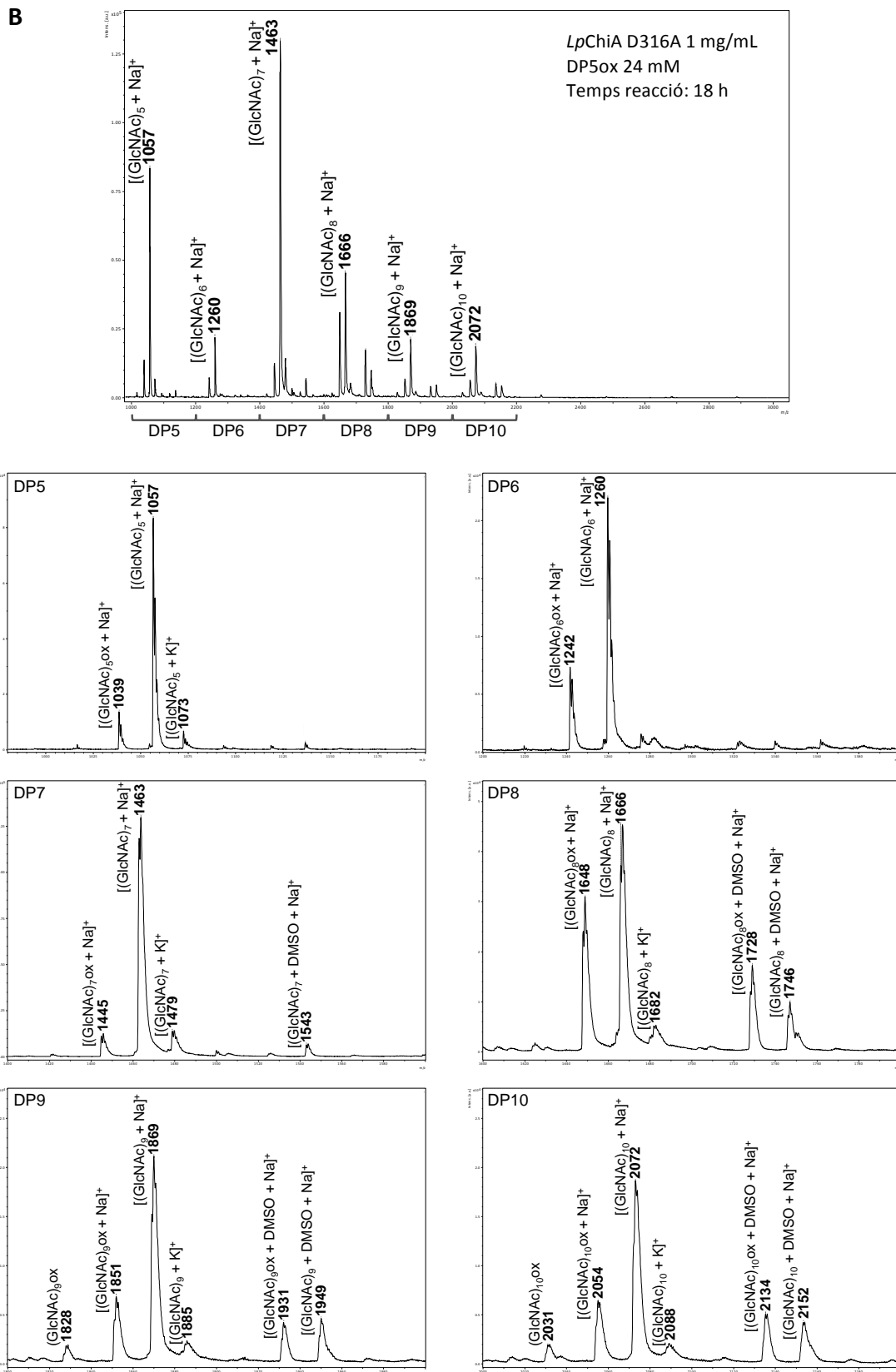
A1.1. Espectre de MALDI-TOF-MS dels productes del precipitat de les reaccions catalitzades per BcChiA D202A amb (GlcNAc)₅-ox. **A.** 2 hores de reacció, **B.** 18 hores de reacció.



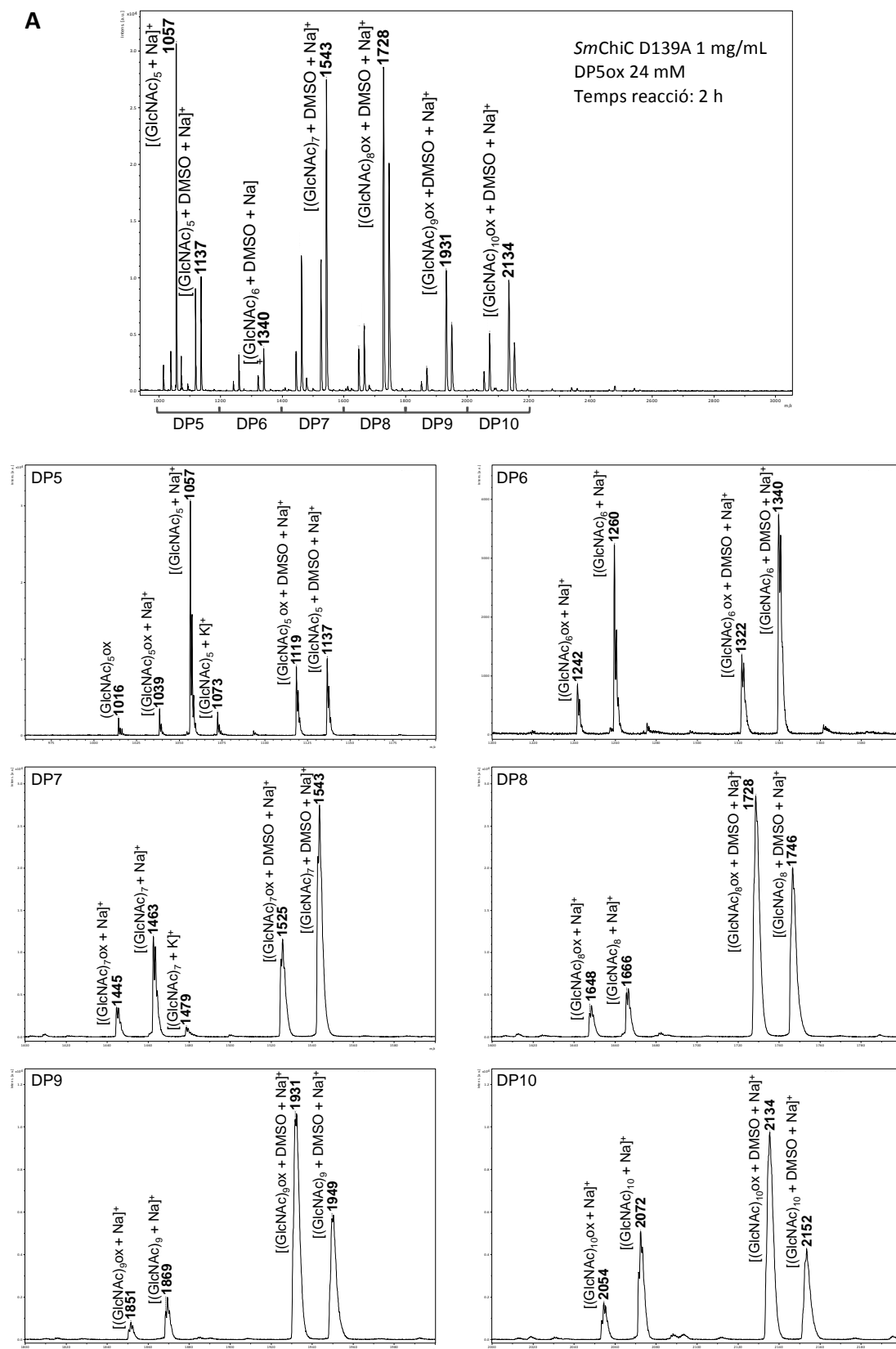


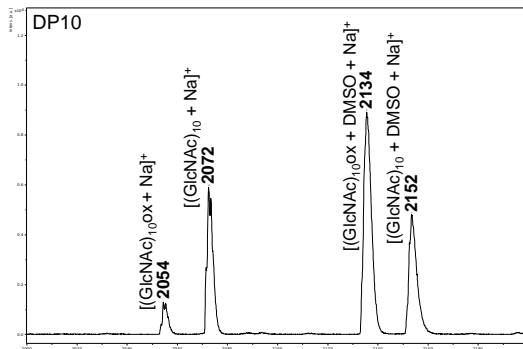
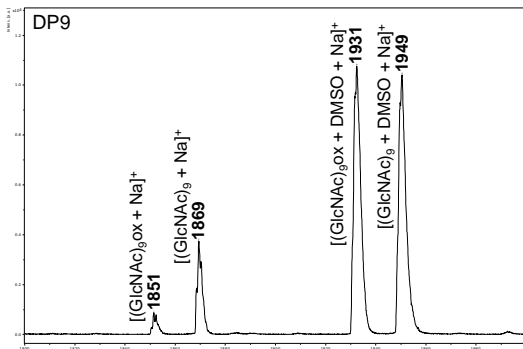
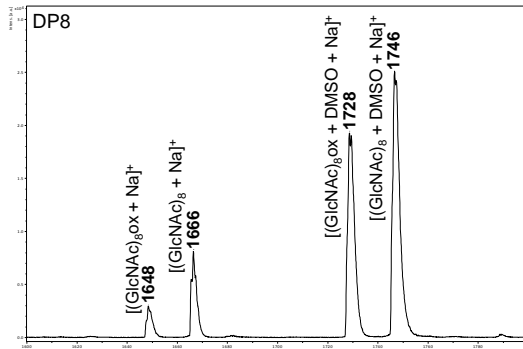
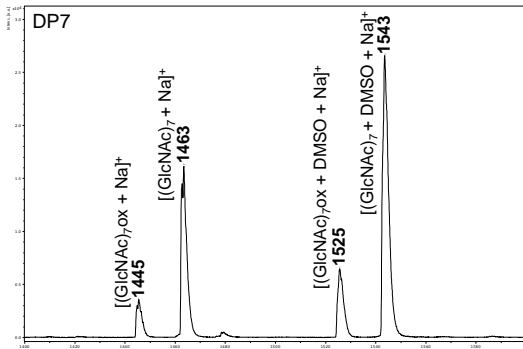
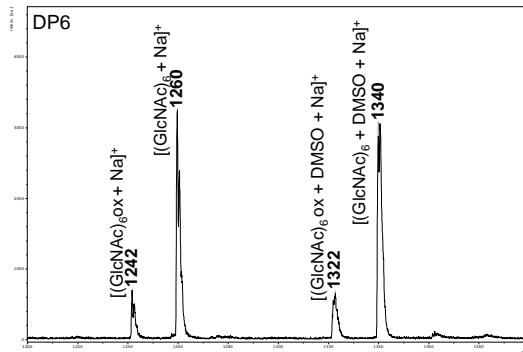
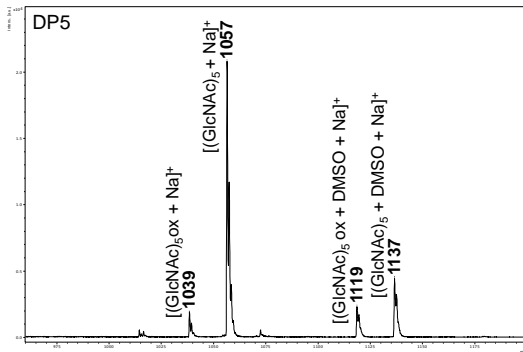
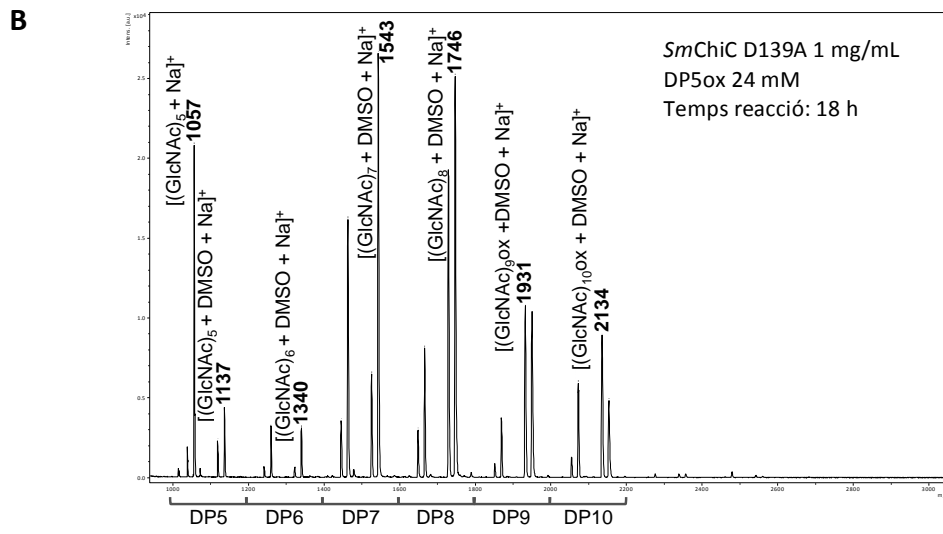
A1.2. Espectre de MALDI-TOF-MS dels productes del precipitat de les reaccions catalitzades per *LpChiA* D316A amb (GlcNAc)₅-ox. **A.** 2 hores de reacció, **B.** 18 hores de reacció.



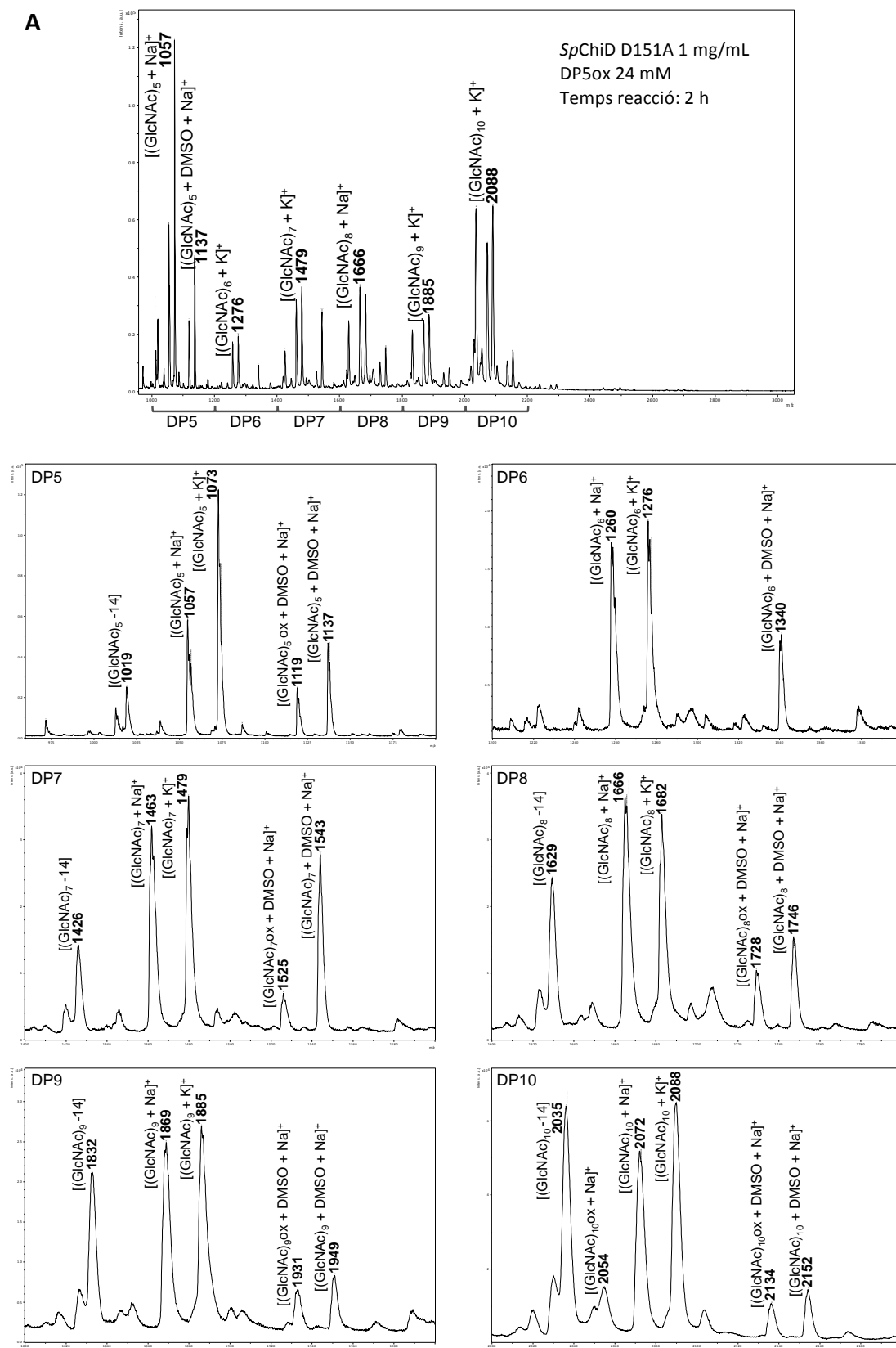


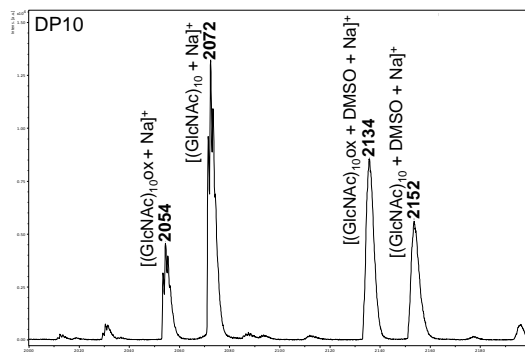
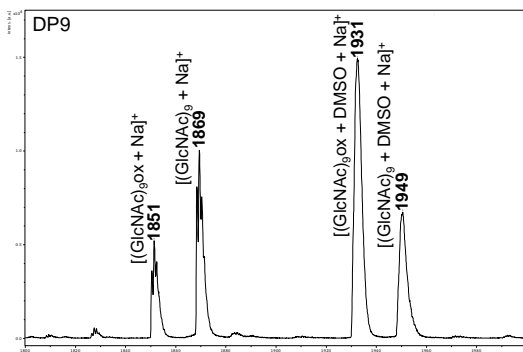
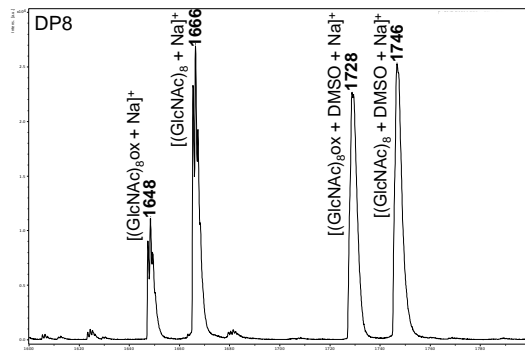
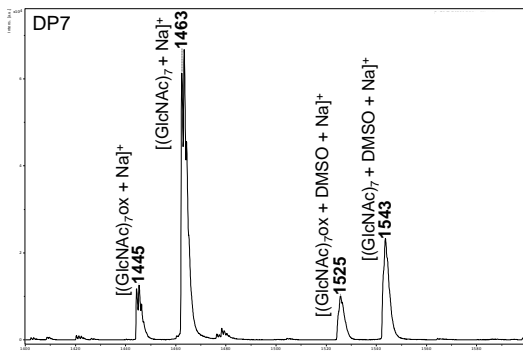
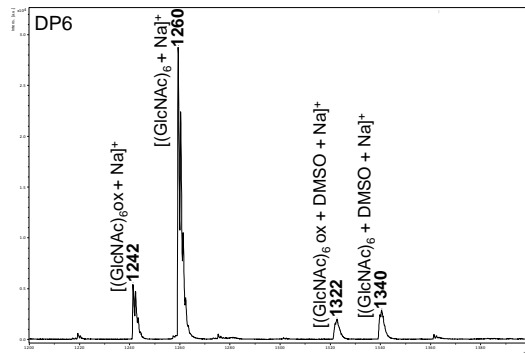
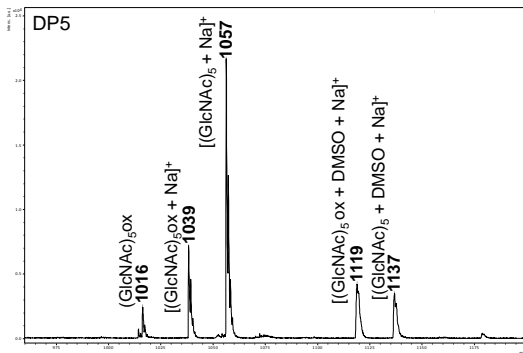
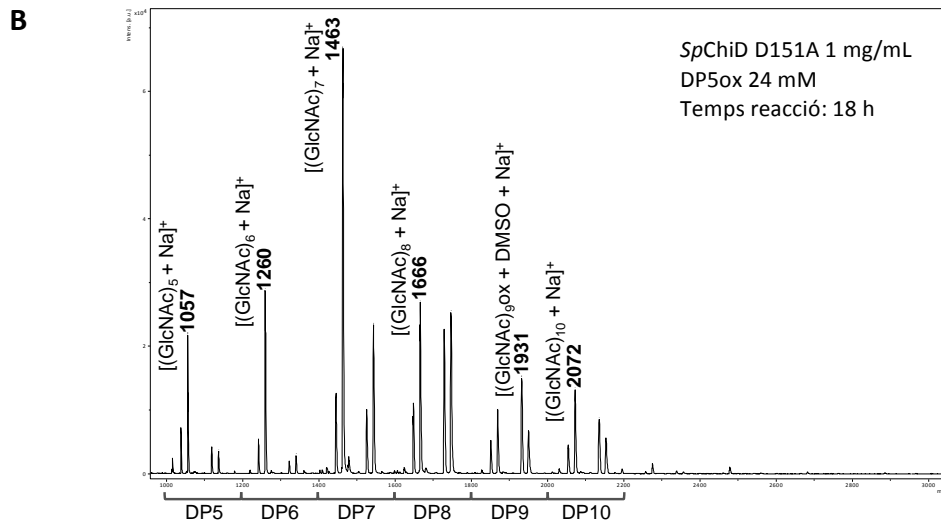
A1.3. Espectre de MALDI-TOF-MS dels productes del precipitat de les reaccions catalitzades per *SmChIC* D139A amb (GlcNAc)₅-ox. **A.** 2 hores de reacció, **B.** 18 hores de reacció.



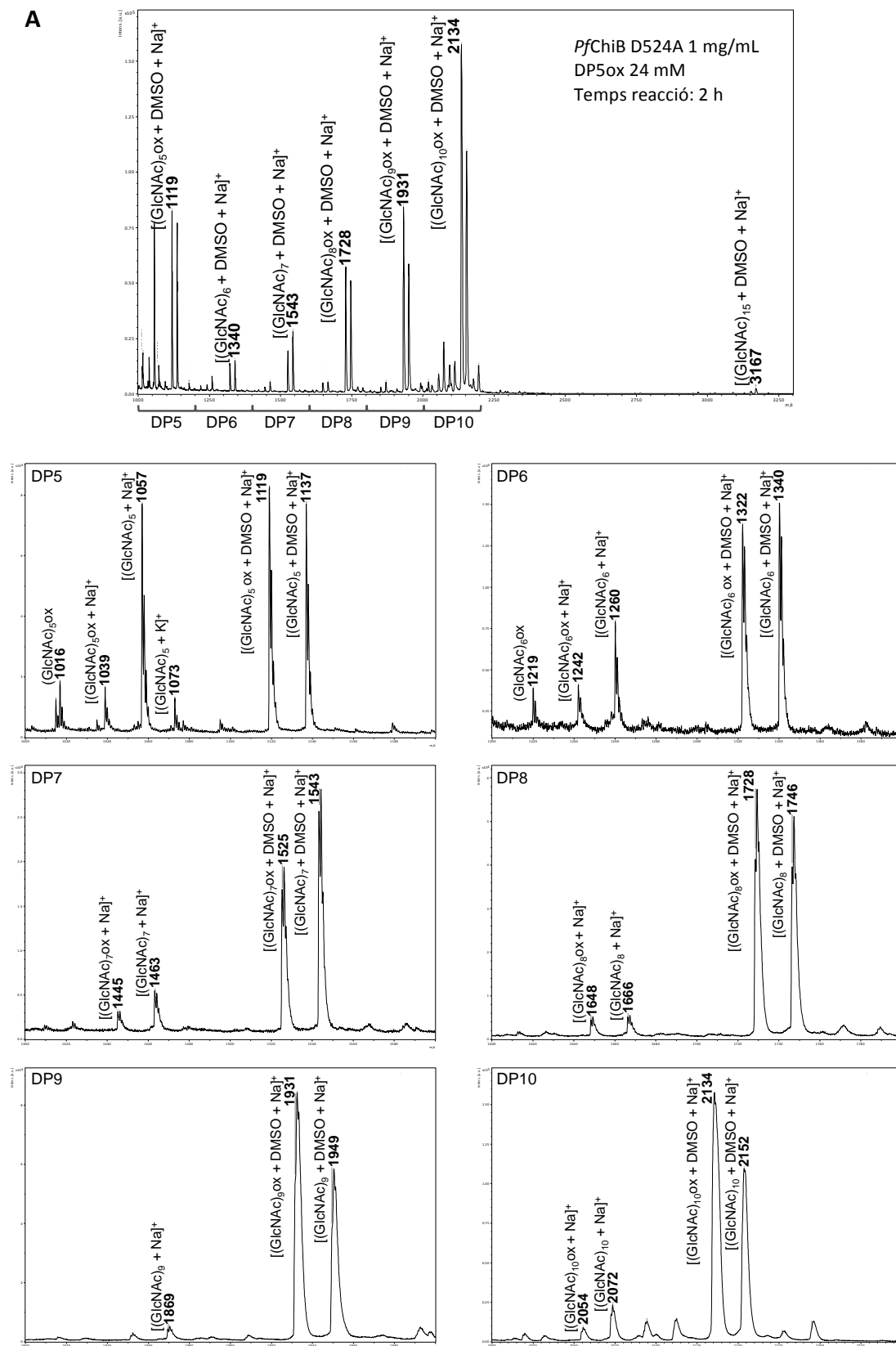


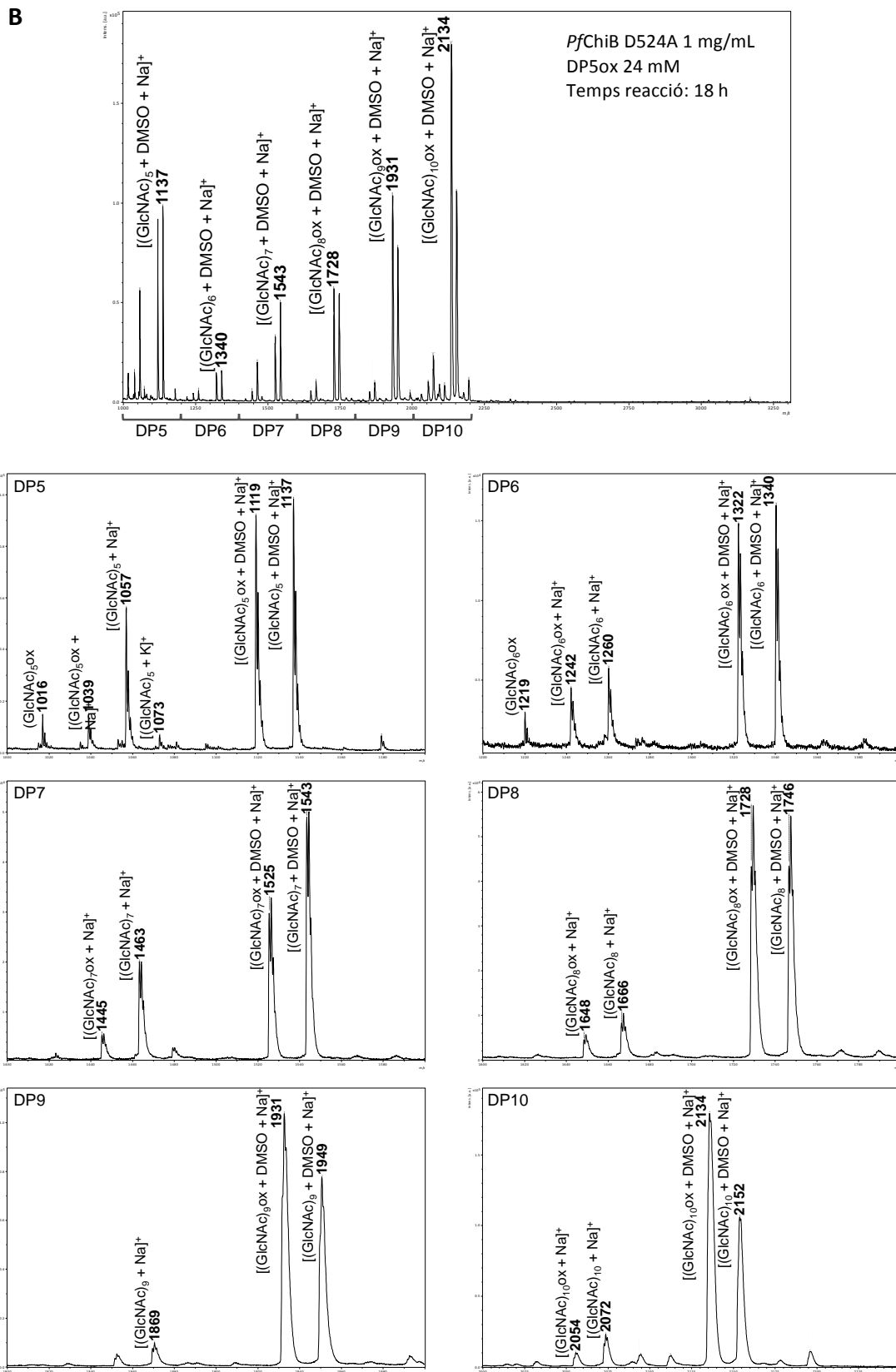
A1.4. Espectre de MALDI-TOF-MS dels productes del precipitat de les reaccions catalitzades per SpChiD D151A amb (GlcNAc)₅-ox. **A.** 2 hores de reacció, **B.** 18 hores de reacció.



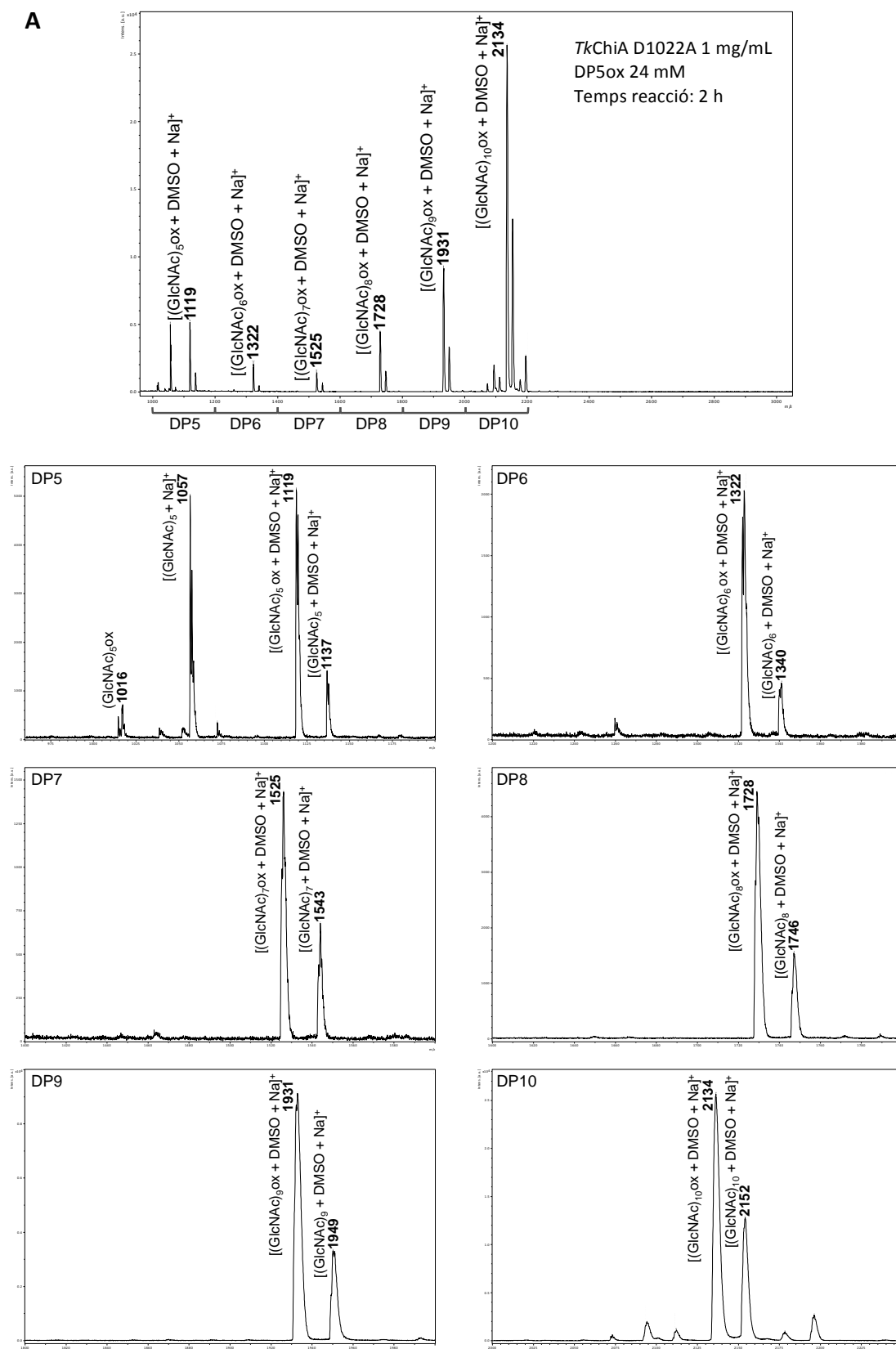


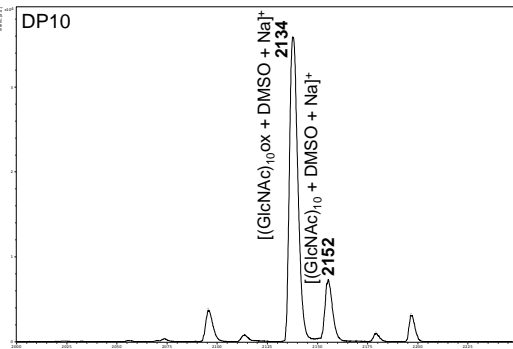
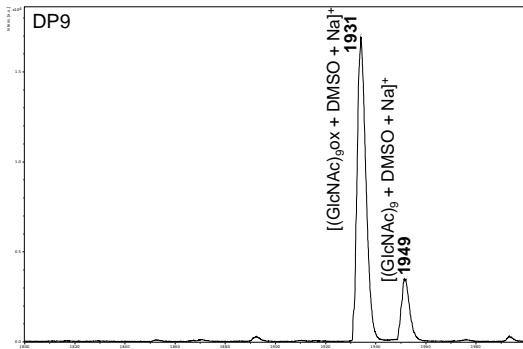
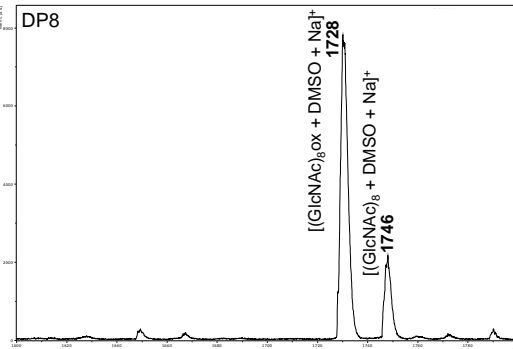
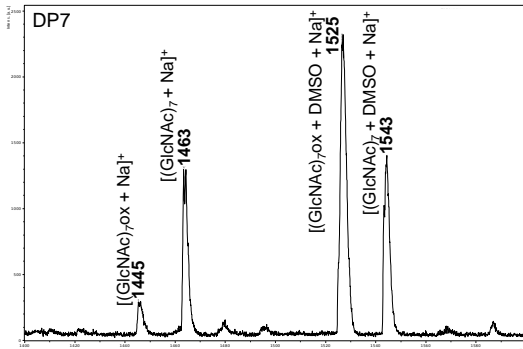
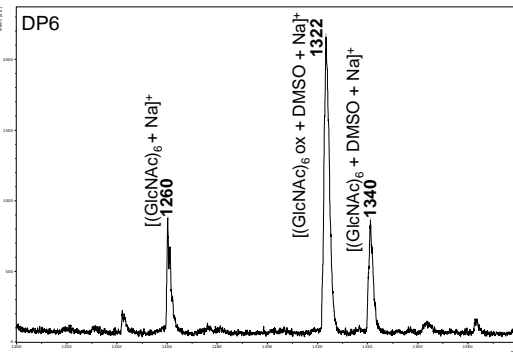
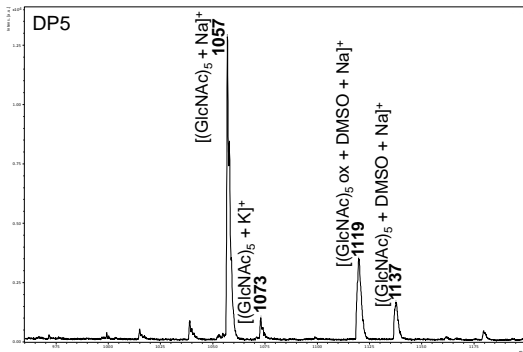
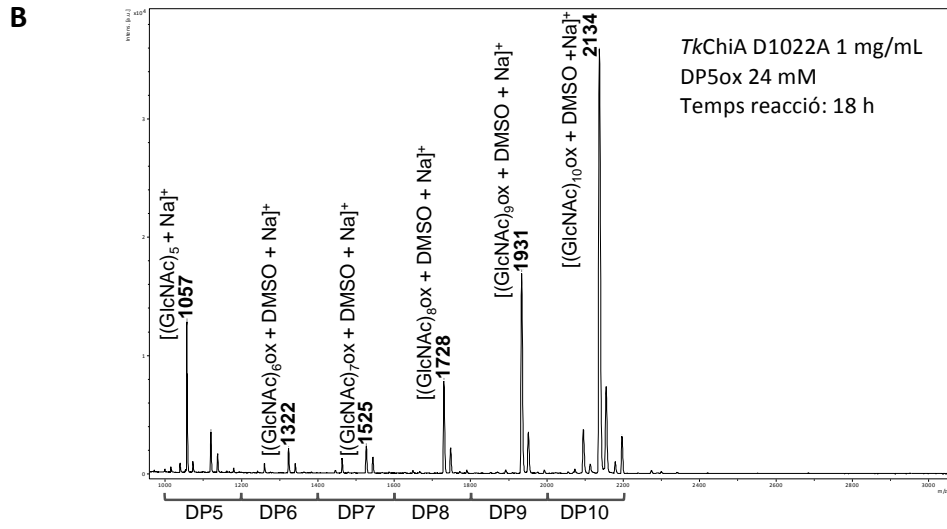
A1.5. Espectre de MALDI-TOF-MS dels productes del precipitat de les reaccions catalitzades per *PfChiB* D524A amb (GlcNAc)₅-ox. **A.** 2 hores de reacció, **B.** 18 hores de reacció.





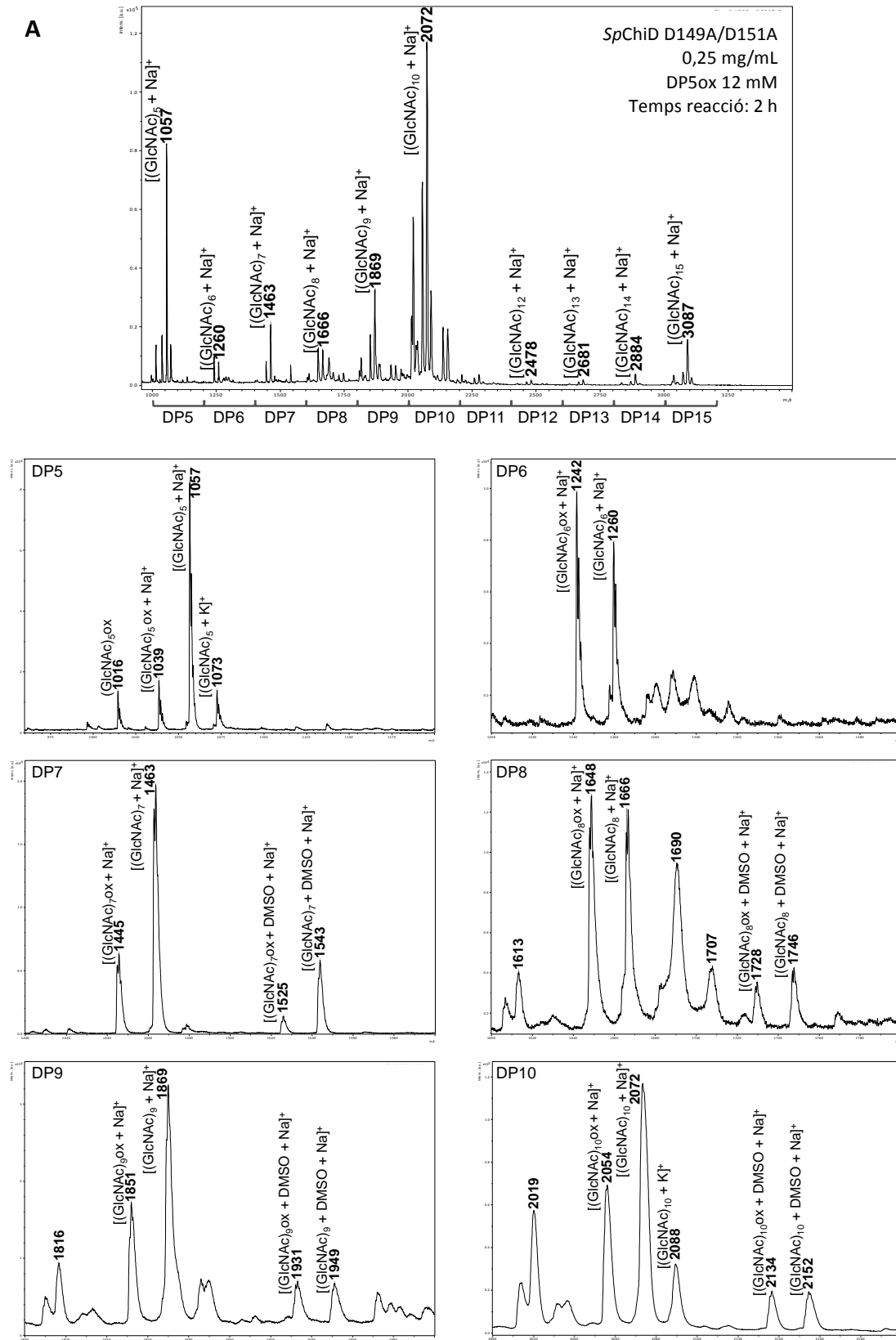
A1.6. Espectre de MALDI-TOF-MS dels productes del precipitat de les reaccions catalitzades per TkChiA D1022A amb (GlcNAc)₅-ox. **A.** 2 hores de reacció, **B.** 18 hores de reacció.

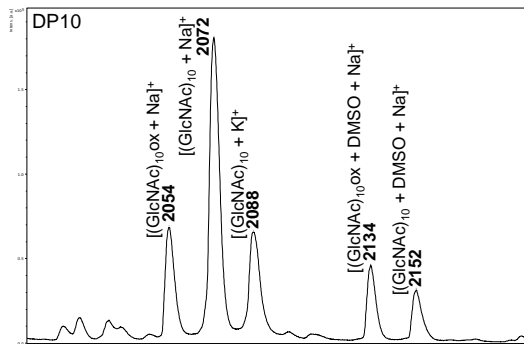
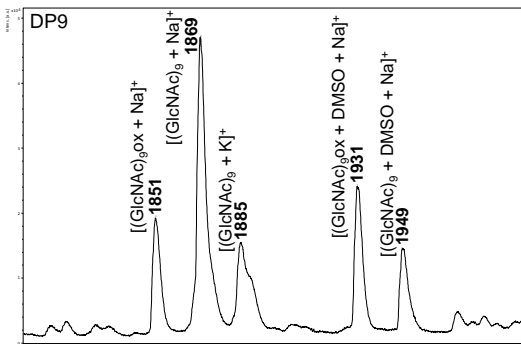
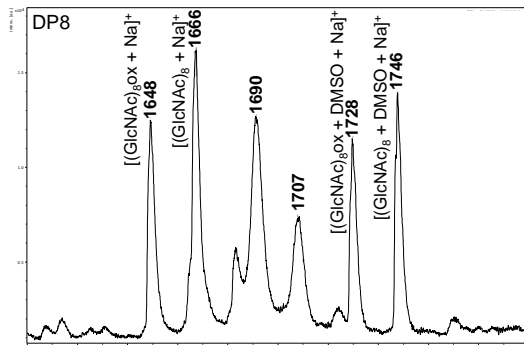
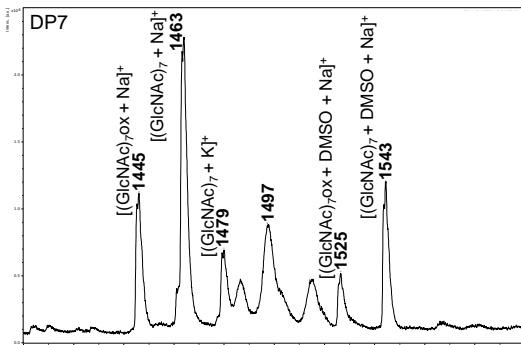
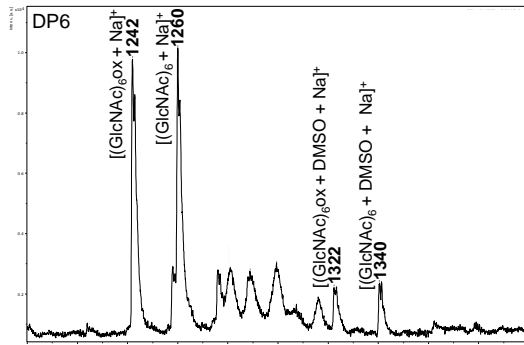
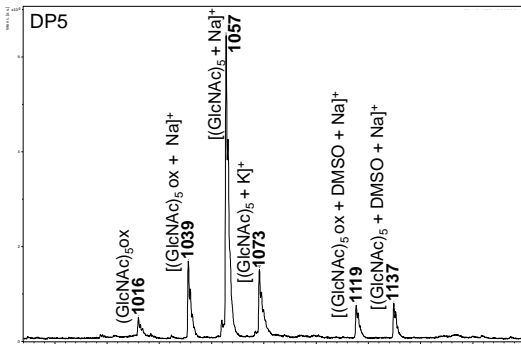
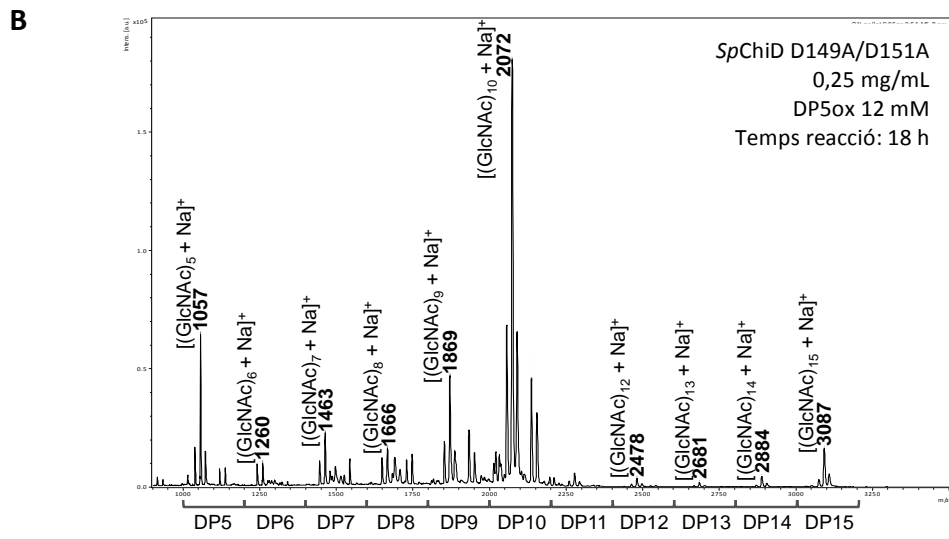




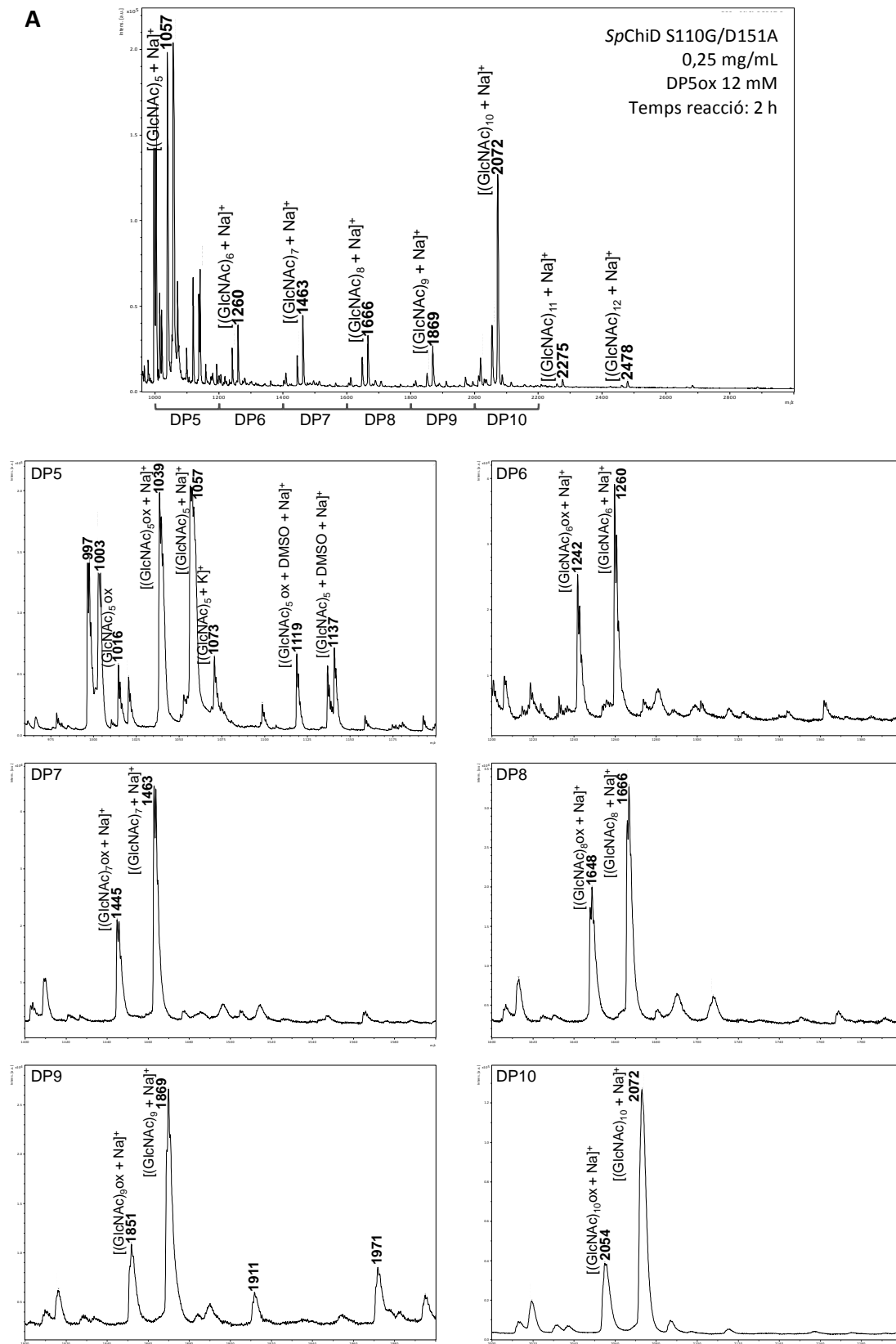
Annex 2. Segona generació glicosintasa

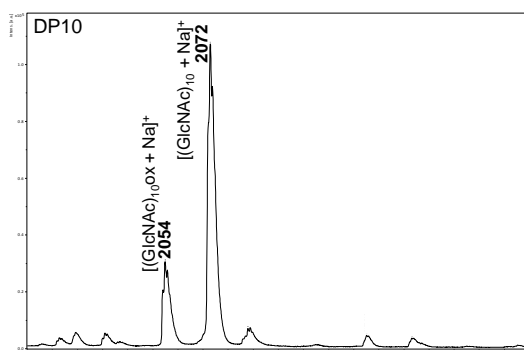
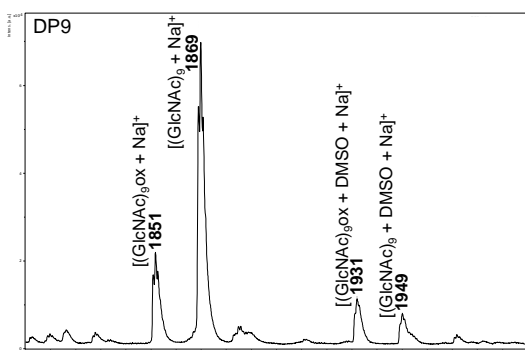
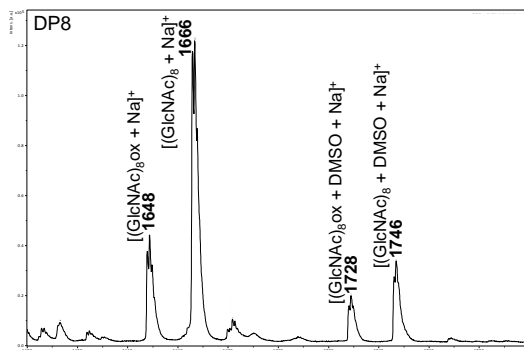
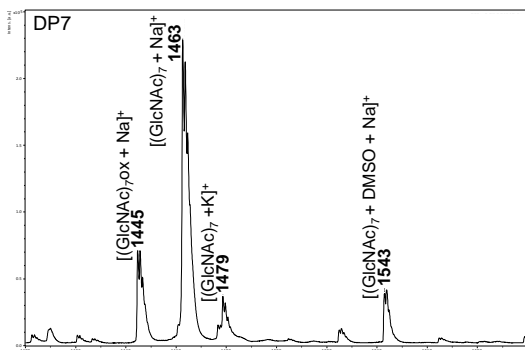
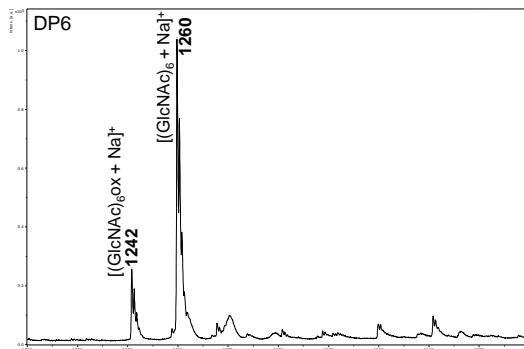
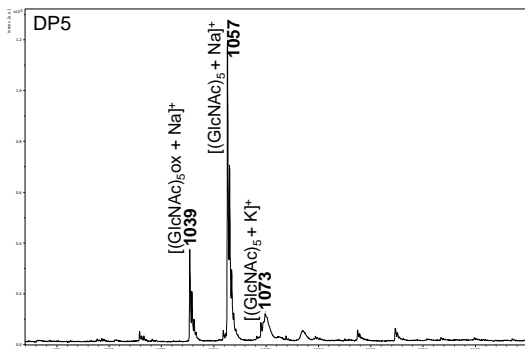
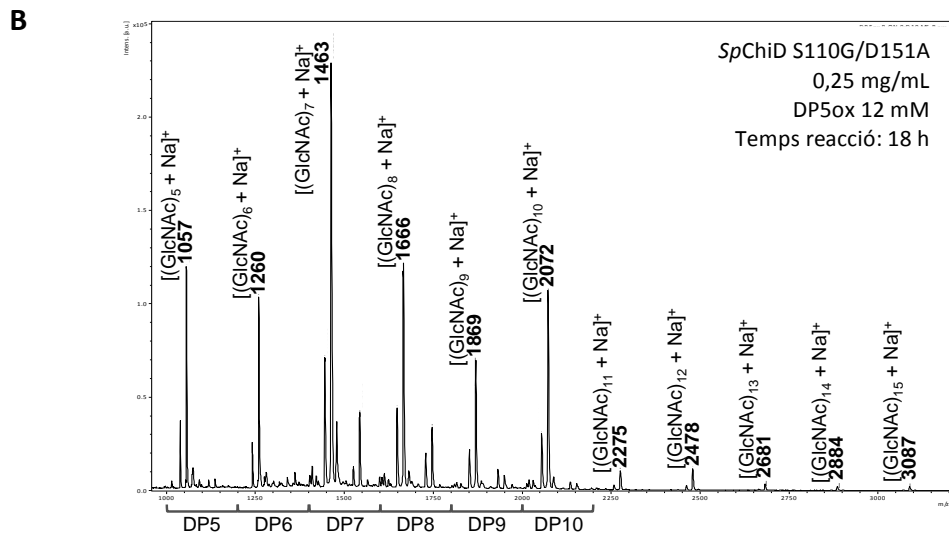
A2.1. Espectre de MALDI-TOF-MS dels productes del precipitat de les reaccions catalitzades per SpChiD D149A/D151A amb (GlcNAc)₅-ox. **A.** 2 hores de reacció, **B.** 18 hores de reacció.



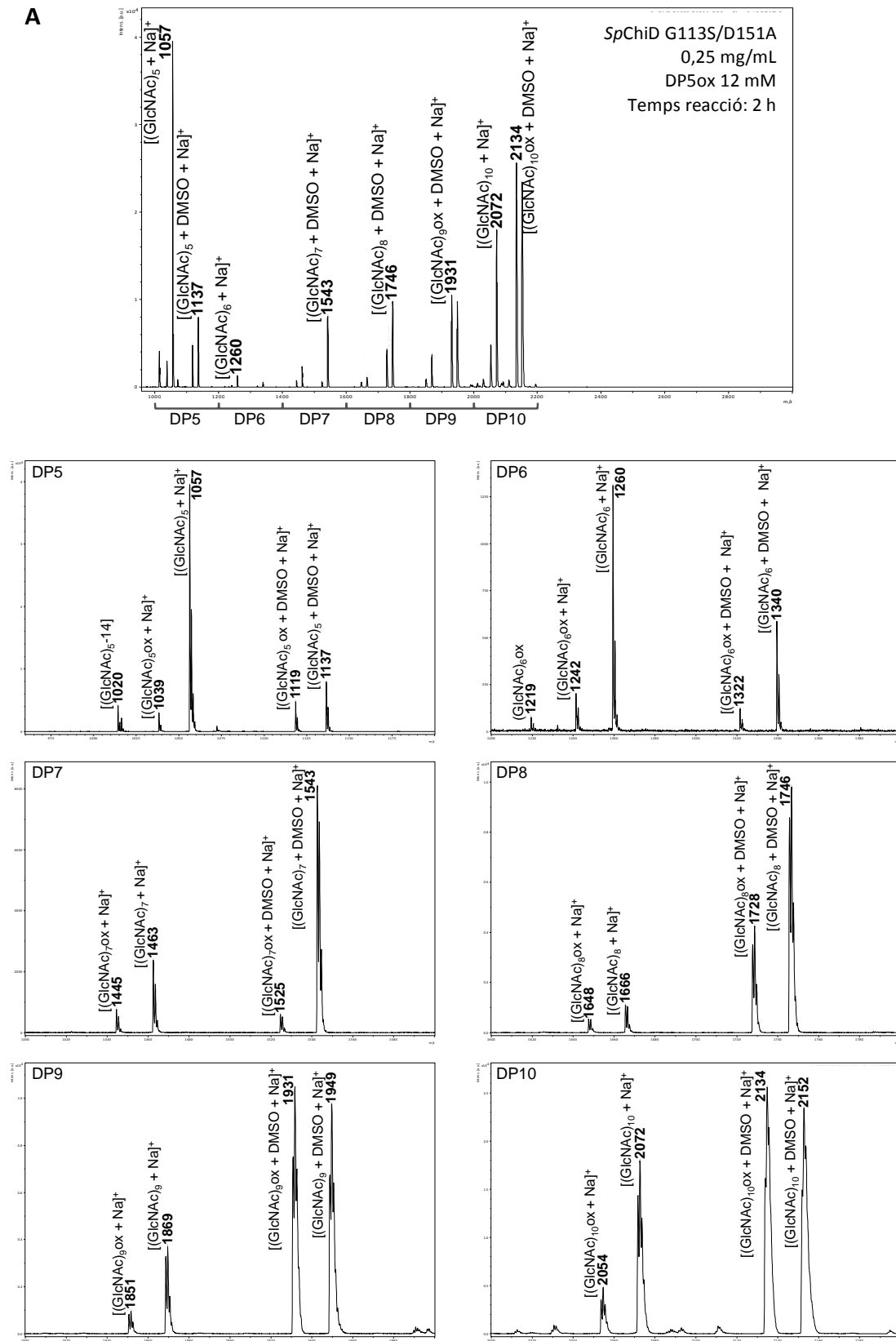


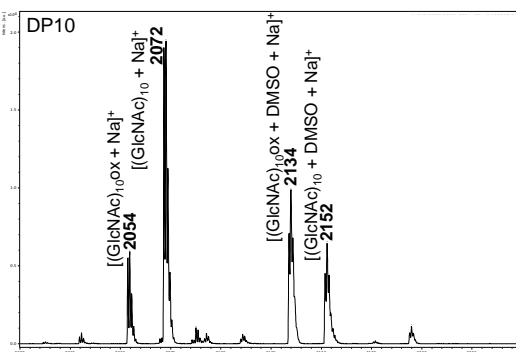
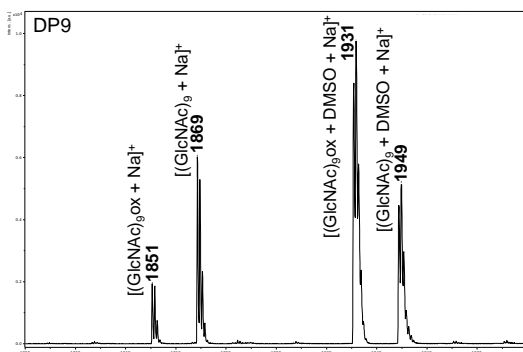
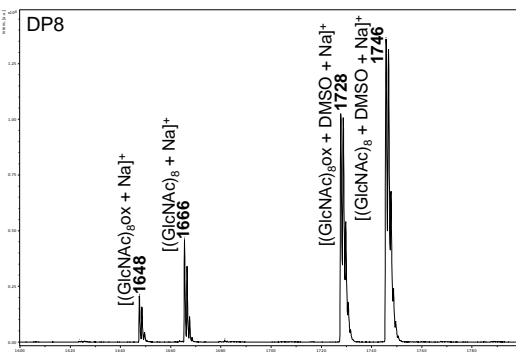
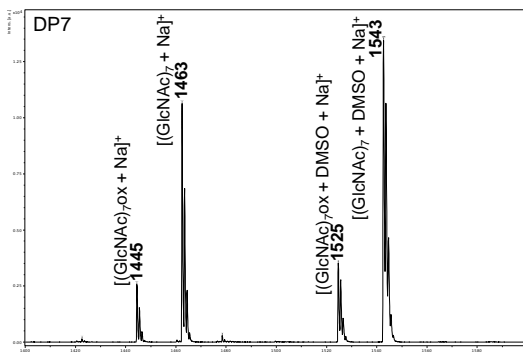
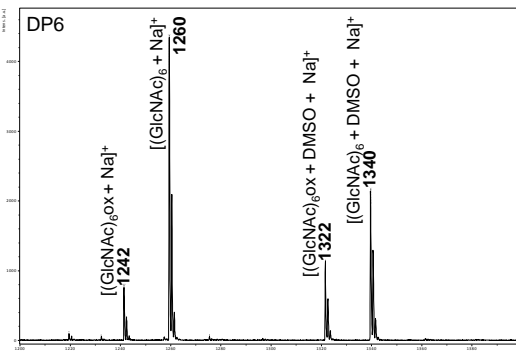
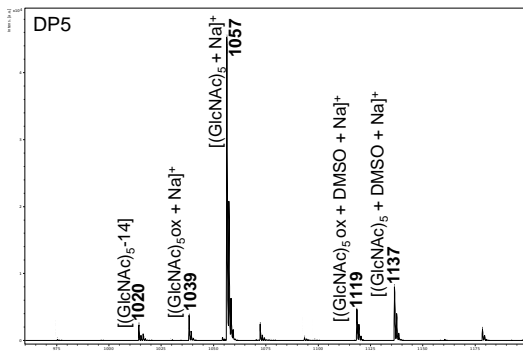
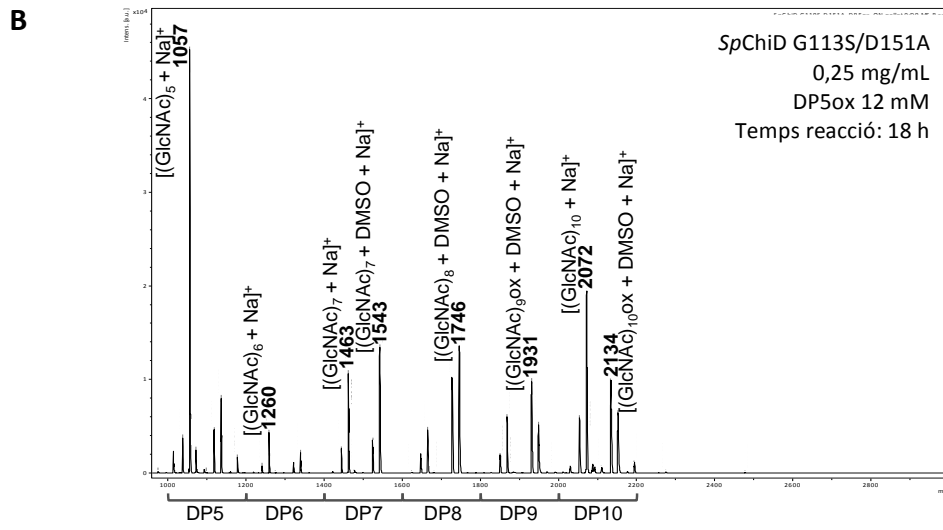
A2.2. Espectre de MALDI-TOF-MS dels productes del precipitat de les reaccions catalitzades per SpChiD S110G/D151A amb (GlcNAc)₅-ox. **A.** 2 hores de reacció, **B.** 18 hores de reacció.



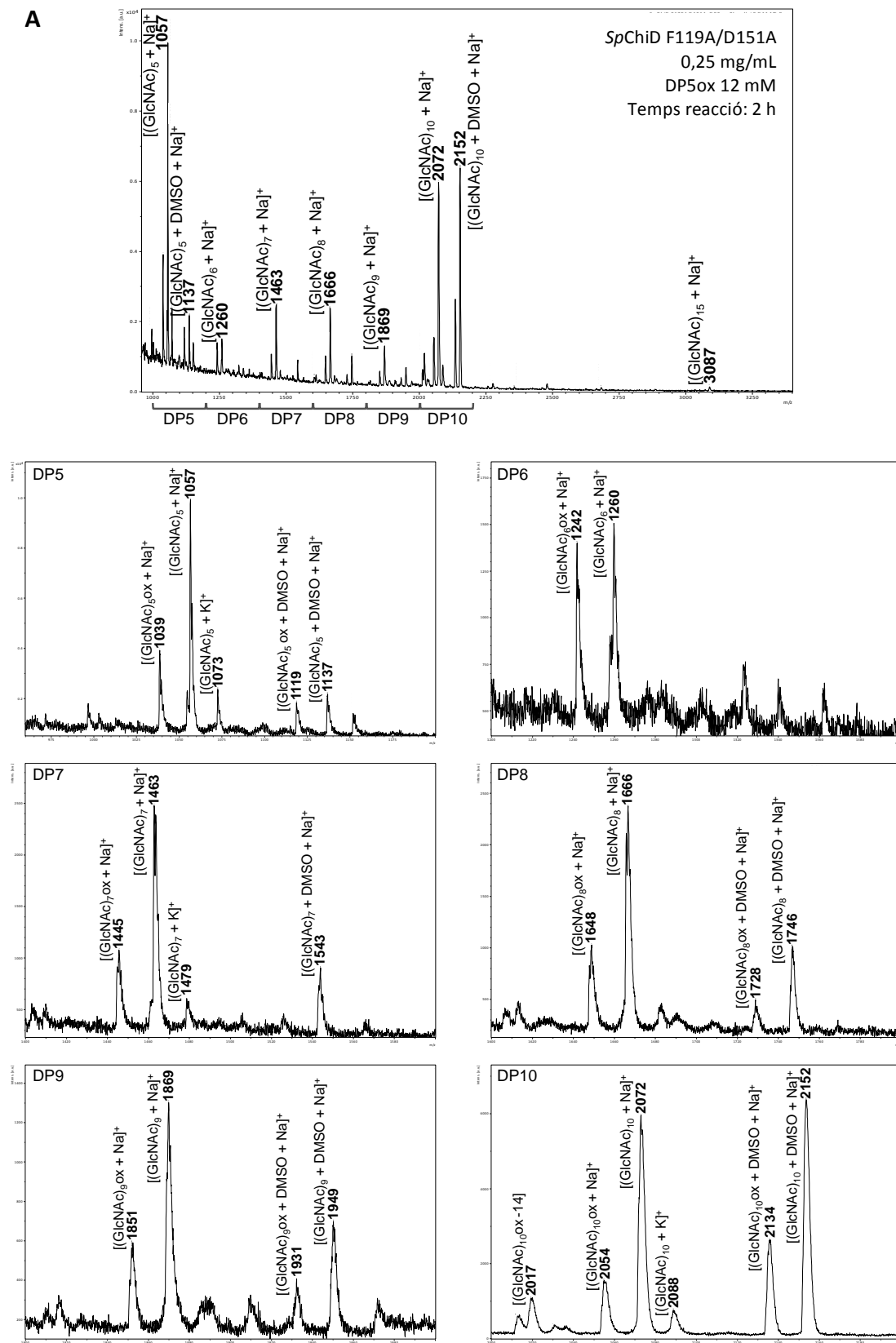


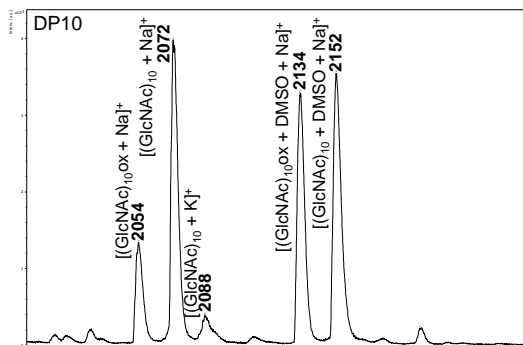
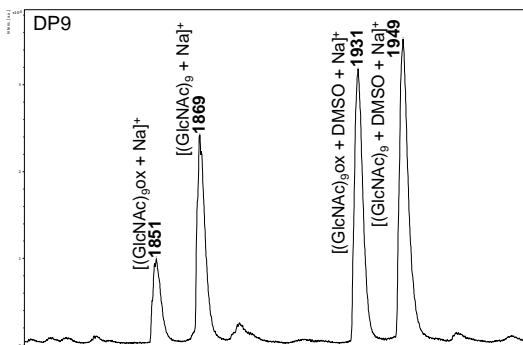
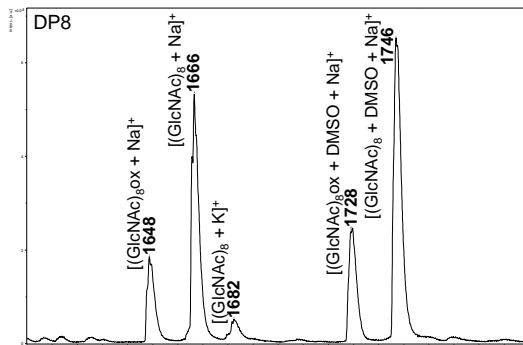
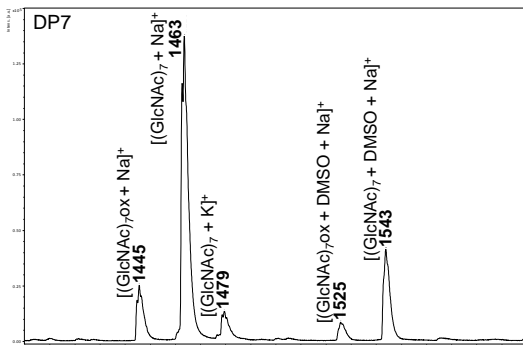
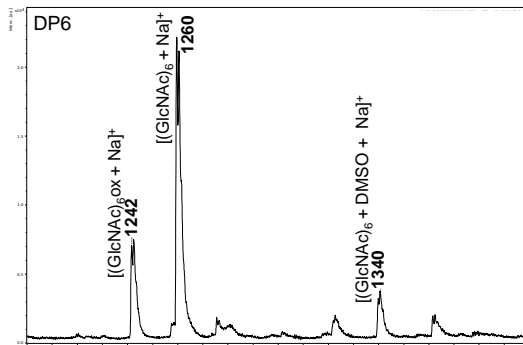
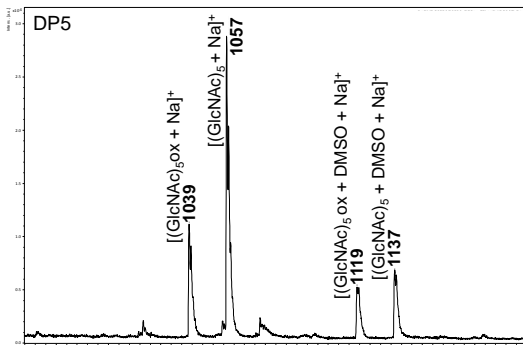
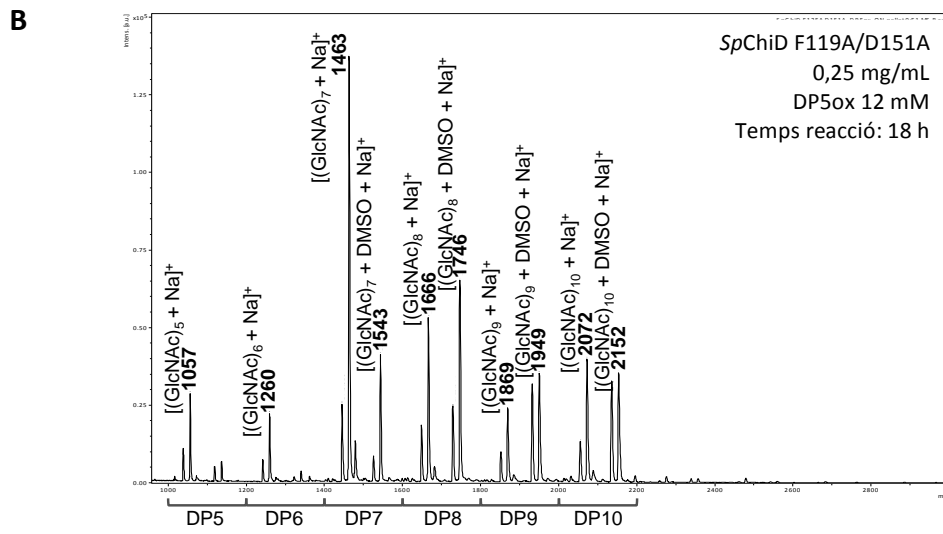
A2.3. Espectre de MALDI-TOF-MS dels productes del precipitat de les reaccions catalitzades per SpChiD G113S/D151A amb (GlcNAc)₅-ox. **A.** 2 hores de reacció, **B.** 18 hores de reacció.





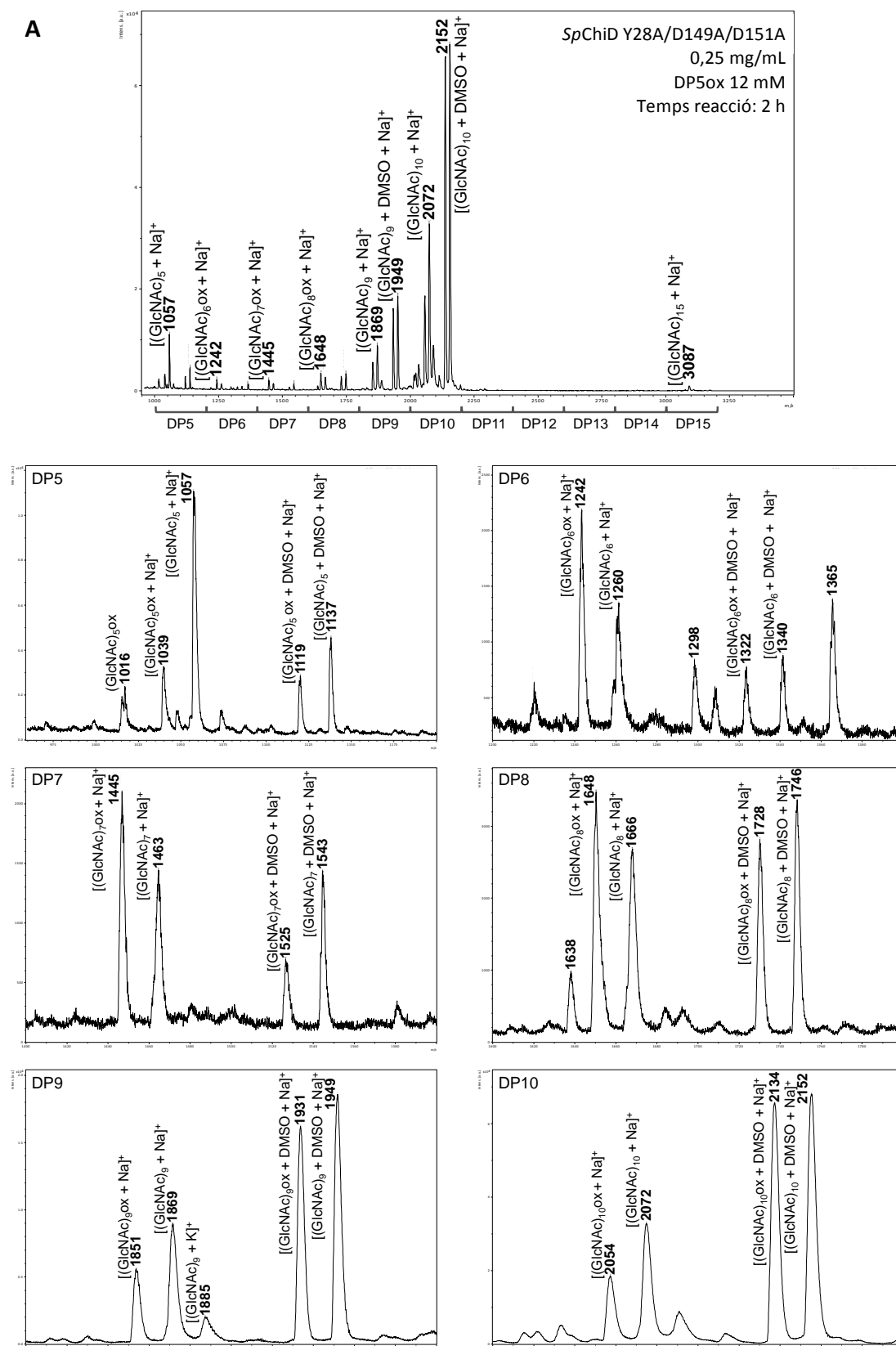
A2.4. Espectre de MALDI-TOF-MS dels productes del precipitat de les reaccions catalitzades per SpChiD F119A/D151A amb (GlcNAc)₅-ox. **A.** 2 hores de reacció, **B.** 18 hores de reacció.

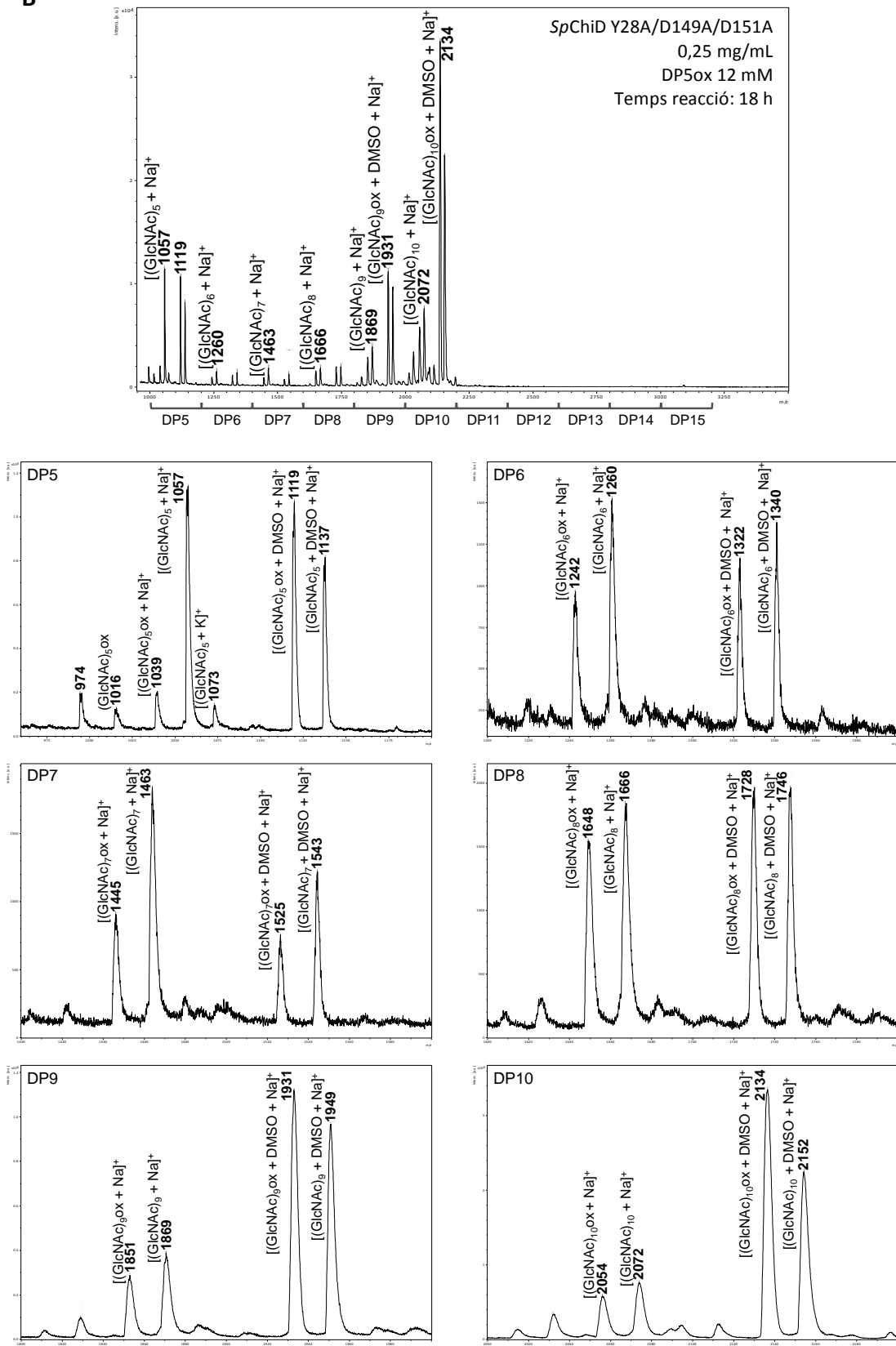




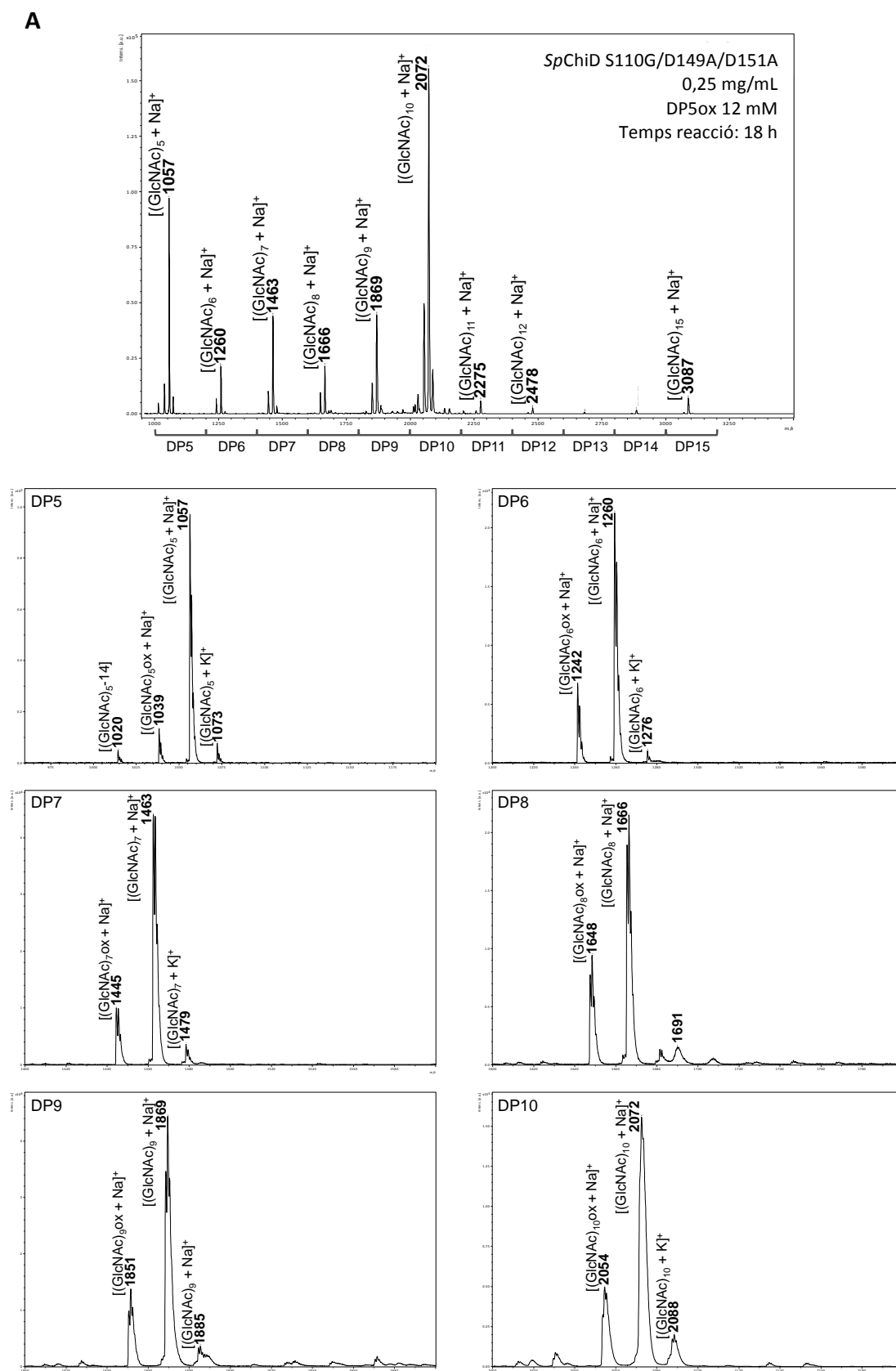
Annex 3. Tercera generació glicosintasa

A3.1. Espectre de MALDI-TOF-MS dels productes del precipitat de les reaccions catalitzades per SpChiD Y28A/D149A/D151A amb (GlcNAc)₅-ox. **A.** 2 hores de reacció, **B.** 18 hores de reacció.

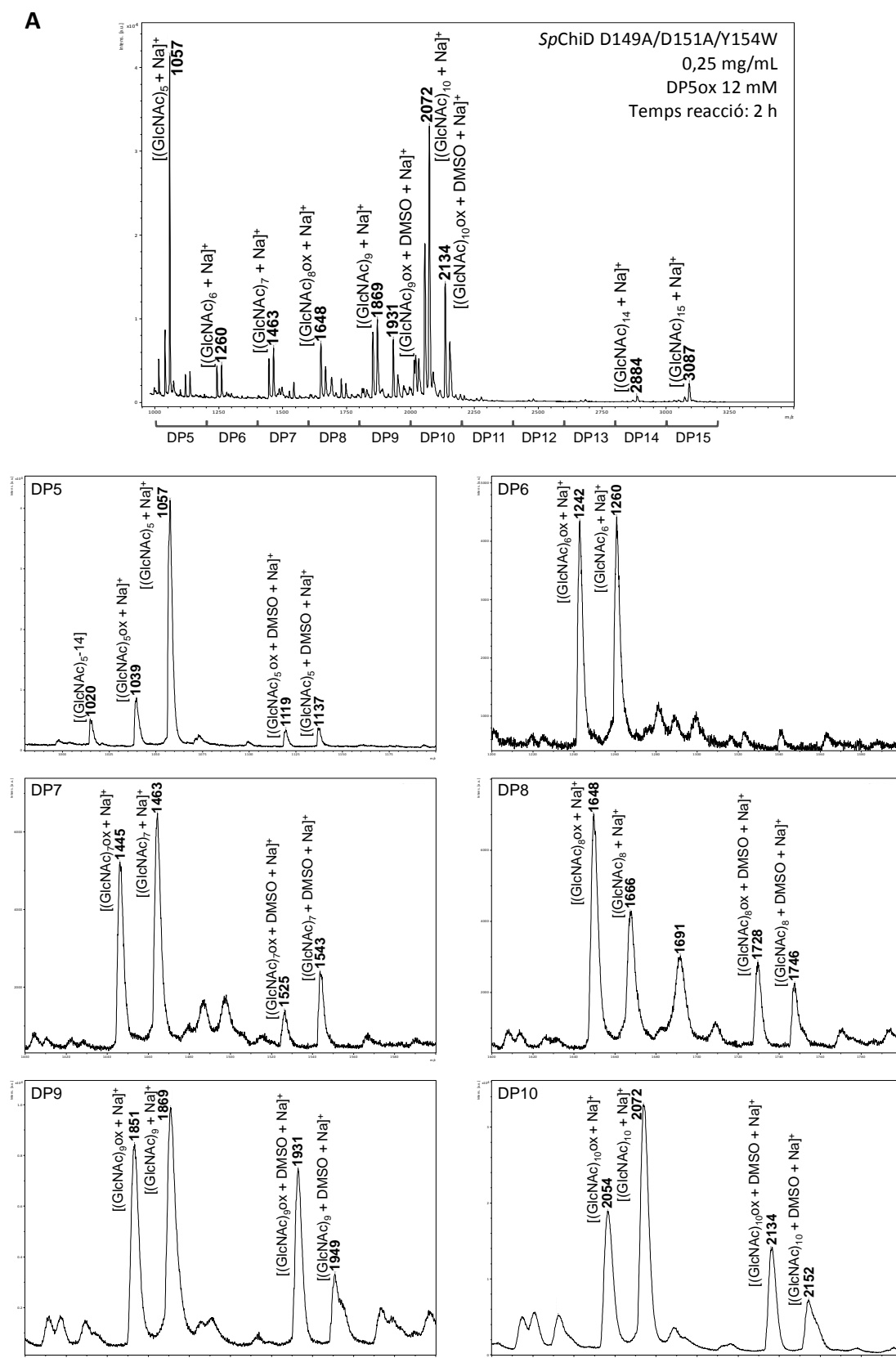


B

A3.2. Espectre de MALDI-TOF-MS dels productes del precipitat de les reaccions catalitzades per SpChiD S110G/D149A/D151A amb (GlcNAc)₅-ox. **A.** 18 hores de reacció.

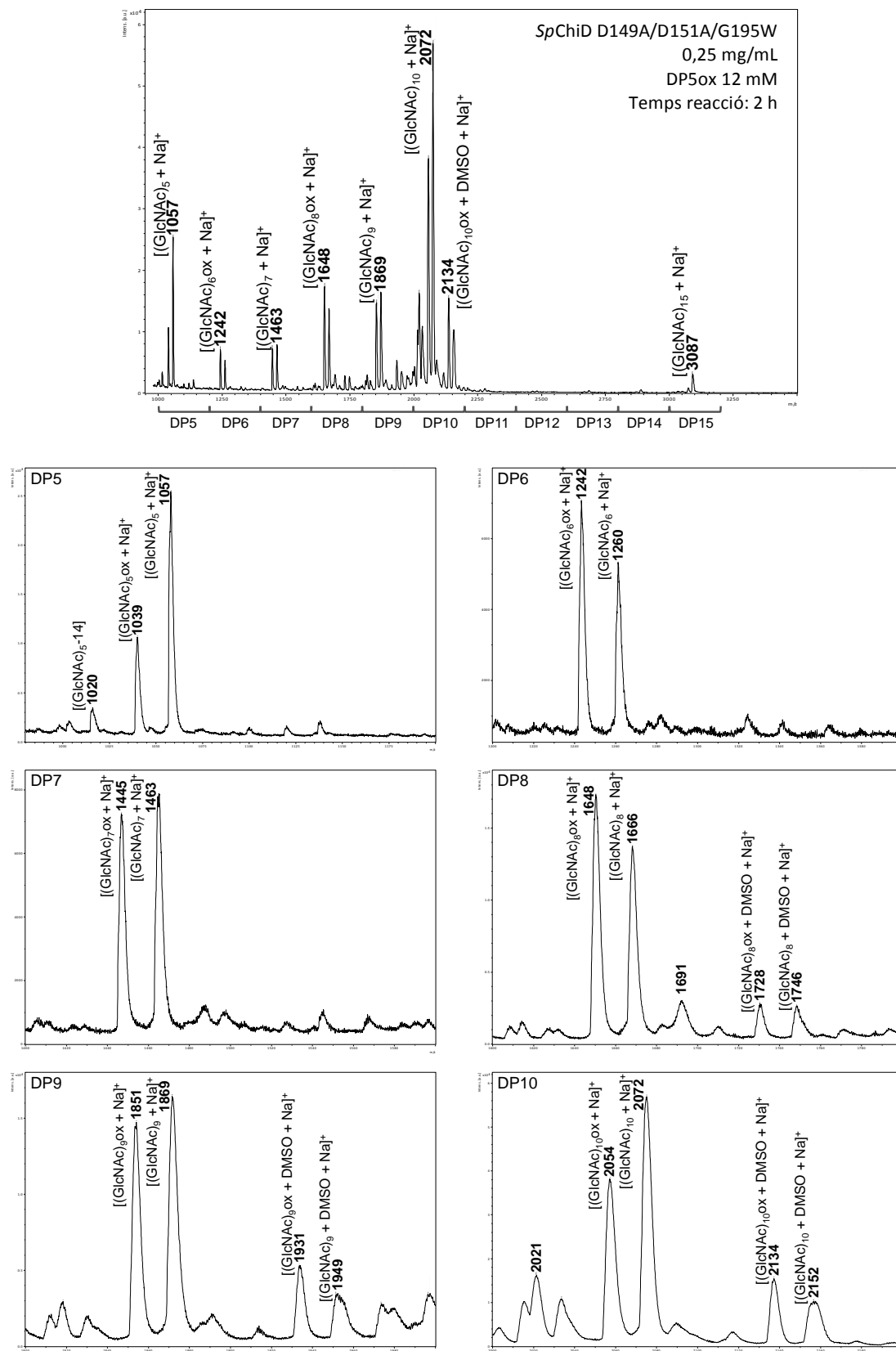


A3.3. Espectre de MALDI-TOF-MS dels productes del precipitat de les reaccions catalitzades per SpChiD D149A/D151A/Y154W amb (GlcNAc)₅-ox. **A.** 2 hores de reacció, **B.** 18 hores de reacció.

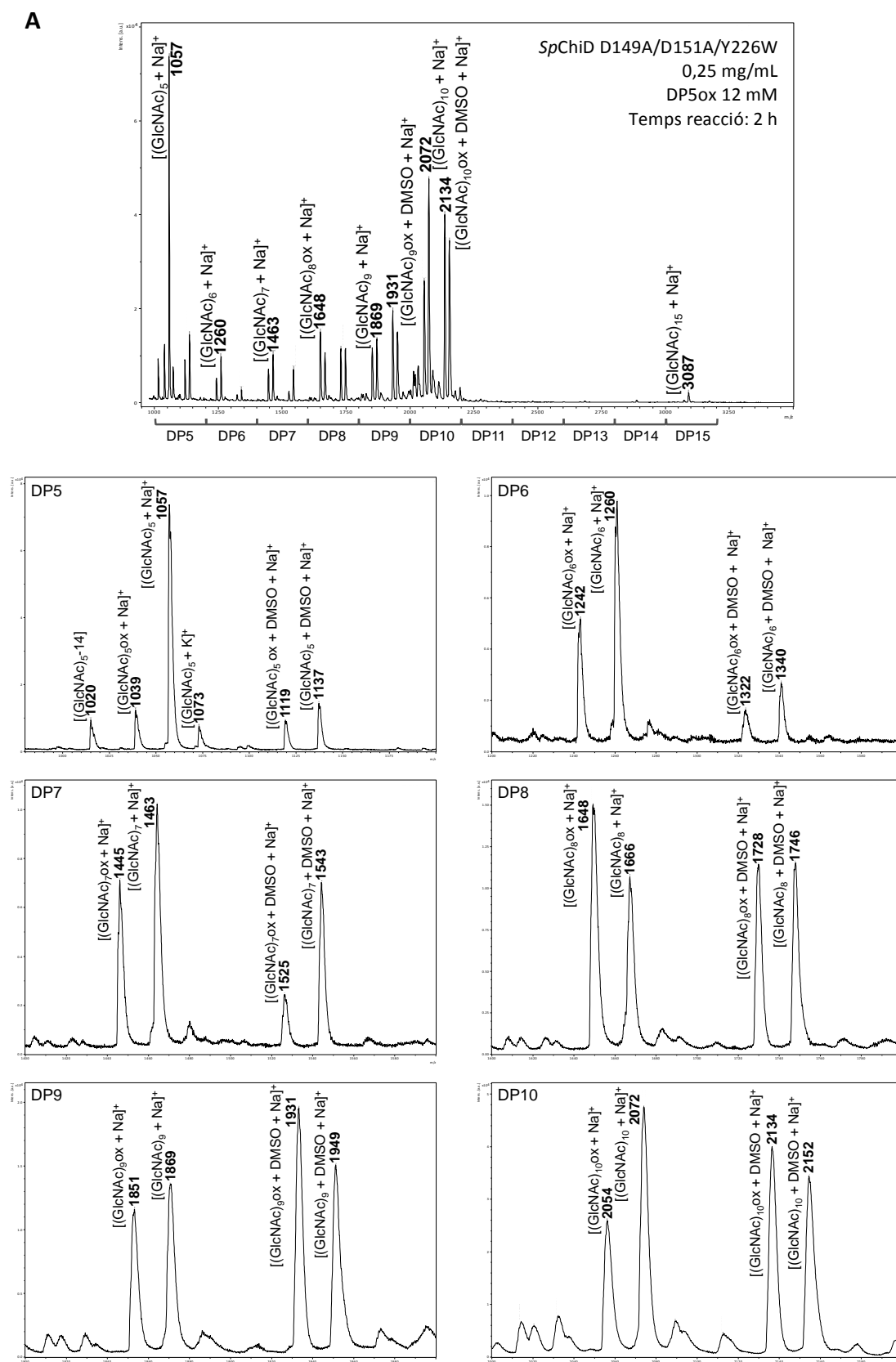


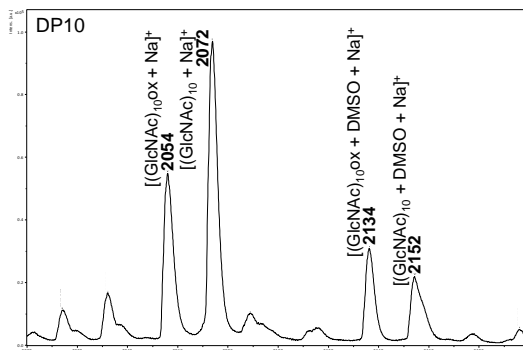
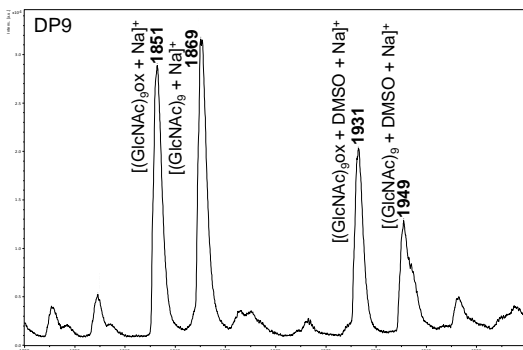
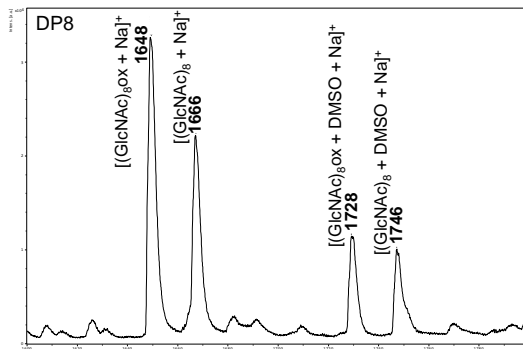
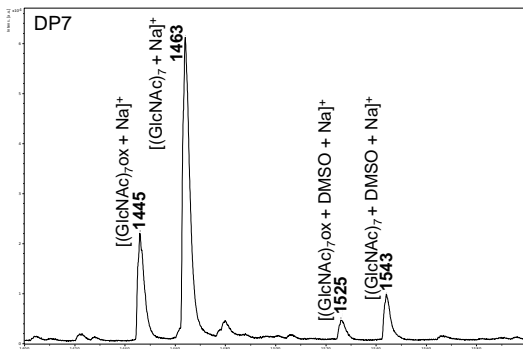
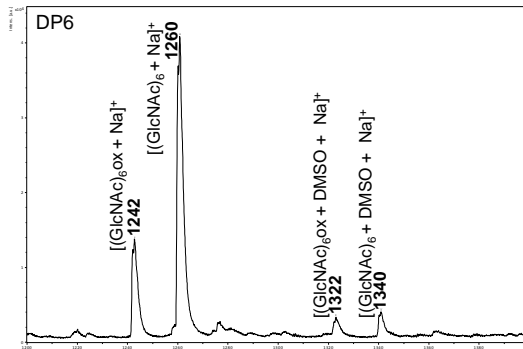
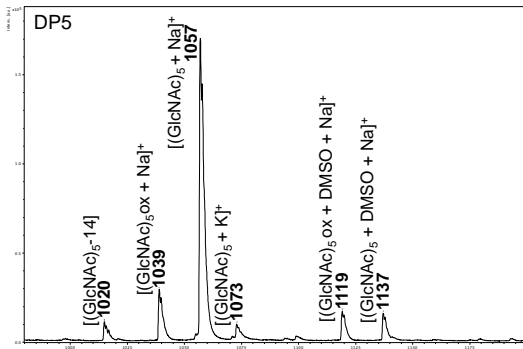
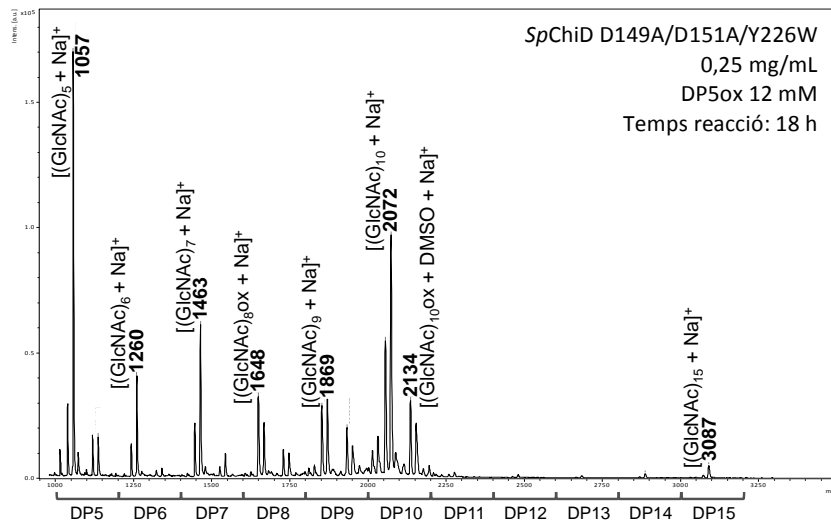
A3.4. Espectre de MALDI-TOF-MS dels productes del precipitat de les reaccions catalitzades per SpChiD D149A/D151A/G195W amb (GlcNAc)₅-ox. **A.** 2 hores de reacció, **B.** 18 hores de reacció.

A



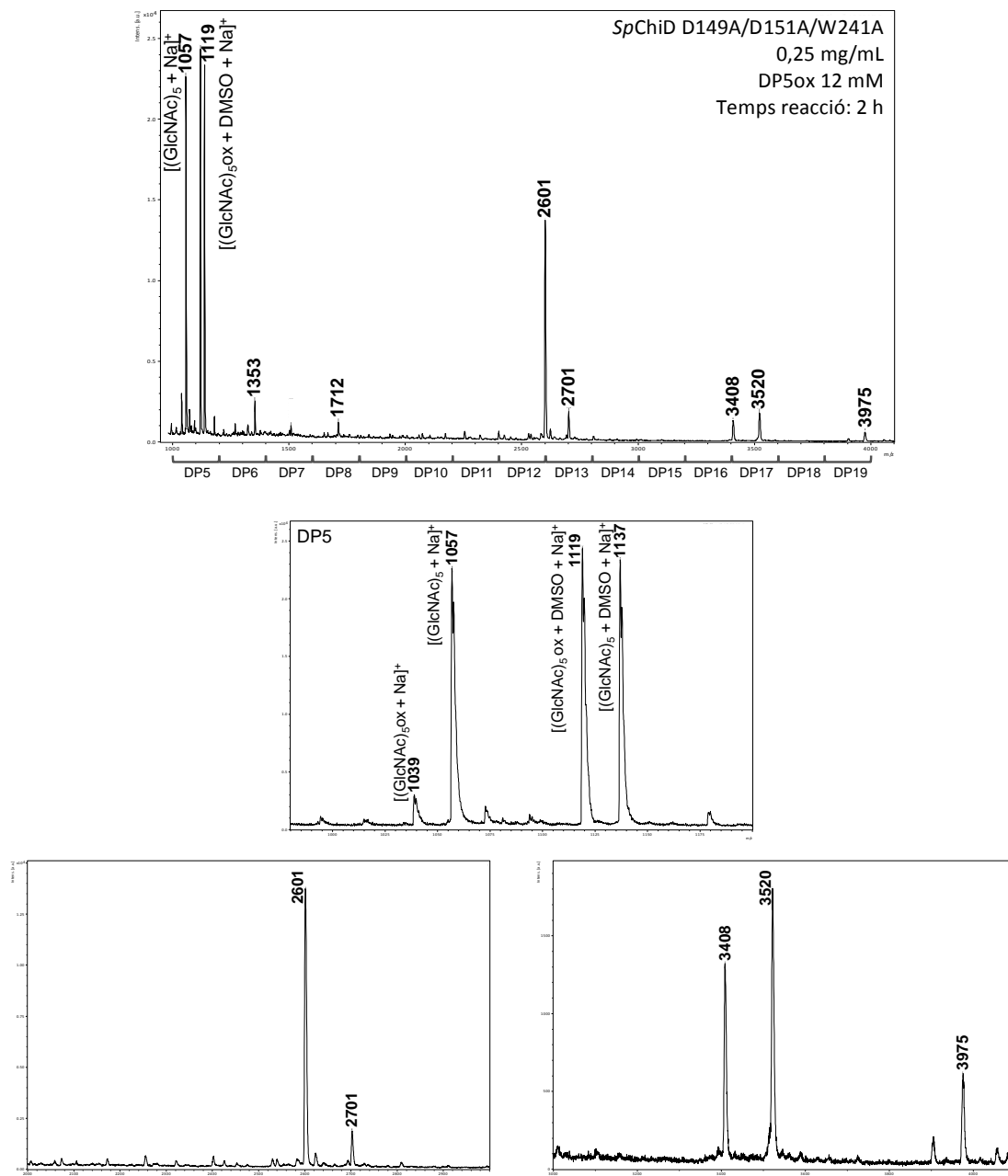
A3.5. Espectre de MALDI-TOF-MS dels productes del precipitat de les reaccions catalitzades per SpChiD D149A/D151A/Y226W amb (GlcNAc)₅-ox. **A.** 2 hores de reacció, **B.** 18 hores de reacció.

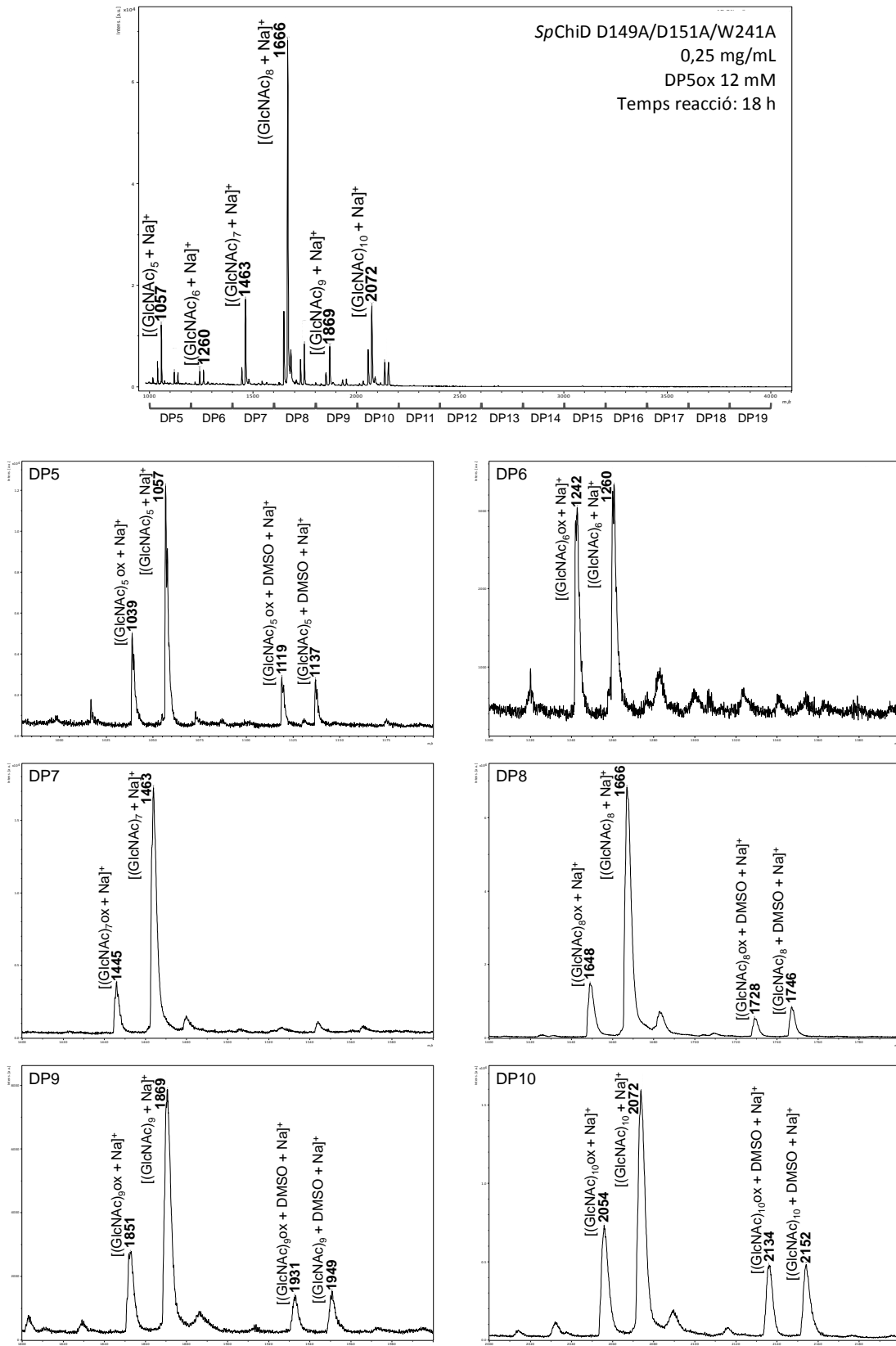


B

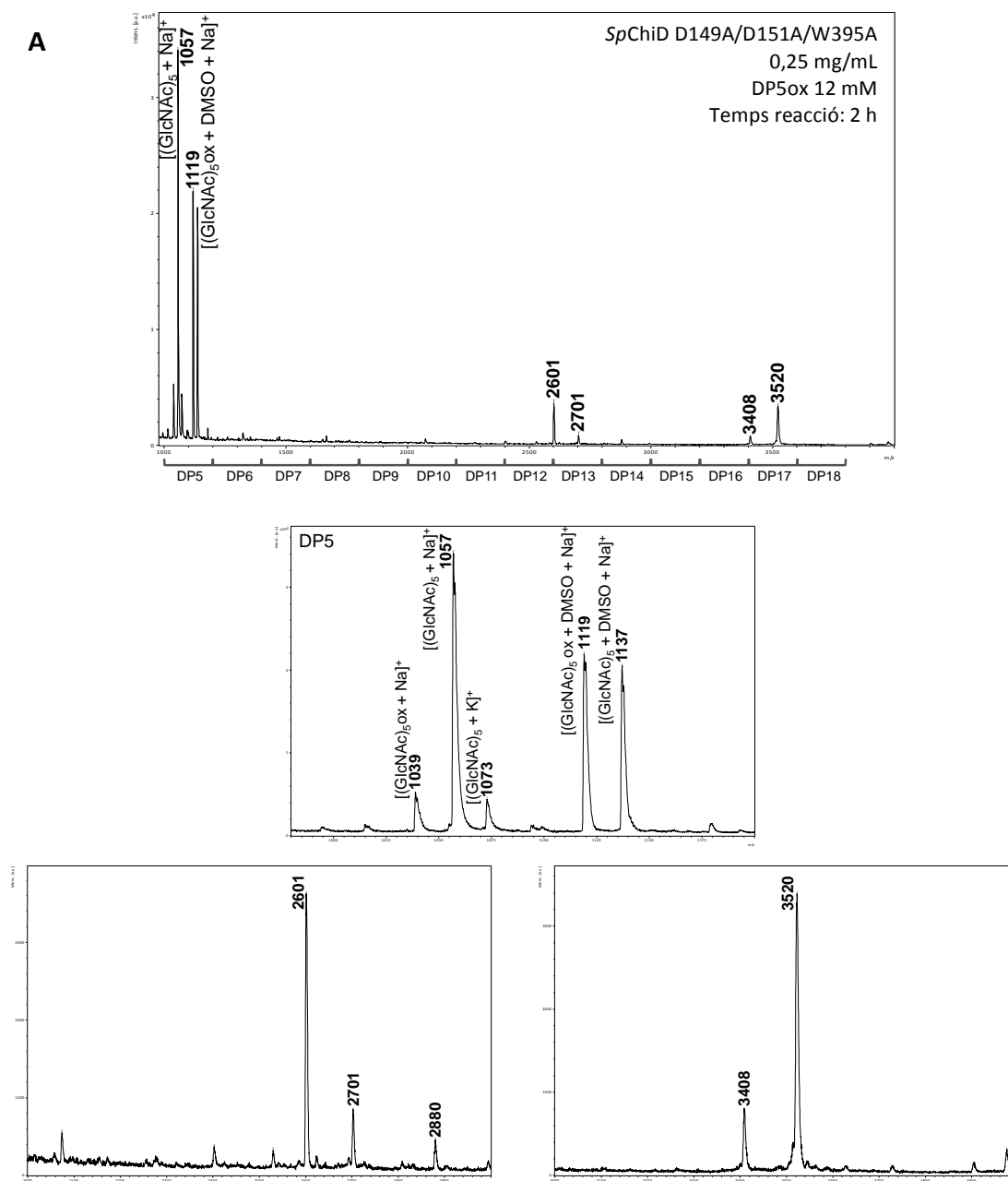
A3.6. Espectre de MALDI-TOF-MS dels productes del precipitat de les reaccions catalitzades per SpChiD D149A/D151A/W241A amb (GlcNAc)₅-ox. **A.** 2 hores de reacció, **B.** 18 hores de reacció.

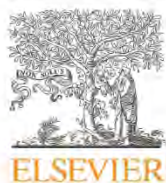
A



B

A3.7. Espectre de MALDI-TOF-MS dels productes del precipitat de les reaccions catalitzades per SpChiD D149A/D151A/W395A amb (GlcNAc)₅-ox. **A.** 2 hores de reacció.



Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

Carbohydrate Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/carres

Glycosynthase-type GH18 mutant chitinases at the assisting catalytic residue for polymerization of chitoooligosaccharides



Cristina Alsina, Magda Faijes, Antoni Planas*

Laboratory of Biochemistry, Institut Químic de Sarrià, Universitat Ramon Llull Via Augusta 390, 08017, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Chitinases
Glycosynthase
Chitoooligosaccharides
Enzymatic synthesis
Oxazoline
Polymerization

ABSTRACT

Chitoooligosaccharides (COS), the depolymerization products of chitin, have many potential applications in agriculture and medicine since they induce immunostimulating effects and disease protective responses. Most of their biological activities require degrees of polymerization (DP) larger than the tetrasaccharide, but structurally well-defined COS with DP larger than six are difficult to produce due to their high insolubility and complex isolation from chitin hydrolysates. Enzymatic synthesis by exploiting the transglycosylation activity of chitinases offers a potential strategy for the assembly of oligomers in the range of bioactive DPs. We here explore the glycosynthase-like activity of six GH18 chitinases from bacterial and archaeal origin by mutating the catalytic assisting residue in the substrate-assisted mechanism of this enzyme family. The alanine mutants at the assisting residue have a significant, but not essential, effect on the hydrolase activity. We studied the ability of the alanine mutants at the assisting residue to catalyze the polymerization of an oxazoline derivative as donor substrate, selecting the oxazoline of pentaacetylchitopentaose (DP5ox) with the aim of obtaining larger oligomers/polymers that, being insoluble, might be resistant to further reactions by the hydrolytically compromised mutant enzymes. For all the enzymes, insoluble polymeric material was obtained, with DP10 as major component, but other COS with different DPs were also obtained, limiting the practical application to produce oligomers/polymers with a defined DP. The balance between the residual hydrolase activity of the mutant enzymes and the solubility/precipitation kinetics still lead to hydrolysis and/or transglycosylation reactions on the newly formed products. From the selected enzymes, the *Thermococcus kodakaraensis* ChiA D1022A mutant gave the best results, with the formation of insoluble polymers in 45% yield (w/w) and containing about 55% of the target DP10 product.

1. Introduction

Chitin, a linear polysaccharide consisting of β -1,4-linked *N*-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) units, is a primary structural component of the exoskeletons of arthropods, crustaceans and insects, as well as the major component of the fungal cell walls [1]. In nature, chitin can serve as a carbon and nitrogen source for many organisms. Chitin and its partially deacetylated derivatives (chitosans) have immunostimulating activities in mammals and plants [2]. They can be sensed by the innate immune cells and have immunomodulatory effects on adaptive immunity. Polymeric chitin and its breakdown chitoooligosaccharide (COS) products have many potential biological applications, particularly in agriculture and medicine [3–7]. Their biological properties include antimicrobial and antitumor activities in animals, immunoenhancing effects in humans as dietary supplements [8–12], and disease protective responses in plants [13,14]. Despite their biological interest, structurally

well-defined COS are difficult to produce. Whereas soluble COS with degree of polymerization (DP) from 2 to 6 are readily isolated (and commercially available) by chemical or enzymatic hydrolysis of chitin followed by chromatographic separation [15,16], COS with DP ≥ 7 remain poorly accessible because of their water-insolubility. Since most of the biological activities associated with COS require DPs larger than the tetrasaccharide [17,18], more efficient methods to prepare higher oligomers are of increasing interest. Particularly, enzymatic synthesis of COS has been a matter of research by exploiting the transglycosylation activity of chitinases [19].

Chitinases are glycoside hydrolases (GH) that catalyzed the hydrolysis of chitin producing COS. Chitinases are widely distributed in bacteria, fungi, plants and animals [20,21]. Based on sequence similarity, chitinases are classified in families GH18 (retaining) and GH19 (inverting) in the Carbohydrate Active Enzymes database (www.cazy.org) [22], which differ in structure and modes of action [21]. The

* Corresponding author.

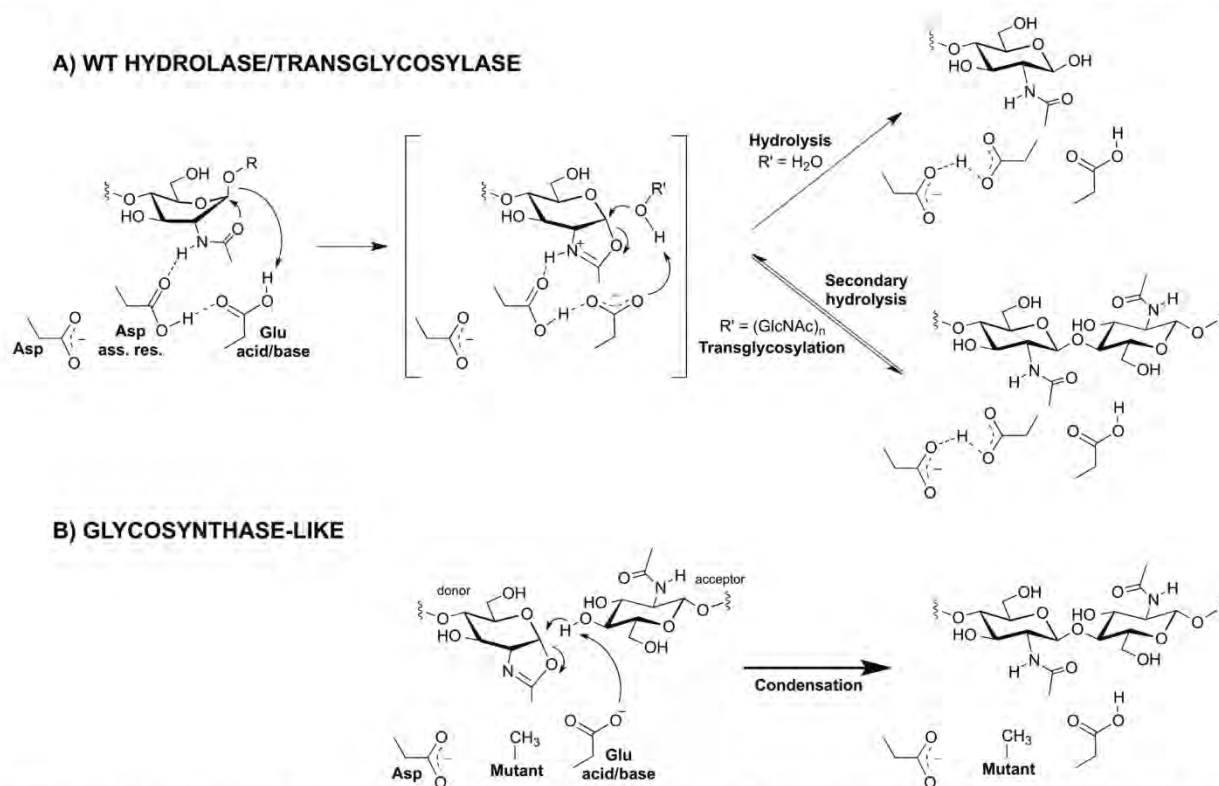
E-mail address: antoni.planas@iqs.edu (A. Planas).

<https://doi.org/10.1016/j.carres.2019.04.001>

Received 3 February 2019; Received in revised form 15 March 2019; Accepted 10 April 2019

Available online 12 April 2019

0008-6215/ © 2019 Published by Elsevier Ltd.



Scheme 1. Mechanism of GH18 chitinases operating by substrate-assisted catalysis. A. Hydrolase and transglycosylation reaction by wt chitinases. B. Glycosynthase-like mechanism for mutants at the assisting residue and an oxazoline derivative as donor substrate.

catalytic domain of GH18 chitinases has a common $(\beta/\alpha)_8$ -TIM barrel fold with several highly conserved motifs [23–28], the most prominent being the DXDXE, which includes the glutamate that acts as the catalytic acid/base residue. GH18 chitinases are retaining enzymes that operate by substrate-assisted catalysis, where the *N*-acetamido group of the substrate acts as an internal nucleophile forming an oxazoline/oxazolinium ion intermediate, which is then attacked by a water molecule assisted by the conjugate base of the general acid residue to yield the hydrolysis product with net retention of the anomeric configuration (Scheme 1A) [29–31]. Even though sequence similarity among GH18 chitinases is not very high, their active sites contain highly conserved residues with important roles in the catalytic mechanism. The conserved DXDXE motif contains the catalytic residues, E being the general acid/base catalytic residue, the central D acting as an assisting residue that hydrogen bonds with the nitrogen atom of the *N*-acetamido group of the substrate and promotes nucleophilic attack on the anomeric carbon, and the first D interacting with the assisting residue and contributing to keep it protonated [29,30,32,33].

Some chitinases have also transglycosylase activity (TG), allowing them to form new glycosidic bonds between donor and acceptor sugar molecules with the consequent generation of oligomeric COS [34–38] (Scheme 1A). This TG is only detected during initial states of the reaction since the TG products are rapidly hydrolyzed by the enzyme [34]. Increasing the transglycosylation/hydrolysis ratio for a more efficient production of COS is being addressed by mutagenesis of amino acid residues at the catalytic center, catalytic groove, and solvent-accessible regions [35,39]. Oxazoline derivatives of COS, a transition state analog of GH18 chitinases, have also been used as glycosyl donors for coupling to an acceptor [40]. Under basic pH, the enzyme has a reduced hydrolytic activity but is still active for the condensation reaction. Artificial chitin and other chitin derivatives were obtained by ring-opening polyaddition of chitobiose oxazoline derivatives [40–44].

Next step was the application of the glycosynthase-like strategy. The glycosynthase technology was introduced on retaining glycosidases

with enzyme nucleophile by mutation of the catalytic nucleophile. These enzymes operate by a double displacement mechanism through formation of a covalent glycosyl-enzyme intermediate. Mutation of the nucleophile to a non-nucleophilic residue (typically to Ala, Ser or Gly) renders a hydrolytically inactive enzyme but able to catalyze glycosyl transfer from an activated donor substrate with an anomeric configuration opposed to that of the substrate of the wt enzyme (*i.e.* an α -glycosyl fluoride for a β -glycosidase) [45–47]. The transglycosylation (or condensation product) accumulates in high yield because it is not hydrolyzed by the hydrolytically incompetent mutant. In the case of GHs acting by substrate-assisted catalysis, the same strategy cannot be applied. A glycosynthase-like approach on these enzyme families is based on mutation of the assisting residue to reduce (ideally abolish) the hydrolyase activity and supply an oxazoline derivative as donor substrate for a condensation reaction with an acceptor (Scheme 1B). The first report aiming to generate a glycosynthase-like from a GH85 endo- β -*N*-acetylglucosaminidase (Endo-M) identified that mutation of the assisting residue (Asn in this case) promoted the coupling reaction with a sugar oxazoline donor and loss of hydrolyase activity [48]. This strategy has been extended to other GH85 endo-glycanases for the efficient synthesis of homogeneous *N*-glycoproteins [49,50]. Within family GH18 chitinases, the glycosynthase-like technology (Scheme 1B) has only been reported on mutants at the assisting residues of *Bacillus circulans* and *Trichoderma harzanium* chitinases [19,51]. The mutants proved to be active for chitobiose oxazoline oligomerization. However, the fact that not only oligomers with even DP (from donor polymerization) but also oligomers with odd DP (from transglycosylation of the initially formed oligomers) were generated, prompted the authors [19] to conclude that this approach does not eliminate the transglycosylation activity already observed with wild type (wt) chitinases. The result was an inextractible mixture of products which diminishes the usefulness of this approach for the synthesis of large, water insoluble COS [19].

With the aim of exploring whether this behavior might be general

for GH18 chitinases or other chitinases may lead to defined oligomers when applying the glycosynthase-like approach, we here selected six GH18 chitinases from different sources and evaluated the behavior of their mutants at the assisting catalytic residue as glycosynthases using a longer chitopentaose oxazoline substrate for polymerization reactions.

2. Results

2.1. Transglycosylating GH18 chitinases. Selection of target enzymes

Family GH18 comprises chitinases (EC 3.2.1.14), lysozymes (EC 3.2.1.17) and endo- β -N-acetylglucosaminidases (EC 3.2.1.96). Currently (www.cazy.org), 482 enzyme members have been characterized with regard to their substrate specificity, and 90 crystallographic structures have been released in the Protein Data Bank (PDB, www.rcsb.org). A literature survey of GH18 chitinases with reported transglycosylation (TG) activity is summarized in [Table S1 \(Supplementary Information\)](#). TG reactions of the wt enzymes and active site mutants were analyzed by using COS (or aryl glycosides of COS) as donor and acceptor substrates, observing two different behaviors:

- Enzymes that yield detectable TG products with larger DP than the substrate. These TG products are initially formed at short reaction times but then hydrolyzed to shorter oligomers. [Table S1](#) details the maximum yield of TG products at the optimal reaction time before the decrease due to product hydrolysis. The best TG yields are reported for the *Trichoderma reesei* chitinase (24% yield in DP6 from DP4 substrate) [52], *Nocardia orientalis* chitinase (21% yield in DP6 from DP4 substrate) [53,54] and *Serratia proteamaculans* ChiD (14% yield in DP5–DP9 from DP4) [34]. Remarkably, some *SpChiD* mutants show increased TG activity, with TG yields of 20–22% in DP5+DP6 from DP4 substrate [55]. To our best knowledge, other reported chitinases render TG yields lower than 10%.
- Enzymes in which no longer oligomers than the substrate are detected, but the hydrolysis products are assigned to the hydrolysis of transient TG products (based on the specificity of the enzyme, meaning that the products can emerge only from hydrolysis of longer oligomers initially generated in a preceding TG event). This is the case of wild type *Serratia marcescens* ChiA and ChiB, *Stenotrophomonas maltophilia* ChiA or *Cycas revoluta* Chi-A ([Table S1](#)), where the high hydrolase activity precludes the kinetic control of the reaction to detect transient TG products.

In few cases, the oxazoline derivatives of COS have been used as donor substrates for condensation reactions (summarized in [Table S2](#)). With wt *Bacillus* chitinases at basic pH where hydrolysis of COS is significantly reduced, the oxazoline substrate is able to act as a glycosyl donor leading to higher oligomers [40]. As described in the introduction, mutants at the assisting residue of *Bacillus circulans* and *Trichoderma harzianum* chitinases have been analyzed for glycosynthase-like polymerization reactions, with limited practical results [19].

Based on these precedents, six endo-chitinases were selected, four bacterial and two archaeal enzymes ([Table 1](#)). *Bacillus circulans* as reference enzyme, *Serratia proteamaculans* ChiD, reported as a transglycosylating enzyme with COS substrates but not studied with oxazoline substrates, and *Laceyella putida* ChiA and *Serratia marcescens* ChiC with no reported TG activity, were the selected bacterial chitinases. Also selected were *Pyrococcus furiosus* ChiB and *Thermococcus kodakaraensis* ChiA, the first with no reported TG activity on COS substrates, as enzymes from hyperthermophilic archaea.

2.2. Cloning, expression and purification of chitinases

The synthetic genes corresponding to the full length proteins (without signal peptide) for the selected chitinases, except for *TkChiA* which corresponded to the second GH18 domain plus accompanying

CBMs, were codon-optimized for expression in *E. coli* (domains organization in [Figure S1](#)). Sequence alignment of the corresponding catalytic domains is shown in [Figure S2](#). The synthetic genes were subcloned into a pET22b vector for recombinant expression in *E. coli*. *BcChiA*, *SmChiC*, *SpChiD* and *PfChiB* chitinases were expressed as soluble proteins, whereas *LpChiA* and *TkChiA* gave soluble and insoluble proteins. The soluble proteins were purified by metal affinity chromatography with high yields, about 10–20 mg per L of culture for *LpChiA*, *SmChiC*, *PfChiB* and *TkChiA*, and 160 mg L⁻¹ for *BcChiA* and *SpChiD*.

The alanine mutant at the assisting residue for each chitinase (second Asp in the conserved DXDXE motif, [Figure S2](#)) were prepared by site directed mutagenesis and purified as the wt enzymes with similar final protein yields.

2.3. Hydrolytic activity of wild type and mutant chitinases

Both wt chitinases and the corresponding assisting residue mutants were assayed for hydrolase activity using two different types of substrates. First were 4-methylumbelliferyl glycosides ((GlcNAc)_n-MU, n = 1–3, MU: 4-methylumbelliferyl), monitoring the release of the MU aglycon by fluorescence. Results are presented in [Table 2](#). *BcChiA* and *LpChiA* showed the highest activity using the larger substrate ((GlcNAc)₃-MU) whereas *SmChiC* was more active on (GlcNAc)₂-MU. These three chitinases showed insignificant activity using GlcNAc-MU as substrate. In contrast, *SpChiD* exhibited a different trend showing the highest activity with the shortest substrate, consistent with its reported chitobiase activity [39]. On the other hand, the archaeal *PfChiB* and *TkChiA* chitinases exhibited the highest activity towards (GlcNAc)₃-MU and (GlcNAc)₂-MU, respectively, and negligible activity with GlcNAc-MU. In the assisting residue mutants, activities with (GlcNAc)₃-MU and (GlcNAc)₂-MU substrates were reduced up to 2–4 orders of magnitude, with the same substrate preference trend than the corresponding wt chitinases. In the case of the shortest GlcNAc-MU substrate, all the mutants showed a lower activity decrease, of only 1 or 2 orders of magnitude relative to the wt enzymes.

To determine the cleavage specificity resulting from the different binding modes of the different chitinases, we used tetra-acetylchitotetraose, (GlcNAc)₄, as substrate and monitored the consumption of substrate and the formation of the disaccharide and trisaccharide reaction products by HPLC-MS. All wt and mutant enzymes showed a biphasic kinetic behavior. Reactions started with a rapid consumption of (GlcNAc)₄ and formation of the hydrolysis products, but slowed down after 2 min of reaction to reach a steady-state rate ([Table 3](#)). To compare activities between enzymes, the steady state rates are used, but the same trend is also observed for the initial rates ([Table S4](#)). Whereas the rate of (GlcNAc)₃ formation is the rate of glycoside bond cleavage, the rate of (GlcNAc)₂ formation is twice the rate of bond cleavage since two molecules of the same product are released per cleavage event. *BcChiA*, *LpChiA* and *SmChiC* are the most active enzymes in terms of substrate consumption and showed higher hydrolysis rate of the central glycosidic linkage of the tetrasaccharide (binding preference at subsites –2 to +2) with faster release of (GlcNAc)₂ than (GlcNAc)₃, which arises from binding to subsites –3 to +1, or less likely –1 to +3, since these enzymes are mainly endo-chitinases. A different specificity was observed for *SpChiD* and the archaeal *PfChiB* and *TkChiA*, where both binding modes have similar affinities with similar hydrolysis rates leading to the di- and trisaccharide products. The assisting residue mutants of *BcChiA* and *LpChiA* showed a 10⁵ to 10⁴-fold decrease in the rate of substrate consumption but this decrease was only 10²-fold for the other four mutants.

2.4. Glycosynthase-like activity of mutant chitinases

Glycosynthase-like activity of the mutant enzymes at the assisting residue was evaluated using pentaacetylchitopentaose oxazoline

Table 1
Selected chitinases in this study.

Organism	Chitinase	UNIPROT	PDB	Reported TG activity of wt enzymes (% yield) ^a [ref]	Assisting res. Mutant ^c
<i>Bacillus circulans</i>	BcChiA1	P20533	1ITX	DP6 → DP8 (8.2%) [64] Gal(GlcNAc) ₂ -Ox + DP2 → Gal(GlcNAc) ₄ (32%) ^b [19]	D202A
<i>Laceyella putida</i>	LpChiA	W0T116	–	n.r.	D316A
<i>Serratia marcescens</i>	SmChiC	Q700B8	4AXN	n.r.	D139A
<i>Serratia proteamaculans</i>	SpChiD	A8GFD6	4Q22 4PTM	DP3 → DP4-DP6 (10%) [34] DP4 → DP5-DP9 (14%) [34] DP5 → DP6-DP10 (5%) [34] DP6 → DP7-DP10 (traces) [34]	D151A
<i>Pyrococcus furiosus</i>	PfChiB	Q8U1H5	3A4W 3A4X	n.r.	D524A
<i>Thermococcus kodakaraensis</i>	TkChiA	Q9UWR7	–	DP3 → DP4, DP5 (traces) [65]	D1022A

^a Yield (mM product/mM initial substrate donor).

^b Ratio TG/remaining donor substrate.

^c Mutant at the assisting residue prepared in this work.

Table 2
Specific activity ($V_0/[E]$) of wild type and mutant chitinases using (GlcNAc)_n-MU substrates.

	$V_0/[E]$ (min ⁻¹) ¹		
	GlcNAc-MU	GlcNAc ₂ -MU	GlcNAc ₃ -MU
BcChiA wt	(2 ± 0.1)·10 ⁻³	70 ± 4	300 ± 70
BcChiA D202A	(3 ± 1)·10 ⁻⁵	0.036 ± 0.007	0.17 ± 0.04
D202A/wt	1.5 × 10 ⁻²	5.1 × 10 ⁻⁴	5.7 × 10 ⁻⁴
LpChiA wt	(2.5 ± 0.2)·10 ⁻³	180 ± 8	230 ± 10
LpChiA D316A	(1.2 ± 0.8)·10 ⁻⁴	0.040 ± 0.004	0.106 ± 0.008
D316A/wt	4.8 × 10 ⁻²	2.2 × 10 ⁻⁴	4.6 × 10 ⁻⁴
SmChiC wt	(6.3 ± 0.5)·10 ⁻⁴	1.90 ± 0.05	1.00 ± 0.05
SmChiC D139A	(1.4 ± 0.1)·10 ⁻⁵	0.035 ± 0.004	0.018 ± 0.002
D139A/wt	2.2 × 10 ⁻¹	1.8 × 10 ⁻²	1.8 × 10 ⁻²
SpChiD wt	15 ± 6	14 ± 7	7.1 ± 1.7
SpChiD D151A	0.17 ± 0.04	0.022 ± 0.004	0.016 ± 0.002
D151A/wt	1.1 × 10 ⁻²	1.6 × 10 ⁻³	2.3 × 10 ⁻³
PfChiB wt	(8 ± 1)·10 ⁻⁵	1.302 ± 0.008	3.708 ± 1.376
PfChiB D524A	(7 ± 2)·10 ⁻⁵	0.040 ± 0.001	0.035 ± 0.004
D524A/wt	8.8 × 10 ⁻¹	3.1 × 10 ⁻²	9.4 × 10 ⁻³
TkChiA wt	(3.2 ± 0.2)·10 ⁻⁴	0.58 ± 0.05	0.15 ± 0.01
TkChiA D1022A	(5 ± 1)·10 ⁻⁵	0.012 ± 0.001	0.010 ± 0.002
D1022A/wt	1.6 × 10 ⁻¹	2.1 × 10 ⁻²	6.7 × 10 ⁻²

Conditions: 50 μM substrate in 50 mM Na₂HPO₄ buffer, pH 7.0. ¹ Average of three repetitions.

(DP5ox) as substrate. Oxazolines have a reduced stability at acidic pH spontaneously decomposing to the hydrolysis product, whereas at pH > 6.5 they remain stable for 20 h (Figure S3). Therefore, glycosynthase-like reactions were performed at pH 7.0. Due to the insoluble nature of chitooligomers with DP > 6, DP5ox polymerization was monitored by formation of an insoluble precipitate. Control reactions in the absence of enzymes under the same experimental conditions showed no precipitate formation and only DP5 has detected in the solution (Figure S4).

After 2 h of incubation, a white precipitate started to form. It was recovered by centrifugation, and the freeze-dried solid was analyzed by MALDI-TOF-MS, resulting to be a mixture of COS for all the mutants (Table 4, Fig. 1, and Figures S5-S10). DP10, which results from the self-condensation of DP5ox (product of the glycosynthase-type reaction, Scheme 1B), was the main product in the reactions catalyzed by SpChiD D151A, PfChiB D524A and TkChiA D1022A. In these reactions, the precipitate was a mixture of COS ranging from DP5 to DP15. In the reaction catalyzed by LpChiA D316A, the precipitate was a mixture of COS with DP ranging from 5 to 10, DP5 being the most abundant product, followed by DP10. BcChiA D202A and SmChiC D139A gave a similar pattern of polymerization with a mixture of COS ranging from DP5 to DP12, being DP7 and DP8 the main products. Polymer yields were low for the bacterial mutant enzymes (less than 2.5% (w/w)),

Table 3
Specific activity ($V_0/[E]$, steady-state rates) of wild type and mutant chitinases using tetraacetylchitotetraose as substrate.

	Consumption	Formation	
	$V_0/[E]$ (min ⁻¹) ¹	$V_0/[E]$ (min ⁻¹) ¹	
	(GlcNAc) ₄	(GlcNAc) ₂	(GlcNAc) ₃
BcChiA wt	-178 ± 66	127 ± 9	22 ± 3
BcChiA D202A	≈ -0.01	0.14 ± 0.03	0.09 ± 0.01
D202A/wt	5.6 × 10 ⁻⁵	1.1 × 10 ⁻³	4.1 × 10 ⁻³
LpChiA wt	-2280 ± 1200	1689 ± 170	540 ± 180
LpChiA D316A	-1.3 ± 0.5	0.39 ± 0.08	0.03 ± 0.01
D316A/wt	5.7 × 10 ⁻⁴	2.3 × 10 ⁻⁴	5.6 × 10 ⁻⁵
SmChiC wt	-43 ± 3	35 ± 5	< 10
SmChiC D139A	-3 ± 1	2.0 ± 0.5	< 1
D139A/wt	7.3 × 10 ⁻²	5.7 × 10 ⁻²	≈ 10 ⁻¹
SpChiD wt	-27 ± 9	8 ± 4	8 ± 2
SpChiD D151A	-1.1 ± 0.5	0.04 ± 0.03	0.4 ± 0.1
D151A/wt	4.1 × 10 ⁻²	5.0 × 10 ⁻³	5.0 × 10 ⁻²
PfChiB wt	-196 ± 114	164 ± 71	94 ± 10
PfChiB D524A	-7 ± 3	3.7 ± 1.8	1.8 ± 1.1
D524A/wt	3.6 × 10 ⁻²	2.3 × 10 ⁻²	1.9 × 10 ⁻²
TkChiA wt	-65 ± 8	125 ± 20	73 ± 8
TkChiA D1022A	-6 ± 2	3.7 ± 0.4	7 ± 2
D1022A/wt	9.2 × 10 ⁻²	2.9 × 10 ⁻²	9.6 × 10 ⁻²

Conditions: 2 mM substrate in 50 mM Na₂HPO₄ buffer, pH 7.0. ¹ Average of three repetitions.

except for SmChiC that was 34% (but DP10 was not the main product). For the archaeal chitinase mutants, PfChiB and TkChiA, polymer yields were 8% and 20%, respectively.

After 18 h of incubation, although the total polymer yields increased, DP10 was hydrolyzed resulting in an increase of COS ranging from DP5-DP9. For the bacterial chitinases, the main products became DP7 and DP8. In contrast, in the case of the archaeal chitinase mutants, despite the increase of DP5-DP9, DP10 remained as the main product, with an increment of the polymer yield up to 40% approximately.

3. Discussion

The conventional approach to generate a glycosynthase on retaining GH having an enzyme nucleophile by knocking out the nucleophilic residue [45,46,47] cannot be applied to glycosidases that operate by substrate-assisted catalysis. Instead, the strategy is based on mutation of the assisting residue to reduce (ideally abolish) the hydrolase activity and supply an oxazoline derivative as donor substrate for a condensation reaction with an acceptor. Whereas this glycosynthase-like approach has been successfully applied to GH85 endo-β-N-acetylglucosaminidases [48–50], less explored is its application to other GH

Table 4
Glycosynthase products of DP5ox polymerization reaction catalyzed by assistant residue mutant chitinase determined by MALDI-TOF-MS.

Assisting Mutant	2h reaction			18h reaction		
	Peaks ^a (% Area)	Precip.yield ^b (w/w)	App. yield ^c	Peaks ^a (% Area)	Precip. yield ^b (w/w)	App. yield ^c
			DP6-DP9 DP ≥ 10			DP6-DP9 DP ≥ 10
<i>BcChiA</i> D202A	DP5 (76.8%), DP8 (6.9%), DP7 (6.3%), DP10 (4.0%), DP9 (2.8%), DP6 (2.4%), DP11-12 (< 0.8%)	< 2.5%	0.5%	DP7 (40.0%), DP8 (26.6%), DP9 (16.2%), DP5 (8.3%), DP10 (5.5%), DP6 (3.4%)	10.7%	9.2%
<i>LpChiA</i> D316A	DP5 (91.3%), DP10 (4.3%), DP8 (1.9%), DP7 (1.3%), DP9 (1.1%)	< 2.5%	0.1%	DP7 (37.1%), DP8 (27.4%), DP5 (12.0%), DP9 (9.5%), DP10 (9.3%), DP6 (4.4%), DP11-15 (< 0.3%)	< 2.5%	2.0%
<i>SmChiC</i> D139A	DP8 (34.3%), DP7 (26.9%), DP10 (11.9%), DP5 (11.8%), DP9 (11.6%), DP6 (2.9%), DP11-12 (< 0.6%)	33.6%	25.4%	DP8 (34.1%), DP7 (27.9%), DP9 (15.5%), DP10 (12.0%), DP5 (7.2%), DP6 (2.8%), DP11-12 (< 0.5%)	47.5%	38.1%
<i>SpChiD</i> D151A	DP10 (42.2%), DP5 (27.2%), DP7 (11.4%), DP8 (9.8%), DP9 (7.6%), DP6 (1.7%), DP15 (< 0.1%)	2.5%	0.8%	DP7 (33.8%), DP8 (29.5%), DP9 (12.8%), DP6 (7.1%), DP5 (5.4%), DP11-13 (< 0.8%)	47.9%	39.9%
<i>PfChiB</i> D524A	DP10 (50.9%), DP9 (17.6%), DP5 (12.6%), DP8 (12.0%), DP7 (4.4%), DP6 (2.2%), DP15 (0.3%)	8.2%	3.0%	DP10 (42.9%), DP9 (21.8%), DP5 (12.2%), DP8 (11.8%), DP7 (8.8%), DP6 (2.3%), DP15 (0.2%)	36.9%	16.5%
<i>TkChiA</i> D1022A	DP10 (64.8%), DP9 (16.6%), DP5 (7.5%), DP8 (6.9%), DP6 (2.1%), DP7 (1.9%), DP15 (0.1%)	20.9%	5.8%	DP10 (55.0%), DP9 (20.6%), DP5 (9.5%), DP8 (9.0%), DP7 (3.5%), DP6 (2.2%), DP11 (0.2%)	44.7%	15.8%

Reaction conditions: 24 mM DP5ox, 1 mg/mL-1 enzyme in 50 mM Na₂HPO₄ pH 7 at 37 °C.

^a Area of the peaks assigned to each DP product in the MALDI-TOF spectra calculated as the sum of all peaks corresponding to the different adducts (*m/z* M + Na⁺, K⁺, DMSO adducts).

^b Precipitate yield (w/w), mg of precipitate per mg of initial donor substrate.

^c App. yield, percentage amount of COS of DP6 to DP9 (due to hydrolysis or TG) or of DP ≥ 10, calculated as the product of %area of the peaks per precipitate yield.

families operating by substrate-assisted catalysis (GH18 chitinases, GH20 hexosaminidases and GH56 hyaluronidases).

With the aim of engineering a glycosynthase to obtain chitin oligomers/polymers with defined DP, six chitinases from family 18 of glycosyl hydrolases (GH18) were selected and their assisting residues mutated to alanine. The Asp to Ala mutation significantly reduces the hydrolase activity. For all the studied chitinases, the general trend from the kinetics with both types of substrates, MU-glycosides and tetraacetylchitotetraose, is that the alanine mutation at the assisting residue results in 10²–10⁴-fold reduction of the hydrolase activity, revealing an important, but not essential, role of this residue in the hydrolase mechanism. These results are in agreement with the few reported cases of the effect of assisting residue mutations on the catalytic activity of GH18 chitinases, *i.e.* 0.1% for *SmChiA* D313A [56], 0.03% for *SmChiB* D142A [56], 2% for heveamine D125A [57], or < 0.1% for *VhChiA* D313A [58] relative to their corresponding wt enzymes.

For the six mutant chitinases here studied, enzyme-catalyzed polymerization of the pentaacetylchitopentaose oxazoline (DP5ox) was observed, leading to a mixture of oligomers up to DP15. The main product in the reactions catalyzed by the assisting residue mutants of *SpChiD*, *PfChiB*, *TkChiA* and *LpChiA*, was DP10 at 2 h of reaction time. In contrast, using *BcChiA* D202A and *SmChiC* D139A, DP10 was also produced but the main products were DP7 and DP8 at the same reaction time. The insoluble oligomers initially formed were hydrolyzed upon longer incubation times resulting in an increase of COS ranging from DP5 to DP9 due to the residual hydrolase activity of the mutant enzymes. These results are in line with the observations reported by Cottaz and coworkers on mutants at the assisting residue of *B. circulans* and *T. harzanium* chitinases [19]. They observed that chitobiose oxazoline oligomerization resulted in COS with both even and odd DP, the latter explained as the result of transglycosylation events from the initially formed oligomers. It was concluded that mutation of the assisting residue does not eliminate the TG activity of the wt enzymes. In our case, we have used a larger donor, DP5ox, with the aim of obtaining larger oligomers that, because of their insolubility, will precipitate and might not be accessible for these further TG reactions. However, a mixture of COS with intermediate DPs were obtained. As the residual hydrolase activity of these mutants is still significant (just a 10²–10⁴-fold decrease relative to the corresponding wt enzymes), hydrolysis as well as TG reactions of the initial glycosynthase products seem to take place, leading to a complex mixture of products. Indeed, DP10 (arising from a first glycosynthase-like coupling) is the major product at short reaction time for four of the chitinases, but then decreases at longer reaction times. The products profile varies for the different chitinases studied, but hydrolysis and/or transglycosylation are always observed. No simple structural differences among chitinases correlate with the product distribution observed for the different chitinases. X-ray structures have been solved for *BcChiA*, *SmChiC*, *SpChiD* and *PfChiB*. The bacterial *BcChiA* and *SpChiD* enzymes have a deep binding cleft since they have an α + β loop insertion that partially closes the binding cleft [59,60], and *SpChiD* has an additional loop that partially covers the negative subsites in the binding cleft. The archaeal *PfChiB* has a more open cleft since it lacks this loop insertion [61]. Likewise, the bacterial *SmChiC* also lacks this loop insertion and have a similar open cleft [62]. From the selected enzymes, the *Thermococcus kodakaraensis* ChiA D1022A mutant gave the best results, with the formation of insoluble polymers in 45% yield (w/w) and containing about 55% of the target DP10 product.

4. Conclusions

Mutation of the assisting residue of GH18 chitinases operating by substrate-assisted catalysis has a significant, but not essential, effect on the hydrolase activity on chitooligosaccharides, in the range of 10²–10⁴-fold decrease relative to the parental wt enzymes. When attempting the glycosynthase-like strategy using the alanine mutants at

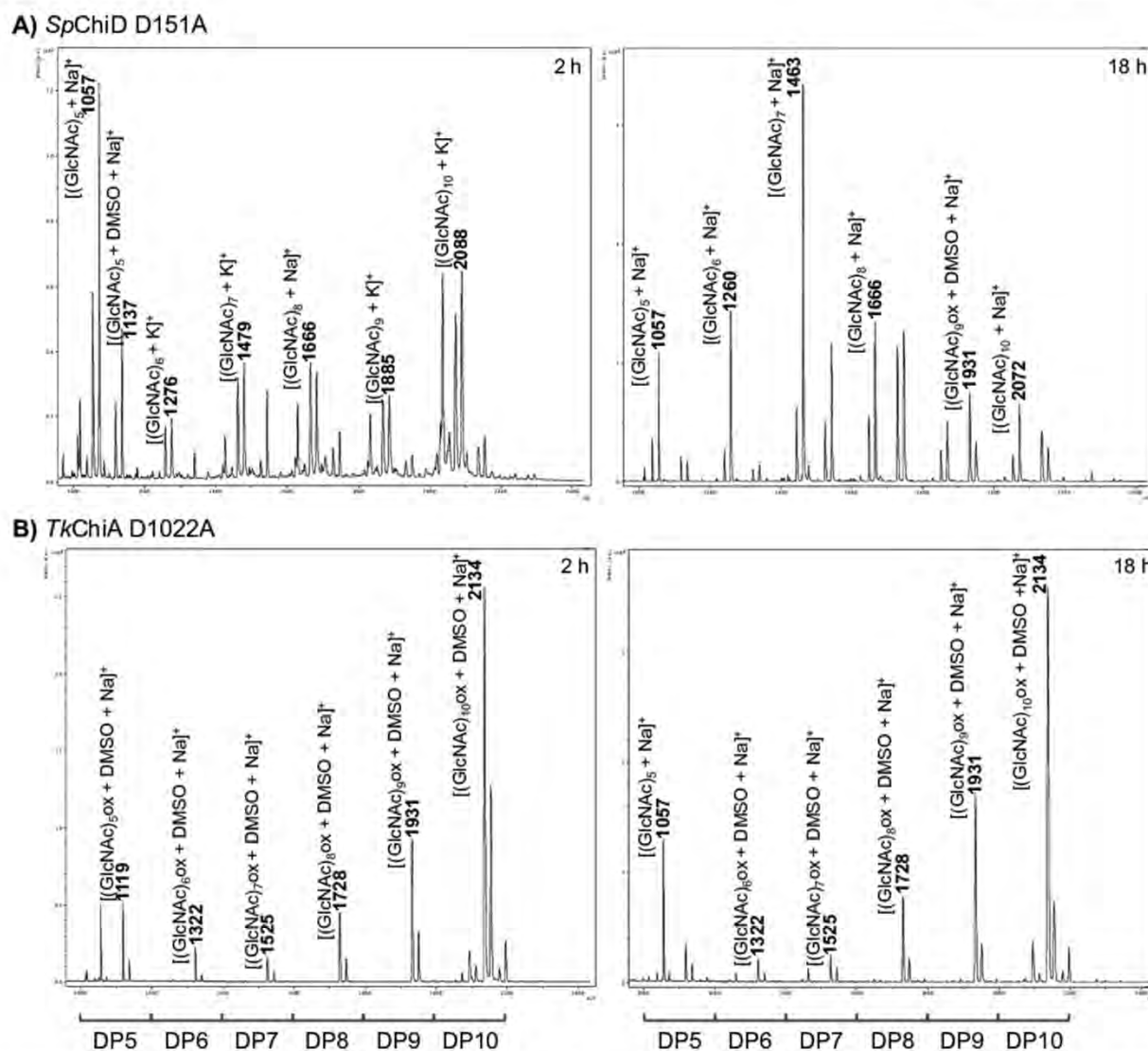


Fig. 1. MALDI-TOF mass spectra of the precipitate products from representative reactions catalyzed by the chitinase mutants SpChiD D151A and TkChiA D1022A with pentaacetylchitopentaose oxazoline (DP5ox). Results for the other enzymes and well as magnifications of the peak profiles for each product (DPx: (GlcNAc)_x) are provided in the *Supplementary Information*.

the assisting residue with an oxazoline derivative as donor substrate (oxazoline derivative of pentaacetylchitopentaose (DP5ox)), the condensation reaction leading to DP10 is observed, but further hydrolysis and transglycosylation reactions also take place. Therefore, the still significant hydrolase activity of the single mutants at the assisting residue is too large to confer them a practical glycosynthase-like activity. These results are in line with the previous observations on *Bacillus circulans* and *Trichoderma harzianum* chitinases with a chitobiose oxazoline substrate [19]. We studied several different GH18 chitinases with a larger donor substrate (DP5ox), with the aim of obtaining larger insoluble oligomers/polymers that might be resistant to further reactions by the hydrolytically compromised mutant enzymes. However, the balance between residual hydrolase activity and solubility/precipitation kinetics still leads to hydrolysis and transglycosylation reactions on the newly formed products. In conclusion, a single mutation at the assisting residue is not sufficient to introduce a practical glycosynthase-like activity on GH18 chitinases. Additional mutations aiming at abolishing the hydrolase activity but accepting an oxazoline donor for self-condensation (polymerization) are the next step to develop a useful biocatalyst for the controlled polymerization of chitooligosaccharides.

5. Experimental section

5.1. General

4-methylumbelliferyl *N*-acetyl- β -D-glucosaminide, 4-methylumbelliferyl β -D-*N,N'*-diacetylchitobioside and 4-methylumbelliferyl β -D-*N,N',N''*-triacetylchitotrioside were obtained from Sigma-Aldrich. Diacetylchitobiose ((GlcNAc)₂), triacetylchitotriose ((GlcNAc)₃) and tetraacetylchitotetraose ((GlcNAc)₄) as substrates and standards for HPLC-MS quantification were from Megazyme. Pentaacetylchitopentaose oxazoline (DP5ox) was from Enantia SL, Barcelona. MALDI-TOF mass spectra were recorded on a Bruker Daltonik (Bremen, Germany) microflex spectrometer equipped with a pulsed nitrogen laser (337 nm), in the reflectron, positive ion mode, using a 20 kV reflector voltage. 2,5-Dihydroxybenzoic acid (DHB) was used as ionization matrix at a concentration of 50 g L⁻¹ in water.

5.2. DNA manipulations and cloning of wild type chitinases

Synthetic genes were provided by GeneArt Gene Synthesis (ThermoFisher) with codon optimization for expression in *E. coli*. *E. coli* DH5 α were transformed with pMK-RQ or pMA-T containing each

chitinase synthetic gene. Positive transformants were selected using LB medium supplemented with 0.1 mg mL⁻¹ kanamycin (for pMK-RQ constructs) or ampicillin (for pMA-T constructs) and cells were grown in 5 mL of the same media and incubated overnight at 37 °C (200 rpm). Purification of the plasmid was done using High Purity Plasmid Miniprep Kit (NeoBiotech). The chitinase genes were subcloned into the NdeI and HindIII restriction sites of the pET22b(+) vector. The resulting plasmids were transformed into *E. coli* DH5α cells. Transformants were selected on ampicillin-containing LB plates. After insert sequence verification by DNA sequencing, the resulting plasmids were transformed into *E. coli* BL21(DE3)star cells for protein expression.

5.3. Construction of site-directed mutants

The assisting residue of each chitinase was mutated by PCR site-directed mutagenesis (QuikChange protocol [63]). For each single mutant, a mutagenic sense/antisense primer pair was designed (Table S3). Plasmid pET22b(+) with the corresponding wild type chitinase was used as template for mutagenesis. PCRs were carried out using iProof polymerase. Amplification was carried out in 40 μL final volume reaction mixture containing plasmidic DNA (5 ng), 0.5 μM of each primer and iProof High-Fidelity mix (Bio-Rad). PCR conditions consisted in a 3 min initial denaturation at 98 °C followed by 30 cycles of denaturation (95 °C, 30"), hybridization (30" at the corresponding annealing temperature for the different primers), extension (72 °C, 2'30") and a final extension (72 °C, 3'). PCR conditions were modified for *TkChiA* D1022A: 3% of DMSO was added in the PCR mix, and also the extension period of each cycle was increase up to 4'. After the PCR reactions, the samples were digested with DpnI for 3 h at 37 °C and transformed into *E. coli* DH5α. Positive transformants were verified by DNA sequencing. BL21(DE3)star cells were transformed with the final plasmids for protein expression.

5.4. Expression and purification of wild type and mutant chitinases

Freshly transformed *E. coli* BL21(DE3)star cells were used to inoculate 30 mL LB supplemented with 100 μg mL⁻¹ ampicillin. Cells were grown at 37 °C until OD₆₀₀ ~ 1.5, induced with 0.5 mM IPTG and incubated overnight at 25 °C, 250 rpm. Cells were harvested by centrifugation and resuspended with 0.8 mL of PBS buffer (50 mM Na₂HPO₄, 300 mM NaCl, pH 7) and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and lysed by sonication at 4 °C using a Soniprep 150 sonifier (5 min, 10 s ON/25 s OFF, 50% amplitude). The soluble fraction was separated by centrifugation at 12000 rpm for 60 min. Protein purification was done by using the commercial 0.1 mL His SpinTrap columns (GE Healthcare) following the manufacturer's instructions. Protein was eluted with 0.5 M imidazole in 50 mM Na₂HPO₄ pH 7. The protein-containing fractions were combined and the buffer was exchanged to 50 mM Na₂HPO₄ pH 7 by using the PD SpinTrap G-25 columns (GE Healthcare). Protein concentration was determined with the BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher).

5.5. Hydrolase activity assay

a) Fluorometric assay. Chitinase activity was measured by a fluorometric assay with 4-methylumbelliferyl *N*-acetyl-β-D-glucosaminide (GlcNAc-MU), 4-methylumbelliferyl β-diacetylchitobioside ((GlcNAc)₂-MU) and 4-methylumbelliferyl β-triacetylchitotrioside ((GlcNAc)₃-MU). The reactions were done at final concentrations of 50 μM substrate in 50 mM Na₂HPO₄ buffer at pH 7 in a total volume of 200 μL at 37 °C. Different concentrations of enzymes were assayed. At different time intervals, 20 μL aliquots were withdrawn and mixed with 80 μL of glycine 0.3 M pH 10 in a dark microplate to stop the reaction. The fluorescence of released 4-methylumbelliferone was measured with a FLX800 Biotek microplate reader (λ_{em} = 360 nm, λ_{ex} = 460 nm). Specific activity (V₀/[E]) was

calculated as the slope of initial rate (μM MU released·min⁻¹) vs enzyme concentration (μM).

b) HPLC-MS assay. Chitinase reactions were done at 2 mM tetraacetylchitotetraose ((GlcNAc)₄) substrate and different enzyme concentrations in 50 mM Na₂HPO₄ buffer at pH 7 in a total volume of 100 μL at 37 °C, in a 96-well microtiter plate. At different time intervals, 10 μL aliquots were withdrawn and mixed with 90 μL of H₂O:propanol (1:1) in another microtiter plate, using the Bravo Automated Liquid Handling Platform (Agilent). Samples were analyzed by HPLC-MS (HPLC 1200, ESI-MS 6100 series SQ, Agilent Technologies) using a XBridge BEH Amide XP column 130 Å, 2.5 μm, 3.0 × 100 mm (Waters), in combination with a XBridge BEH Amide Guard Cartridge pre-column (2.5 μm, 2.1 × 5 mm, Waters), 5 μL injection volume, and isocratic elution at 60 °C with acetonitrile/water 70:30 v/v, 0.1% formic acid, at a flow rate of 0.7 mL/min. The MS detection was done monitoring the corresponding [M+H]⁺ and [M+Na]⁺ ion masses of (GlcNAc)₂ (*m/z* 425.30 and 447.30), (GlcNAc)₃ (*m/z* 628.30 and 650.30) and (GlcNAc)₄ (*m/z* 831.30 and 853.30). Data were analyzed with the ChemStation Software (Agilent Technologies). External standards of (GlcNAc)_n, n = 2–4, were used for quantification of the reaction products.

5.6. Glycosynthase activity assay

Glycosynthase reactions were done using pentaacetylchitopentaose oxazoline (DP5ox) as donor. 1 mg mL⁻¹ of chitinase mutant was mixed with 24 mM DP5ox in 50 mM Na₂HPO₄ buffer at pH 7 in a total volume of 100 μL, and the solution incubated in an orbital shaker at 37 °C. After 2 or 18 h the resulting suspension was centrifuged at 12000 rpm and the pellet was washed twice by resuspension in cold water in an ultrasound bath for 2 min before freeze-drying. Glycosynthase products were resuspended in DMSO:H₂O 1:70000 and mixed with the same volume of DHB matrix solution before air drying at room temperature on the MTP AnchorChip sample plate for MALDI-MS analysis. The area of each product (DP_x) was calculated as the sum of the different peaks corresponding to the different adducts (with Na⁺, K⁺ and DMSO, Figures S5–S10). A control reaction under the same experimental conditions but without enzyme showed no precipitate formation and the only presence of DP5 in the solution after 18 h incubation (Figure S4).

Acknowledgments

Work supported by the European Union's Seventh Framework Programme for research, technological development and demonstration under grant agreement n°613931 (NANO3BIO), and grant BFU2016-77427-C2-1-R from MINECO (Ministerio de Economía, Industria y Competitividad), Spain. C.A. acknowledges a predoctoral contract from NANO3BIO. We acknowledge Dr. Cristina Val for the studies of oxazoline stability.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.carres.2019.04.001>.

References

- [1] A. Varki, R.D. Cummings, J.D. Esko, P. Stanley, G.W. Hart, M. Aebi, A.G. Darvill, T. Kinoshita, N.H. Packer, J.H. Prestegard, R.L. Schnaar, P.H. Seeberger, *Essentials of Glycobiology*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2015, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27010055>, Accessed date: 22 January 2019.
- [2] D. Elieh Ali Komi, L. Sharma, C.S. Dela Cruz, Chitin and its effects on inflammatory and immune responses, *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 54 (2018) 213–223, <https://doi.org/10.1007/s12016-017-8600-0>.
- [3] K. Azuma, S. Ifuku, T. Osaki, Y. Okamoto, S. Minami, Preparation and biomedical applications of chitin and chitosan nanofibers, *J. Biomed. Nanotechnol.* 10 (2014) 2891–2920, <https://doi.org/10.1166/jbn.2014.1882>.

- [4] M.N. Ravi Kumar, A review of chitin and chitosan applications, *React. Funct. Polym.* 46 (2000) 1–27, [https://doi.org/10.1016/S1381-5148\(00\)00038-9](https://doi.org/10.1016/S1381-5148(00)00038-9).
- [5] T. Philibert, B.H. Lee, N. Fabien, Current status and new perspectives on chitin and chitosan as functional biopolymers, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 181 (2017) 1314–1337, <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2286-2>.
- [6] M. Rinaudo, Chitin and chitosan: properties and applications, *Prog. Polym. Sci.* 31 (2006) 603–632, <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001>.
- [7] W. Xia, P. Liu, J. Zhang, J. Chen, Biological activities of chitosan and chitooligosaccharides, *Food Hydrocolloids* 25 (2011) 170–179, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.03.003>.
- [8] H.J. Yoon, M.E. Moon, H.S. Park, S.Y. Im, Y.H. Kim, Chitosan oligosaccharide (COS) inhibits LPS-induced inflammatory effects in RAW 264.7 macrophage cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 358 (2007) 954–959, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.05.042>.
- [9] M. Yousef, R. Pichyangkura, S. Soodvilai, V. Chatsudthipong, C. Muanprasat, Chitosan oligosaccharide as potential therapy of inflammatory bowel disease: therapeutic efficacy and possible mechanisms of action, *Pharmacol. Res.* 66 (2012) 66–79, <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.03.013>.
- [10] M.J. Chung, J.K. Park, Y. Il Park, Anti-inflammatory effects of low-molecular weight chitosan oligosaccharides in IgE-antigen complex-stimulated RBL-2H3 cells and asthma model mice, *Int. Immunopharmacol.* 12 (2012) 453–459, <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2011.12.027>.
- [11] K.-T. Shen, M.-H. Chen, H.-Y. Chan, J.-H. Jeng, Y.-J. Wang, Inhibitory effects of chitooligosaccharides on tumor growth and metastasis, *Food Chem. Toxicol.* 47 (2009) 1864–1871, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.04.044>.
- [12] J.K. Park, M.J. Chung, H.N. Choi, Y. Il Park, Effects of the molecular weight and the degree of deacetylation of chitosan oligosaccharides on antitumor activity, *Int. J. Mol. Sci.* 12 (2011) 266–277, <https://doi.org/10.3390/ijms12010266>.
- [13] L.A. Hadwiger, Plant science review: multiple effects of chitosan on plant systems: solid science or hype, *Plant Sci.* 208 (2013) 42–49, <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.03.007>.
- [14] D. Katiyar, A. Hemantaranjan, B. Singh, A.N. Bhanu, A future perspective in crop protection: chitosan and its oligosaccharides, *Adv. Plants Agric. Res.* 1 (2014) 4–11, <https://doi.org/10.15406/apar.2014.01.00006>.
- [15] T. Inaba, T. Ohgushi, Y. Iga, E. Hasegawa, Synthesis of 4-Methylcoumarin-7-yloxy tetra-N-acetyl- β -chitotetraoside, a novel synthetic substrate for the fluorometric assay of lysozyme, *Chem. Pharm. Bull.* 32 (1984) 1597–1603, <https://doi.org/10.1248/cpb.37.3229>.
- [16] Y. Takiguchi, K. Shimahara, Isolation and identification of a thermophilic bacterium producing N,N'-diacetylchitobiose from chitin, *Agric. Biol. Chem.* 53 (1989) 1537–1541.
- [17] L.P. Hamel, N. Beaudoin, Chitooligosaccharide sensing and downstream signaling: contrasted outcomes in pathogenic and beneficial plant-microbe interactions, *Planta* 232 (2010) 787–806, <https://doi.org/10.1007/s00425-010-1215-9>.
- [18] F. Côté, M.G. Hahn, Oligosaccharins: structures and signal transduction, *Plant Mol. Biol.* 26 (1994) 1379–1411, <https://doi.org/10.1007/BF00016481>.
- [19] E.A. Martinez, H. Boer, A. Koivula, E. Samain, H. Driguez, S. Armand, S. Cottaz, Engineering chitinases for the synthesis of chitin oligosaccharides: catalytic amino acid mutations convert the GH-18 family glycoside hydrolases into transglycosylases, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 74 (2012) 89–96, <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.09.003>.
- [20] S. Armand, H. Tomita, A. Heyraud, C. Gey, T. Watanabe, B. Henrissat, Stereochemical course of the hydrolysis reaction catalyzed by chitinases A1 and D from *Bacillus circulans* WL-12, *FEBS Lett.* 343 (1994) 177–180, [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(94\)80314-5](https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)80314-5).
- [21] B. Henrissat, G. Davies, Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7 (1997) 637–644.
- [22] V. Lombard, H. Golaconda Ramulu, E. Drula, P.M. Coutinho, B. Henrissat, The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013, *Nucleic Acids Res.* 42 (2014) 490–495, <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1178>.
- [23] A. Perrakis, I. Tews, Z. Dauter, A.B. Oppenheim, I. Chet, K.S. Wilson, C.E. Vorgias, Crystal structure of a bacterial chitinase at 2.3 Å resolution, *Structure* 2 (1994) 1169–1180, [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(94\)00119-7](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(94)00119-7).
- [24] A.C. Terwisscha van Scheltinga, K.H. Kalk, J.J. Beintema, B.W. Dijkstra, Crystal structures of hevamine, a plant defense protein with chitinase and lysozyme activity, and its complex with an inhibitor, *Curr. Biol.* 2 (1994) 1181–1189.
- [25] T. Hollis, A.F. Monzingo, K. Bortone, S. Ernst, R. Cox, J.D. Robertus, The X-ray structure of a chitinase from the pathogenic fungus *Coccidioides immitis*, *Protein Sci.* 9 (2000) 544–551, <https://doi.org/10.1110/ps.9.3.544>.
- [26] D.M.F. Aalten, B. Synstad, M.B. Brurberg, E. Hough, B.W. Riise, V.G.H. Eijnsink, R.K. Wierenga, Structure of a two-domain chitotriosidase from *Serratia marcescens* at 1.9 Å resolution, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97 (2000) 5842–5847.
- [27] F. Fusetti, H. Von Moeller, D. Houston, H.J. Rozeboom, B.W. Dijkstra, R.G. Boot, J.M.F.G. Aerts, D.M.F. Van Aalten, Structure of human chitotriosidase: implications for specific inhibitor design and function of mammalian chitinase-like lectins, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 25537–25544, <https://doi.org/10.1074/jbc.M201636200>.
- [28] A.C. Terwisscha Van Scheltinga, M. Hennig, B.W. Dijkstra, The 1.8 Å resolution structure of hevamine, a plant chitinase/lysozyme, and analysis of the conserved sequence and structure motifs of glycosyl hydrolase family 18, *J. Mol. Biol.* 262 (1996) 243–257, <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0510>.
- [29] D.M.F. van Aalten, D. Komander, B. Synstad, S. Gåseidnes, M.G. Peter, V.G.H. Eijnsink, Structural insights into the catalytic mechanism of a family 18 exochitinase, *Proc. Natl. Acad. Sci. Unit. States Am.* 98 (2001) 8979–8984.
- [30] K.A. Brameld, W.A. Goddard, Substrate distortion to a boat conformation at subsite -1 is critical in the mechanism of family 18 chitinases, *J. Am. Chem. Soc.* 120 (1998) 3571–3580, <https://doi.org/10.1021/ja972282h>.
- [31] J. Coines, M. Alfonso-Prieto, X. Biarnés, A. Planas, C. Rovira, Oxazolone or ox-azolinium ion? The protonation state and conformation of the reaction intermediate of chitinase enzymes revisited, *Chem. Eur. J.* 24 (2018) 19258–19265, <https://doi.org/10.1002/chem.201803905>.
- [32] B. Synstad, S. Gåseidnes, D.M.F. Van Aalten, G. Vriend, J.E. Nielsen, V.G.H. Eijnsink, Mutational and computational analysis of the role of conserved residues in the active site of a family 18 chitinase, *Eur. J. Biochem.* 271 (2004) 253–262, <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03923.x>.
- [33] G. Vaaje-Kolstad, S.J. Horn, M. Sørle, V.G.H. Eijnsink, The chitinolytic machinery of *Serratia marcescens* - a model system for enzymatic degradation of recalcitrant polysaccharides, *FEBS J.* 280 (2013) 3028–3049, <https://doi.org/10.1111/febs.12181>.
- [34] P. Purushotham, A.R. Podile, Synthesis of long-chain chitooligosaccharides by a hypertransglycosylating processive endochitinase of *Serratia proteamaculans* 568, *J. Bacteriol.* 194 (2012) 4260–4271, <https://doi.org/10.1128/JB.06473-11>.
- [35] H. Zakariassen, M.C. Hansen, M. Joranli, V.G.H. Eijnsink, M. Sørle, Mutational effects on transglycosylating activity of family 18 chitinases and construction of a hypertransglycosylating mutant, *Biochemistry* 50 (2011) 5693–5703.
- [36] W. Suginta, A. Vongsuwan, C. Songsiririthgul, J. Svasti, H. Prinz, Enzymatic properties of wild-type and active site mutants of chitinase A from *Vibrio carchariae*, as revealed by HPLC-MS, *FEBS J.* 272 (2005) 3376–3386, <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04753.x>.
- [37] K. Suma, A.R. Podile, Chitinase A from *Stenotrophomonas maltophilia* shows transglycosylation and antifungal activities, *Bioresour. Technol.* 133 (2013) 213–220, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.103>.
- [38] B. Aguilera, K. Ghauharali-van der Vlugt, M.T.J. Helmond, J.M.M. Out, W.E. Donker-Koopman, J.E.M. Groener, R.G. Boot, G.H. Renkema, G.A. Van der Marel, J.H. Van Boom, H.S. Overkleef, J.M.F.G. Aerts, Transglycosidase Activity of Chitotriosidase: improved enzymatic assay for the human macrophage chitinase, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 40911–40916, <https://doi.org/10.1074/jbc.M301804200>.
- [39] J. Madhupratkash, K. Tanneeru, P. Purushotham, L. Guruprasad, A.R. Podile, Transglycosylation by Chitinase D from *Serratia proteamaculans* improved through altered substrate interactions, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 44619–44627, <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.400879>.
- [40] S. Kobayashi, T. Kiyosada, S. Shoda, Synthesis of artificial Chitin: irreversible catalytic behavior of a glycosyl hydrolase through a transition state analogue substrate, *J. Am. Chem. Soc.* 118 (1996) 13113–13114.
- [41] H. Ochiai, M. Ohmae, S. Kobayashi, Enzymatic glycosidation of sugar oxazolines having a carboxylate group catalyzed by chitinase, *Carbohydr. Res.* 339 (2004) 2769–2788, <https://doi.org/10.1016/j.carres.2004.08.016>.
- [42] A. Makino, M. Ohmae, S. Kobayashi, Synthesis of fluorinated chitin derivatives via enzymatic polymerization, *Macromol. Biosci.* 6 (2006) 862–872, <https://doi.org/10.1002/mabi.200600128>.
- [43] A. Makino, H. Nagashima, M. Ohmae, S. Kobayashi, Chitinase-catalyzed synthesis of an alternately N-sulfonated chitin derivative, *Biomacromolecules* 8 (2007) 188–195, <https://doi.org/10.1021/bm0609240>.
- [44] S. Kobayashi, A. Makino, H. Matsumoto, S. Kunii, M. Ohmae, T. Kiyosada, K. Makiguchi, A. Matsumoto, M. Horie, S.I. Shoda, Enzymatic polymerization to novel polysaccharides having a glucose-N-acetylglucosamine repeating unit, a cellulose-chitin hybrid polysaccharide, *Biomacromolecules* 7 (2006) 1644–1656, <https://doi.org/10.1021/bm060094q>.
- [45] L.F. Mackenzie, Q. Wang, R.A.J. Warren, S.G. Withers, Glycosynthases: mutant glycosidases for oligosaccharide synthesis, *J. Am. Chem. Soc.* 120 (1998) 5583–5584, <https://doi.org/10.1021/ja980833d>.
- [46] C. Malet, A. Planas, From β -glucanase to β -glucosynthase: glycosyl transfer to α -glycosyl fluorides catalyzed by a mutant endoglucanase lacking its catalytic nucleophile, *FEBS Lett.* 440 (1998) 208–212, [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)01448-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)01448-3).
- [47] A. Planas, M. Fajjes, V. Codera, When enzymes do it better: enzymatic glycosylation methods, in: Laura Cipolla (Ed.), *Carbohydr. Chem. State Art Challenges Drug Dev. An Overv. Struct. Biol. Roles, Synth. Methods Appl. As Ther. Imperial College Press, London*, 2015, pp. 215–245.
- [48] M. Umekawa, W. Huang, B. Li, K. Fujita, H. Ashida, L.-X. Wang, K. Yamamoto, Mutants of *Mucor hiemalis* endo-beta-N-acetylglucosaminidase show enhanced transglycosylation and glycosynthase-like activities, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 4469–4479, <https://doi.org/10.1074/jbc.M707137200>.
- [49] F. Tang, L.X. Wang, W. Huang, Chemoenzymatic synthesis of glycoengineered IgG antibodies and glycosite-specific antibody-drug conjugates, *Nat. Protoc.* 12 (2017) 1702–1721, <https://doi.org/10.1038/nprot.2017.058>.
- [50] Q. Yang, L.X. Wang, Chemoenzymatic glycan remodeling of natural and recombinant glycoproteins, *Methods Enzymol.* Academic Press, 2017, pp. 265–281, <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2017.06.006>.
- [51] S. ichiro Shoda, M. Fujita, C. Lohavisavanich, Y. Misawa, K. Ushizaki, Y. Tawata, M. Kuriyama, M. Kohri, H. Kuwata, T. Watanabe, Efficient method for the elongation of the N-acetylglucosamine unit by combined use of chitinase and β -galactosidase, *Helv. Chim. Acta* 85 (2002) 3919–3936, [https://doi.org/10.1002/1522-2675\(200211\)85:11<3919::AID-HLCA3919>3.0.CO](https://doi.org/10.1002/1522-2675(200211)85:11<3919::AID-HLCA3919>3.0.CO).
- [52] T. Usui, H. Matsui, K. Isobe, Enzymic synthesis of useful chito-oligosaccharides utilizing transglycosylation by chitinolytic enzymes in a buffer containing ammonium sulfate, *Carbohydr. Res.* 203 (1990) 65–77, [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(90\)80046-6](https://doi.org/10.1016/0008-6215(90)80046-6).
- [53] T. Usui, Y. Hayashi, F. Nanjo, K. Sakai, Y. Ishido, Transglycosylation reaction of a chitinase purified from *Nocardia orientalis*, *BBA - Gen. Subj.* 923 (1987) 302–309, [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(87\)90017-1](https://doi.org/10.1016/0304-4165(87)90017-1).
- [54] F. Nanjo, K. Sakai, M. Ishikawa, K. Isobe, T. Usui, Properties and transglycosylation reaction of a chitinase from *Nocardia orientalis*, *Agric. Biol. Chem.* 53 (1989)

- 2189–2195, <https://doi.org/10.1080/00021369.1989.10869627>.
- [55] J. Madhuprakash, B. Dalhus, T.S. Rani, A.R. Podile, V.G.H. Eijsink, M. Sørlie, Key residues affecting transglycosylation activity in family 18 chitinases: insights into donor and acceptor subsites, *Biochemistry* 57 (2018) 4325–4337, <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.8b00381>.
- [56] H. Zakariassen, M.C. Hansen, M. Jøranli, V.G.H. Eijsink, M. Sørlie, Chitinases and construction of a hypertransglycosylating mutant, *Biochemistry* (2011) 5693–5703.
- [57] E. Bokma, H.J. Rozeboom, M. Sibbald, B.W. Dijkstra, J.J. Beintema, Expression and characterization of active site mutants of hevamine, a chitinase from the rubber tree *Hevea brasiliensis*, *Eur. J. Biochem.* 269 (2002) 893–901, <https://doi.org/10.1046/j.0014-2956.2001.02721.x>.
- [58] P. Sirimontree, W. Suginta, N. Sritho, Y. Kanda, S. Shinya, T. Ohnuma, T. Fukamizo, Mutation strategies for obtaining chitoooligosaccharides with longer chains by transglycosylation reaction of family GH18 chitinase, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 78 (2014) 2014–2021, <https://doi.org/10.1080/09168451.2014.948373>.
- [59] T. Matsumoto, T. Nonaka, M. Hashimoto, T. Watanabe, Y. Mitsui, Three-dimensional structure of the catalytic domain of chitinase A1 from *Bacillus circulans* WL-12 at a very high resolution, *Proc. Japan Acad. Ser. B-Physical Biol. Sci.* 75 (1999) 269–274, <https://doi.org/10.2183/pjab.75.269>.
- [60] J. Madhuprakash, A. Singh, S. Kumar, M. Sinha, P. Kaur, S. Sharma, A.R. Podile, T.P. Singh, Structure of chitinase D from *Serratia proteamaculans* reveals the structural basis of its dual action of hydrolysis and transglycosylation, *Int. J. Biochem. Mol. Biol.* 4 (2013) 166–178.
- [61] T. Nakamura, S. Mine, Y. Hagihara, K. Ishikawa, K. Uegaki, Structure of the catalytic domain of the hyperthermophilic chitinase from *Pyrococcus furiosus*, *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 63 (2007) 7–11, <https://doi.org/10.1107/S1744309106051773>.
- [62] G.T. Beckham, S.J. Horn, V.G.H. Eijsink, J. Baban, B. Dalhus, M. Sørlie, A.S. Arvai, G. Vaaje-Kolstad, C.M. Payne, M. Björås, P.H. Backe, Hallmarks of processivity in glycoside hydrolases from crystallographic and computational studies of the *Serratia marcescens* chitinases, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 36322–36330, <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.402149>.
- [63] QuikChange® II XL Site-Directed Mutagenesis Kit, <https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/200523.pdf>, Accessed date: 7 January 2019.
- [64] C. Sasaki, A. Yokoyama, Y. Itoh, M. Hashimoto, T. Watanabe, T. Fukamizo, Comparative study of the reaction mechanism of family 18 chitinases from plants and microbes, *J. Biochem.* 131 (2002) 557–564, <https://doi.org/10.1242/jeb.068544>.
- [65] T. Tanaka, T. Fukui, T. Imanaka, Different cleavage specificities of the dual catalytic domains in chitinase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis* KOD1, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 35629–35635, <https://doi.org/10.1074/jbc.M105919200>.