



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

Delimitando la región N-terminal involucrada en
la procesividad de la levansacarasa LevS de
Leuconostoc mesenteroides.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO QUÍMICO

PRESENTA:

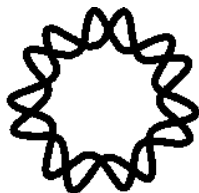
SALVADOR MARTÍNEZ BAHENA

ASESOR EXTERNO

Dra. Clarita Olvera Carranza

ASESOR INTERNO

Mtro. Daniel Morales Guzmán





A mis padres...



AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Clarita Olvera por haberme recibido en su grupo de trabajo, permitirme realizar mi tesis de licenciatura, pero, aún más importante, por introducirme y guiarme en el fantástico mundo de las enzimas.

A la futura Dra. Flor de María por introducirme e instruirme en las distintas etapas de mi trabajo, por los momentos divertidos dentro y fuera del instituto, junto con el Dr. Enrique Raga y el M. en C. Juan Montor, los tres grandes pilares a mi llegada al laboratorio de polímeros biocompatibles.

A todos los miembros del LINPI 3 desde que aparecí en el instituto, Maira, Carlos, Jazmín, Grissel, Ari, Julia y la Dra. Dulce por todos los divertidos momentos y el armonioso trabajo en equipo dentro del grupo COC.

A la Dra. Marcela Ayala por todos sus aportes a mi trabajo y formación, así como a su grupo (los radicales), Rosa, Ezekio, Prís, Gus y Alina, por sus atenciones, aportes y amabilidad conmigo durante mi estancia.

A mis dos grandes y queridos amigos que la vida me concedió: Mary De La Luz y Gustavo Ruiz Ponce, son un ejemplo para mí, su amistad un tesoro y sus ánimos un fuerte y constante impulso en mi camino.

A mi padre, madre y hermano, por todo el apoyo, cariño y confianza en mí, de no ser por ustedes no estaría donde actualmente me encuentro, mi agradecimiento hacia ustedes es tan profundo que el límite del lenguaje me impide expresar.

A mis profesores de química de la licenciatura, ya que gracias a ellos me enamore de mi carrera.

A todos mis amigos.

Este proyecto fue financiado por UNAM (PAPIIT 216120). Agradecemos a la Biol. Rosa Román Miranda por el apoyo técnico brindado. Además, agradecemos al Laboratorio de Polímeros Biocompatibles liderado por la Dra., Clarita Olvera Carranza por toda la confianza, apoyo y conocimiento para desarrollar este trabajo.

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS.....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
ÍNDICE DE TABLAS.....	vii
ABREVIATURAS.....	viii
RESUMEN.....	x
I. Introducción.....	1
I.1 Fructansacararas	1
I.2 Mecanismo molecular de reacción de transfructosilación de las fructansacararas	4
I.3 Subsitios de unión a sustrato/producto en las fructansacararas.....	5
I.4 Mecanismo de elongación en las fructansacararas	7
I.5 Fructansacararas multidominio	9
II. Antecedentes	12
II.1 LevS de <i>Leuconostoc mesenteroides</i>.....	12
II.2 Estudio de los dominios adicionales de LevS.....	13
III. Objetivos	16
III.1 Objetivo general.....	16
III.2 Objetivos específicos	16
IV. Materiales y métodos	18
IV.1 Apartado de estudios computacionales	18
IV.1.1 Modelamiento por homología de la región N-terminal de LevS.....	18
IV.1.2 Evaluación de los modelos generados.....	18
IV.1.3 Estudio de la posible interacción entre los dominios de LevS	18
IV.2 Apartado de biología molecular	19
IV.2.1 Diseño de cebadores (primers).....	19
IV.2.2 Electroforesis de ácidos nucleicos.....	20
IV.2.3 Generación de las versiones truncadas a través de PCR.....	20
IV.2.4 Digestiones con enzimas de restricción	22
IV.2.5 Cepas utilizadas y condiciones de crecimiento	23
IV.2.6 Purificación de plásmido	23
IV.2.7 Clonación de las versiones truncadas en el vector pJET 1.2.....	24

IV.2.8 Subclonación de las versiones truncadas al vector de expresión.....	26
IV.3 Apartado de expresión de proteínas.....	28
IV.3.1 Expresión de LevS Δ N85C.....	28
IV.3.2 Expresión de LevS Δ N85C con barrido en la concentración de inductor	28
IV.3.3 Expresión de las versiones truncadas de LevS	28
IV.3.4 Extracción de proteínas.....	28
IV.3.5 Electroforesis de proteínas.....	29
IV.4 Apartado de ensayos enzimáticos	30
IV.4.1 Medición de la actividad enzimática.....	30
IV.4.2 Condiciones de las reacciones químicas catalizadas por las versiones truncadas de LevS	31
IV.5 Apartado de análisis de perfil de productos sintetizados por las versiones truncadas de LevS	31
IV.5.1 Análisis de polímero de alto y bajo peso molecular	31
IV.5.2 Análisis de FOS.....	31
IV.5.3 Análisis de hidrolisis-transferencia.....	32
V. RESULTADOS	33
V.1 Predicción de la estructura terciaria de la región N-terminal de la levansacarasa LevS.....	33
V.2 La región N-terminal contiene regiones intrínsecamente desordenadas.....	37
V.3 Diseño de las versiones truncadas en la región N-terminal de LevS	43
V.4 Construcción de las versiones truncadas en la región N-terminal de LevS.....	44
V.5 Expresión de forma recombinante de las versiones truncadas de LevS.	49
V.6 Caracterización de las versiones truncadas de LevS	52
V.6.1 Efecto de la remoción de las diferentes zonas de la región N- terminal de LevS en la conversión de sustrato y en la especificidad hacia la hidrólisis-transferencia.....	53
V.6.2 Efecto de la remoción de las diferentes zonas de la región N-terminal de LevS en el mecanismo de elongación.....	55
V.6.3 Síntesis de FOS de las versiones truncadas de LevS	58
VI. Discusión.....	63
VII. Conclusión.....	68
VIII. Bibliografía.....	69

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. ESQUEMA DE LAS REACCIONES CATALIZADAS POR LAS FRUCTANSACARASAS..	1
FIGURA 2. ESTRUCTURA TIPO B-PROPELA DE LAS FS	2
FIGURA 3. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LAS FRUCTANAS.	3
FIGURA 4. MECANISMO MOLECULAR DE REACCIÓN DE LAS FS.	5
FIGURA 5. SUBSITIOS DE UNIÓN EN LAS FS.	6
FIGURA 6. MECANISMO DE SINTESIS DE FRUCTANAS DE LAS FS.	8
FIGURA 7. FRUCTANSACARASAS MULTIDOMINIO.	10
FIGURA 8. FS Y GS RELACIONADAS.	12
FIGURA 9. DOMINIOS QUE CONFORMAN A LEVS	13
FIGURA 10. ESQUEMA DE LAS VERSIONES TRUNCADAS DE LEVS GENERADAS HASTA EL MOMENTO.	14
FIGURA 11. ESQUEMA DE TRABAJO DE LA ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.	17
FIGURA 12. VECTOR DE CLONACIÓN PJET/1.2/BLUNT	24
FIGURA 13. VECTOR DE EXPRESIÓN PET-22B(+).	26
FIGURA 14. MODELOS DE LEVS GENERADOS CON DISTINTOS SERVIDORES.	34
FIGURA 15. VISTAS DEL MODELO DE LEVS GENERADO POR I-TASSER.	37
FIGURA 16. AMINOÁCIDOS PRESENTES EN LA REGIÓN N-TERMINAL DE LEVS.	38
FIGURA 17. COMPOSICIÓN PORCENTUAL DE AMINOÁCIDOS EN LA REGIÓN N-TERMINAL DE LEVS.	40
FIGURA 18. ANÁLISIS DE PREDICCIÓN DE PROTEÍNAS DESORDENADAS DE LEVS EN IUPRED.	40
FIGURA 19. ANÁLISIS DE PREDICCIÓN DE PROTEÍNAS DESORDENADAS DE LEVS EN DISMETA.	41
FIGURA 20. SUT PREDICHOS PARA LEVS.	42
FIGURA 21. ANÁLISIS DE PREDICCIÓN DE SUT EN LEVS REALIZADA EN ANCHOR.	42
FIGURA 22. VERSIONES TRUNCADAS EN LA REGIÓN N-TERMINAL DE LEVS.	44
FIGURA 23. AMPLIFICACIÓN DE LAS VERSIONES TRUNCADAS DE LEVS.	45
FIGURA 24. REPRESENTACIÓN DE LA CONSTRUCCIÓN DE LAS VERSIONES TRUNCADAS EN EL VECTOR DE CLONACIÓN.	45
FIGURA 25. ELECTROFORESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS DE LAS CUATRO VERSIONES TRUNCADAS DE LEVS.	47
FIGURA 26. PATRÓN DE DIGESTIÓN DE LAS CONSTRUCCIONES EN EL VECTOR DE EXPRESIÓN.	49
FIGURA 27. BARRIDO DE IPTG PARA LA EXPRESIÓN DE $\Delta N85C$.	50
FIGURA 28. GEL DE EXPRESIÓN DE LAS CUATRO VERSIONES TRUNCADAS Y ZIMOGRAMA. EN LA IMAGEN.	52
FIGURA 29. RELACIÓN HIDRÓLISIS-TRANSFERENCIA DE LEVS ΔC .	53
FIGURA 30. RELACIÓN HIDRÓLISIS-TRANSFERENCIA DE LEVS N45C.	54
FIGURA 31. RELACIÓN HIDRÓLISIS-TRANSFERENCIA DE LEVS $\Delta N85C$.	55
FIGURA 32. PRODUCCIÓN DE POLÍMERO DE ALTO PESO MOLECULAR DE LAS VERSIONES TRUNCADAS DE LEVS.	56
FIGURA 33. CROMATOGRAMA DEL PERFIL DE PRODUCTOS QUE PRESENTA LEVS ΔC .	59
FIGURA 34. CROMATOGRAMA DEL PERFIL DE PRODUCTOS QUE PRESENTA LEVS $\Delta N45C$.	61
FIGURA 35. CROMATOGRAMA DEL PERFIL DE PRODUCTOS QUE PRESENTA LEVS $\Delta N85C$.	62
FIGURA 36. REPRESENTACIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN DE FOS SINTETIZADOS POR LAS DIFERENTES VERSIONES TRUNCADAS DE LEVS.	63
FIGURA 37. POSIBLE PLEGAMIENTO EN "U" DE LA LEVANSACARASA LEVS DE LEUCONOSTOC MESENTEROIDES.	67

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. HIDRÓLISIS Y TRANSFERENCIA DE LAS DIFERENTES VERSIONES TRUNCADAS DE LEVS.	15
TABLA 2. OLIGONUCLEÓTIDOS DISEÑADOS PARA GENERAR LAS VERSIONES TRUNCADAS DE LEVS.	19
TABLA 3. CONCENTRACIONES UTILIZADAS DE LOS DIFERENTES REACTIVOS NECESARIOS PARA LA PCR. 21	
TABLA 4. CONDICIONES TÉRMICAS UTILIZADAS EN EL ENSAYO DE PCR	21
TABLA 5. CONCENTRACIONES UTILIZADAS DE LOS DIFERENTES REACTIVOS NECESARIOS PARA LAS DIGESTIONES DOBLES.	22
TABLA 6. CONCENTRACIONES DE LOS REACTIVOS UTILIZADAS EN LA REACCIÓN DE LIGACIÓN.	25
TABLA 7. RECOPIACION DE LOS DATOS ANALIZADOS EN PROCHECK.	35
TABLA 8. RELACIÓN HIDROLISIS-TRANSFERENCIA DE LAS VERSIONES TRUNCADAS DE LEVS.	57

ABREVIATURAS

Å	Angstrom (longitud)
Aa	Aminoácido(s)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNS	Ácido-3,5-dinitrosalicílico
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfatos
DP	Grado de polimerización
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FOS	Fructooligosacáridos
Fs	Fructansacararas
Gs	Glucansacararas
HPAEC-PAD	Cromatografía de intercambio aniónico con detector de pulso amperométrico.
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
I.R.	Detector de infrarrojo
IDP	Proteína Intrínsecamente Desordenada
IDR	Región Peptídica Intrínsecamente Desordenada
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
kb	Kilobases
kDa	Kilodalton
mA	Miliamperios
nm	Nanómetros

PAPM	Polímero de alto peso molecular
pb	Pares de bases
PBPM	Polímero de bajo peso molecular
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RDP	Motivo Arg-Asp-Pro en fructansacarosas de GH68
RMN	Espectroscopía de resonancia magnética nuclear
RMSd	Desviación cuadrática media de las posiciones atómicas
rpm	Revoluciones por minuto
SUT	Sitios de unión teóricos desordenados a carbohidrato y/o proteína
UV	Radiación ultravioleta
WT	Wild type (Silvestre)
X	Cualquier aminoácido

RESUMEN

La levansacarasa LevS de *Leuconosctoc mesenteroides* NRRL B-512F es una fructansacarasa que cataliza la síntesis de fructanas transfiriendo el residuo fructosilo de la sacarosa a una molécula aceptora. Estas enzimas presentan una arquitectura multidominio, compuesta por la región N-terminal, dominio catalítico, región de transición y una región C-terminal. Se determinó que la región N-terminal está involucrada en la síntesis de fructanas de alto peso molecular, mediante un mecanismo procesivo. Con el objetivo de determinar si dentro de la región N-terminal existe una zona mínima responsable de la procesividad de esta enzima, se realizaron estudios *in silico* de esta región, para posteriormente delimitar esta zona de forma experimental. Los estudios *in silico* sugirieron que el extremo N-terminal podría ser una región intrínsecamente desordenada, con 5 sitios teóricos de unión a biomolécula. Con base en este hallazgo, se construyeron enzimas truncadas eliminando el SUT I y II de la región N-terminal. Estas versiones truncadas fueron caracterizadas con base en su perfil de productos, especificidad de reacción y regioselectividad. Este análisis reveló que los primeros dos SUT no son esenciales en el reconocimiento a sustrato, especificidad hacia reacción de hidrolisis-transferencia ni regioselectividad, pero tienen influencia en la síntesis de levanas de alto peso molecular. Estos resultados permitieron definir una región mínima indispensable para la elongación del polímero de alto peso molecular, que se denominó zona de procesividad. Estos resultados sugieren que las determinantes estructurales que rigen el mecanismo de elongación procesivo se encuentran dentro de esta zona. Este trabajo dio luz a las bases moleculares de la procesividad, que podría ser empleado en el diseño e ingeniería de enzimas, específicamente en fructansacarosas con estructuras definidas y propiedades enzimáticas controladas.

I. Introducción

I.1 Fructansacararas

Las fructansacararas (Fs) son un grupo de enzimas capaces de sintetizar polímeros de fructosa, conocidos como fructanas, empleando sacarosa como sustrato. Durante la reacción de síntesis de fructanas, la sacarosa, compuesta por una unidad de fructosa unida covalentemente a una glucosa, funciona como molécula donadora del residuo fructosilo. Al inicio de la reacción, la enzima interacciona con el sustrato, formando un intermediario covalente enzima-fructosa, con una concomitante liberación de una molécula de glucosa al medio de reacción. Este es el primer paso de la reacción, conocido como glicosilación. En un segundo paso, llamado desglicosilación, existen tres tipos de reacción que están en competencia, la naturaleza química de la molécula que fungirá como aceptor de la fructosa es lo que define cuál de las reacciones ocurrirá (Dedonder, 1966). Estas reacciones (Figura 1) engloban la posibilidad de obtener productos de reacción distintos: (i) reacción de polimerización, la cual ocurre cuando se transfieren unidades de fructosa

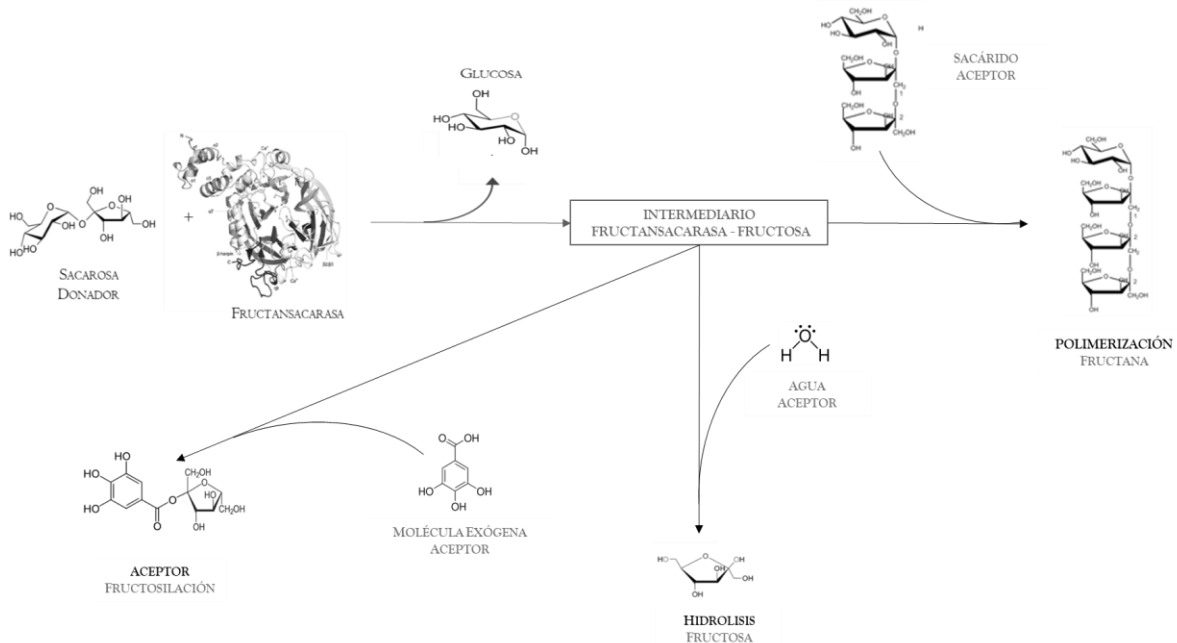


Figura 1. Esquema de las reacciones catalizadas por las Fructansacararas. Reacciones características de las Fs. Las flechas de color azul representan la etapa de glicosilación, mientras que las flechas verdes indican la etapa de desglicosilación.

provenientes de una molécula de sacarosa, a fructanas en crecimiento, (ii) hidrólisis, reacción que ocurre cuando la unidad de fructosa se transfiere a una molécula de agua que actúa como aceptora generándose así glucosa y fructosa libre, y (iii) reacción de aceptor, que ocurre cuando las unidades de fructosa se transfieren a moléculasceptoras exógenas (aglicón) al medio de reacción generando fructósidos (Chambert, Treboul & Dedonder, 1974)

Las Fs son enzimas producidas por microorganismos de forma extracelular o asociadas a pared celular. Basados en la secuencia aminoacídica y arquitectura estas enzimas están clasificadas dentro de la familia 68 de las glicosilhidrolasas (GH68). Estas, enzimas se caracterizan por tener un dominio catalítico que oscila entre 60 y 75 kDa, que posee una estructura tridimensional de tipo β -propela de cinco hojas, cada hoja presenta una topología en forma de "W" constituida de cuatro laminas β antiparalelas. Las cinco hojas en conjunto se pliegan formando un embudo central (Figura 2) donde se encuentra localizado el sitio catalítico (Pijning et al., 2011).

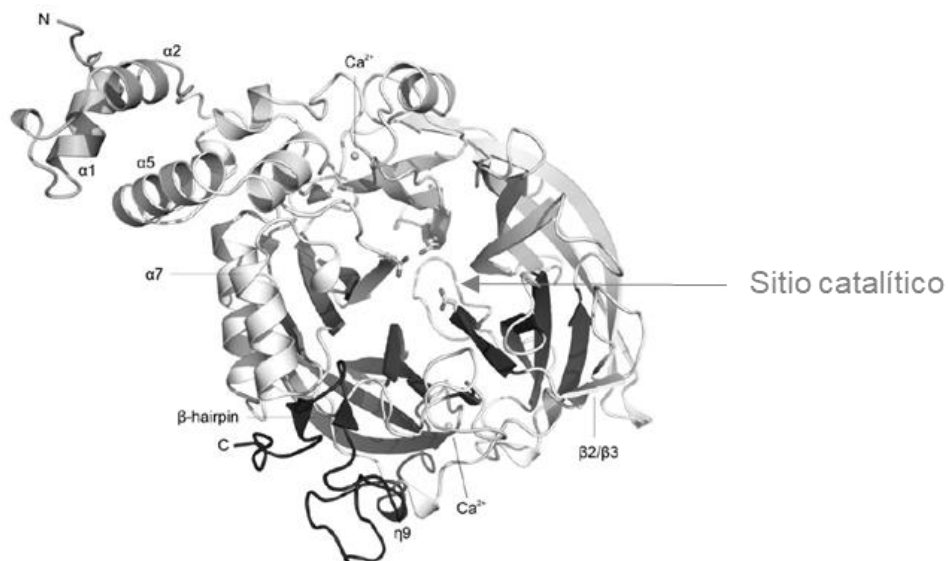


Figura 2. Estructura tipo β -propela de las Fs. Estructura cristalográfica de la inulosacarasa InuJ de *L. johnsonii* que muestra la topología β -propela (Pijning et al., 2011)

Las Fs también pueden ser clasificadas de acuerdo con la fructana que sintetizan, si bien la cadena principal de estos polímeros está compuesta por unidades de fructosa, la posición del enlace glicosídico puede variar. Las fructanas que poseen enlaces glicosídicos con posición $\beta(2\rightarrow6)$ en su cadena principal reciben el nombre de levanas (Figura 3A), y por consecuencia, las Fs responsables de su síntesis se llaman levansacarasas. Por otra parte, las fructanas que poseen enlaces glicosídicos en posición $\beta(2\rightarrow1)$ reciben el nombre de inulinas (Figura 3B), por lo que las enzimas involucradas en su síntesis se conocen como inulosacarasas (Banguela, 2006).

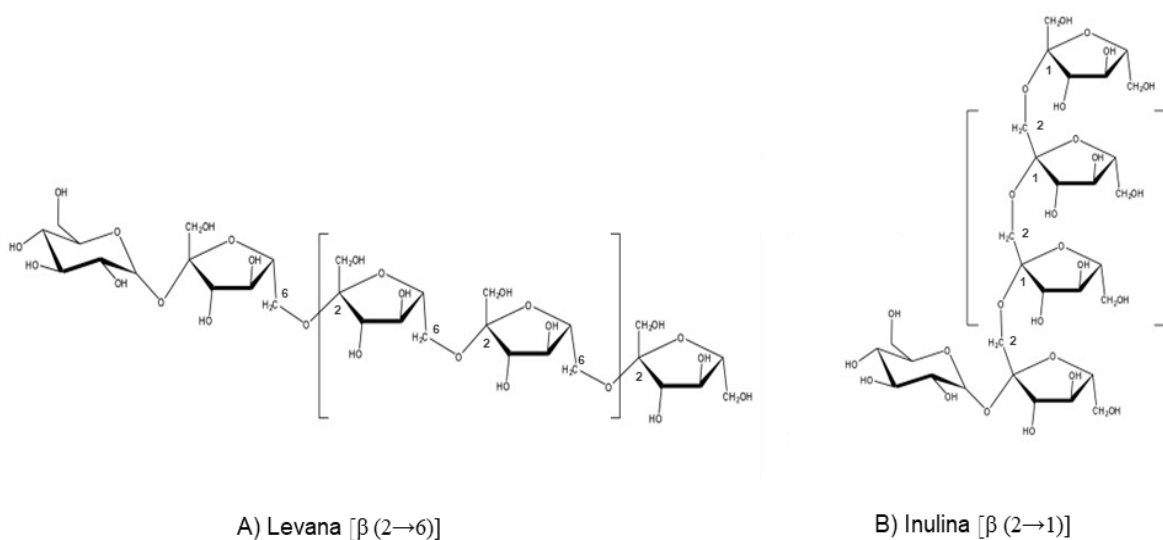


Figura 3. Estructura química de las fructanas. En la figura A (izquierda), se aprecia la estructura química de la levana con números en rojo indicando la posición del enlace con respecto a los carbonos del monosacárido, en la figura B se aprecia la estructura química de la inulina.

I.2 Mecanismo molecular de reacción de transfructosilación de las fructansacarasas

La síntesis de fructanas por parte de las Fs implica la ruptura y formación de nuevos enlaces, proceso que se describe como mecanismo de reacción. Este mecanismo involucra la participación de tres residuos catalíticos conocidos como “la triada catalítica”. Estos residuos desempeñan la función de nucleófilo, estabilizador del estado de transición y catalizador ácido-base (McIntosh et al., 1996). Al iniciar la reacción, la molécula donadora, por lo general una molécula de sacarosa, se acerca al sitio catalítico localizado al fondo del “embudo” de la enzima donde el nucleófilo, reconocido como ácido aspártico en su forma ionizada (aspartato) con la asistencia de su cadena lateral, realiza un ataque nucleofílico al carbono anomérico de la unidad de fructosa de la sacarosa. Al mismo tiempo, el residuo ácido-base, reconocido como ácido aspártico, cede un protón al oxígeno del enlace glicosídico de la molécula donadora, con la formación de un intermediario covalente Fs-fructosa (Figura 4A), esta reacción también permite la liberación de la unidad de glucosa al medio de reacción. En la segunda etapa conocida como desglucosilación (Figura 4B), el residuo ácido-base actúa como base removiendo un hidrógeno ácido de la molécula aceptora, lo que se traduce en la formación de una molécula con una carga formal negativa, que realiza un ataque nucleofílico sobre el carbono anomérico del intermediario covalente Fs-fructosa, causando la ruptura del intermediario y la transferencia de la unidad de fructosa a la molécula aceptora, con la regeneración de los residuos que actúan como catalizadores ácido-base y nucleofílico (Chambert & Gonzy-Treboul, 1976).

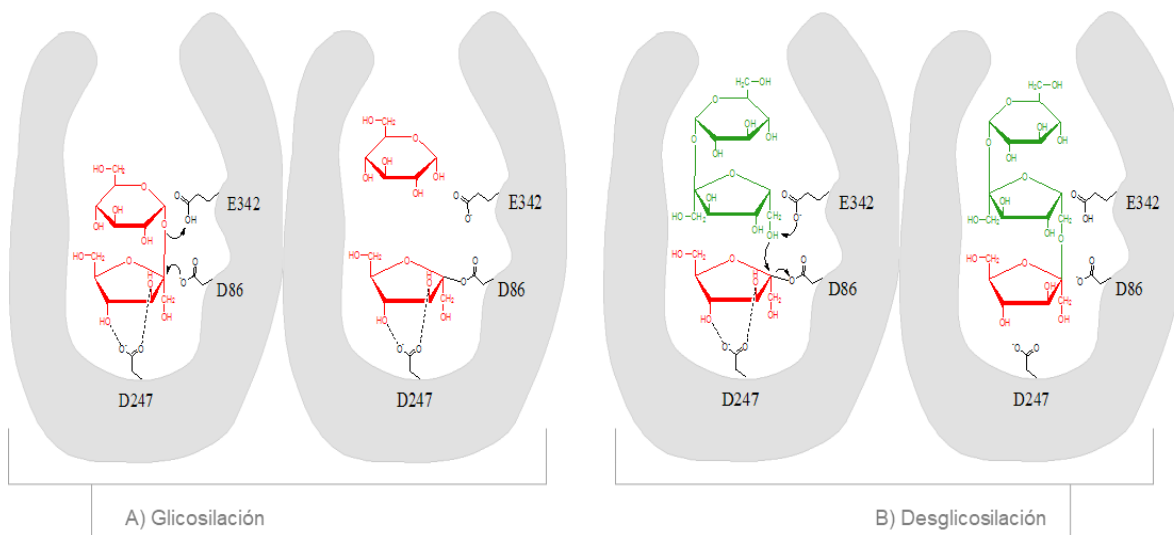


Figura 4. Mecanismo molecular de reacción de las Fs. Representación del mecanismo de reacción en dos etapas. (Raga Carbajal. 2015, Tesis doctoral).

I.3 Subsitios de unión a sustrato/producto en las fructansacarosas

Además de los residuos que participan en la catálisis de la reacción, más allá del sitio catalítico, se encuentran otros sitios que auxilian en el acomodo del sustrato en la cavidad catalítica y en la entrada de las moléculasceptoras (Figura 5C) para llevar a cabo las reacciones características de las Fs (Davies, Wilson & Henrissat, 1997). A través de interacciones intermoleculares, que comprenden desde interacciones hidrofóbicas del tipo π - π (stacking) entre residuos que contienen anillos aromáticos con el esqueleto cíclico de los monosacáridos (McGaughey, Gagné & Rappé, 1998), hasta puentes de hidrógeno directos y mediados por moléculas de agua (Meng & Futterer, 2003), en las cuales participan tanto las cadenas laterales de los residuos, así como los esqueletos de las mismas proteínas (grupos carbonilo y amida), estos residuos (Figura 5A) son conocidos como subsitios de unión a carbohidrato.

Por convención, los sacáridos se esquematizan con el extremo no reductor a la izquierda, mientras que el extremo reductor se localiza a la derecha. Las Fs obedecen el sistema de nomenclatura de subsitios de unión $-n$, $+n$, en el que la molécula a ser transferida se encuentra en el subsitio -1 y la molécula aceptora en

los subsitios con números positivos (+1, +2, etc., según la longitud del sacárido aceptor) como se muestra en la figura 5B (Davies, Wilson & Henrissat, 1997).

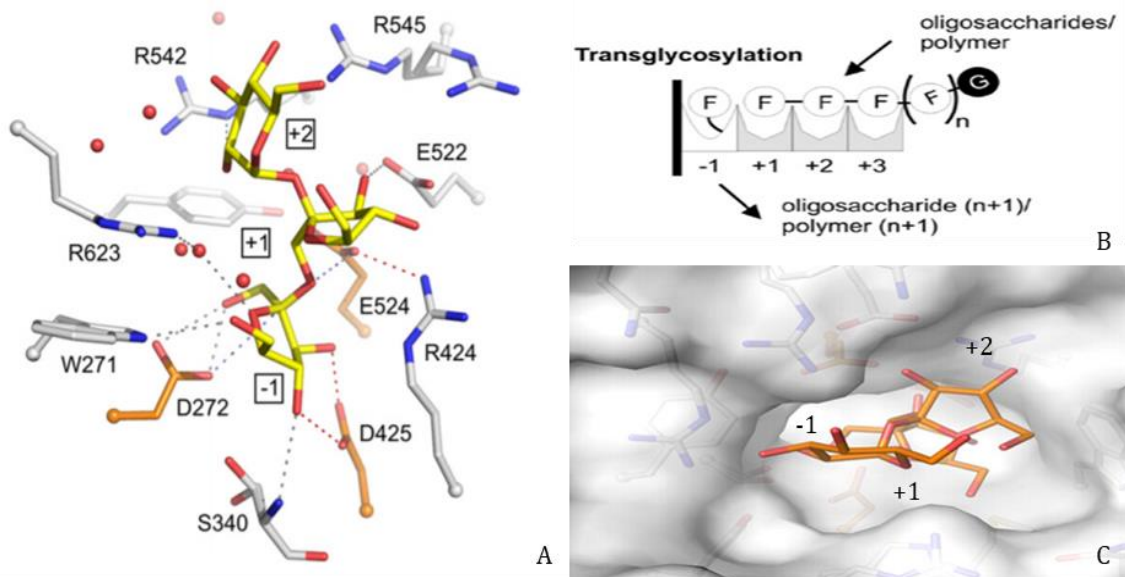


Figura 5. Subsitios de unión en las Fs. Esquemización de los subsitios de unión, a nivel molecular (A), en la reacción de transglicosilación (B) y presentación de los mismos subsitios en forma de superficie gris que acomodan al sustrato coloreado en naranja InuJ (C) (Pijning et al., 2011).

I.4 Mecanismo de elongación en las fructansacarosas

La reacción de polimerización de las Fs que se dirige hacia la síntesis de fructanas también está regida por otro mecanismo: el mecanismo de elongación, el cual puede tomar dos vías para la construcción de fructanas de diferente tamaño: El mecanismo procesivo y no procesivo (Horn, Sørli et al, 2012). En la figura 6 observamos en la parte superior un ciclo de reacción de polimerización en una levansacarasa, donde observamos que la enzima (E), interactúa con el sustrato, la sacarosa (S), dándose la interacción enzima-sustrato (ES), lo que resulta en la ruptura del enlace glicosídico con la posterior liberación de glucosa al medio de reacción (G), lo que se traduce en la formación de un intermediario covalente enzima-fructosa (EF). La molécula aceptora (Ln) a la que se le transferirá la fructosa presente en el intermediario EF, interacciona con este complejo (EL) realizándose la transferencia de la fructosa a la molécula aceptora en crecimiento con la posterior liberación de esta misma al medio de reacción y la regeneración del catalizador, que es la enzima (Raga-Carbajal et al., 2015)

Cuando las moléculas de fructosa se transfieren consecutivamente a una misma molécula de fructana en crecimiento o una molécula aceptora iniciadora de la síntesis de fructana, hasta que alcanza el tamaño adecuado y es liberado al medio de reacción, se dice que el mecanismo de elongación es procesivo (i). Cuando las unidades de fructosa se añaden a las fructanas circundantes en el medio de reacción con la liberación de la fructana en cada transferencia se propone que el mecanismo de elongación (Raga-Carbajal et al., 2015) es no procesivo (ii). Se ha reportado que en la fructansacarasa la síntesis del polímero de alto peso molecular se lleva a cabo mediante un mecanismo procesivo, mientras que los fructooligosacáridos (FOS) o polímero de bajo peso molecular se generan mediante un mecanismo no procesivo (Ozimek, 2006).

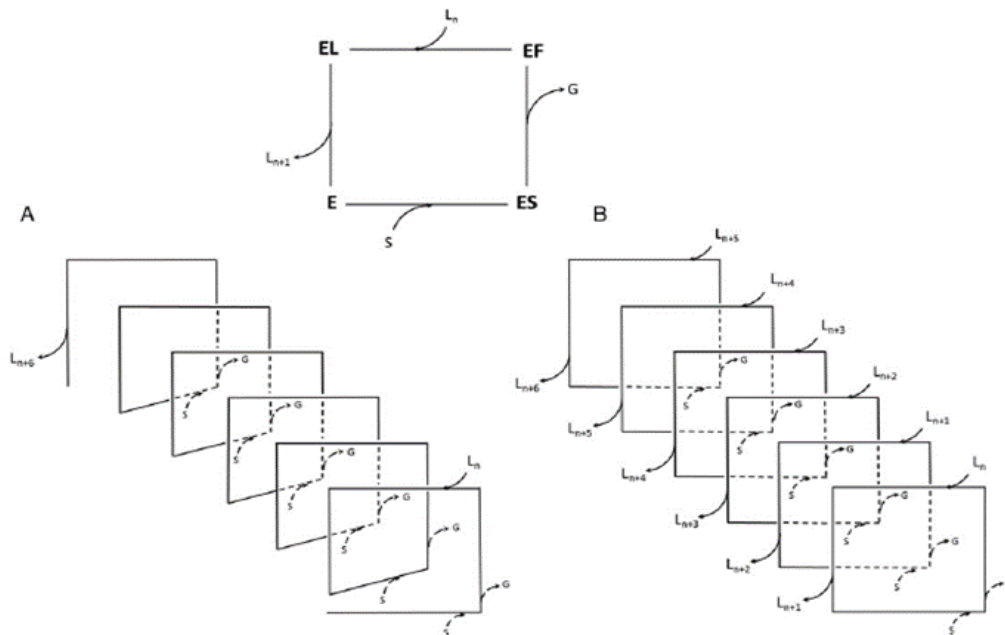


Figura 6. Mecanismo de síntesis de fructanas de las Fs. Comportamiento procesivo (A) y (B) no procesivo (Raga-Carbajal, 2016).

En la literatura se ha reportado que la variación en la concentración de enzima levansacarasa, durante la reacción enzimática puede modular el tamaño de las fructanas sintetizadas: una concentración baja de enzima produce fructanas de alto peso molecular (2300 kDa), mientras que una concentración elevada de la enzima produce FOS y fructanas con un peso molecular de 7.2 kDa (Raga Carbajal et al., 2015).

I.5 Fructansacarosas multidominio

Existen enzimas fructansacarosas unidominio que solo cuentan con el dominio catalítico y Fs multidominio que además del dominio catalítico poseen dominios adicionales (Figura 7), que comprenden a la región N-terminal, dominio catalítico y región C-terminal (Coutinho, 1999).

En las Fs multidominio, la región N-terminal presenta un tamaño de entre 150 y 200 aminoácidos aproximadamente, mientras que su composición aminoacídica es variable. El dominio catalítico descrito anteriormente, cuenta aproximadamente con 500 residuos, dentro de los que se encuentran los responsables de la catálisis de la reacción. Por otro lado, la región C-terminal, la cual se ha demostrado que tiene una función de anclaje a la pared celular, gracias a la presencia del motivo LPXTG, además de regiones repetidas que están relacionadas con la asociación a pared celular en la inulosacarasa (Del Moral y cols., 2008) y levansacarosas de *L. reuteri* 121 (Lee, Pancholi & Fischetti et al., 2002; van Hijum, Kralj, Ozimek, Dijkhuizen & van Geel-Schutten, 2006)

Ejemplo de estas son la levansacarasa Lev (Figura 7B), la cual sintetiza levana de dos masas moleculares distintas (150 kDa y 2MDa) e Inu (Figura 7C) que es capaz de sintetizar inulina de alto peso molecular (10^7 Da) y FOS (1-kestosa y 1,6-nistosa principalmente), ambas, aisladas de *Lactobacillus reuteri* 121 (van Hijum et al., 2002; van Hijum et al., 2004).

En 2010, Anwar et al., caracterizaron tres Fs, la primera fue una inulosacarasa aislada del organismo *Lactobacillus gasseri* DSM 20243 que llamaron InuGA. la segunda también una inulosacarasa de la cepa DSM 20604 denominada InuGB (Figura 7D y E respectivamente) y la tercera fue una levansacarasa LevG (Figura 7F) de la cepa DSM 20077. InuGA e InuGB poseen una región N-terminal variable de 168 aa, seguidos por el dominio catalítico con conformación β -propela, LevG también posee una región N-terminal variable de 153 aa, estas tres enzimas poseen una región C-terminal con repeticiones PXX y motivos LPKAG implicados en la unión a pared celular.

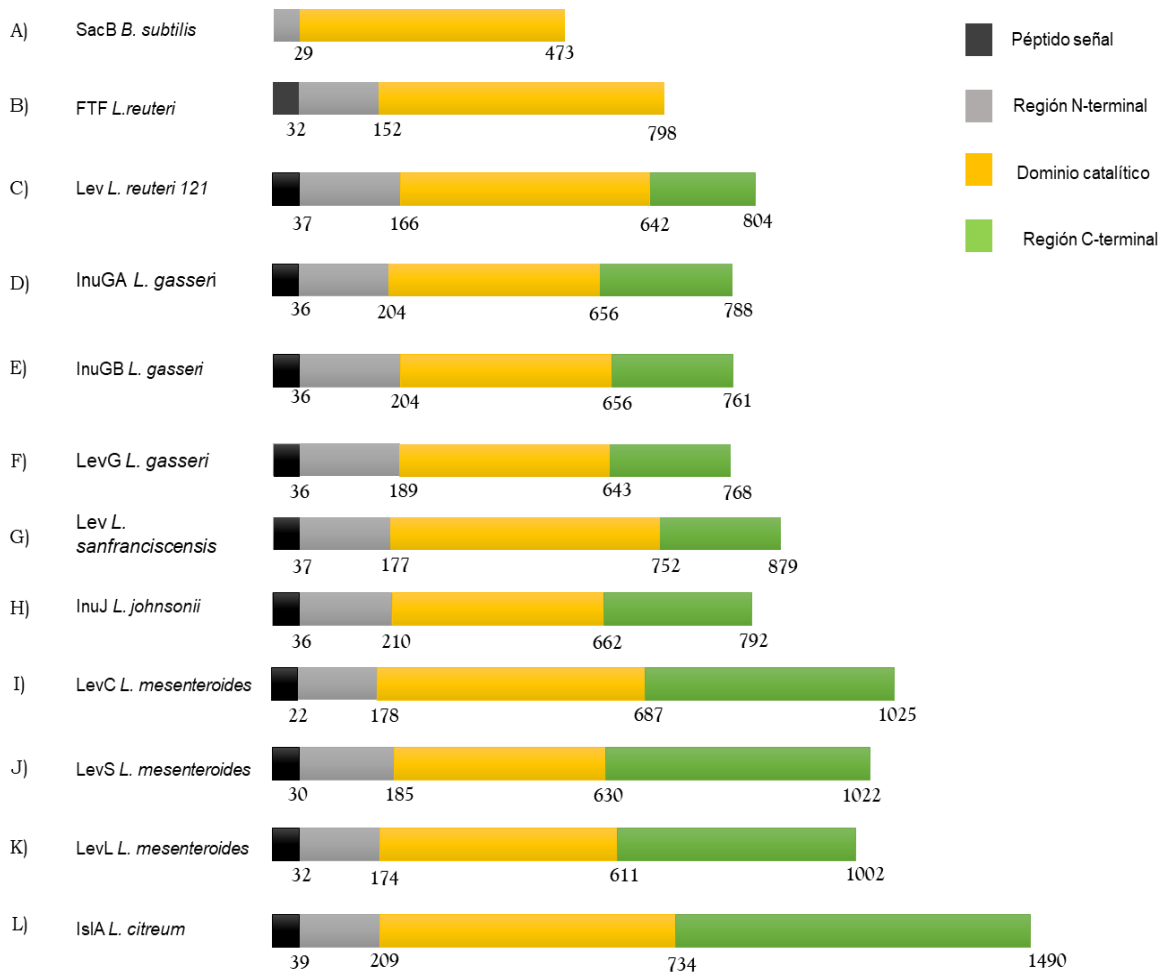


Figura 7. Fructansacarasas multidominio. Representación esquemática de la diversidad de fructansacarasas multidominio de origen microbiano

La levansacarasa de *Lactobacillus sanfranciscensis* TMW 1.392 (Figura 7G) fue aislada en 2004 por Tieking et al., enzima multidominio con un péptido-senal de 37 aminoácidos, una región N-terminal compuesta de 7 repeticiones de 16 residuos que no presentan similitud e identidad con las proteínas depositadas en la literatura, un dominio catalítico altamente conservado para las Fs de la familia GH68 y una región C-terminal, compuesta por 6 repeticiones de 12 aminoácidos de naturaleza PXX, además de encontrarse también en esta región los motivos LPXTG relacionados con su anclaje a pared celular. La inulosacarasa InuJ (Figura 7H) fue

identificada en 2008 de *Lactobacillus johnsonii* NCC 533, por Anwar et al., al caracterizarse se observó que esta enzima era capaz de sintetizar FOS de hasta DP 15 y polímero de 4×10^7 Da de tipo inulina. En 2011, Pijning et al., obtuvieron la estructura cristalográfica de esta enzima, en la que se describe una región N-terminal variable compuesta por 172 residuos, un dominio catalítico conservado (GH68) de 453 aminoácidos y una región C-terminal con un motivo de unión a pared celular y motivos PXX a lo largo de esta. En 2003, Olivares et al., caracterizaron la enzima IsIA de *Leuconostoc citreum* CW28, que codifica para una inulosacarasa multidominio (Figura 7L), que cuenta con una péptido señal de 39 aminoácidos, una región N-terminal variable de 170 aminoácidos, un dominio catalítico similar al de la levansacarasa de *Bacillus subtilis* y una región C-terminal con repeticiones en tándem que se ha sugerido podría estar involucrado como módulo de unión a glucano, esta enzima genera productos tipo inulina. Posteriormente, en 2006 Morales Arrieta et al., caracterizan la enzima LevS de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F, que es una levansacarasa que tiene un péptido señal de 30 residuos, una región N-terminal variable de 155 aminoácidos, un dominio catalítico compuesto por 445 aminoácidos y una región C-terminal compuesta por 500 residuos donde aparecen repeticiones de 90 residuos que se sugiere al igual que con IsIA, podrían estar involucrados como módulo de unión a carbohidrato, esta enzima recibe su nombre por su capacidad de sintetizar fructana tipo levana. Por otra parte, se identificaron y caracterizaron las enzimas LevC y LevL, levansacarasa multidominio. LevC posee un dominio N-terminal compuesto por 10 repeticiones de 13 aminoácidos en promedio, mientras que LevL posee una región N-terminal con una composición aminoacídica variable. Por otra parte, el dominio catalítico de LevL está conformado por 444 residuos, mientras que el de LevC tiene un dominio catalítico compuesto por 445 residuos, que comparte un 89% de identidad con LevS de *L. mesenteroides*, y, entre ellos poseen un 64% de identidad. Tanto LevC como LevL tienen un dominio C-terminal compuesto por un promedio de 500 residuos que guardan un 24% de identidad entre ellos (Olvera, Centeno-Leija & López-Munguía, 2006).

II. Antecedentes

II.1 LevS de *Leuconostoc mesenteroides*

Como ya se mencionó anteriormente, en 2006, Morales Arrieta et al., aislaron una Fs multidominio denominada LevS de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512-F, que cuenta con tres dominios, relacionados estructuralmente con las fructansacararas y glucansacararas (Figura 8), estas últimas, enzimas que pueden transferir residuos glucosilo empleando sacarosa como sustrato para sintetizar glucanos. La arquitectura de la enzima LevS consta de un dominio catalítico con 445 residuos relacionado con las enzimas pertenecientes a la familia 68 de las GH, una región de transición con 138 aminoácidos que se encuentra dentro de la región C-terminal, que está relacionada con los módulos de unión a glucano similares a los de las Gs y una región N-terminal variable compuesta por 155 aminoácidos, que está unida a 30 aminoácidos que funcionan como péptido-sígnal, ya que es una exoenzima.

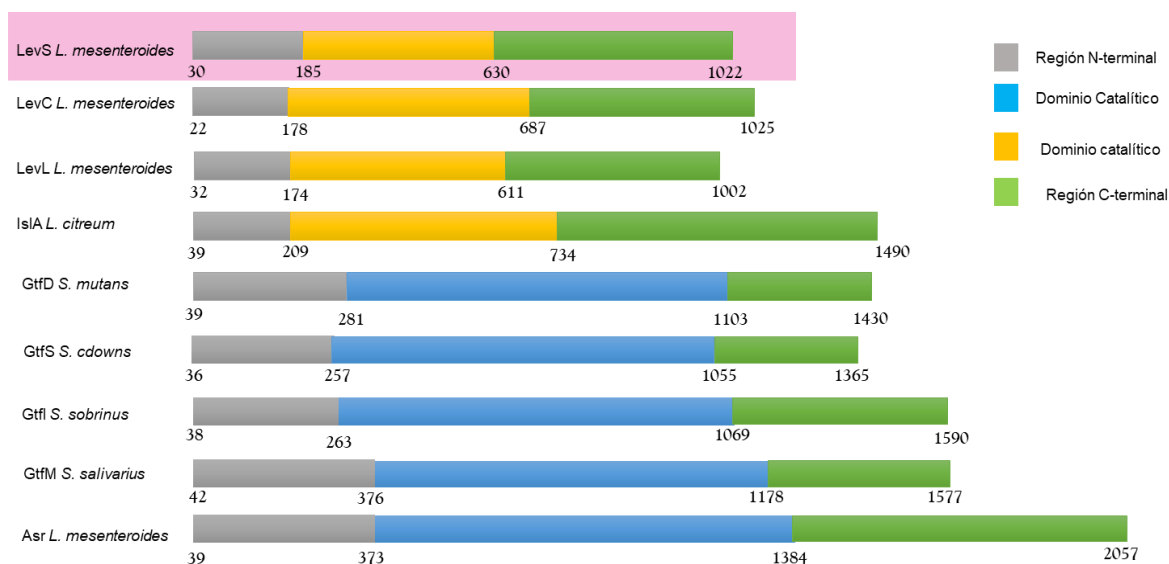


Figura 8. Fs y Gs relacionadas. Representación de las Fs y Gs relacionadas en cuanto a secuencia aminoacídica (Modificado de García Paz, 2019. Tesis de Doctorado).

En la figura 9, se representa a la enzima LevS madura, es decir, sin el péptido-señal que está unido a la región N-terminal, LevS posee un 53% de similitud entre su región N-terminal y la de LevC. El dominio catalítico, por otra parte, exhibe un 50% de similitud con el dominio catalítico de IsIA de *Leuconostoc citreum*, un 87% de identidad con el de LevC y 64% con el de LevL. Además, se observa que la región C-terminal comparte un 98% de identidad con el dominio C-terminal de LevC, 89% con el de LevL y en menor medida (25%) con el dominio de unión a glucano de las Gs del género *Streptococcus* y *Leuconostoc*. Una característica singular del dominio de unión a glucano de las Gs radica en la presencia de unidades de secuencia repetitivas (Russell, 1990), en LevS se encuentran tres repeticiones de 90 aminoácidos conservadas, el doble de la cantidad de aminoácidos reportada para Gs con un 75% de identidad entre ellas (Morales-Arrieta et al., 2006).

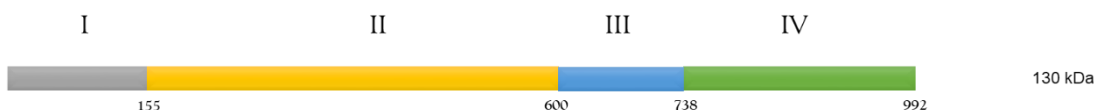


Figura 9. Dominios que conforman a LevS. (I) Dominio N-terminal [155 residuos, que incluye el péptido señal con 30aa], (II) dominio catalítico [445 residuos], (III) región de transición [138 residuos], y (IV) dominio C-terminal presentes en la proteína madura (sin péptido señal).

II.2 Estudio de los dominios adicionales de LevS

Con la finalidad de conocer la participación de los dominios adicionales en la reacción y síntesis de levanas, Morales Arrieta et al., en 2006 construyeron versiones truncadas eliminando diferentes dominios adicionales de esta levansacarasa (Figura 10A), una de estas versiones sufre la eliminación de 185 residuos, que abarcan la región N-terminal y el péptido-señal (Figura 10B), a la que se le denomina LevS Δ N con un peso molecular de aproximadamente 110 kDa. LevS Δ C es una versión truncada en la que se remueve la región C-terminal (Figura 10C) compuesta por 254 aminoácidos con un peso aproximado de 97 kDa. Finalmente, la versión LevS Δ TnC, que surge al eliminar la región C-terminal como la región de transición, esta última compuesta por 138 aminoácidos (Figura 10D),

arrojando una masa molecular de aproximadamente 85 kDa. Por último, se diseñó una versión truncada que cuenta únicamente con el dominio catalítico (Figura 10E), lo que significa que todos los dominios adicionales fueron removidos (N-terminal con el péptido-síñal, región de transición y la región C-terminal).

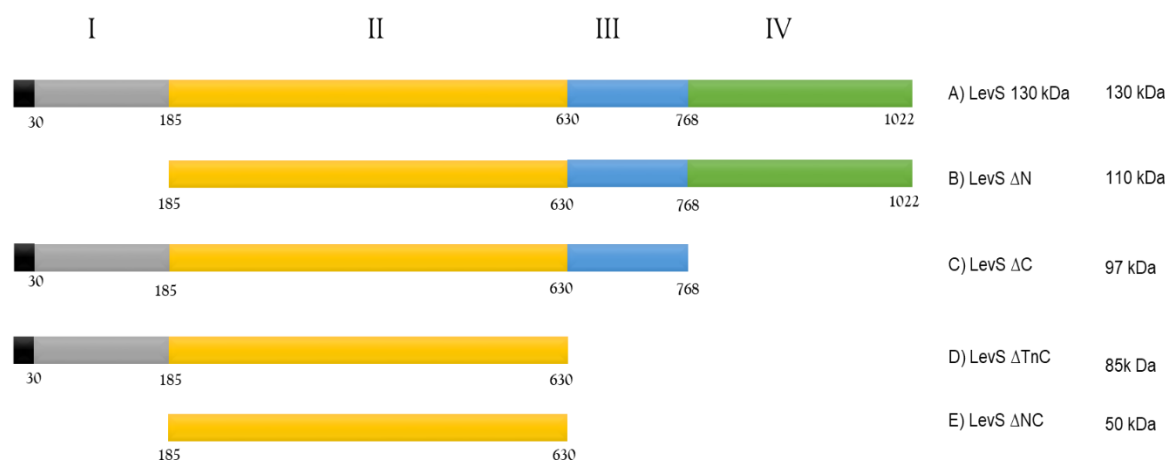


Figura 10. Esquema de las versiones truncadas de LevS generadas hasta el momento.

Posteriormente, se evaluó la capacidad de sintetizar polímero de alto y de bajo peso molecular de estas versiones truncadas, además de su capacidad de hidrolizar/transferir su sustrato (García-Paz F., 2019, Tesis doctoral). Como podemos observar en todas las versiones truncadas hay un efecto en la tasa de hidrólisis (Tabla 1), lo que sugiere que los dominios adicionales están involucrados en la actividad transferasa, siendo la región de transición esencial para la elongación del polímero. Sin embargo, lo más interesante es que en las versiones con la deleción en la región N-terminal, se observa un cambio en el perfil de productos produciéndose una mayor proporción de compuestos de bajo peso molecular que de alto peso molecular, estos resultados sugieren que la región N-terminal parece estar involucrada en la procesividad de la enzima.

Tabla 1. Hidrólisis y transferencia de las diferentes versiones truncadas de LevS. Los valores en la tabla reflejan el porcentaje de sacarosa utilizada para la hidrólisis y la síntesis de polímero y FOS de una concentración inicial de 0.29M en el inicio de la reacción (García Paz, 2016)

Versión de LevS	Polímero de alto peso molecular	Productos de bajo peso molecular	Hidrólisis
LevS (WT)	64.4 ± 0.45	0.6 ± 0.13	35 ± 0.40
LevS ΔC	47.1 ± 0.10	0.9 ± 0.42	52 ± 0.10
LevS ΔTnC	5.7 ± 0.08	9.3 ± 0.03	85 ± 0.10
LevS ΔN	4.8 ± 0.27	46.2 ± 0.73	49 ± 0.50
LevS ΔNTnC	0	38.7 ± 0.44	61.3 ± 0.30

En consecuencia, la eliminación de la región N-terminal en la levansacarasa LevS modificó el mecanismo de elongación de la enzima, de procesivo a no procesivo. Actualmente no existe información que explique cómo la región N-terminal está involucrada en la procesividad de la enzima, sin embargo, se sugiere que esta región podría participar como un subsitio de unión al aceptor o al producto. Por lo tanto, en este trabajo se plantea realizar estudios identificando la región N-terminal mínima involucrada en el mecanismo de elongación de estas enzimas que nos permita a futuro identificar nuevos sitios de unión a sustrato que participen en los mecanismos de elongación de enzima y así profundizar en el conocimiento de las reacciones que estas fructansacarosas multidominio realizan.

Hipótesis

La región N-terminal de la levansacarasa LevS de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512-F alberga una región mínima involucrada en la procesividad de esta enzima.

III. Objetivos

III.1 Objetivo general

Delimitar la región N-terminal involucrada en el mecanismo de elongación de la levansacarasa LevS de *L. mesenteroides*.

III.2 Objetivos específicos

- 1) Predicción con base a modelos, el plegamiento de la región N-terminal de LevS.
- 2) Diseño y construcción de versiones truncadas en la región N-terminal de LevS.
- 3) Expresión de forma recombinante de las versiones truncadas.
- 4) Caracterización en cuanto al perfil de productos de las versiones truncadas.

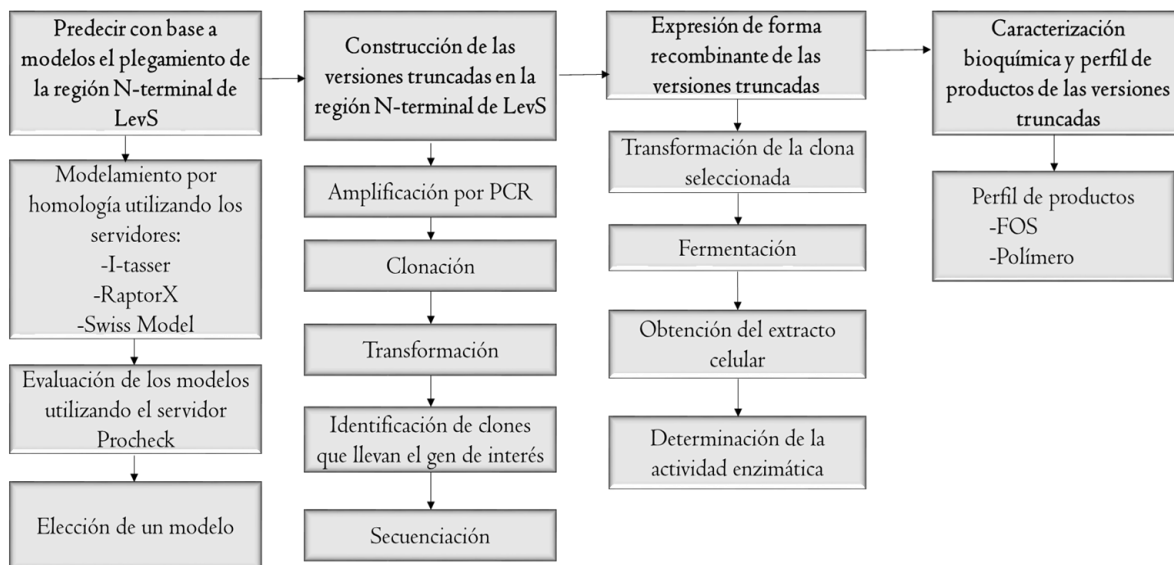


Figura 11. Esquema de trabajo de la estrategia experimental.

IV. Materiales y métodos

IV.1 Apartado de estudios computacionales

IV.1.1 Modelamiento por homología de la región N-terminal de LevS

Se depositó la secuencia aminoacídica de LevS en los servidores I-tasser (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER>), Raptor X (<http://raptorx.uchicago.edu>) y Swiss Model (<https://swissmodel.expasy.org>) con el fin de obtener la construcción de modelo por homología que revelara el ordenamiento en el espacio de la región N-terminal conjugada a los demás dominios de la enzima.

IV.1.2 Evaluación de los modelos generados

Generados los modelos con estos servidores, se eligió el mejor entre los tres más destacados que los servidores proporcionaban con base al puntaje que otorga a cada uno el propio servidor, posterior a esto, se evaluó la calidad estereoquímica de cada modelo representante por servidor, con ayuda de PROCHECK, a excepción del modelo generado por Robetta.

IV.1.3 Estudio de la posible interacción entre los dominios de LevS

Obtenidos los puntajes correspondientes a cada modelo, se realizó un análisis de la posible interacción entre los dominios adicionales y el catalítico, además de la organización de la región N-terminal y el tipo de plegamiento proporcionado por los servidores, todo esto, con ayuda del software PyMOL.

IV.2 Apartado de biología molecular

IV.2.1 Diseño de cebadores (primers)

Con el fin de obtener las construcciones deseadas, se diseñaron primers específicos para cada construcción, con base a la secuencia nucleotídica de LevS de *L. mesenteroides* reportado por Morales Arrieta y cols., en 2006 que se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Oligonucleótidos diseñados para generar las versiones truncadas de LevS.

Primer	Sentido	Secuencia Nucleotídica [5'→3']	Sitio de restricción acoplado	T _m [°C]	Construcción blanco del primer
SPS	Forward	CACCC <u>CATATG</u> GATACTACGAACAGTACAAC CT	NdeI	59.9	LevS SPS y ΔC
N45	Forward	CACCC <u>CATATG</u> AGTGATGATAGCAATTCTAACTCAGC	NdeI	60.9	ΔN45 y ΔN45C
N85	Forward	CACCC <u>CATATG</u> ACAACATCAACTACCGCA	NdeI	60.5	ΔN85 y ΔN85C
43r	Reverse	<u>CTCGAG</u> ACGTAAGTAATATGTGCCATCA TTACC	XhoI	59.6	LevS SPS, ΔN45 y ΔN85
STn	Reverse	<u>CTCGAG</u> ATCCGTTACATCTTGTAAGTAA CC	XhoI	59.6	ΔN45C, ΔN85C, ΔC y ΔNC

T_m: Temperatura de alineamiento

Estos cebadores fueron diseñados con sitios de restricción NdeI y XhoI para delimitar la secuencia nucleotídica de interés, además de que se aprovechó que estos sitios no aparecen a lo largo del gen de LevS por lo que no representa un problema, y se utilizó la naturaleza del sitio NdeI que contiene en su secuencia un codón de inicio (CATATG), esto con el objetivo de poder utilizarlos como herramientas para trasladar las versiones truncadas entre un vector y otro según se requiera.

IV.2.2 Electroforesis de ácidos nucleicos

Esta técnica se llevó a cabo en geles de agarosa al 0.8% p/v (agarosa: buffer TAE 1X), siendo esta última, una solución compuesta por EDTA, TRIS base y ácido acético glacial. Se utilizó una corriente eléctrica de 100V con amperaje constante durante aproximadamente 1 hora para geles grandes (10 x 10cm) y 30 minutos para geles pequeños (7.5 x 6cm). Las muestras se colocaron con ayuda de un buffer de carga, y un marcador de peso molecular para poder discernir el tamaño de las muestras, se adicionó un intercalante (EVAGREEN) para poder observar las bandas de DNA con ayuda de luz UV en un equipo transiluminador.

IV.2.3 Generación de las versiones truncadas a través de PCR

La generación de los amplicones se realizó utilizando la enzima Vent® DNA Polymerase (New England Biolabs® Inc.). La reacción se realizó utilizando como DNA molde el gen de LevS silvestre que se encuentra en el vector de expresión pBAD/TOPO, el buffer de la enzima fue enriquecido a una concentración final de 2 mM de MgSO₄, la mezcla de dNTP es Thermo Scientific™ y el agua utilizada es tetradestilada y esterilizada. Los detalles de la misma se muestran en la tabla 3.

La reacción de PCR se ensayó utilizando un gradiente de temperatura para encontrar las condiciones térmicas óptimas, el gradiente abarcaba las temperaturas de 54, 56, 58, 60 y 62 °C, posterior a esto se establecieron las condiciones en las que operaría el termociclador T100 thermal cycler de BioRad®, las cuales se describen en la tabla 4.

Tabla 3. Concentraciones utilizadas de los diferentes reactivos necesarios para la PCR.

Reactivo	Concentración Inicial	Concentración Final	Volumen
DNA molde	200 ng/ μ L	200 ng	1 μ L
Buffer ThermoPol [®]	10X	1X	5 μ L
Mezcla de dNTPs	25mM	0.25mM	0.5 μ L
Cebador Forward	10 μ M	0.2 μ M	1 μ L
Cebador Reverse	10 μ M	0.2 μ M	1 μ L
Vent [®] Polimerasa	2 U/ μ L	2U	1 μ L
Agua Estéril	xx	xx	40 μ L
Volumen de Reacción			50 μ l aprox.

Tabla 4. Condiciones térmicas utilizadas en el ensayo de PCR

Etapa del Proceso	Tiempo	Temperatura	Ciclos
Desnaturalización Inicial	7 minutos	94 °C	1x
Desnaturalización	1 minuto	94 °C	30x
Alineamiento	1 minuto	60 °C	
Extensión	2 minutos	72 °C	
Extensión Final	7 minutos	72 °C	1x

IV.2.4 Digestiones con enzimas de restricción

Se utilizaron las endonucleasas de restricción NdeI (CATATG) y XhoI (CTCGAG) ambas de Thermo Scientific™, para poder clonar y trasladar los fragmentos de DNA de las versiones truncadas según se necesitara. Las condiciones para estas digestiones dobles (pJET 1.2/blunt y pET-22b(+)) se muestran en la tabla 5, siendo el DNA problema las diferentes versiones truncadas de LevS y el vector de expresión pET-22b(+), los volúmenes de agua y de DNA variaban de acuerdo a la concentración en que se encontraban y se ajustaban (H₂O) para cada ensayo.

Tabla 5. Concentraciones utilizadas de los diferentes reactivos necesarios para las digestiones dobles.

Reactivo	Concentración Empleada	Volumen
DNA problema	Aprox. 1 µg	xx µL
NdeI	2 U	0.2 µL
XhoI	2 U	0.2 µL
Buffer de reacción	1X	2 µL
Agua Estéril	xx	xx µL
Volumen de Reacción		20 µl aprox.

Las reacciones se llevaron a cabo a 37°C durante 1 hora aproximadamente, sin agitación.

IV.2.5 Cepas utilizadas y condiciones de crecimiento

Los ensayos que consideran la manipulación de células, en este caso de *E. coli*, fueron cultivadas en medio Luria Bertani, compuesto por 10g/L de bacto triptona (Bacto™), 5 g/L de extracto de levadura (Bacto™) y 10 g/L de cloruro de sodio (J.T. Baker®). Para la generación del medio sólido se añadían 2 gramos de agar por cada 100 mL.

Para la selección de colonias a través de marcadores de selección, los medios utilizados en este trabajo se enriquecían con ampicilina a una concentración final de 200 µg/mL.

Los preinóculos utilizados se exponían a condiciones de crecimiento que consistían en incubar los medios inoculados a una temperatura de 37°C durante 12 horas a 200 rpm.

Las fermentaciones que tenían la tarea de producir enzima se incubaban a 37°C y 200 rpm, hasta que se alcanzaba una densidad óptica (absorbancia) de 0.5 - 0.6 unidades de absorbancia en el espectrofotómetro, una vez alcanzados estos niveles, la fermentación se incubaba a 18°C y 120 rpm durante 12 horas.

Las cepas utilizadas fueron *E.coli* DH5α para propósitos de clonación y *E.coli* BL21 para fines de expresión de proteínas.

IV.2.6 Purificación de plásmido

La purificación de plásmido se realizó con la asistencia del kit Zippy™ Plasmid Miniprep kit de Zymo Research, posterior al crecimiento de las células hospedadoras (*E. coli* DH5α) del plásmido a purificar, se cosecharon las células por centrifugación a 8,000 rpm durante 5 minutos y se resuspendían en agua tetradestilada, a través de las indicaciones especificadas en el protocolo del proveedor, se purificaba el plásmido, el cual se eluía con agua tetradestilada estéril, se cuantificaba por

espectrofotometría UV a 260 nm y se verificaba la integridad y pureza del plásmido aislado por electroforesis de ácidos nucleicos en gel de agarosa.

IV.2.7 Clonación de las versiones truncadas en el vector pJET 1.2

Obtenidos los amplicones de interés y al ser productos mayoritarios, se realizó la inserción de los fragmentos en el vector de clonación pJET 1.2/blunt cuyo mapa se muestra en la figura 12, el cual contiene un promotor T7, un sitio múltiple de clonación, marcador de selección al antibiótico ampicilina y un gen letal para el organismo hospedero que se ve inhabilitado al ligar fragmentos de DNA en el sitio de clonación.

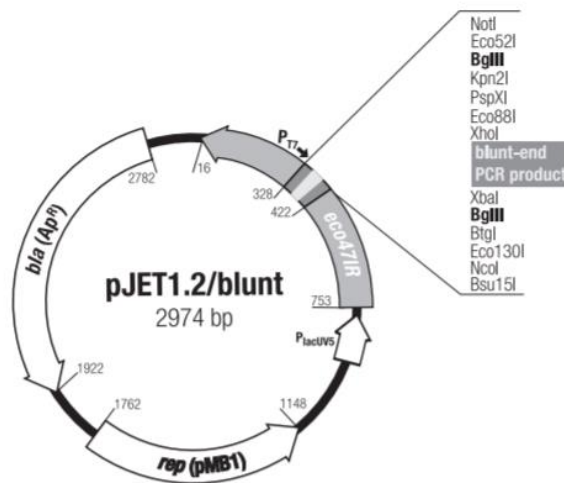


Figura 12. Vector de clonación pJET/1.2/blunt

Dado que los amplicones generados poseen extremos romos, efecto de la polimerasa utilizada, se realizó la reacción de ligación de acuerdo a las recomendaciones del proveedor para ligación de extremos romos, utilizando el kit CloneJET™ PCR Cloning #K1232 de Thermo Scientific™, como se muestra en la tabla 6, la reacción se llevó a cabo durante 30 minutos a 22°C, sin agitación, el

apartado “amplicón” se refiere a cada una de las secuencias nucleotídicas de las versiones truncadas Δ NC, Δ N45C, Δ N85C y Δ C.

Tabla 6. Concentraciones de los reactivos utilizadas en la reacción de ligación.

Reactivo	Concentración Inicial	Concentración Final	Volumen
Vector pJET 1.2/blunt	50 ng/ μ L	50 ng	1 μ L
Amplicón	xx	xx	5 μ L
Buffer de Reacción	2X	1X	10 μ L
Ligasa T4	5 U/ μ L	5U	1 μ L
Agua Estéril	xx	xx	3 μ L
Volumen de Reacción			20 μ l aprox.

Una vez que el periodo de incubación de la reacción había terminado, se purificó con una extracción líquido-líquido utilizando como solvente orgánico 20 μ L cloroformo (CHCl_3), mezclando vigorosamente y centrifugando durante 3 minutos a 10,000 rpm, transfiriendo a un nuevo microtubo la fase acuosa, que contiene el producto nucleotídico de la reacción.

IV.2.8 Subclonación de las versiones truncadas al vector de expresión

La subclonación consistió en trasladar el fragmento de la versión truncada del vector de clonación pJET 1.2/blunt al vector de expresión (Invitrogen) pET-22b(+), el cual contiene un promotor T7, un sitio de clonación múltiple, secuencia codificante para una cola de histidinas, marcador de selección al antibiótico ampicilina además de que es inducible por IPTG (Figura 13).

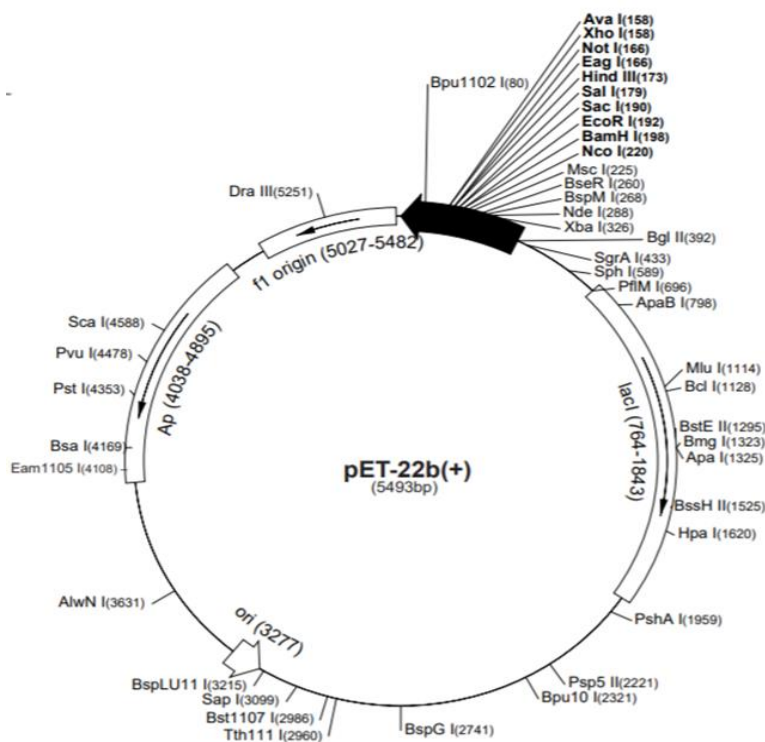


Figura 13. Vector de expresión pET-22b(+).

Como primer paso se realizaba una reacción de digestión doble con las enzimas de restricción NdeI y XhoI al vector de clonación que contenía cada una de las

construcciones de interés, en paralelo, el vector de expresión pET-22b(+) se exponía también a una digestión doble con las mismas enzimas de restricción para generar los extremos cohesivos complementarios en ambos ensayos.

El producto de la digestión proveniente del vector de clonación se procesaba a través de electroforesis en gel de agarosa y se purificaba el fragmento correspondiente a la construcción con ayuda del kit de purificación de banda QIAEX II Gel Extraction kit (150), de acuerdo con el protocolo del proveedor, mientras que el vector de expresión linearizado se purificaba con ayuda del kit de purificación de producto de PCR.

Finalizada la purificación de ambos fragmentos, se cuantificaban por espectrofotometría UV con una longitud de onda de 260 nm.

Una vez cuantificado, se establecía una relación estequiométrica basada en el tamaño del vector de expresión y de cada una de las construcciones para Δ NC fue de 4:1, para Δ N85C, Δ N45C y Δ C se utilizó una relación 3:1, a un volumen final de reacción de 20 μ L, bajo las mismas condiciones de reacción y de concentración de reactivos como se muestra en la tabla 5.

Una vez finalizada la reacción de ligación se realizaba el mismo paso de purificación descrito en la tabla 6.

IV.3 Apartado de expresión de proteínas

IV.3.1 Expresión de LevS Δ N85C

La primera versión truncada de LevS en ser expresada heterológicamente en *E. coli* DH5 α fue Δ N85C, el proceso consistía en incubar un preinóculo de la cepa transformada alrededor de 12 horas, en medio LB con ampicilina (marcador de selección), posterior a esto, se tomaba un volumen considerando una relación 1:100 preinóculo-fermentación. Posterior al tratamiento descrito en la sección 4.2.5, se inducía con IPTG a una concentración final en el volumen de la fermentación de 0.4 mM, y se incubaba a 18 °C durante 12 horas a 120 rpm.

IV.3.2 Expresión de LevS Δ N85C con barrido en la concentración de inductor

Con los resultados obtenidos en el ensayo de expresión de Δ N85C, se optó por realizar un barrido de concentración del inductor (IPTG) que consistía en fermentaciones de 100 mL, con concentraciones finales de 0.8, 1, 1.5 y 2 mM.

IV.3.3 Expresión de las versiones truncadas de LevS

Los ensayos de expresión de todas las versiones truncadas de LevS se llevaron a cabo en fermentaciones en volúmenes de 100 mL, en matraces de 500 mL, con una concentración final de inductor de 2mM.

IV.3.4 Extracción de proteínas

La extracción de las proteínas del citoplasma se realizó a través de tres pasos que consistían en lo siguiente:

- *Lisis enzimática asistida por lisozima.* - Una vez cosechadas las células, se resuspendían en un volumen de 5mL de buffer de acetatos ($\text{CH}_3\text{COO}\cdot\text{Na}^+/\text{CH}_3\text{COOH}$), 50 mM, pH 6, que a su vez estaba enriquecido con lisozima a una concentración de 1mg/mL, esto se incubaba a 4°C (en hielo) durante 30 minutos.
- *Desestabilización de la membrana por cambios térmicos.* - En un vaso de precipitado se depositaba hielo seco y posterior a esto se adicionaba acetona grado industrial, generando una solución refrigerante en la cual se sumergía el preparado de células con el buffer de acetatos, posterior a esto se descongelaba con ayuda de agua en constante agitación, este ciclo de congelación-descongelación se realizaba tres veces.
- *Ultrasonificación.* - El extracto se sónico en un equipo Ultrasonic Processor, Gex 130 con ciclos de 10 segundos activos y 30 segundos de descanso, con una amplitud del 70% durante 1 minuto y medio activo. Terminado esto, la muestra se centrifugaba a 12,000 rpm durante 40 minutos a 4°C.

IV.3.5 Electroforesis de proteínas

La electroforesis de proteínas se llevó a cabo en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE). Los geles se corrieron utilizando un campo eléctrico de amperaje constante de 20 mA. Posteriormente, los geles tenían dos posibles destinos que son y consistían en: teñir con azul de Coomassie, esta técnica consistió en lavar diez minutos el gel con agua destilada, posteriormente se teñía durante diez minutos con el reactivo azul de Coomassie, seguido de un lavado durante diez minutos con agua destilada. Realizado lo anterior, el gel se dejaba reposar 12 horas en agua destilada con un trozo de papel, realizado este paso, el gel se lavó con una solución etanol-agua 50% (v/v), junto con dos papeles celofán durante 10 minutos, por último, se secó el gel en un marco con ayuda de papel celofán para adjuntar a la bitácora de laboratorio.

El ensayo de zimograma constó de un lavado de diez minutos con agua destilada, se retiró el agua y se realizaron tres lavados de treinta minutos cada uno con una

solución Tween® a 1% (v/v) con buffer de trabajo para proteínas (acetatos) como solvente, finalizado el paso anterior, el gel se incubó de 12 a 16 horas en una solución de sacarosa a 100g/L con agitación moderada (20 rpm). Después se realizó un lavado con etanol al 75% (v/v) durante 30 minutos, a continuación, se realizaba una incubación durante una hora en una solución de ácido peryódico 0.7% y ácido acético 5% (v/v). Posteriormente se hicieron tres lavados con metabisulfito de sodio 0.2% (v/v) cada uno de 20 minutos, esto seguido de un tratamiento del gel con reactivo de Schiff hasta ver la aparición de bandas de color rosa, después se lavó el exceso de coloración con metabisulfito de sodio 0.5% (v/v), para ser secado y colocado en un marco.

IV.4 Apartado de ensayos enzimáticos

IV.4.1 Medición de la actividad enzimática

Se realizó a través del análisis denominado “azúcares reductores”, que consiste en la medición de la capacidad catalítica de la enzima frente a su sustrato, con diferentes volúmenes de proteína hasta encontrar la indicada, mediante análisis colorimétrico (540nm) asistido por ácido 3,5-dinitrosalicílico (agente oxidante).

Se realizaban reacciones como las descritas en el apartado 4.4.2, con variación en el volumen de extracto proteico utilizado, una muestra de 50µL era tomada en los tiempos 0 (blanco), 2.5, 5, 7.5 y 10 minutos, posteriormente, en la muestra se añadían 50µL de una solución de DNS, y se calentaba a 100°C aproximadamente en baño maría durante cinco minutos, para garantizar la transferencia de electrones entre el azúcar reductor y el agente oxidante, siendo el último el que cambiaba la coloración de la mezcla desde amarillo hasta café, efecto de reducir un grupo nitro a amino, lo que indicaba presencia de azúcares reductores y evaluación de la reacción global de la enzima.

IV.4.2 Condiciones de las reacciones químicas catalizadas por las versiones truncadas de LevS

La producción de fructanas para su posterior análisis se desarrolló realizando reacciones enzimáticas en condiciones de reacción que comprenden la utilización de sacarosa a 100 g/L, 1 U/mL de extracto enzimático, buffer de acetatos pH 6 a una concentración final de 50mM, CaCl₂ 1mM a un volumen final de 600μL, a 30°C y 250rpm.

IV.5 Apartado de análisis de perfil de productos sintetizados por las versiones truncadas de LevS

IV.5.1 Análisis de polímero de alto y bajo peso molecular

Con la asistencia de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-GPC) con columna Ultra Hidrogel[®] linear y Ultra Hidrogel 500[®] en serie, con fase móvil de NaNO₃ 0.1M, flujo de 0.8 mL/min, 30°C y con detector I.R., se realizó la cuantificación de polímero de alto y bajo peso molecular, con muestras de reacciones tomadas en distintos tiempos y sin diluir, realizadas por las enzimas a condiciones descritas en el apartado 4.4.2.

IV.5.2 Análisis de FOS

A través de HPLC con una columna CarboPac PA-200 (3X50 mm) con una fase móvil con gradiente de concentración compuesta de NaOH y CH₃COO⁻NA⁺, a 30°C, además de que la muestra analizada comprendía una composición de 10μL crudo

de reacción y 90µL de agua destilada, el detector del equipo utilizado era de pulso amperométrico.

IV.5.3 Análisis de hidrolisis-transferencia

Con ayuda de HPLC Waters®, con una columna Private Prevail®, a 30°C, fase móvil compuesta por acetonitrilo:agua. Se utilizó un detector I.R., la muestra analizada obedecía la composición 20µL crudo de reacción y 80µL de agua destilada, de la cual se cuantificaban glucosa, fructosa y sacarosa.

V. RESULTADOS

V.1 Predicción de la estructura terciaria de la región N-terminal de la levansacarasa LevS

Debido a que no se ha dilucidado la estructura cristalográfica de la levansacarasa multidominio LevS de *L. mesenteroides*, y que en la literatura actual no existe información que ayude a comprender la estructura terciaria y función de la región N-terminal en las Fs, se decidió analizar a través de alineamientos a nivel de aminoácidos la región N-terminal comprendida por 155 aminoácidos. Desafortunadamente no se encontró similitud e identidad con alguna secuencia depositada en las bases de datos., por lo tanto, se decidió modelar por homología la enzima LevS (N-terminal, dominio catalítico y región de transición) para predecir la posible estructura tridimensional a partir de su secuencia aminoacídica, utilizando servidores como I-tasser (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) y modeladores por homología como Raptor X (<http://raptorx.uchicago.edu/>) y Swiss Model (<https://swissmodel.expasy.org/>).

De estos ensayos *in silico* se lograron obtener tres modelos de la estructura terciaria de la proteína utilizando como molde la enzima inulosacarasa InuJ [PDB: 2YFS] de *Lactobacillus johnsonii* (Figura 14).

El modelo generado por I-tasser (Figura 14A), incluyó toda la secuencia aminoacídica seleccionada con una cobertura del 100%, al igual que el modelo construido por el servidor Raptor X. Sin embargo, el modelamiento de la secuencia de interés por parte de Swiss-Model sólo mostró un porcentaje de cobertura del 68.15%, modelando desde el residuo 125 al 628, lo que dejaba fuera de la estructura tridimensional predicha la mayoría de la región de transición y de la región N-terminal, la cual era objeto de estudio, por lo que este modelo no fue de gran relevancia para consideraciones futuras.

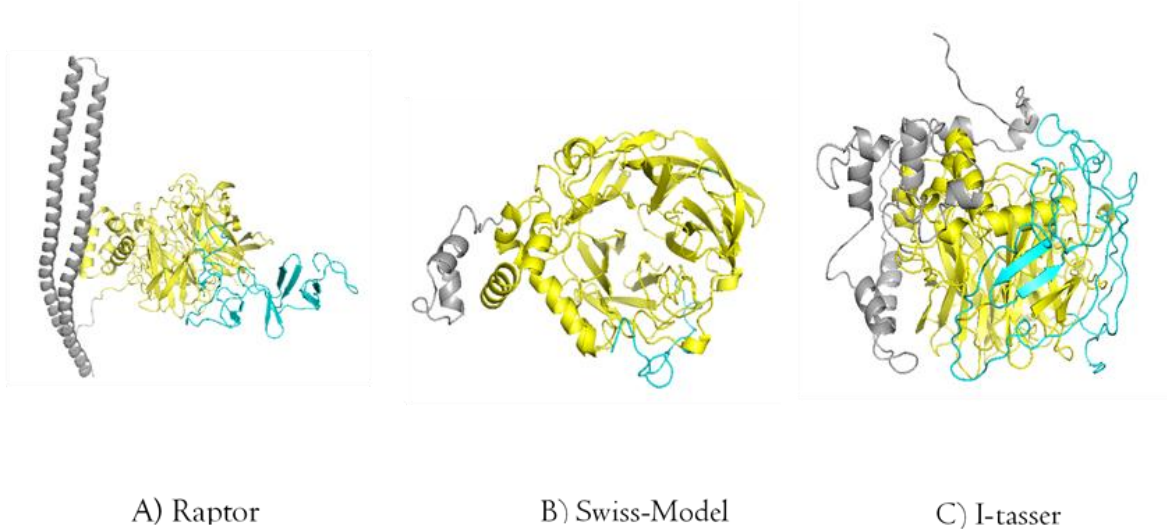


Figura 14. Modelos de LevS generados con distintos servidores. Modelamiento de las regiones (i) N-terminal en gris, (ii) dominio catalítico en amarillo y (iii) región de transición en azul celeste de LevS; en la figura 14A se observa el modelo obtenido con el servidor Raptor X, mientras que en la figura 14B se observa el modelamiento obtenido con Swiss-Model y en la figura 14C observa el modelo generado por el servidor I-tasser.

Por otro lado, a pesar de que Raptor X fue capaz de modelar toda la secuencia aminoacídica, el resultado del plegamiento de la región N-terminal solo fue una larga hélice α con un dobléz que la asemeja a un “cable de teléfono” (Figura 14A), plegamiento que no se observa en la naturaleza, por lo que consideramos que este modelo está fuera de la realidad.

El modelo generado por I-tasser fue capaz de modelar toda la secuencia sometida (Tabla 7), y a diferencia de los dos servidores mencionados anteriormente, I-tasser fue superior ya que a diferencia de Swiss-Model, fue capaz de modelar toda la región N-terminal. Por otra parte, a diferencia de Raptor X, I-tasser ofreció un plegamiento distinto para la región N-terminal, lo que nos hizo elegir este servidor

para modelar la fragmentación de la región N-terminal de esta enzima junto con el dominio catalítico y de transición.

En la tabla 7 se muestran los resultados una evaluación que se realizó al modelo generado por I-tasser, que comprende el gráfico de Ramachandran, Z-score, las desviaciones estándar de la media cuadrática de la longitud de enlace (RMSd) y el ángulo de torsión con respecto a los enlaces N-C α -C (ángulos Φ y Ψ).

El gráfico de Ramachandran, es una de las más confiables herramientas para determinar la calidad de una estructura proteica, el cual se divide en cuatro regiones, la región altamente favorecida (RF+) y la permitida (RAP), en la que no se presenta impedimento estérico, las regiones generosamente permitidas (RGP) son aquellas en las que, sí se es menos estricto en los parámetros estereoquímicos a evaluar, se permite que los átomos tengan contactos más cercanos, y las regiones no permitidas (RNP), en las cuales los contactos entre átomos son muy cercanos con impedimento estérico. El modelo de I-tasser muestra un 68.6% de aminoácidos dentro de la región permitida, (Tabla 7). De acuerdo con Laskowski et al., una estructura que cuente con un porcentaje mayor o igual a 90 de residuos situados en las regiones permitidas del gráfico de Ramachandran es considerada “buena”, comparada con una estructura cristalográfica con una resolución de 2Å, por lo que podemos observar que el modelo de I-tasser es bueno, ya que muestra un 97.5% de aminoácidos entre las regiones permitidas por Ramachandran (68.6% en RF+, 24.9% en RAP y 4% en RGP respectivamente).

Tabla 7. Recopilación de los datos analizados en PROCHECK. Se muestran los servidores utilizados en el modelamiento por homología, seguido del análisis de Ramachandran con los porcentajes de aminoácidos presentes en la región altamente favorecida (RF+), la región adicionalmente permitida (RAP), la región generosamente permitida (RGP) y la región no permitida; posteriormente encontramos la columna (AA) que arroja el número de aminoácidos estereoquímicamente mal modelados (outliers), el Z-score y los RMSd de torsión de ángulo y longitud de enlace.

Servidor	Secuencia Modelada (aa)	Análisis de Ramachandran				Calificaciones Globales		Contactos cercanos	
		RF+	RAP	RGP	RNP	AA	Z-Score	RMSd (ángulo)	RMSd (longitud)
I-tasser	Toda	68.6%	24.9%	4%	2.5%	40	-4.91	2.5°	0.014 Å

El Z-score es una medida global de la calidad del modelo, que refleja la confiabilidad de la estructura obtenida evaluada en comparación con estructuras de proteínas obtenidas experimentalmente (cristalografía de rayos X y RMN) que tengan la misma cantidad de aminoácidos en su secuencia. De acuerdo con el servidor PROCHECK, esta comparación de los modelos la realizó con una librería de 252 proteínas resueltas por cristalografía de rayos X con una secuencia aminoacídica menor a 500 residuos, con una resolución de 1.8Å, por lo que se menciona en el mismo servidor que valores positivos del Z-score indican “buena puntuación” (Sippl, M.J. 1993). De acuerdo con los resultados obtenidos, el modelo de I-tasser obtuvo un valor de -4.91 que es regular.

La RMSd del ángulo de torsión y de longitud de enlace toma en cuenta el error en las coordenadas y cómo repercute esto en la estereoquímica de los modelos generados. Para los ángulos de torsión Φ y Ψ se toma en cuenta la RMSd reportada por Morris y cols., que es de 2.8°, mientras que para la longitud de enlace el valor es 0.019Å. Abordado esto, con respecto al ángulo de torsión tenemos que el modelo de I-tasser muestra un valor de 2.5°, mientras que por parte de la longitud de enlace, el modelo generado por I-tasser muestra un valor de 0.019 Å, por lo que el modelo a pesar de tener un Z-score regular, tiene buenos puntajes para el ángulo y longitud descritos anteriormente.

Este modelo arrojado por I-tasser propone una estructura interesante en la que se observa que la región N-terminal está justo encima de la β -propela (Figura 15), lugar donde se encuentra la cavidad catalítica, lo que se sugiere podría traducirse en posibles interacciones entre estos dos dominios de la enzima. Sin embargo, debemos tener en mente que este es un modelo de la estructura calificado como regular.

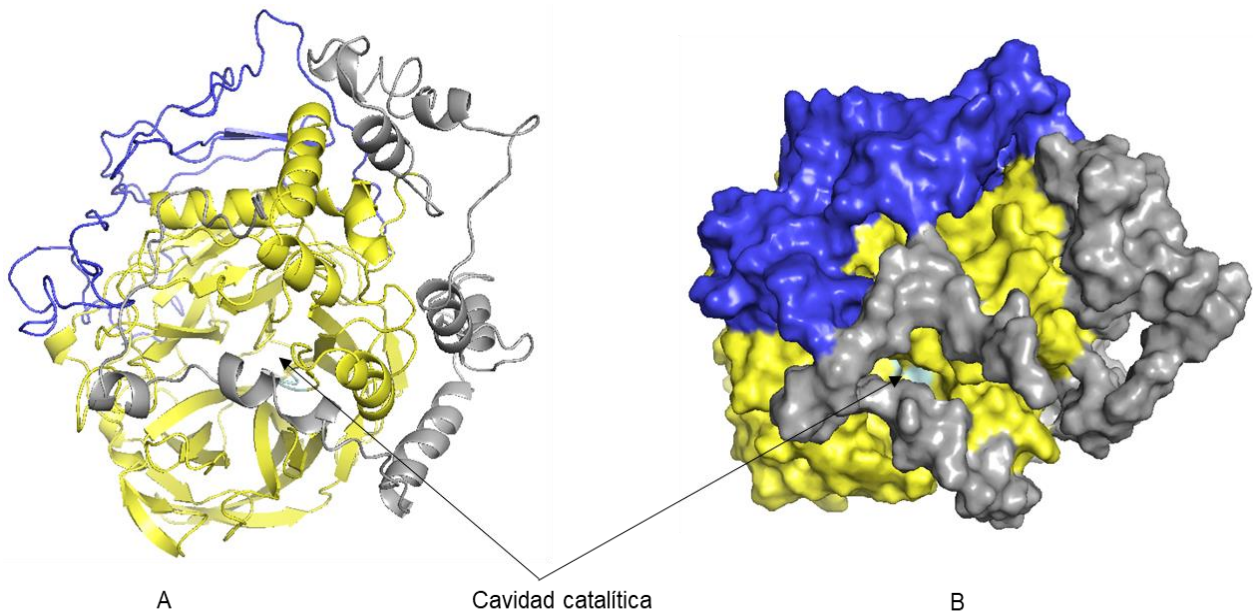


Figura 15. Vistas del modelo de LevS generado por I-tasser. Este modelo permite observar cómo la región N-terminal (gris) se posiciona en la parte superior del dominio catalítico (A) con forma de “embudo”, justo por encima de la cavidad catalítica, a su vez, la vista de superficie de este modelo permite ver el mismo comportamiento con una posible interacción entre el dominio N-terminal y de transición (azul y gris).

V.2 La región N-terminal contiene regiones intrínsecamente desordenadas

Debido a que el modelo por homología realizado por el servidor I-tasser fue calificado como regular se decidió hacer un análisis de composición de aminoácidos de esta región con el objetivo de determinar si estaba enriquecida por algunos aminoácidos. Al analizar la composición aminoacídica de la región N-terminal se observó que entre los residuos que la conforman destacan Treonina (33 residuos, 21.2%), Serina (28 residuos, 18.06%), Alanina (16 residuos, 10.3%), Glutamato (11 residuos, 7%), Lisina (11 residuos, 7%), Glutamina (5 residuos, 3.2%), un residuo

de Prolina y un residuo de Glicina (Figura 16), cada uno representa 0.6%. Estos residuos se caracterizan por ser una composición particular aminoacídica de ciertas proteínas o regiones peptídicas que se les denomina proteínas intrínsecamente desordenadas IDPs (*Intrinsically Disordered Proteins*) o regiones peptídicas intrínsecamente desordenadas IDR (*Intrinsically Disordered Regions*) respectivamente (Dyson & Wright, 2005).

Estas proteínas se caracterizan por desafiar el paradigma de estructura-función en el que se postula que “una proteína funcional debe poseer una estructura tridimensional definida” (Stryer, 1995) , ya que funcionan al depender de estados conformacionales altamente flexibles en lugar de una sola estructura bien definida (van der Lee, 2014; Dunker & Obradovic, 2001; Tompa, 2012) y esto las clasifica dentro de una nueva clase de proteínas cuya importancia ha sido reconocida en los últimos años (Wright & Dyson, 1999).

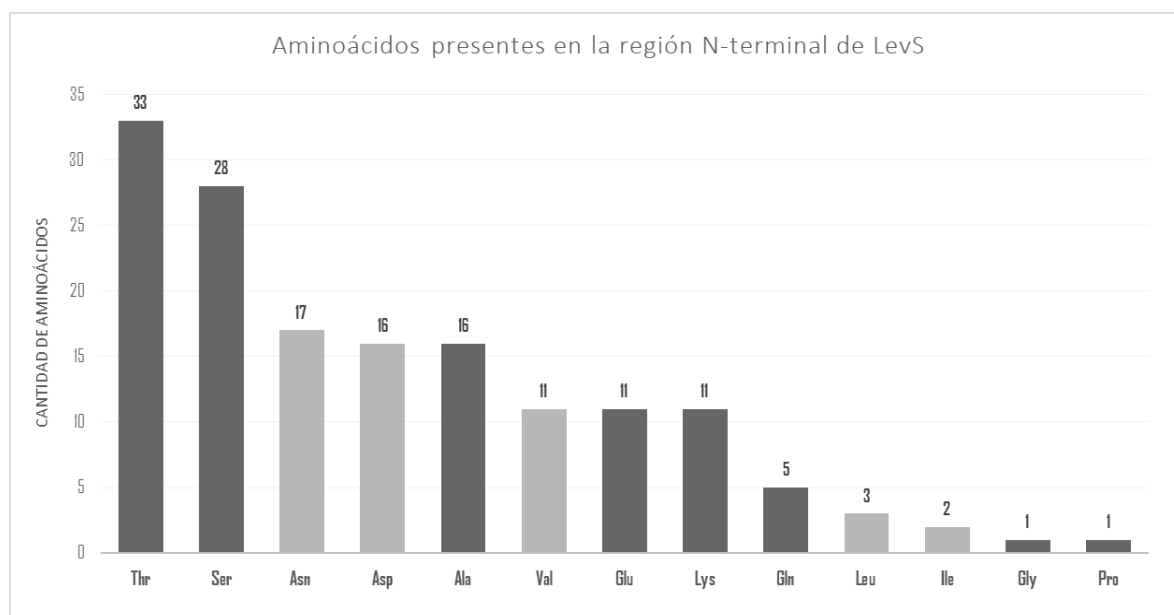
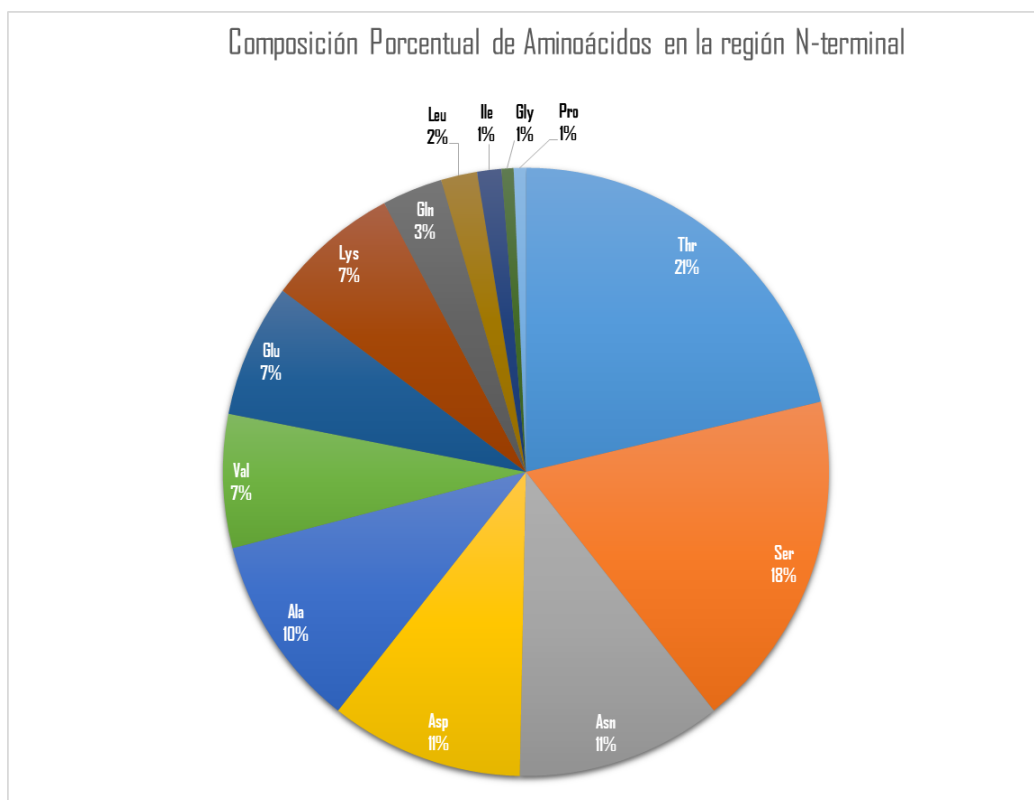


Figura 16. Aminoácidos presentes en la región N-terminal de LevS. Encima de cada una de las barras se encuentra el número de aminoácidos correspondiente al mismo; en verde se marcan los aminoácidos reportados por Dyson H.J., que se sabe aparecen en las IDPs e IDRs.

La composición de residuos de la región N-terminal permite apreciar un detalle interesante, el 68% de sus residuos pertenecen a los asociados a IDPs e IDRs (Figura 17), lo que sugiere la posibilidad de que el dominio N-terminal sea una IDR.

Tomando estos indicios en cuenta, se decidió someter la secuencia aminoacídica de la proteína LevS madura al servidor IUPRED (<http://iupred.elte.hu/>) para analizar, si la región N-terminal o algún dominio adicional al catalítico mostraban regiones desordenadas, a su vez, este ensayo se ejecutó asociando el servidor IUPRED a ANCHOR (<http://anchor.elte.hu/pred.php>) que permite reconocer sitios de unión teóricos desordenados a carbohidrato y/o proteína (SUT), los cuales se definen como regiones ubicadas en proteínas desordenadas que funcionan a través de una transición de desorden a orden al interactuar con una proteína globular asociada o alguna otra biomolécula (Mészáros et al., 2009).



Los resultados obtenidos resultaron muy interesantes, ya que de acuerdo con la predicción de IUPRED, los primeros 166 residuos de la proteína madura LevS se encasillan dentro del rango que exhibe a los residuos “desordenados” debido a que tienen un valor numérico mayor a 0.5, como se muestra en la figura 18.

Estos 166 residuos son por definición, toda la región N-terminal de LevS y 11 residuos adyacentes pertenecientes al dominio catalítico.

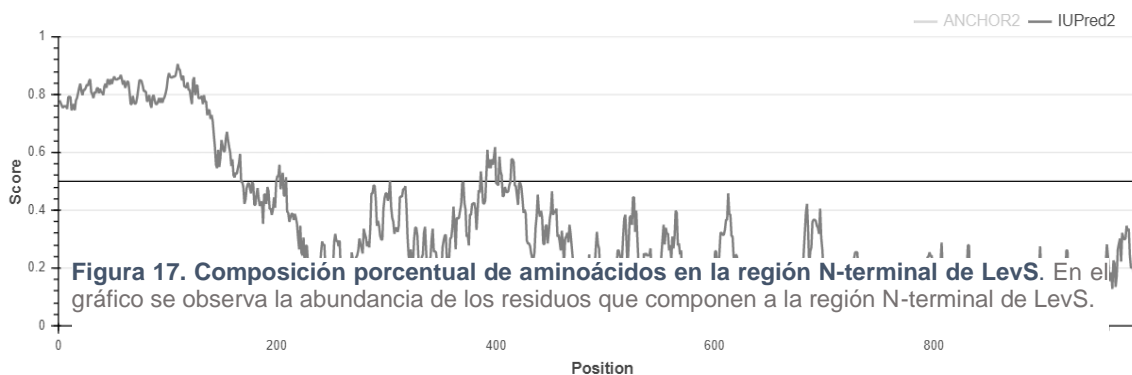


Figura 18. Análisis de predicción de proteínas desordenadas de LevS en IUPRED. En el gráfico se observa el número de aminoácidos contra su calificación, siendo los que tienen un puntaje mayor a 0.5 los que se predicen “desordenados” (líneas que se encuentran encima de la línea media del gráfico) mientras que, por debajo de este puntaje, se predice tienen una estructura globular bien definida

Con la finalidad de corroborar la información obtenida por este servidor, se decidió someter la secuencia de la proteína madura a distintos servidores que cuentan con la capacidad de predecir IDPs e IDRs. El segundo servidor utilizado fue DisMeta (<http://www-nmr.cabm.rutgers.edu/bioinformatics/disorder/>), el cual proporcionó resultados similares (Figura 19).

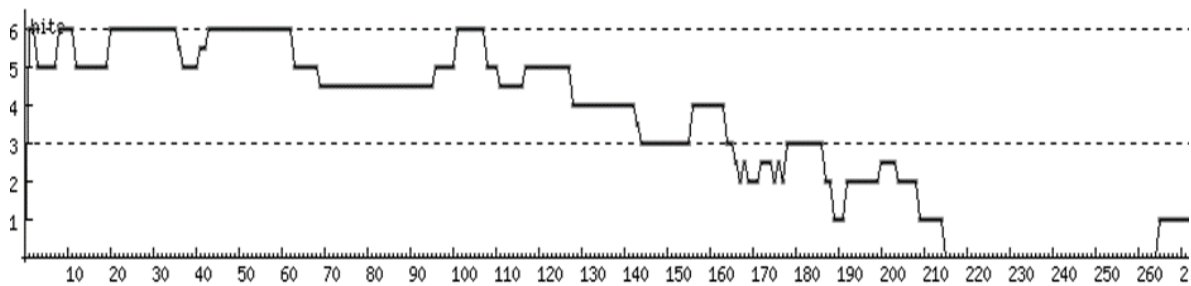


Figura 19. Análisis de predicción de proteínas desordenadas de LevS en DisMeta. En el gráfico se observa el número de aminoácidos contra su puntuación, siendo los que tienen un puntaje mayor a 3 los que se predicen “desordenados” (línea que se encuentra encima de la línea media del gráfico) mientras que, por debajo de este puntaje, se predice tienen una estructura globular bien definida. El gráfico no se pone completo debido a su longitud, pero cabe destacar que toda la secuencia restante se clasifica dentro de las proteínas que tienen estructura definida.

El servidor Predict Protein también pronostica que el dominio N-terminal se encuentra desordenado, en específico los residuos 1 al 145, 149 al 154 y el residuo 157. Este resultado es consistente con DisMeta que considera los residuos 1 al 165 son desordenados, mientras que IUPRED considera los residuos 1 al 166 también los son, lo que sugiere aun con más fuerza que este dominio de LevS es un dominio intrínsecamente desordenado.

Posteriormente, se analizó si la región desordenada de LevS (dominio N-terminal) tenía sitios de unión teóricos desordenados a carbohidrato y/o proteína (SUT), por lo que se sometió la secuencia de la proteína madura LevS a el servidor ANCHOR (Figura 21), con lo que se pudo encontrar otro interesante hallazgo, dentro de la región N-terminal se alojan 5 SUT y uno adyacente, que pertenece a los residuos del dominio catalítico (Figura 20).

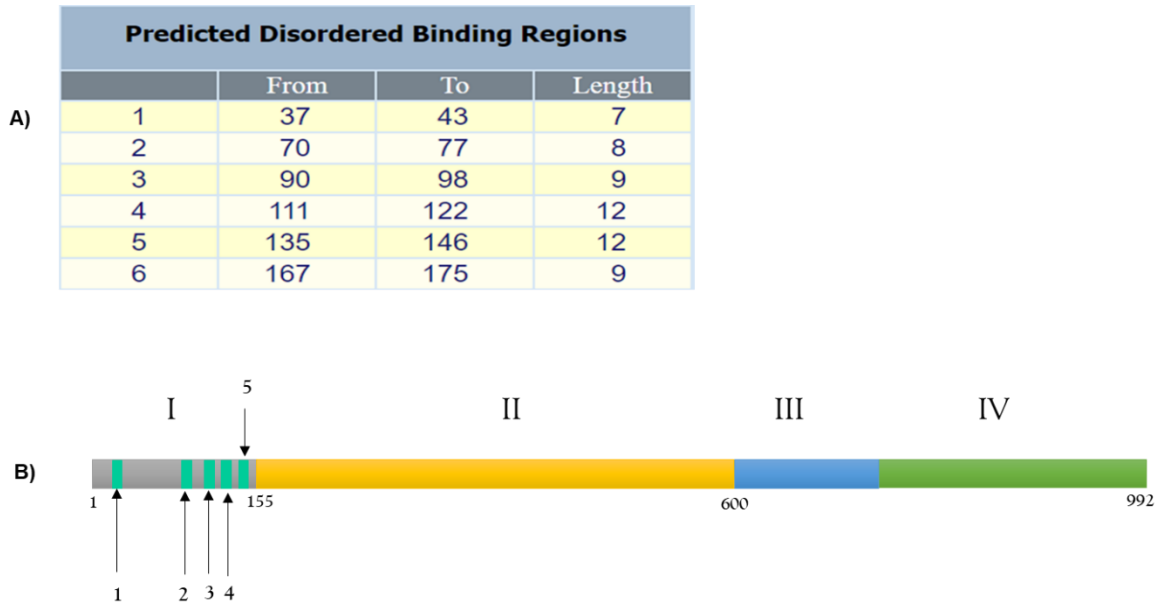


Figura 20. SUT predichos para LevS. En la tabla (A) se observan las regiones predichas para la proteína madura LevS, se puede observar que en la región N-terminal se encuentran 5 SUT de los seis sitios predichos. En la figura B se aprecia la representación esquemática de los SUT en LevS.

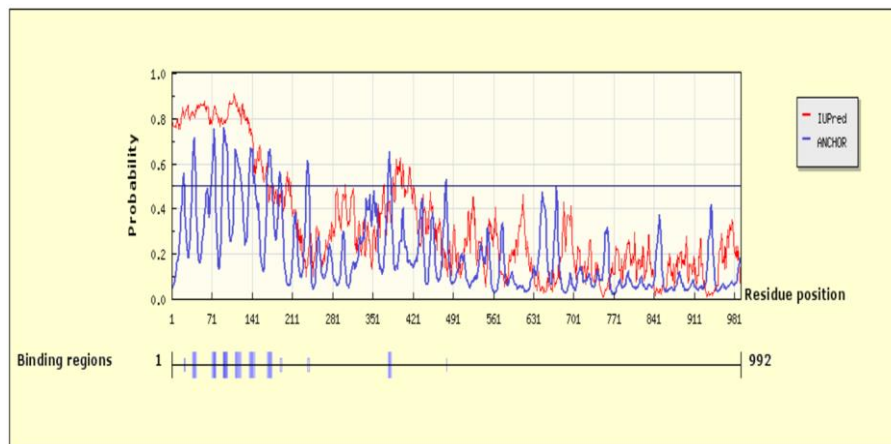


Figura 21. Análisis de predicción de SUT en LevS realizada en ANCHOR. En el gráfico se observa con una línea roja la evaluación propia de IUPRED y con azul la evaluación de los residuos realizada por ANCHOR, los conjuntos de residuos que tienen un puntaje mayor a 0.5 se predicen SUT, y debajo de ellos se muestra una línea con la leyenda "Binding regions" que muestra cuales son los SUT encontrados a lo largo de la secuencia aminoacídica.

V.3 Diseño de las versiones truncadas en la región N-terminal de LevS

Debido al gran interés que tenemos por estudiar la región N-terminal de LevS se decidió diseñar cuatro versiones truncadas, eliminando los SUTI y II y así poder estudiar su papel en la síntesis de levanas llevada a cabo por la enzima. La primera versión truncada fue denominada LevS Δ C que comprende el dominio catalítico y la región de transición y la totalidad de la región N-terminal compuesta por 155 aminoácidos (Figura 22B), la que, de acuerdo con el análisis de regiones peptídicas desordenadas contiene 5 SUT. La segunda versión construida a partir de LevS Δ C fue denominada LevS Δ N45C que cuenta con solo 110 residuos de la región N-terminal (Figura 22C), debido a la remoción de los primeros 45 aminoácidos de la proteína madura, esta versión carece del SUT I. La tercera versión truncada derivada de LevS Δ C fue denominada LevS Δ N85C que cuenta con solo 70 residuos (Figura 22D) de la región N-terminal, causado por la remoción de los primeros 85 residuos del extremo amino terminal, generando a su vez, una versión truncada en este dominio que ha perdido dos SUT (I y II). Finalmente se construyó una tercer versión truncada denominada LevS Δ NC que no cuenta con ninguno de los SUT (Figura 22E). Una aclaración importante es que para este estudio se planteó construir versiones truncadas en la región N-terminal que no cuenten con la región C-terminal debido a la practicidad para trabajar con estas enzimas y además que de acuerdo con los análisis realizados por García Paz (Tabla 1), la remoción de la región C-terminal de LevS silvestre no supone un cambio drástico en el comportamiento de la enzima.

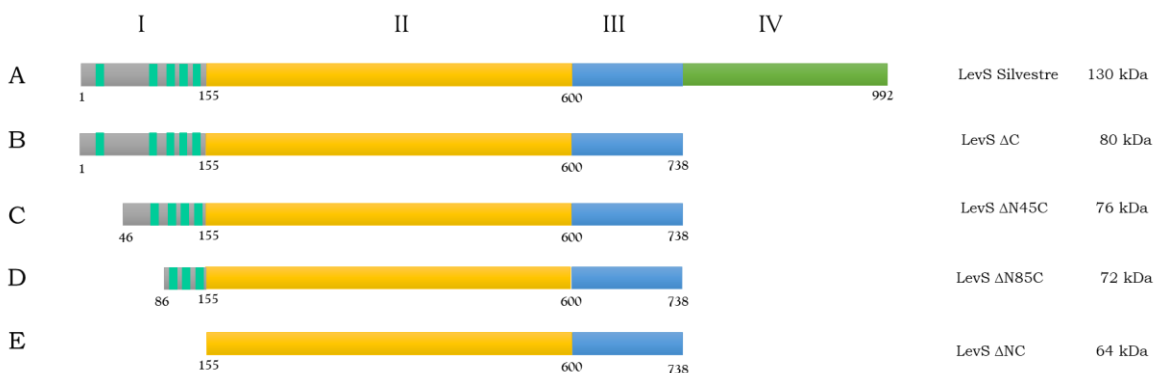


Figura 22. Versiones truncadas en la región N-terminal de LevS. Esquema representativo de las construcciones generadas a partir de la fragmentación de la región N-terminal, se enlistan en orden descendente de acuerdo con el peso molecular.

V.4 Construcción de las versiones truncadas en la región N-terminal de LevS

Utilizando como molde el gen de LevS silvestre contenido en el vector de expresión pBAD/TOPO, bajo las condiciones que se describen en la sección 4.2, se realizaron cuatro reacciones de amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con el fin de obtener los fragmentos de DNA que codifiquen para las cuatro versiones truncadas (Figura 22). Una vez realizada la amplificación, se analizaron los productos de las reacciones de PCR por electroforesis de ácidos nucleicos en gel de agarosa. En la figura 23, en el carril uno se puede observar la presencia de una banda que corresponde al amplicón esperado para la construcción Δ NC (1749 pb). En el carril número dos también se observa una única banda, que corresponde a la versión truncada Δ N85C con un tamaño de 1959 pb. El tercer carril corresponde a la versión truncada Δ N45C, en el que, a pesar de no verse una sola banda, sino tres, el producto mayoritario corresponde al tamaño esperado para esta construcción (2079 pb) y en el cuarto carril, se aprecia una banda que corresponde a la construcción Δ C, la cual, con un tamaño de 2214 pb, a través de este resultado confirma su correcta amplificación.

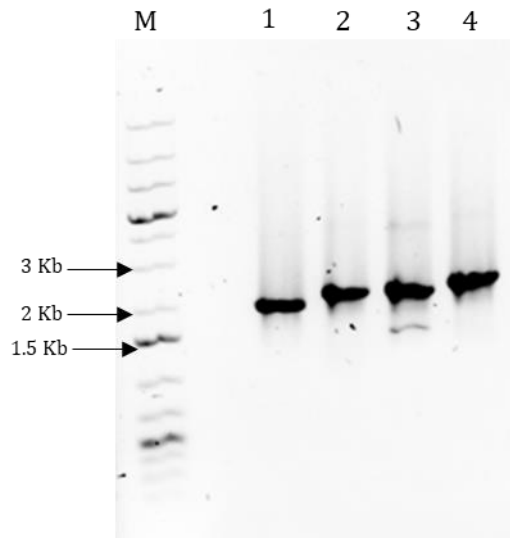


Figura 23. Amplificación de las versiones truncadas de LevS. Electroforesis en gel de agarosa en el que se muestra en el carril M el marcador de peso molecular, en el carril 1 el producto de PCR del ensayo de Δ NC, en el carril 2 para Δ N85C, en el carril 3 para Δ N45C y en el carril número 4 para Δ C.

Una vez obtenidos los amplicones de interés, se realizó la clonación de estos como se describe en la sección 4.2.7 de materiales y métodos, en el vector pJET 1.2/blunt (Figura 24) que contiene el marcador de selección ampicilina y transformadas en cepas de *E. coli* DH5 α .

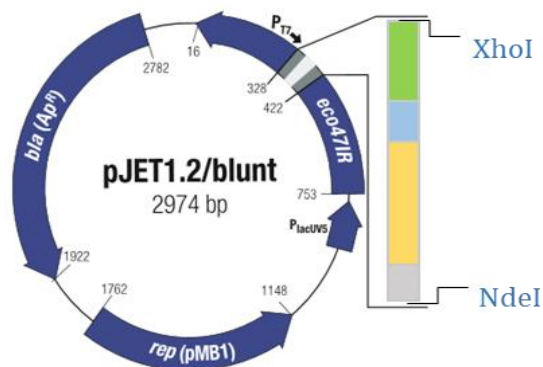


Figura 24. Representación de la construcción de las versiones truncadas en el vector de clonación. Se muestra el vector utilizado (pJET 1.2/blunt) y la construcción resaltando los sitios de restricción utilizados.

Para las cuatro construcciones se realizó extracción de plásmido de las clonas candidatas obtenidas para realizar la búsqueda de las clonas positivas por patrón de digestión con las endonucleasas NdeI y XhoI como se describe en la sección 4.2.4. Las clonas examinadas para la construcción ΔC (Figura 25A) exhiben un patrón de digestión con generación de dos bandas, una que corresponde al vector de clonación y una más pequeña que corresponde a la construcción propiamente, siendo clonas positivas las de los carriles 1, 2, 3 y 4. La construcción $\Delta N45C$ se analizó a través de únicamente dos clonas candidatas, como se observa en la figura 25B, el carril uno exhibe un patrón de digestión esperado, a través de la liberación de dos bandas en los pesos esperados (2.9 kb para el vector y 2 kb para la construcción).

En el patrón de digestión de las clonas de la construcción $\Delta N85C$ (Figura 25C) se observa que la clona del carril uno es la única potencialmente positiva, ya que exhibe la liberación de dos bandas de los pesos esperados: 2.9 Kb para el vector de clonación y 1959 pb para el amplicón $\Delta N85C$. La construcción más pequeña, ΔNC (Figura 25D) exhibió un patrón de digestión similar al de las construcciones analizadas con anterioridad, siendo la clona 2 la positiva, ya que se observa la liberación de una banda de 2.9 Kb que es el peso esperado para el vector de clonación linearizado y un fragmento de 1749 pb que corresponde a esta construcción.

Para corroborar que las clonas eran las correctas se analizaron mediante secuenciación de la construcción en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA del Instituto de Biotecnología de la U.N.A.M.

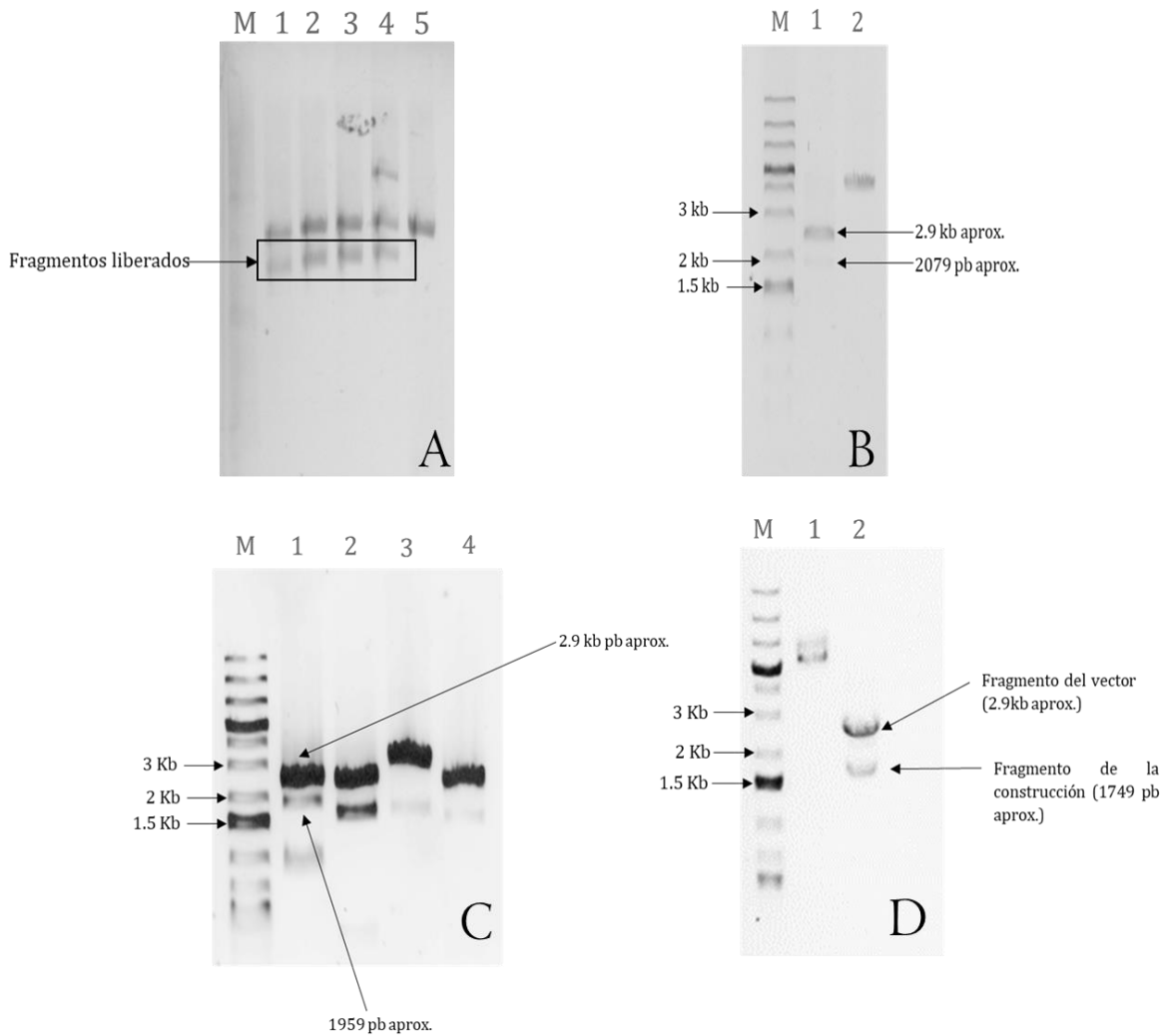


Figura 25. Electroforesis de ácidos nucleicos de las cuatro versiones truncadas de LevS. Se muestra el patrón de digestión exhibido por cada una de las clonas positivas de las versiones truncadas después de haber sido clonadas, (A) ΔC , (B) $\Delta N45C$, (C) $\Delta N85C$ y (D) ΔNC .

Las construcciones clonadas se trasladaron del vector de clonación (pJET 1.2/blunt) a un vector de expresión (pET 22b (+)), para producir de forma recombinante las versiones truncadas de LevS. Se realizaron digestiones empleando las enzimas de restricción NdeI y XhoI para liberar las secuencias nucleotídicas de las versiones truncadas de LevS del vector de clonación. En paralelo el vector de expresión pET 22b (+), fue digerido con las enzimas NdeI y XhoI para linearizarlo. Obtenidos el

vector y las secuencias de interés se ligaron y se transformaron en células *E. coli* DH5 α . Se analizó el patrón de digestión con las enzimas NdeI y XhoI para cada una de las clonas candidatas para las versiones truncadas, obteniéndose para la construcción Δ NC (Figura 26A), dos clonas candidatas de las cuales solo una, que está en el carril dos tiene el patrón esperado, mostrando dos bandas, una de aproximadamente 5.5 Kb que corresponde al vector pET22b(+), y una banda que se encuentra ligeramente por encima de la banda que corresponde a 1.5 Kb en el marcador de DNA, por lo que se sugiere que esta corresponde al fragmento propio de la construcción.

Para la construcción Δ N85C se observa (Figura 26B) que solo una de las colonias candidatas fue positiva para contener el fragmento, liberando en el último carril (número cuatro) un fragmento aparentemente correspondiente a el vector y la construcción (1959 pb).

El análisis por patrón de digestión de la construcción Δ N45C (Figura 26C) muestra la aparición de tres colonias candidatas a positivas al exhibir un patrón de digestión con dos bandas (carriles 1,3 y 4), una correspondiente al vector de expresión y otro para la construcción (2079 pb), por último, en la figura 26D, se observa que solo una de las clonas expuestas a este ensayo presento un patrón de digestión (carril 5) apto para considerarse clona candidata positiva.

Con el objetivo de corroborar que las secuencias nucleotídicas que codifican para las versiones truncadas estaban libres de mutaciones, las clonas positivas se secuenciaron en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA del Instituto de Biotecnología de la U.N.A.M.

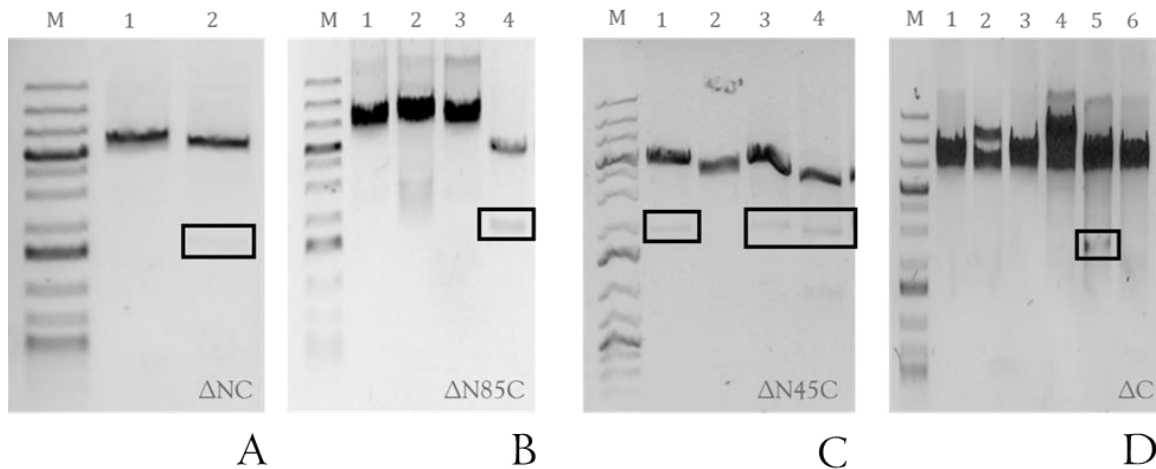


Figura 26. Patrón de digestión de las construcciones en el vector de expresión. Electroforesis en gel de agarosa en el cual se puede observar la digestión de los fragmentos correspondientes a cada una de las construcciones, las bandas encerradas en cuadros corresponden a fragmentos que coinciden con las construcciones buscadas.

V.5 Expresión de forma recombinante de las versiones truncadas de LevS.

Una vez que las versiones truncadas de LevS fueron correctamente clonadas en el vector pET22b, se transformaron los plásmidos en células de *Escherichia coli* de la cepa BL21 para la expresión de estas en un sistema heterólogo.

Se decidió explorar a través de un barrido de concentración del inductor, (0.8, 1, 1.5 y 2mM) cual era la concentración ideal para la expresión de las versiones truncadas de LevS. En todas las concentraciones del IPTG probadas se observa la producción de una proteína cuyo bandeo coincide con el peso esperado (72 KDa) de la versión truncada $\Delta N85C$, siendo la banda más notable la que corresponde a la concentración 1.5mM de IPTG en la fracción soluble (Figura 27) a volumen final de la fermentación, por lo que se puede sugerir que esta es la concentración ideal para la expresión de las versiones truncadas de LevS.

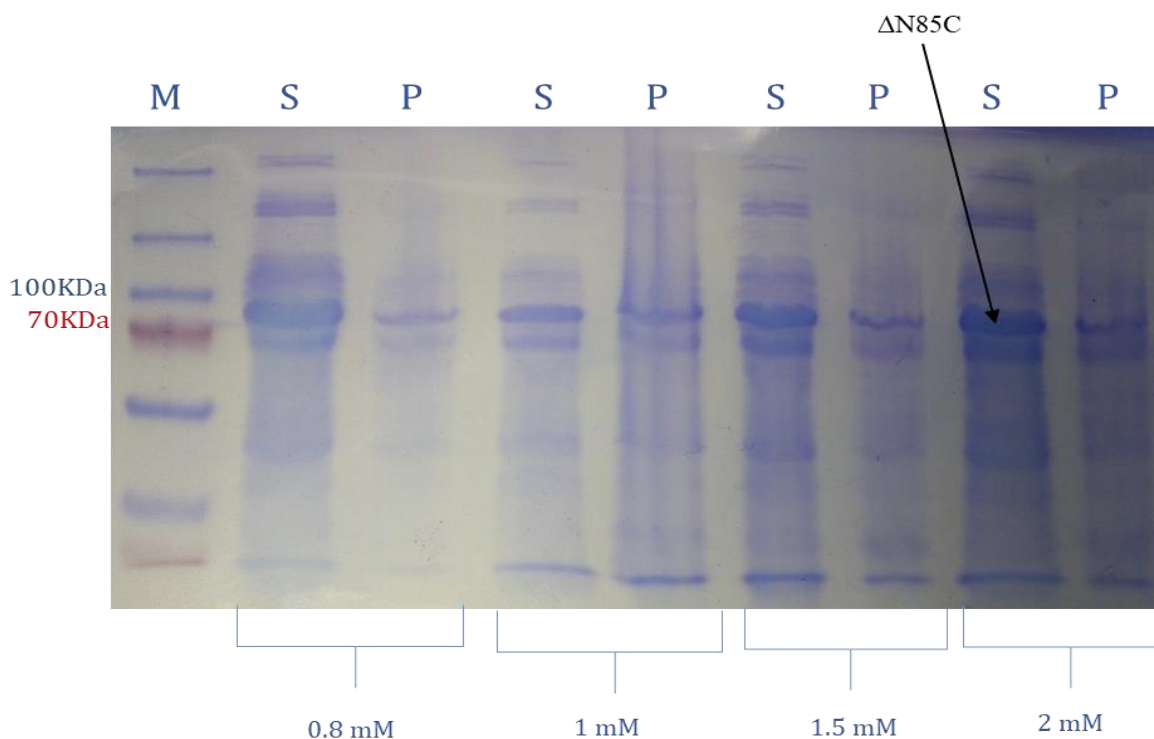


Figura 27. Barrido de IPTG para la expresión de $\Delta N85C$. Electroforesis en gel de acrilamida, Marcador de proteínas (M), fracción soluble del lisado celular (S) y fracción insoluble (P).

Con estos resultados, se realizó la expresión de las demás versiones truncadas de LevS, en fermentaciones de un volumen de 100 mL para cada una. A excepción de la construcción $\Delta N85C$ (Figura 28A, carril C), las demás construcciones fueron imposibles de observar en el gel de acrilamida (Figura 28A carriles A, B y D), ya que no mostraban una banda sobrerrepresentada en el peso molecular esperado como lo hace $\Delta N85C$, por lo que se realizó en conjunto un zimograma de todas las fermentaciones construcciones. Con la asistencia de este ensayo fue posible observar que, a pesar de que las versiones truncadas de Levs no están sobrerrepresentadas en el gel de expresión, si es notable su presencia debido a que se detectan bandas de polímero de fructana en el zimograma. Para la construcción ΔC , con un peso esperado de 80KDa, no observamos una banda sobrerrepresentada en el gel de expresión (Figura 28 carril A), pero en el zimograma observamos tres bandas (Figura 28 carril E), siendo la más tenue la que corresponde a su peso, y seguida de estas dos bandas más que podrían sugerir que la enzima sufre proteólisis. La versión truncada $\Delta N45C$, tampoco exhibe alguna

banda sobrerrepresentada en el peso predicho para el gel de expresión (Figura 28 carril B), mientras que en el zimograma (Figura 28 carril F) se observa una banda en su peso esperado (76 KDa), pero esta banda parece tener una especie de efecto de barrido en su corrimiento, lo que también se sugiere que esta enzima sufre proteólisis. La construcción $\Delta N85C$ es la única de las versiones truncadas que podemos observar tanto en el gel de expresión como en el zimograma (Figura 28 carriles C y G) en su peso esperado, pero con una banda adyacente a esta misma que podría indicar también proteólisis. Por último, la versión truncada de Levs, ΔNC , es la única de estas cuatro enzimas que no es posible observarla en gel de expresión, ni en el zimograma a través de su actividad enzimática. Basados en esta observación realizamos un re-análisis de esta construcción determinado que la única clona obtenida fue clonada en dirección contraria a la del promotor, fue por esta razón que no fue posible expresarla. Decidimos no volver a construir esta versión truncada ya que en el trabajo de García-Paz, ya se estaba construyendo esta versión truncada para realizar análisis de la importancia de esta región en las propiedades de la enzima.

Algo realmente interesante, es que se logra, por primera vez generar una versión truncada de LevS que se puede sobreexpresar en un sistema heterólogo, siendo esta la versión truncada LevS $\Delta N85C$.

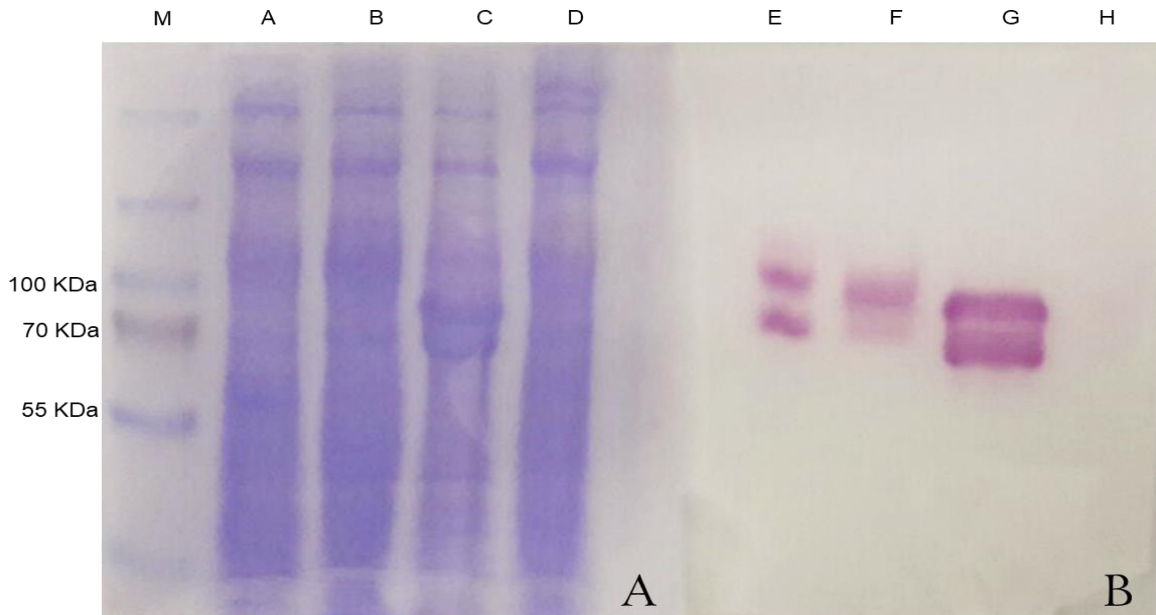


Figura 28. Gel de expresión de las cuatro versiones truncadas y zimograma. En la imagen podemos apreciar la electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes (A) y el zimograma (B), el marcador de peso molecular de proteínas (M), ΔC (A y E), $\Delta N45C$ (B y F), $\Delta N85C$ (C y G), ΔNC (D y H).

V.6 Caracterización de las versiones truncadas de LevS

Con el objetivo de determinar el efecto de la eliminación de las zonas seleccionadas de la región N-terminal en las propiedades de la enzima, realizamos una caracterización de estas enzimas en cuanto a su especificidad de la reacción hacia la hidrólisis y transferencia, en cuanto a su perfil de productos de alto y bajo pesos molecular, y en cuanto a su tipo de enlace.

V.6.1 Efecto de la remoción de las diferentes zonas de la región N- terminal de LevS en la conversión de sustrato y en la especificidad hacia la hidrólisis-transferencia.

Con el objetivo de estudiar la especificidad de la enzima hacia la reacción transferencia/ hidrólisis y la conversión de sacarosa de las versiones truncadas, cuantificamos el consumo de sacarosa para determinar el grado de conversión del sustrato durante la reacción, asimismo, determinamos la liberación de monosacáridos (glucosa y fructosa) durante la reacción mediante HPEAC-PAD.

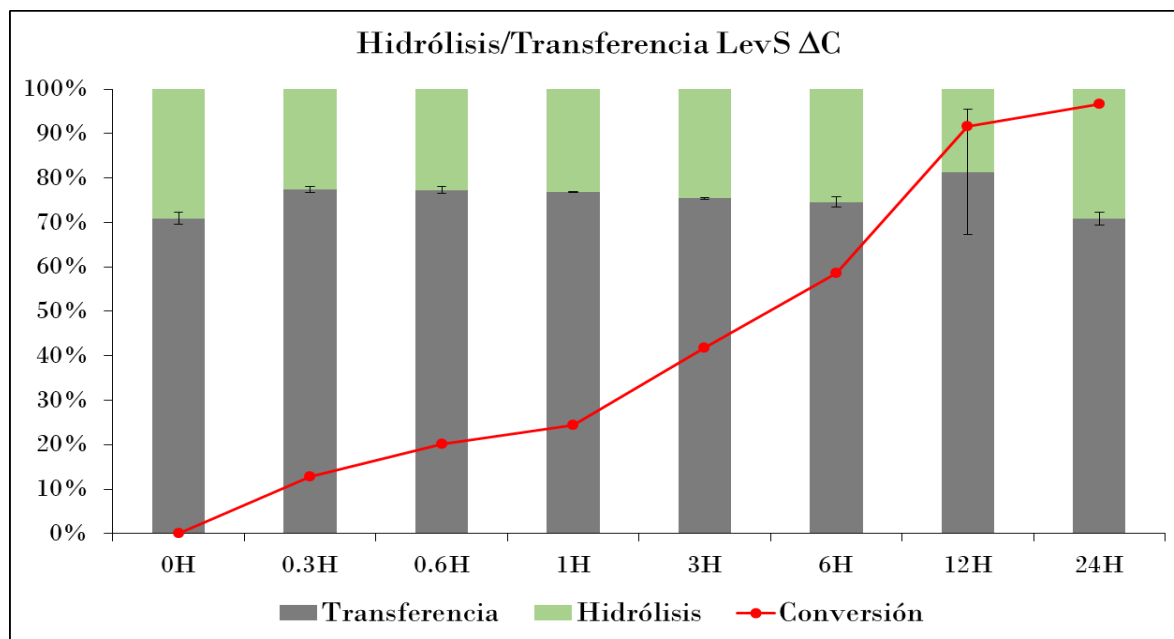


Figura 29. Relación hidrólisis-transferencia de LevS ΔC. En el gráfico se observa la evolución de la reacción en términos de la actividad (hidrolasa y transferasa) que presenta la enzima a diferentes tiempos; en rojo se muestra el porcentaje de conversión en ese punto de la reacción.

En la Figura 29, se observa que la conversión de sustrato en las reacciones llevadas a cabo por la versión LevS ΔC a las 12h es más de 90%, llegando a 97% de utilización del sustrato a las 24h de la versión LevS ΔC . En este gráfico también se muestra la actividad transferasa de la reacción llevada a cabo por esta versión, en donde observamos que esta actividad es predominante en un 80% durante toda la reacción, sin embargo, se observa que esta capacidad transferasa alcanza su máximo punto desde de la primera hora de reacción, lo cual decrece ligeramente a las 24h. El aparente aumento en la actividad hidrolítica de sustrato a las 24h puede deberse a que la enzima comienza a hidrolizar sus productos. Lorenzo, et al 2015, reportó que este fenómeno se presenta al final de las reacciones cuando el sustrato inicial se ha consumido casi en su totalidad.

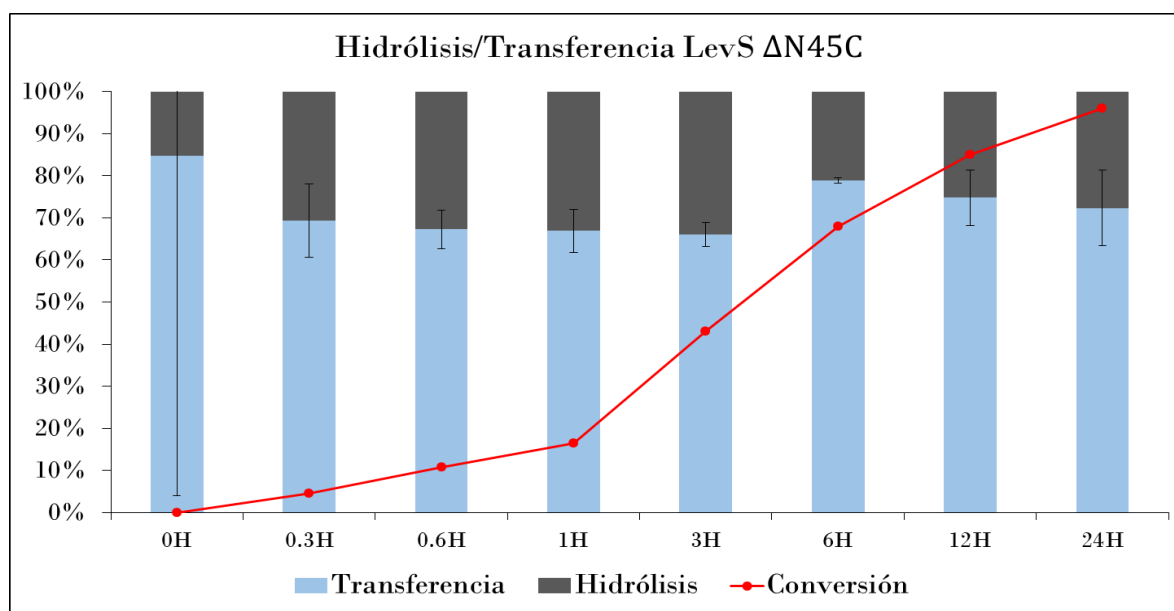


Figura 30. Relación hidrólisis-transferencia de LevS $\Delta N45C$. En el gráfico se observa la evolución de la reacción en términos de la actividad (hidrolasa y transferasa) que presenta la enzima a diferentes tiempos; en rojo se muestra el porcentaje de conversión en ese punto de la reacción.

Por otro lado, en las reacciones desarrollado por la enzima LevS $\Delta N45C$ se observa que la conversión de sustrato a las 12h es de 80%, llegando a utilizar aproximadamente el 97% a las 24h de reacción. En cuanto a la relación hidrólisis-transferencia esta enzima presenta una actividad transferasa menor al 70% durante

las primeras tres horas de reacción, en la hora seis se observa su máximo punto en la actividad transferasa (79%) (Figura 30).

Finalmente, en las reacciones desarrollado por la enzima LevS Δ N85C se observa que la conversión de sustrato a las 12h es de 90%, llegando a utilizar aproximadamente el 99% de la sacarosa a las 24h de reacción. En cuanto a la actividad transferasa en las reacciones llevadas a cabo por la versión de LevS Δ N85C observamos que esta predomina con un 80% aproximadamente (Figura 31) a lo largo de las 24 horas de reacción

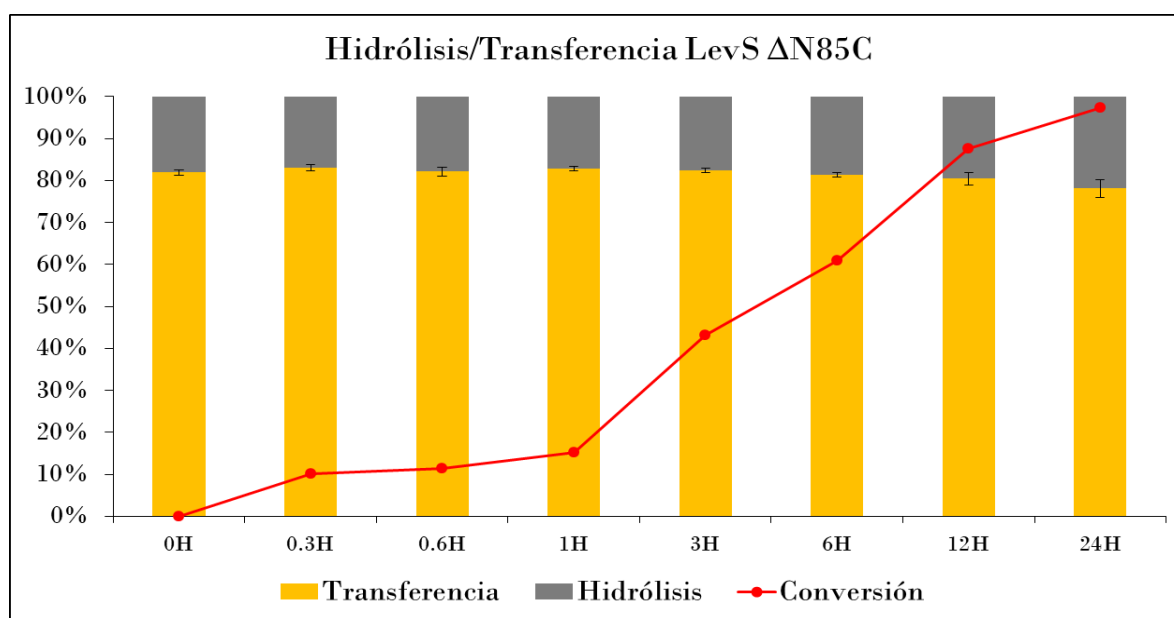


Figura 31. Relación hidrólisis-transferencia de LevS Δ N85C. En el gráfico se observa la evolución de la reacción en términos de la actividad (hidrolasa y transferasa) que presenta la enzima a diferentes tiempos.

V.6.2 Efecto de la remoción de las diferentes zonas de la región N-terminal de LevS en el mecanismo de elongación.

Raga-Carbajal et al en 2016, demostró que el polímero producido por las levansacarosas bacterianas debe su peso molecular al mecanismo de elongación empleado en su síntesis. El polímero de alto peso molecular (2,300 kDa para la enzima SacB de *Bacillus subtilis*) es sintetizado mediante un mecanismo de elongación procesivo mientras que el polímero de bajo peso molecular (7.2kD) es sintetizado mediante un mecanismo no procesivo.

Para determinar el efecto de la remoción de las zonas de la región N-terminal en el mecanismo de elongación de la enzima. Se analizó el perfil de productos de reacción de las tres versiones truncadas. El polímero de alto peso molecular fue identificado y cuantificado mediante cromatografía de exclusión molecular HPLC-SEC, mientras que los productos de bajo peso molecular fueron estimados por sustracción de la concentración del polímero de alto peso molecular al sustrato transferido.

En la Figura 32, observamos el análisis del polímero de alto peso molecular producido por las tres versiones truncadas en condiciones estándar de reacción. Podemos observar las tres enzimas son capaces de sintetizar polímero de fructana con similar peso molecular.

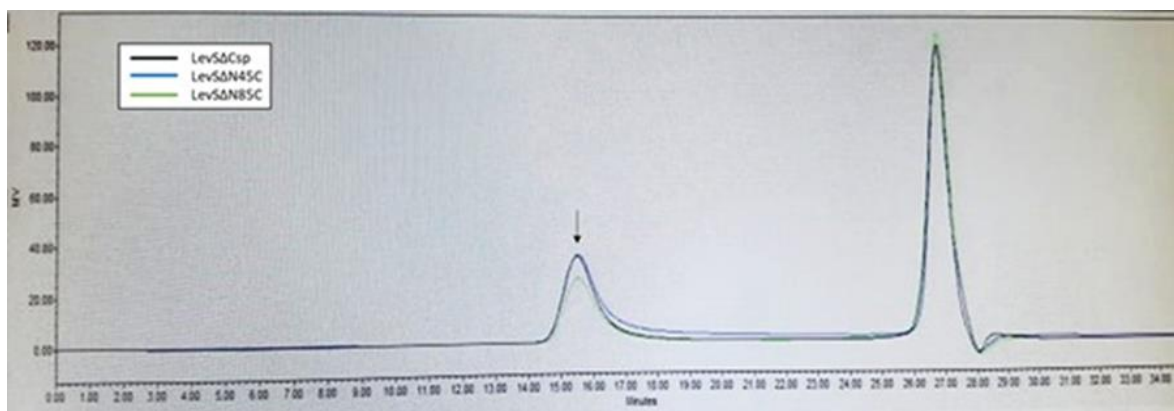


Figura 32. Producción de polímero de alto peso molecular de las versiones truncadas de LevS. Cromatograma correspondiente al análisis de polímero de alto peso molecular sintetizado por las versiones truncadas de LevS.

En la Tabla 8, se muestran los datos de porcentaje de sacarosa transferida destinada a la producción de polímero de alto y bajo peso molecular, donde podemos observar que en la versión que cuenta con el dominio N-terminal de LevS (ΔC) la actividad transferasa que es destinada a la síntesis de PAMP es de 49.2% de mientras que el 31.7% es empleado para la síntesis de PBPM. En la versión $\Delta N45C$, se utiliza 36.6% de la sacarosa consumida para la producción PAMP y el 38.3% al PBPM. El dato más interesante es obtenido en la versión de LevS $\Delta N85C$ que dirige solo un 11.5% de su actividad transferasa a la síntesis de PBPM y un 68.4% para la síntesis de PAMP.

Tabla 8. Relación hidrólisis-transferencia de las versiones truncadas de LevS. Porcentaje de sacarosa utilizado para la síntesis de fructanas de alto y bajo peso molecular, 24 horas de reacción, 30°C, 0.29 M.

Versión truncada de LevS	Polímero de alto peso molecular	Productos de bajo peso molecular	Hidrólisis
ΔC	49.2 \pm 2.5	31.7 \pm 0.2	19 \pm 0.1
$\Delta N45C$	36.6 \pm 1.6	38.3 \pm 0.2	25 \pm 0.6
$\Delta N85C$	68.4 \pm 2.2	11.5 \pm 1.8	20 \pm 0.1

Estos resultados demuestran que la eliminación de 45 aminoácidos que conforman el primer sitio de unión a ligando teórico de la región N-terminal ($\Delta N45C$) aumentan solo en un 5% la hidrólisis, mientras que al eliminar 85 residuos ($\Delta N85C$) no se afectan la capacidad hidrolítica de la enzima. Sin embargo, observamos que al eliminar los primeros 45 residuos ($\Delta N45C$) hay una disminución de 13% en la capacidad de producir PAPM, mientras que aumenta 26% al eliminar los otros 85 residuos ($\Delta N85C$). Si comparamos la capacidad de producir PAPM de la versión que carece de 85 aminoácidos de la región N-terminal ($\Delta N85C$) con la enzima que cuenta con toda región N-terminal (ΔC) podemos observar que la versión truncada es superior en un 19%, este aumento en la capacidad de producir PAPM es acompañada por una disminución de la misma magnitud (19%) en la producción de PBPM, lo que sugiere que la eliminación de dos sitios de unión a ligando mejora la procesividad de esta enzima.

Este resultado además de interesante es inesperado debido a que por lo general la eliminación de una región de una proteína tiende a desestabilizarla y afectar su actividad enzimática.

V.6.3 Síntesis de FOS de las versiones truncadas de LevS

Con el fin de determinar el efecto de la delección de diferentes SUT de la región N-terminal en la síntesis de los productos de bajo peso molecular constituidos, tanto por fructanas de bajo grado de polimerización como de FOS, estos compuestos sintetizados y acumulados por las versiones truncadas de LevS fueron analizados e identificados con ayuda de estándares de fructanas existentes en el grupo de investigación.

En la Figura 33, podemos observar que LevS ΔC sintetiza únicamente FOS de la serie 1-kestosa hasta un DP7, los productos de esta serie son generados por la transferencia de la primera fructosa al hidroxilo del carbono uno de la fructosa de la sacarosa aceptora y a partir de ahí, las fructosas se añaden en el hidroxilo del carbono seis de la fructosa aceptora (Figura 36). Asimismo, esta enzima también sintetiza productos de la serie 6-kestosa alcanzando hasta un DP7, esta serie se caracterizan debido a que en el primer ciclo catalítico la sacarosa iniciadora recibe una primera fructosa en el hidroxilo del carbono seis formando un enlace $\beta(2\rightarrow6)$. (Figura 36). Otro producto sintetizado por esta versión truncada fue la neokestosa (Figura 33), que se caracteriza por ser una molécula de sacarosa a la que se le transfirió una fructosa en el hidroxilo del carbono 6 de la glucosa del aceptor. También podemos observar la síntesis de blastosa, (Figura 33) el cual es un isómero de la sacarosa que se caracteriza por tener la fructosa unida en el carbono seis de la glucosa, y la blastotriosa, que resulta de la adición de una fructosa en el carbono seis de la fructosa terminal proveniente de la blastosa (Figura 36).

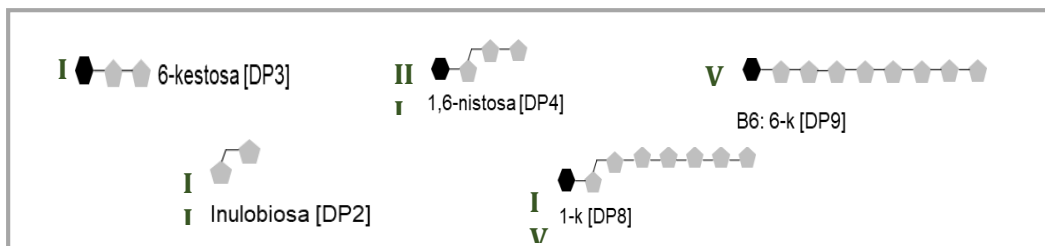
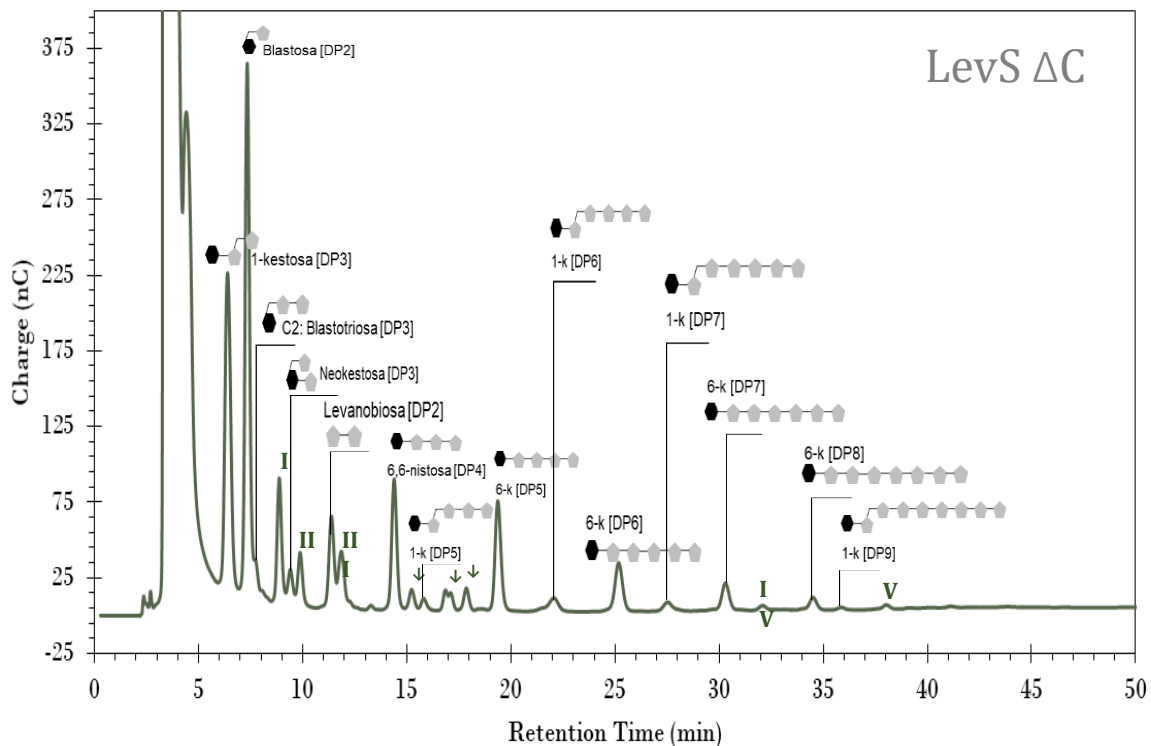


Figura 33. Cromatograma del perfil de productos que presenta LevS Δ C. Cada señal en el cromatograma representa un compuesto sintetizado por la variante de LevS, las señales que se marcan con una flecha no pudieron ser identificadas con estándares, la clave de la posición del enlace glicosídico se muestra en la figura 36.

Esta versión truncada también sintetiza levanobiosa e inulobiosa, productos que se distinguen de los antes mencionados debido a que no tienen una glucosa inicial, ya que son únicamente fructosas unidas entre sí, la levanobiosa es un disacárido compuesto por dos fructosas con enlace tipo $\beta(2\rightarrow6)$, mientras que la inulobiosa es análogo a la levanobiosa pero con enlace tipo $\beta(2\rightarrow1)$ (Figura 34). Estos últimos productos probablemente se originan por la transferencia a la fructosa libre que es producto de la hidrólisis de la sacarosa. Finalmente, esta versión truncada de LevS también sintetizó tres productos que están marcados con flechas rojas, que no pudieron ser identificados, lo que sugiere que podrían tratarse de compuestos nuevos o con ramificaciones.

Por otra parte, LevS $\Delta N45C$ sintetiza FOS de la serie 1-kestosa desde DP3 hasta DP9 (Figura 34), para la serie 6-kestosa, sintetiza FOS desde DP3 hasta DP9. Esta versión truncada también es capaz de sintetizar blastosa y elongarla hasta blastotriosa (Figura 34). Se pudo observar la presencia de neokestosa, levanobiosa e inulobiosa dentro del perfil de productos de esta enzima. Además, se observa la síntesis de tres productos de esta reacción (señalados con flechas rojas) que no pudieron ser identificados (Figura 34), los cuales pudieran tener ramificaciones o una posición del enlace glicosídico distinta a los FOS presentes en nuestros estándares.

La versión truncada de LevS que cuenta con apenas 70 residuos de la región N-terminal ($\Delta N85C$), sintetiza levanas de la serie 1-kestosa desde DP3 hasta DP7, también sintetiza levanas de la serie 6-kestosa con DP3 hasta DP7 (Figura 35). Dentro de su perfil de productos se detectó la presencia de neokestosa, blastosa, blastotriosa, levanobiosa e inulobiosa, así como la síntesis de los tres productos de reacción no identificados observados en las versiones truncadas anteriores.

La FOS sintetizados por las tres versiones truncadas de LevS fueron similares, esto indica que la remoción del SUT I y II (Figura 22) no afecta la especificidad de la enzima, demostrando que estos residuos no son esenciales en la orientación del sustrato durante la síntesis de levanas.

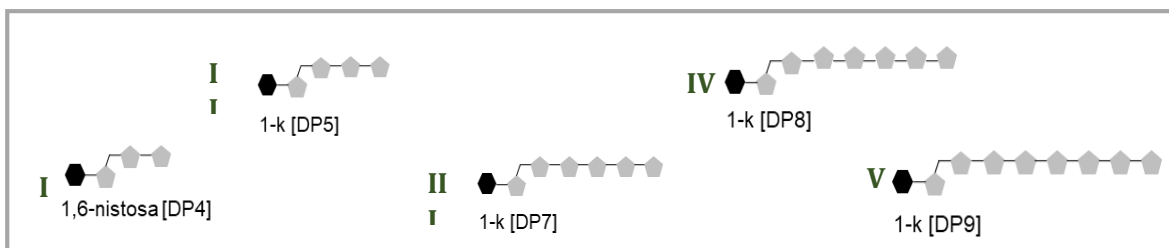
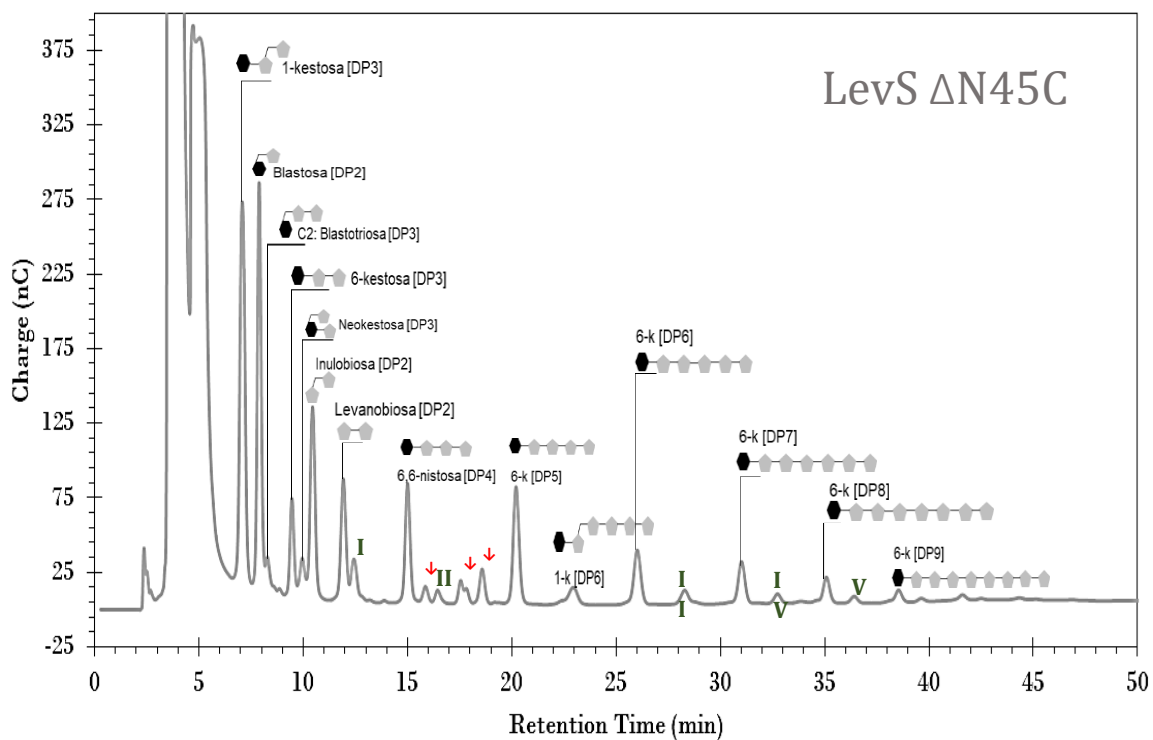


Figura 34. Cromatograma del perfil de productos que presenta LevS Δ N45C. Cada señal en el cromatograma representa un compuesto sintetizado por la variante de LevS. Las señales que se marcan con una flecha no pudieron ser identificadas con estándares, la clave de la posición del enlace glicosídico se muestra en la figura 36.

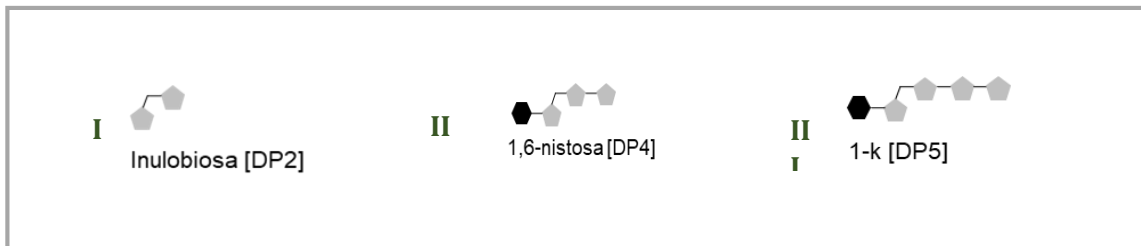
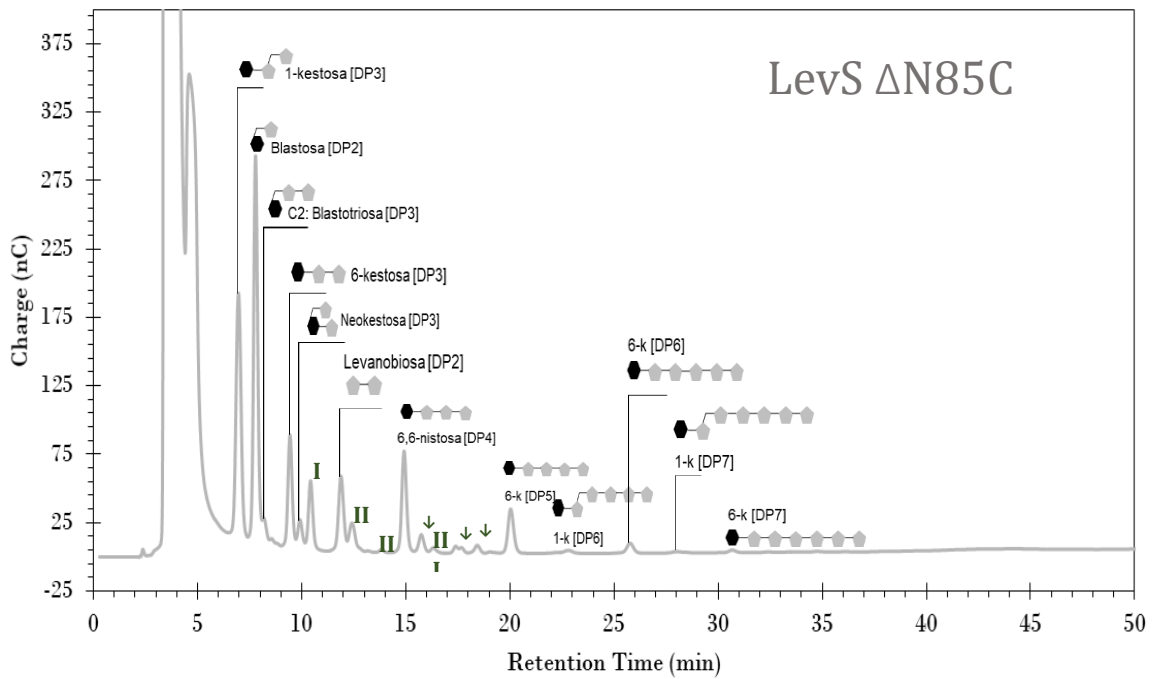


Figura 35. Cromatograma del perfil de productos que presenta LevS Δ N85C. Cada señal en el cromatograma representa un compuesto sintetizado por la variante de LevS. Las señales que se marcan con una flecha no pudieron ser identificadas con estándares internos, la clave de la posición del enlace glicosídico se muestra en la figura 35.



Figura 36. Representación de la distribución de FOS sintetizados por las diferentes versiones truncadas de LevS. En la figura se ilustran los compuestos sintetizados por series 1-kestosa, 6-kestosa y otras series, remarcando la posición del enlace glicosídico con respecto a los carbonos de los monosacáridos glucosa y fructosa. Cada código de letra con número está identificado con el cromatograma (Figura 32 – 34)

VI. Discusión

LevS es una levansacarasa multidominio de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F, que es capaz de sintetizar polímero de alto peso molecular de manera eficiente, debido a la presencia de regiones adicionales al dominio catalítico (Morales-Arrieta et al., 2007). Recientes estudios han demostrado que la región N-terminal es la responsable de la procesividad de la enzima (García-Paz et al., 2019), basados en esta observación, el objetivo de este trabajo es el análisis estructural de la región N-terminal, así como la delimitación de esta región, que está involucrada en la procesividad durante la síntesis de PAPM.

El análisis estructural de la región N-terminal de LevS sugiere que esta región es intrínsecamente desordenada, con la predicción de diversos sitios de unión teóricos

a carbohidrato y/o proteína desordenados (SUT). La presencia de regiones intrínsecamente desordenadas, así como la posible existencia de SUT en levansacarosas jamás había sido reportado. Cinco SUT fueron predichos en esta región, estos se encuentran desde el residuo 37 al 147. De la misma forma, la predicción de regiones intrínsecamente desordenadas ha sido descrita en glucansacarosas, enzimas similares funcionalmente a las levansacarosas, ya que producen polímeros de glucosa (glucano) a partir de sacarosa. Dentro de esta familia de enzimas, se encuentra la alternansacarasa ASR de *L. citreum* NRRL B-1355, en la que se han predicho regiones intrínsecamente desordenadas a lo largo de toda la enzima (Molina et al., 2019), sin embargo, no se han reportado estudios acerca de su relación con la síntesis de PAPM.

Con el objetivo de estudiar la participación de los SUTs en la especificidad de la enzima y su procesividad, se removieron gradualmente zonas de la región N-terminal, (Figura 20). Tres versiones truncadas fueron construidas y analizadas, una que contiene la región N-terminal, que incluye los cinco SUT (ΔC), otra eliminando el SUT I ($\Delta N45C$), y una más eliminando los SUT I y II ($\Delta N85C$). Esta caracterización nos permite estudiar el efecto de los SUT I y SUT II en las propiedades de la enzima. A la par de este trabajo, García-Paz construyó y caracterizó la versión truncada LevS ΔNC de forma activa (Figura 22), la cual carece de la región N-terminal. La comparación de nuestros resultados con los obtenidos con la versión truncada carente de los cinco SUT nos permitió estudiar la importancia de los SUT restantes (SUT III, IV y V).

La caracterización de las tres versiones truncadas de LevS demostró que al eliminar los SUT I y II, no existe un cambio en la conversión de sustrato, ni en la tasa de reacción hacia la hidrólisis-transferencia. De manera similar, en la literatura se reportó que al eliminar 209 residuos de la región N-terminal (conservando 101 residuos) de la inulosacarasa multidominio IsIA4 de *Leuconostoc citreum* CW28, no existe un cambio significativo en la tasa de hidrólisis-transferencia ni en la utilización y reconocimiento de sustrato. Por lo tanto, se sugiere que la primera mitad de la región N-terminal en las Fs (que en LevS contiene los SUT I y II), no participa en la especificidad de reacción ni en el reconocimiento a sustrato.

De la misma forma, el perfil de FOS sintetizado por estas versiones truncadas fue similar al generado por la enzima que contiene los cinco SUT, además, no se detectó la presencia de FOS tipo inulina en ninguna de las versiones truncadas. Estos resultados sugieren, que los SUT I y II no modifican el perfil de FOS, ni en la regioselectividad de LevS. En la literatura se ha reportado que la alternansacarasa ASR de *L. citreum* muestra un comportamiento similar a LevS, ya que la eliminación gradual del dominio V conformado por las regiones N- y C-terminal de la enzima, no afectan el tipo, ni la distribución de oligosacáridos (Molina et al., 2019). Este mismo fenómeno se observa en la GTF180- Δ N de *Lactobacillus reuteri* 180, donde se mantiene el mismo perfil de productos al eliminar 741 residuos de su región N-terminal (Pijning et al., 2014), e incluso, al eliminar el dominio V de esta enzima (Meng et al., 2014).

En cuanto a la participación de los SUT en mecanismo de elongación de LevS, nuestros resultados demuestran que la enzima que contiene los cinco SUT (Δ C), muestra un carácter bifuncional: procesivo y no procesivo, debido a que es capaz de producir PAPM y productos de bajo peso molecular (Tabla 8). De la misma forma, al eliminar el SUT I (Δ N45C) se conserva el carácter bifuncional. En cambio, la eliminación de los SUT I y II (Δ N85C), genera un aumento en la producción de PAPM en detrimento de la síntesis de productos de bajo peso molecular. El aumento en la síntesis PAPM revela un efecto sobre el mecanismo de elongación de la enzima, favoreciendo la procesividad. Por otro lado, los resultados obtenidos por García Paz, analizando la versión que carece de la región N-terminal (LevS Δ NC) demuestran que esta versión pierde totalmente la procesividad, produciendo únicamente FOS, con aumento significativo en la hidrólisis del 72% (García-Paz, 2019). Estos resultados demuestran que la eliminación de los 3 SUT de la región N-terminal que no fueron eliminados en nuestro trabajo son indispensables para la procesividad de la enzima. Este fenómeno ha sido reportado en la GTF180- Δ N, enzima en la cual la eliminación del dominio V (GTF180- Δ N Δ V), muestra un descenso drástico en la procesividad, favoreciendo la síntesis de oligosacáridos de manera no procesiva (Meng et al., 2014). Del mismo modo, cuando se elimina el dominio V en la alternansacarasa ASR, se ve afectada la procesividad, lo que se ve reflejado en la caída de la síntesis de PAPM (Molina et al., 2019).

Sorprendentemente, LevS Δ N85C, que sólo cuenta con 70 residuos de la región N-terminal, demuestran ser suficientes para dirigir la síntesis de levanas bajo la vía procesiva, e incluso, dirigirla hacia valores (sacarosa destinada a la síntesis de PAPM) cercanos a los de la misma enzima silvestre (Tabla 8), por lo que se denominó a esta región “zona de procesividad”.

Estos resultados nos conducen a cuestionar: ¿De qué manera la zona de procesividad intrínsecamente desordenada participa en la elongación de levanas bajo la vía procesiva?

Como ya se mencionó, no existen estructuras cristalográficas de fructansacarosas multidominio reportadas hasta la fecha. Sin embargo, estructuras cristalográficas de enzimas multidominio relacionadas, similares funcionalmente ya han sido reportadas. Como es el caso de las glucansacarosas ASR y GTF180- Δ N. En estas enzimas se ha descrito un plegamiento tipo “U”, donde los extremos N- y C-terminal conformados por los dominios C, A, B, IV y V interaccionan entre sí (Vujičić-Žagar and Dijkstra, 2006; Ito et al., 2011; Brison et al., 2012). En la GTF180- Δ N, se ha observado una interacción directa del dominio V con el dominio catalítico, razón por la cual, al eliminar el dominio V se observa un descenso drástico en la procesividad (Meng et al., 2015). Este fenómeno se ve reforzado por estudios de dinámica molecular realizados con la GTFA-SI de *Streptococcus mutans*, donde se predice la interacción del dominio V con el dominio catalítico, lo que resulta en la formación de una red de subsitios de unión a carbohidrato, que permiten la interacción *in vitro* con un oligosacárido de DP 23 (Osorio et al., 2018).

Con base en estos antecedentes, podemos sugerir que los diferentes comportamientos de LevS a medida que se trunca la región N-terminal, podrían estar ligados a la estabilización entre los dominios adicionales al dominio catalítico de esta enzima, específicamente entre la región N-terminal y la región de transición. Esto sugeriría que a medida que eliminamos residuos de la región N-terminal, específicamente para la versión truncada LevS Δ N45C, la posible interacción entre el dominio N-terminal y la región de transición no es lo suficientemente efectiva, fenómeno que se ve reflejado en su descenso hacia la síntesis de PAPM, que migra a síntesis de FOS y una pequeña porción a hidrólisis de la sacarosa. Mientras que,

cuando se eliminan 85 residuos ($\Delta N85C$), la región de procesividad (70aa) si es capaz de interactuar de manera efectiva con la región de transición de manera parecida a la interacción de dominios adyacentes con el catalítico restituyendo, la síntesis de PAMP en valores cercanos a la enzima LevS silvestre (Tabla 8). Esto sugiere que existe una región N-terminal mínima como en las glucansacarosas (Figura 37), que promueve la formación de subsitios de unión a carbohidrato, que estabiliza las cadenas nacientes de levanas que provienen del dominio catalítico, a medida que se elongan, de esta manera, se mantendría el carácter procesivo de la enzima.

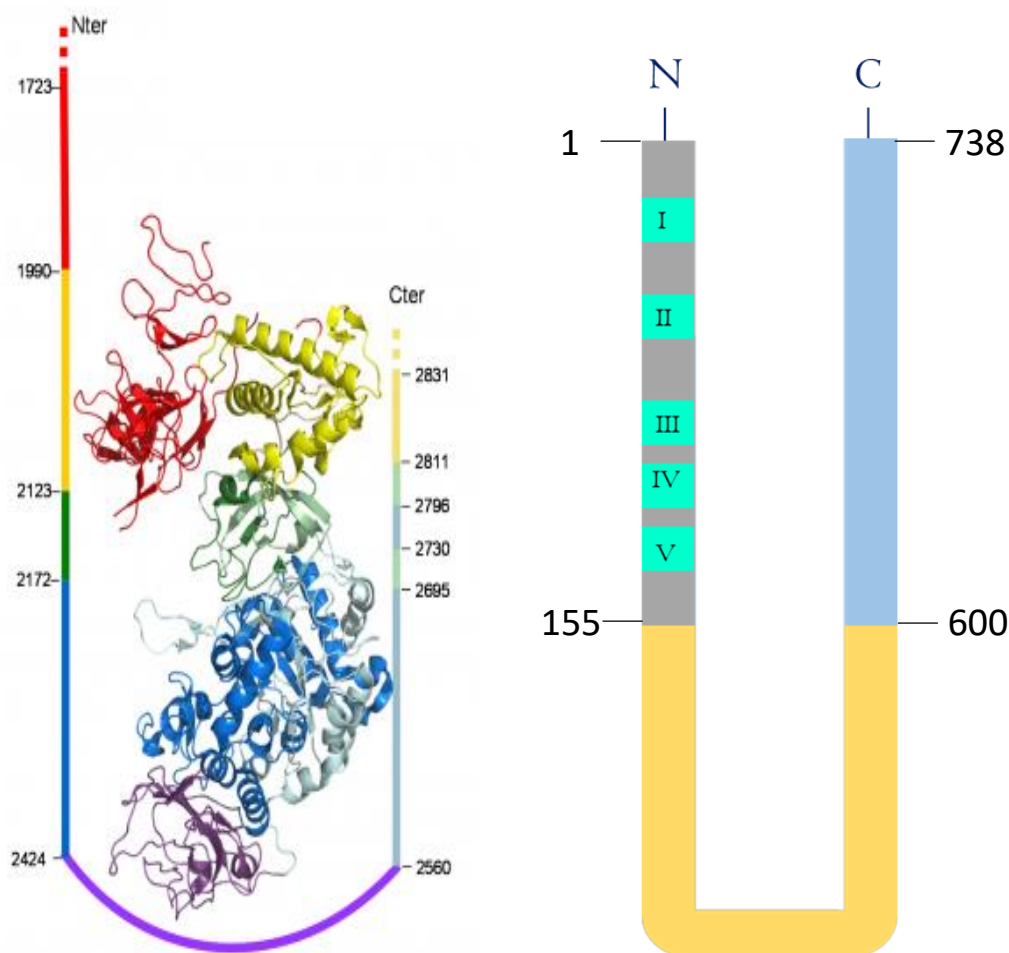


Figura 37. Posible plegamiento en "U" de la levansacarasa LevS de *Leuconostoc mesenteroides*. A la izquierda se observa la representación esquemática de la estructura terciaria de las glucansacarosas (DSR-E de *Leuconostoc mesenteroides*) en la que se aprecia el plegamiento en "U", de lado izquierdo se aprecia la región N-terminal (gris con etiquetas cian) con sus sitios de unión a ligando desordenados (etiquetas cian), el dominio catalítico (amarillo) y la región de transición (color azul cielo) al mismo nivel.

VII. Conclusión

En este trabajo, reportamos el análisis estructural *in silico* de la región N-terminal de LevS de *Leuconosctoc mesenteroides* NRRL B-512F, que reveló su naturaleza intrínsecamente desordenada, además de la presencia de cinco SUT distribuidos dentro de sus 155 residuos, predicciones jamás descritas en la literatura para una levansacarasa multidominio. En este trabajo analizamos la importancia de 2 SUT predichos (SUTI y II), que resultaron no esenciales en el reconocimiento a sustrato, en la especificidad de reacción de hidrolisis-transferencia, ni en el espectro de FOS sintetizados por LevS. Sin embargo, la ausencia de estos dos SUT favoreció la procesividad de la enzima, probablemente por una interacción adecuada de los dominios adicionales con el sitio catalítico. La comparación de nuestros datos con los obtenidos por García-Paz et al., 2019, nos permitió identificar una región N-terminal mínima involucrada en la síntesis de PAMP de LevS, que denominamos “zona de procesividad”. El estudio de esta zona de procesividad, donde residen los elementos estructurales que rigen el mecanismo de elongación de estas fructansacarasas, se está desarrollando actualmente. Por lo que consideramos que nuestros resultados dieron una nueva visión en el estudio de la región N-terminal, además de revelar información interesante acerca de la organización estructural de LevS y de las enzimas multidominio de la familia GH68. Estos nuevos descubrimientos podrían ser empleados en el diseño e ingeniería de proteínas dirigido a la construcción de enzimas con una arquitectura definida, que deviene en propiedades enzimáticas altamente específicas.

VIII. Bibliografía

1. Anwar, M., Kralj, S., Pique, A., Leemhuis, H., van der Maarel, M. and Dijkhuizen, L. (2010). Inulin and levan synthesis by probiotic *Lactobacillus gasseri* strains: characterization of three novel fructansucrase enzymes and their fructan products. *Microbiology*, 156(4), pp.1264-1274.
2. Anwar, M., Kralj, S., van der Maarel, M. and Dijkhuizen, L. (2008). The Probiotic *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 Produces High-Molecular-Mass Inulin from Sucrose by Using an Inulosucrase Enzyme. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(11), pp.3426-3433.
3. Banguela, A., & Hernandez, L. E. (2006). Fructans: from natural sources to transgenic plants. Recuperado de <https://www.semanticscholar.org/paper/Fructans-%3A-fromnatural-sources-to-transgenic-BanguelaHernandez/4a3a184112b125f7a26d88e37eae211dd4835e1>
4. Brison, Y., Pijning, T., Malbert, Y., Fabre, É., Mourey, L., Morel, S., Potocki-Véronèse, G., Monsan, P., Tranier, S., Remaud-Siméon, M. and Dijkstra, B. (2012). Functional and Structural Characterization of α -(1→2) Branching Sucrase Derived from DSR-E Glucansucrase. *Journal of Biological Chemistry*, 287(11), pp.7915-7924.
5. Chambert, R., & Gonzy-Treboul, G. (1976). Levansucrase of *Bacillus subtilis*. Characterization of a Stabilized Fructosyl-Enzyme Complex and Identification of an Aspartyl Residue as the Binding Site of the Fructosyl Group. *European Journal Of Biochemistry*, 71(2), 493-508. doi: 10.1111/j.1432-1033.1976.tb11138.x
6. Chambert, R., Treboul, G., & Dedonder, R. (1974). Kinetic Studies of Levansucrase of *Bacillus subtilis*. *European Journal Of Biochemistry*, 41(2), 285-300. doi: 10.1111/j.1432-1033.1974.tb03269.x
7. Davies, G., Wilson, K., & Henrissat, B. (1997). Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases. *Biochemical Journal*, 321(2), 557-559. doi: 10.1042/bj3210557
8. Dedonder, R. (1966). [86] Levansucrase from *Bacillus subtilis*. *Methods In Enzymology*, 500-505.

9. Del Moral, S., Olvera, C., Rodriguez, M. and Munguia, A. (2008). Functional role of the additional domains in inulosucrase (IslA) from *Leuconostoc citreum* CW28. *BMC Biochemistry*, 9(1), p.6.
10. Dunker, A., & Obradovic, Z. (2001). The protein trinity—linking function and disorder. *Nature Biotechnology*, 19(9), 805-806
11. Dyson, H., & Wright, P. (2005). Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(3), 197-208. doi: 10.1038/nrm1589
12. García-Paz F., (2019). Estudio de la relación estructura/función de la fructosiltransferasa multidominio LevS de *Leuconostoc mesenteroides*. Instituto de Biotecnología, U.N.A.M.
13. Horn, S., Sørliie, M., Vårum, K., Väljamäe, P., & Eijsink, V. (2012). Measuring Processivity. *Cellulases*, 69-95.
14. Ito, K., Ito, S., Shimamura, T., Weyand, S., Kawarasaki, Y., Misaka, T., Abe, K., Kobayashi, T., Cameron, A. and Iwata, S. (2011). Crystal Structure of Glucansucrase from the Dental Caries Pathogen *Streptococcus mutans*. *Journal of Molecular Biology*, 408(2), pp.177-186.
15. Lee, S., Pancholi, V., & Fischetti, V. (2002). Characterization of a Unique Glycosylated Anchor Endopeptidase That Cleaves the LPXTG Sequence Motif of Cell Surface Proteins of Gram-positive Bacteria. *Journal Of Biological Chemistry*, 277(49), 46912-46922.
16. McGaughey, G., Gagné, M., & Rappé, A. (1998). π -Stacking Interactions. *Journal Of Biological Chemistry*, 273(25), 15458-15463.
17. McIntosh, L., Hand, G., Johnson, P., Joshi, M., Körner, M., & Plesniak, L. et al. (1996). The pKa of the General Acid/Base Carboxyl Group of a Glycosidase Cycles during Catalysis: A ^{13}C -NMR Study of *Bacillus circulans* Xylanase†. *Biochemistry*, 35(31), 9958-9966.
18. Meng, G., & Fütterer, K. (2003). Structural framework of fructosyl transfer in *Bacillus subtilis* levansucrase. *Nature Structural & Molecular Biology*, 10(11), 935-941.
19. Meng, X., Dobruchowska, J., Pijning, T., Gerwig, G., Kamerling, J. and Dijkhuizen, L. (2015). Truncation of domain V of the multidomain glucansucrase GTF180 of *Lactobacillus reuteri* 180 heavily impairs its

polysaccharide-synthesizing ability. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(14), pp.5885-5894.

20. Meng, X., Dobruchowska, J., Pijning, T., López, C., Kamerling, J. and Dijkhuizen, L. (2014). Residue Leu940Has a Crucial Role in the Linkage and Reaction Specificity of the Glucansucrase GTF180 of the Probiotic Bacterium *Lactobacillus reuteri* 180. *Journal of Biological Chemistry*, 289(47), pp.32773-32782.
21. Mészáros, B., Simon, I. and Dosztányi, Z. (2009). Prediction of Protein Binding Regions in Disordered Proteins. *PLoS Computational Biology*, 5(5), p.e1000376.
22. Molina, M., Moulis, C., Monties, N., Pizzut-Serin, S., Guieysse, D., Morel, S., Cioci, G. and Remaud-Siméon, M. (2019). Deciphering an Undecided Enzyme: Investigations of the Structural Determinants Involved in the Linkage Specificity of Alternansucrase. *ACS Catalysis*, 9(3), pp.2222-2237.
23. Morales-Arrieta, S., Rodríguez, M., Segovia, L., López-Munguía, A. and Olvera-Carranza, C. (2006). Identification and functional characterization of levS, a gene encoding for a levansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 F. *Gene*, 376(1), pp.59-67.
24. Moulis, C., Arcache, A., Escalier, P., Rinaudo, M., Monsan, P., Remaud-Simeon, M. and Potocki-Veronese, G. (2006). High-level production and purification of a fully active recombinant dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. *FEMS Microbiology Letters*, 261(2), pp.203-210.
25. Olivares-Illana, V., Lopez-Munguia, A. and Olvera, C. (2003). Molecular Characterization of Inulosucrase from *Leuconostoc citreum*: a Fructosyltransferase within a Glucosyltransferase. *Journal of Bacteriology*, 185(12), pp.3606-3612.
26. Olvera, C., Centeno-Leija, S. and López-Munguía, A. (2006). Structural and functional features of fructansucrases present in *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 8293. *Antonie van Leeuwenhoek*, 92(1), pp.11-20.
27. Osorio, M., Zúñiga, M., Mendoza, F., Jaña, G. and Jiménez, V. (2018). Modulation of glucan-enzyme interactions by domain V in GTF-SI from *Streptococcus mutans*. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 87(1), pp.74-80.

28. Ozimek, L. (2006). The levansucrase and inulosucrase enzymes of *Lactobacillus reuteri* 121 catalyse processive and non-processive transglycosylation reactions. *Microbiology*, 152(4), pp.1187-1196.
29. Pijning, T., Anwar, M., Böger, M., Dobruchowska, J., Leemhuis, H., & Kralj, S. et al. (2011). Crystal Structure of Inulosucrase from *Lactobacillus*: Insights into the Substrate Specificity and Product Specificity of GH68 Fructansucrases. *Journal Of Molecular Biology*, 412(1), 80-93.
30. Pijning, T., Vujičić-Žagar, A., Kralj, S., Dijkhuizen, L. and Dijkstra, B. (2014). Flexibility of truncated and full-length glucansucrase GTF180 enzymes from *Lactobacillus reuteri* 180. *FEBS Journal*, 281(9), pp.2159-2171.
31. Raga-Carbajal, E., Carrillo-Nava, E., Costas, M., Porrás-Dominguez, J., López-Munguía, A. and Olvera, C. (2015). Size product modulation by enzyme concentration reveals two distinct levan elongation mechanisms in *Bacillus subtilis* levansucrase. *Glycobiology*, 26(4), pp.377-385.
32. Raga-Carbajal, E., López-Munguía, A., Alvarez, L. and Olvera, C. (2018). Understanding the transfer reaction network behind the non-processive synthesis of low molecular weight levan catalyzed by *Bacillus subtilis* levansucrase. *Scientific Reports*, 8(1).
33. Robin van der Lee, Marija Buljan, Benjamin Lang, Robert J. Weatheritt, Gary W. Daughdrill, A. Keith Dunker, Monika Fuxreiter, Julian Gough, Joerg Gsponer, David T. Jones, Philip M. Kim, Richard W. Kriwacki, Christopher J. Oldfield, Rohit V. Pappu, Peter Tompa, Vladimir N. Uversky, Peter E. Wright, and M. Madan Babu *Chemical Reviews* 2014 114 (13), 6589-6631
34. Russell, R. (1990). Molecular genetics of glucan metabolism in oral streptococci. *Archives of Oral Biology*, 35, pp.S53-S58.
35. Strube, C., Homann, A., Gamer, M., Jahn, D., Seibel, J. and Heinz, D. (2011). Polysaccharide Synthesis of the Levansucrase SacB from *Bacillus megaterium* Is Controlled by Distinct Surface Motifs. *Journal of Biological Chemistry*, 286(20), pp.17593-17600.
36. Stryer, L. (1995). *Biochemistry*. New York: W.H. Freeman.
37. Tieking, M., Ehrmann, M., Vogel, R. and Gänzle, M. (2004). Molecular and functional characterization of a levansucrase from the sourdough isolate *Lactobacillus sanfranciscensis* TMW 1.392. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66(6), pp.655-663.

38. Tompa, P. (2012). Intrinsically disordered proteins: a 10-year recap. *Trends In Biochemical Sciences*, 37(12), 509-516.
39. van Hijum, S. (2004). Biochemical and molecular characterization of a levansucrase from *Lactobacillus reuteri*. *Microbiology*, 150(3), pp.621-630.
40. van Hijum, S., Kralj, S., Ozimek, L., Dijkhuizen, L., & van Geel-Schutten, I. (2006). Structure-Function Relationships of Glucansucrase and Fructansucrase Enzymes from Lactic Acid Bacteria. *Microbiology And Molecular Biology Reviews*, 70(1), 157-176.
41. van Hijum, S., van Geel-Schutten, G., Rahaoui, H., van der Maarel, M. and Dijkhuizen, L. (2002). Characterization of a Novel Fructosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* That Synthesizes High-Molecular-Weight Inulin and Inulin Oligosaccharides. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(9), pp.4390-4398.
42. Vujičić-Žagar, A. and Dijkstra, B. (2006). Monoclinic crystal form of *Aspergillus niger* α -amylase in complex with maltose at 1.8 Å resolution. *Acta Crystallographica Section F Structural Biology and Crystallization Communications*, 62(8), pp.716-721.
43. Wright, P., & Dyson, H. (1999). Intrinsically unstructured proteins: re-assessing the protein structure-function paradigm. *Journal Of Molecular Biology*, 293(2), 321-331.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Facultad de Ciencias
Químicas e Ingeniería

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS e INGENIERÍA

Programas educativos de calidad reconocidos por CIEES, CACEI y CONACYT
Certificada en la norma ISO 9001:2015

Cuernavaca, Morelos, 10 de febrero de 2020

MTRO. DANIEL MORALES GUZMÁN
MTRA. MARIBEL OSORIO GARCÍA
DRA. CLARITA OLVERA CARRANZA
DRA. FERNANDA MORALES GUZMÁN
ING. KAREN GUADALUPE SUÁREZ SÁNCHEZ
P R E S E N T E

Me permito comunicarles que han sido designados integrantes del **COMITÉ REVISOR** de la **TESIS** Titulada:

Delimitando la región N-terminal involucrada en la procesividad de la levansacarasa LevS de *Leuconostoc mesenteroides*

Que presenta (el) o (la) **C. SALVADOR MARTÍNEZ BAHENA**. Del programa educativo de: **INGENIERÍA QUÍMICA**



ATENTAMENTE
Por una humanidad culta
Una universidad de excelencia







DRA. VIRIDIANA AYDEÉ LEÓN HERNÁNDEZ

Directora

D I C T A M E N

DRA. VIRIDIANA AYDEÉ LEÓN HERNÁNDEZ
DIRECTORA DE LA FCQeI
P R E S E N T E

En respuesta a su amable solicitud para emitir **DICTÁMEN** sobre el trabajo que se menciona, me permito informarle que nuestro voto es:

VOTO	NOMBRE	FIRMA
Aprobatorio	MTRO. DANIEL MORALES GUZMÁN	
Aprobatorio	MTRA. MARIBEL OSORIO GARCÍA	
Aprobatorio	DRA. CLARITA OLVERA CARRANZA	
Aprobatorio	DRA. FERNANDA MORALES GUZMÁN	
Aprobatorio	ING. KAREN GUADALUPE SUÁREZ SÁNCHEZ	

VALH / fmg

Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México, 62209.
Tel. (777) 329 70,00, Ext. 7039/ fcqei@uaem.mx

**UA
EM**

Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023