



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Caracterización estructural y funcional de dos proteínas tipo quitinasa de *Hevea brasiliensis* con actividad de lectina

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Doctor en Ciencias

PRESENTA:

Carol Siseth Martínez Caballero

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Adela Rodríguez Romero

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, UNAM

Dr. Rogelio Rodríguez Sotres

Facultad de Química

MÉXICO, D. F. enero, 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

M. en C. CAROL SISETH MARTÍNEZ CABALLERO
Alumno (a) del Doctorado en Ciencias Bioquímicas
P r e s e n t e

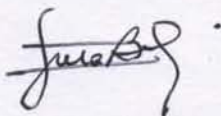
Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día 18 de agosto del presente año, conocieron su solicitud de ASIGNACIÓN de JURADO DE EXAMEN para optar por el grado de DOCTORA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS), con la réplica de la tesis "Caracterización estructural y funcional de dos proteínas tipo quitinasa de *Hevea brasiliensis* con actividad de lectina", dirigida por la Dra. Adela Rodríguez Romero.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado:

PRESIDENTE	Dra. Marietta Tuena Sangri
VOCAL	Dr. Ismael Bustos Jaimes
VOCAL	Dr. Alfredo Torres Larios
VOCAL	Dr. Lorenzo Patrick Segovia Forcella
SECRETARIO	Dra. Romina María de la Paz Rodríguez Sanoja

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 22 de agosto del 2014.
COORDINADORA DEL SUBCOMITÉ ACADÉMICO
CIUDAD DE MÉXICO



DRA. BERTHA GONZÁLEZ PEDRAJO

C.c.p. Archivo

BGP*lgg

A mis padres por su paciencia, apoyo, consejos, cuidados, esfuerzo, ejemplo y amor.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

A la Dra. Adela Rodríguez Romero por su comprensión, confianza, consejos, apoyo y asesoría.

A la Dra. Patricia Cano por sus enseñanzas y consejos.

Al Dr. Juan Hermoso por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo, así como por su confianza y apoyo.

A la Q. F. B María del Rocío Patiño Maya y a la M. en C. Georgina Espinosa Perez por su apoyo técnico.

A los miembros del comité tutor por sus enseñanzas, consejos y sugerencias a lo largo de la realización de este trabajo.

A los miembros del jurado por sus sugerencias y comentarios en la revisión de esta tesis.

A mis compañeros del laboratorio de Química de Biomacromoléculas del Instituto de Química por su amistad , apoyo y consejos.

A mis compañeros de laboratorio del Instituto de Química Física “Rocasolano” (IQFR) de Madrid por su amistad, enseñanza, apoyo y porque siempre me hicieron sentir como en casa.

Al CONACYT por el apoyo económico a los proyectos 82947 y 166472 y a DGAPA-UNAM IN207613.

Al Programa de Apoyo a los Estudios de posgrado (PAEP) por el apoyo económico brindado para la realización de una estancia y asistencia a congresos.

ÍNDICE.....	i
ABREVIATURAS.....	iii
RESUMEN.....	iv
ABSTRACT.....	vi
1.- INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.- Quitinasas.....	1
1.2.- Quitinasas de plantas.....	4
1.3.- Proteínas tipo quitinasa.....	5
1.4.- Quitinasas involucradas en alergia.....	6
2.- ANTECEDENTES.....	8
3.- HIPÓTESIS.....	9
4.- OBJETIVOS.....	9
4.1.- Objetivo general.....	9
4.2.- Objetivos específicos.....	9
5.- MATERIAL Y MÉTODOS.....	10
5.1.- Recolección de muestras y extracción de RNA.....	10
5.2.- Síntesis y amplificación del cDNA.....	10
5.3.- Hibridación Northern.....	11
5.4.- Clonación y expresión de las HbPTQs.....	12
5.5.- Purificación de las HbPTQs y sus respectivos dominios.....	12
5.6.- Espectrometría de masas y determinación del pI.....	13
5.7.- Cristalización de HbPTQ1 y sus dominios.....	14
5.8.- Colecta de datos, determinación de estructura y afinamiento.....	15
5.9.- Producción de mutantes HbPTQ1-A117E y HbPTQ2-A147E.....	16
5.10.- Determinación de actividad catalítica.....	16
5.11.- Ensayos de unión a quitina.....	17
5.12.- Ensayos de inhibición de crecimiento fúngico en placa.....	17
5.13.- Experimentos de fluorescencia.....	17
5.14.- Acoplamiento molecular.....	18
5.15.- Determinación de termoestabilidad usando Dicroísmo Circular (DC).....	19

5.16.- Extracción de DNA genómico y amplificación 5' y 3'RACE.....	20
5.17.- Western blot.....	20
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	22
6.1.- Clonación y expresión de las HbPTQs y sus respectivos dominios.....	22
6.2.- Purificación y caracterización de las HbPTQs.....	28
6.3.- Cristalización de HbPTQ1 y sus dominios.....	30
6.4.- Estructura de HbPTQ1 y sus dominios.....	32
6.4.1.- DUQ1.....	32
6.4.2.- DCat1.....	34
6.4.3.- HbPTQ1.....	41
6.5.- Actividad de quitinasa.....	43
6.6.- Unión a quitina y evaluación de actividad antifúngica.....	47
6.7.- Afinidad de unión al oligosacárido (GlcNAc) ₃	49
6.8.- Sitios de unión a oligosacáridos de quitina del DCat1.....	52
6.9.- Estabilidad térmica de las HbPTQs.....	58
6.10.- Localización celular de las HbPTQs en <i>H. brasiliensis</i>	61
7.0.- CONCLUSIONES.....	64
8.0.- BIBLIOGRAFÍA.....	65
9.0.- ANEXO.....	72

ABREVIATURAS

DC	Dicroísmo Circular
DCat	Dominio Catalítico
DUQ	Dominio de Unión a Quitina
GH	Glicosil Hidrolasas
GlcNAc	N-acetilglucosamina
ITC	Isothermal Titration Calorimetry
K_d	Constante de disociación
MES	2-(N-morfolino) ácido etanosulfónico
pI	Punto Isoeléctrico
PISA	Protein Interfaces, Surfaces and Assemblies
PRP	Proteínas Relacionadas a la Patogenésis
PTQ	Proteínas Tipo Quitinasa
PUM	Proteína de Unión a Maltosa
RACE	Rapid Amplification of cDNA Ends
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
SAD	Single-wavelength Anomalous Diffraction
SAXS	Small-Angle X-ray Scattering
T_m	Temperatura media de desplegamiento

RESUMEN

Las quitinasas y proteínas tipo quitinasa (PTQ) son macromoléculas importantes en los procesos de regulación y defensa desarrollados en plantas. Las quitinasas hidrolizan la quitina contenida en la pared celular de patógenos incluyendo hongos e insectos, mientras que las PTQs carecen de actividad enzimática debido a mutaciones en uno o más de los aminoácidos requeridos para la catálisis. En este trabajo, se clonaron, expresaron y caracterizaron dos PTQs de *H. brasiliensis* relacionadas a la familia 19 de glucósido hidrolasas (GH19). HbPTQ1 presentó una identidad de secuencia del 100% con el alérgeno Hev b 11.0101 reportado por O’Riordan y cols. en el 2002, mientras que HbPTQ2 presentó una inusual repetición de treinta aminoácidos correspondientes a la mitad del dominio de unión a quitina (DUQ) del extremo C-terminal y a un conector. A pesar de la carencia de la actividad hidrolítica debido a una sustitución en el residuo E117A y E147A en HbPTQ1 y HbPTQ2 respectivamente, ambas proteínas mostraron fuerte interacción con quitina y un trisacárido de quitina (GlcNAc)₃; así como actividad anti-fúngica sobre *Alternaria alternate*. Las estructuras cristalográficas de los dominios individuales de HbPTQ1 revelaron que esta proteína conserva el mismo plegamiento de las quitinasas activas relacionadas a la familia GH19. Experimentos de modelado molecular usando un hexasacárido de quitina (GlcNAc)₆ sugieren la participación de algunos residuos altamente conservados involucrados en la unión del azúcar, principalmente los residuos aromáticos Trp171, Tyr173 y Phe207 los cuales participan en interacciones polares y apolares en los subsitios -4 a -2. Interesantemente una reversión de la mutación de Ala por Glu llevó a la recuperación de la actividad hidrolítica indicando que únicamente una mutación puntual produce un cambio en la función de estas proteínas. Por otra parte, la termoestabilidad de las mutantes activas fue mayor que la exhibida por ambas HbPTQs sugiriendo que la

pérdida de actividad hidrolítica y termoestabilidad es sacrificada por una mayor capacidad de unión a quitina.

ABSTRACT

Plant chitinases and chitinase-like proteins (CLPs) are important macromolecules in regulatory processes and defense development. Chitinases hydrolyze chitin contained in the cell walls of pathogens including fungi and insects, while CLPs lack of enzymatic activity due to mutations in one or more of the amino acids required for the catalysis. In this study we cloned, expressed and characterized two CLPs belonging to the glycosyl hydrolase of the GH19 family from the rubber tree *Hevea brasiliensis*. HbCLP1 showed an identical sequence with the allergen Hev b 11.0101 reported by O'Riordan *et al.* 2002, while HbCLP2 exhibited an unusual repetition of thirty amino acids corresponding to half of the chitin binding domain (CBD) and the linker. Despite the lack of hydrolytic activity due to a substitution in the E117A and E147A residue in HbCLP1 and HbCLP2 respectively, both proteins showed strong interaction with chitin and chitotriose (GlcNAc)₃, as well as anti-fungal activity against *Alternaria alternate*. The crystallographic structures of the individual domains of HbCLP1 revealed that this protein retains the same folding of active chitinases belonging to GH19 family. Docking experiments using a chitohexaose (GlcNAc)₆ provides evidence of highly conserved residues involved in sugar binding, mainly the aromatic residues Trp171, Phe207 and Tyr173 present at -4 to -2 subsites. Interestingly, a mutation of Ala to Glu restored the enzymatic activity, indicating that only a punctual mutation changed the function in both proteins. Moreover, the thermostability of the active mutants was higher than the exhibited by the HCLPs suggesting that the loss of thermostability and hydrolytic activity is sacrificed for higher ability to bind chitin.

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- Quitinasas

Las quitinasas (EC 3.2.2.14) son glucósido hidrolasas que catalizan la degradación de la quitina, el segundo polisacárido natural mas abundante después de la celulosa. Estas enzimas son producidas por una gran variedad de organismos como son bacterias, hongos, levaduras, plantas, artrópodos y humanos y su tamaño oscila entre los 20 a 90 kDa (Bhattacharya *et al.*, 2008). Las quitinasas presentan diferencias en su estructura tridimensional, especificidad por el sustrato y su mecanismo catalítico (Kasprzewska, 2003) y actúan de forma sinérgica o sucesiva con otras proteínas, para degradar la quitina (Patil *et al.*, 2009). En general, las quitinasas están divididas en dos grupos: endoquitinasas y exoquitinasas. Las primeras hidrolizan la quitina al azar en sitios internos del polisacárido liberando oligosacáridos como quitotriosa y tetraosa; mientras que las segundas son subdivididas en dos categorías: quitobiosidasas (EC 3.2.1.29), las cuales realizan la hidrólisis a partir del extremo no reductor, liberando progresivamente di-acetilquitobiosa y las 1-4- β -glucosaminidasas (EC 3.31.30), que son enzimas que rompen los oligosacáridos producto de la hidrólisis de endoquitinasas y quitobiosidasas para generar monómeros de N-acetilglucosamina (GlcNAc) (Suginta *et al.*, 2000) (Fig. 1).

Según la base de datos CAZy (<http://www.cazy.org/>), la mayoría de las quitinasas, se encuentran clasificadas en las familias glucósido hidrolasas (GH) 18 y 19. Las quitinasas de la familia GH18 son sintetizadas por muchos tipos de organismos (Arakane & Muthukrishnan, 2010) y están involucradas en importantes procesos biológicos, como la asimilación de

quitina, defensa contra patógenos, crecimiento y morfogénesis (Arakane *et al.*, 2012). Por otra parte, las quitinasas de la familia GH19 son sintetizadas principalmente por plantas (Kasprzewska, 2003), aunque también pueden encontrarse en algunas bacterias (Kawase *et al.*, 2004).

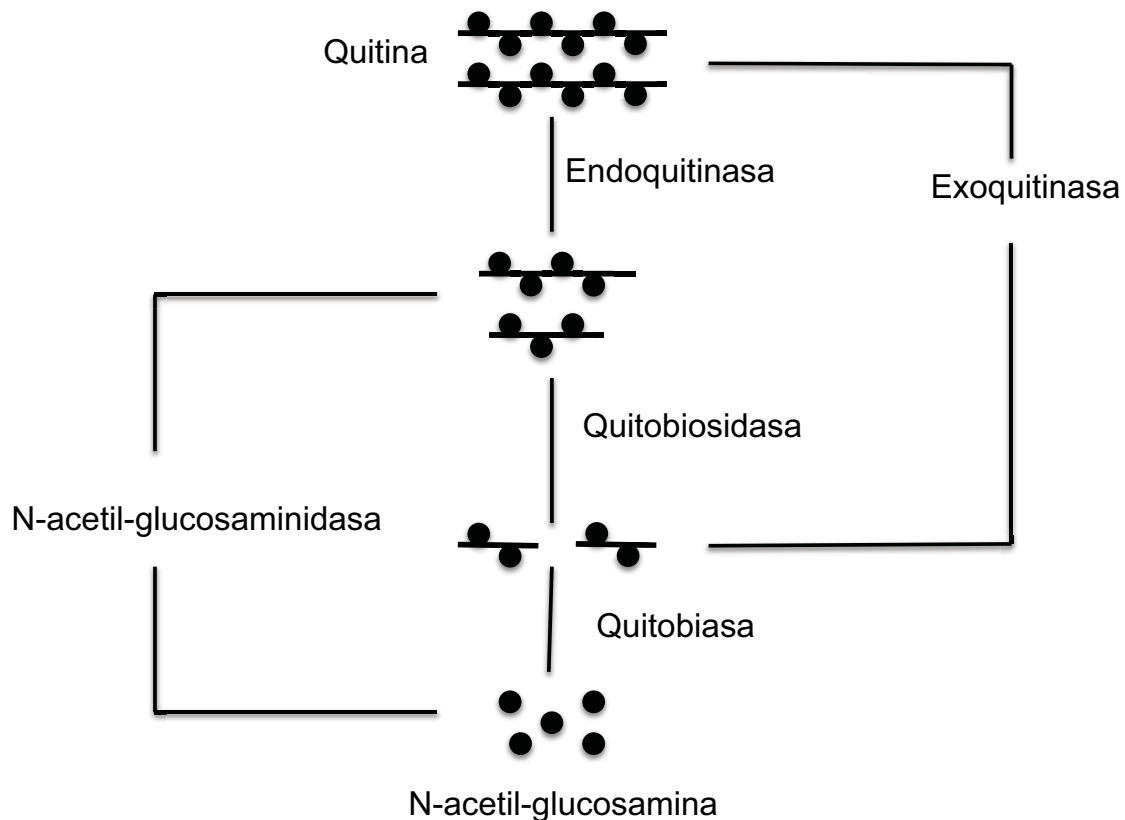


Figura 1. Enzimas involucradas en la hidrólisis de quitina a oligosacáridos de N-acetil-glucosamina.

La familia GH18 se caracteriza por un plegamiento tipo triosa fosfato isomerasa (TIM) (α/β)₈ (Davies & Henriksat, 1995) y sus miembros llevan a cabo la hidrólisis a través de un mecanismo enzimático de desplazamiento, el cual conduce a la retención de la configuración del carbono anomérico (Fig. 2a) (Tews *et al.*, 1997). La familia GH19 se caracteriza por tener

un alto contenido en hélice α y por actuar a través de un mecanismo catalítico de inversión (Fig. 2b) (McCarter & Withers, 1994; Iseli *et al.*, 1996).

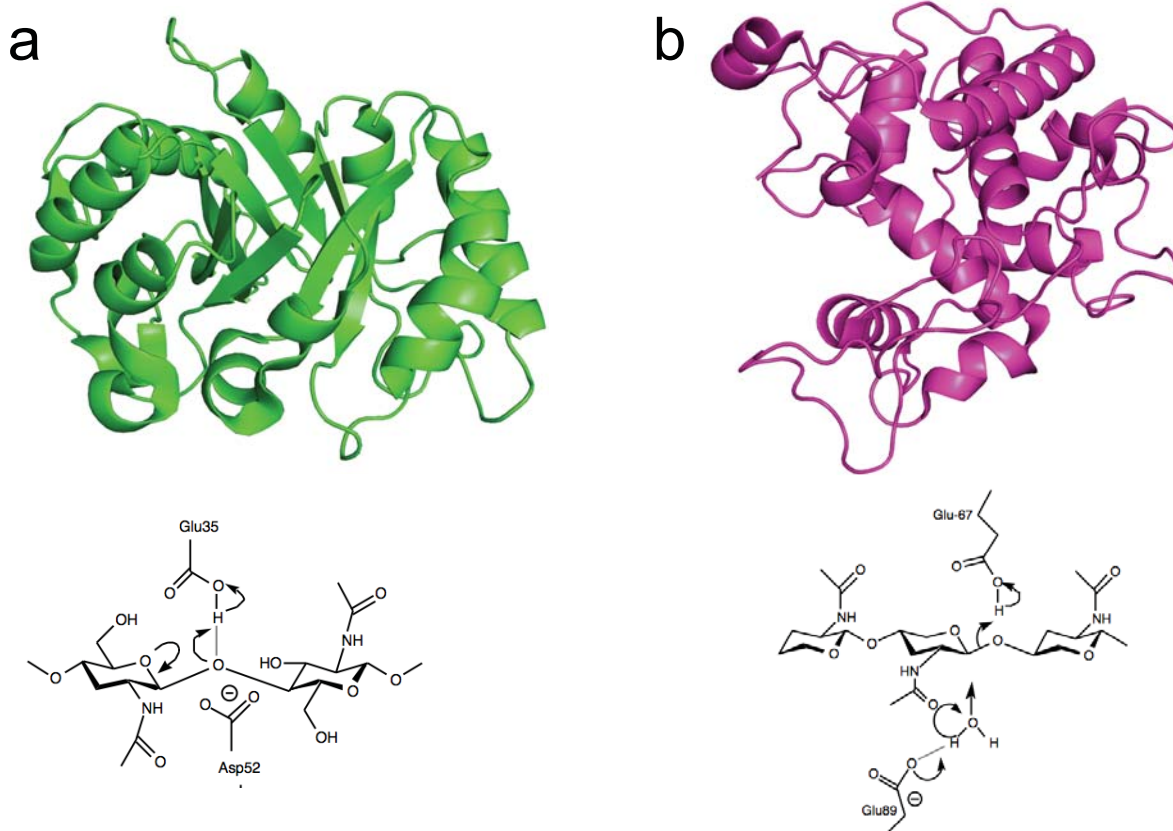


Figura 2. Representación estructural y mecanismo catalítico de dos quitinasas pertenecientes a las familias GH18 y GH19. (a) hevamina perteneciente a la familia GH18 (PDB 2HVM). (b) quitinasa de papaya perteneciente a la familia GH19 (3CQL).

El estudio de las quitinasas es importante ya que presentan una amplia gama de aplicaciones, como biocontrol contra hongos patógenos en plantas, o bien la producción de oligosacáridos con aplicación como sustancias biológicamente activas (Dahiya *et al.*, 2006). Por otra parte, también existen estudios recientes que han demostrado que las quitinasas

activas e inactivas juegan un papel importante en enfermedades humanas, tales como cáncer y asma (Bargagli *et al.*, 2007; Vicencio *et al.*, 2008).

1.2.- Quitinasas de plantas

Con base en la similitud de secuencia, las quitinasas de plantas se han dividido en VII clases (Kasprzewska, 2003; Sarma *et al.*, 2012). Las clases I, II, IV, VI y VII pertenecen a la familia GH19 mientras que las de clase III y V a la familia GH18 (Ohnuma *et al.*, 2011). Las quitinasas de clase I se caracterizan por tener un dominio de unión a quitina (DUQ) rico en cisteínas en el extremo N-terminal, el cual ha sido implicado en la unión a quitina debido a su homología con la heveína, que está presente en el látex de *Hevea brasiliensis* y un dominio catalítico en el extremo C-terminal (DCat). Ambos dominios están conectados por una secuencia de aminoácidos que varía en longitud y composición. Generalmente estas proteínas poseen una extensión o péptido C-terminal que presumiblemente dirige su expresión a la vacuola (Neuhaus *et al.*, 1991). Las quitinasas de clase II son generalmente ácidas y similares a las de clase I en su dominio catalítico, pero carecen del dominio tipo heveína, así como de la extensión C-terminal. En la Figura 3 se muestra un diagrama que indica las características de los dominios de las quitinasas de clases I-VII.

Las quitinasas de plantas participan de manera importante como proteínas de defensa y forman parte del grupo de proteínas relacionadas a la patogénesis (PRP). Las PRP pueden presentar varias funciones biológicas como enzimas hidrolíticas, inhibidores de enzimas o como péptidos permeabilizantes de membrana y tienen efectos antifúngicos, antibacterianos,

insecticidas y antivirales en respuesta a la invasión de patógenos y factores abióticos (Ebrahim *et al.*, 2011; Li & Yi, 2012).

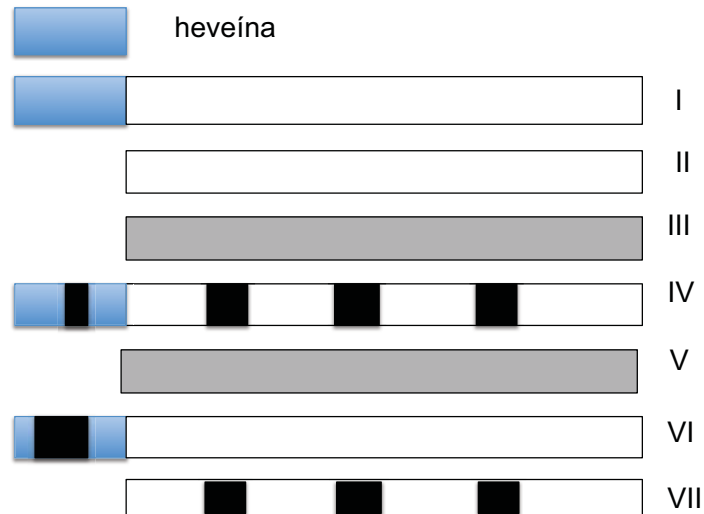


Figura 3. Clasificación de quitinasas de plantas con base a su secuencia de aminoácidos. En rectángulos azules están representados los dominios tipo heveína o DUQs, en rectángulos blancos los DCats, los rectángulos grises representan secuencias con mayor identidad a quitinasas de bacterias y los rectángulos negros representan deleciones de secuencias de aminoácidos.

Además de su función como PRP, las quitinasas de plantas tienen otras funciones fisiológicas que no están relacionadas con su actividad hidrolítica. Por ejemplo, algunas quitinasas se unen a cristales de hielo afectando su crecimiento y morfología proporcionando tolerancia al congelamiento (Hassas-Roudsari & Goff, 2012).

1.3.- Proteínas tipo quitinasa

En algunos eucariontes se ha reportado un número importante de genes codificantes para quitinasas; sin embargo, no todos pertenecen a enzimas activas (Hossain *et al.*, 2010). Muchos organismos incluyendo plantas, invertebrados y animales superiores expresan quitinasas inactivas denominadas proteínas tipo quitinasa (PTQ), las cuales carecen de actividad debido a

substituciones en los residuos catalíticos (Arakene & Muthukrishnan, 2010). A pesar de su inactividad, estas proteínas retienen su capacidad de unión a quitina y están involucradas en algunos procesos fisiológicos (Van Damme *et al.*, 2007), como biosíntesis de celulosa en *Arabidopsis thaliana* y *Oryza sativa* (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2012), o como proteínas de almacenamiento en la etapa de maduración de *Musa paradisiaca* (Peumans *et al.*, 2002). Algunas PTQs tienen actividad antifúngica e insecticida (Vasconcelos *et al.*, 2011; Wasano *et al.*, 2009) y se ha propuesto que la actividad antifúngica es resultado de la habilidad de estas proteínas para inhibir glicosidasas fúngicas como xilanasas, aunque otros mecanismos pudieran estar involucrados. Para la familia GH18 se han reportado quitinasas inactivas tanto en plantas (Patil *et al.*, 2013) como en mamíferos (Bussink *et al.*, 2007); mientras que para la familia GH19 no había reportes de proteínas tipo-quitinasa de plantas hasta la publicación de nuestro artículo (Martínez-Caballero *et al.*, 2014).

1.4.- Quitinasas involucradas en alergia

Las quitinasas de clase I son panalérgenos o alérgenos menores que se han asociado con frecuencia al síndrome látex-frutas. Los individuos alérgicos a las proteínas del látex del árbol del hule (*Hevea brasiliensis*) pueden tener reacciones de hipersensibilidad a frutas, las cuales se ha sugerido contienen moléculas similares a las de este material. La reactividad cruzada puede depender de la presencia de epítomos conformacionales similares, que se encuentran en la superficie de las proteínas plegadas (Barre *et al.*, 2009).

Las respuestas alérgicas a proteínas del látex natural han sido reconocidas como un serio problema de salud. A diferencia de muchas alergias mediadas por las IgE, que son

inducidas por uno o unos cuantos alérgenos, en el látex natural hay muchas proteínas que varían en su potencial alergénico. De estas proteínas, catorce han sido clasificadas oficialmente por la Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas como la principal causa de sensibilización en individuos susceptibles, siendo una ellas la quitinasa de clase I, la cual se ha clasificado como el alérgeno Hev b 11 (O’Riordain *et al.*, 2002; Rhis *et al.*, 2003).

2.- ANTECEDENTES

En el 2002 O’Riordan y cols. fueron los primeros en clonar el gen de la quitinasa de clase I (Hev b 11.0101) del látex de *H. brasiliensis*. Ellos obtuvieron una proteína recombinante de fusión con la proteína de unión a maltosa (PUM), la cual fue expresada utilizando el sistema *E. coli* y el vector pMAL-p2. La proteína recombinante Hev b 11.0101-PUM mostró actividad biológica inhibiendo el crecimiento de *Fusarium oxyspoum* de forma dependiente de la dosis. Además fue reconocida por anticuerpos IgE de sueros de pacientes alérgicos al látex y frutas en ensayos de ELISA e Inmunoblots.

Un año más tarde Rihs y cols expresaron la quitinasa de clase I de hojas de *H. brasiliensis* (Hev b 11.0102), utilizando el mismo sistema de expresión que O’ Riordan y cols. Esta proteína mostró diferencias en 8 aminoácidos comparada con la Hev b 11.0101 obtenida del látex. Un análisis inmunológico reveló la presencia de anticuerpos específicos IgE para esta nueva isoforma en 29 % de sueros de pacientes alérgicos a látex (Rihs *et al.*, 2003). Las isoformas fueron clasificadas como alérgenos Hev b 11.0101 y Hev b 11.0102 por el Sub-Comité de Nomenclatura de Alérgenos de la IUIS (International Union of Immunological Societies), como PRP-3 y como quitinasas de clase I pertenecientes a la GH19. Sin embargo, su actividad biológica fue evaluada únicamente por inhibición de crecimiento fúngico y los resultados no fueron explicados claramente en estos reportes.

3.- HIPÓTESIS

Las quitinasas de clase I de *H. brasiliensis* son endoquitinasas que conservan un plegamiento tridimensional característico a la familia GH19, así como un sitio conservado de unión a oligosacáridos.

4.- OBJETIVOS

4.1.- Objetivo general

Caracterizar funcional y estructuralmente a dos proteínas tipo quitinasa de *H. brasiliensis*.

4.2.- Objetivos específicos

- Clonar, expresar y purificar dos PTQs de *H. brasiliensis*.
- Cristalizar y determinar la estructura tridimensional de las PTQs por técnicas de difracción de rayos X.
- Evaluar la actividad hidrolítica usando diferentes sustratos de quitina.
- Determinar la afinidad de las PTQs a quitina y quitotriosa.
- Predecir las posibles interacciones involucradas en el reconocimiento la oligosacáridos de N-acetil-glucosamina por acoplamiento molecular.
- Evaluar la actividad biológica de las PTQs por experimentos de inhibición de crecimiento fúngico en placa.
- Evaluar la estabilidad térmica de las PTQs por experimentos de Dicroísmo Circular.
- Predecir la localización celular de las PTQs de *H. brasiliensis*.

5.- MATERIAL Y MÉTODOS

5.1.- Recolección de muestras y extracción de RNA

La colecta de látex y hojas de *H. brasiliensis* se realizó en el campo experimental “El Palmar” de Tezonapa, Veracruz a partir de árboles de las clonas GV-42 y RIMM600. Para la extracción del RNA total un gramo de hojas se congeló y homogenizó en nitrógeno líquido. El polvo fue resuspendido en amortiguador de extracción (0.1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM EDTA, 1% SDS y 1% β -mercaptoetanol) y mezclado con un volumen de Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico (PCI) en una relación v/v 25:24:1. Después se centrifugó a 14,300 g por 25 min a temperatura ambiente. La fase acuosa fue extraída con PCI y recuperada por centrifugación, este procedimiento se repitió dos veces. El sobrenadante fue mezclado con acetato de sodio a una concentración final de 150 mM y un volumen de etanol y se incubó durante dos horas a -20 °C. El pellet fue resuspendido con agua libre de RNAsas y precipitado con 4 M de LiCl a -20 °C durante toda la noche. El RNA fue colectado por centrifugación a 20,000 g por 30 min a 4 °C y resuspendido en 30 μ L de agua libre de RNAsas. La extracción del RNA del látex se realizó siguiendo el protocolo reportado por Tang *et al.*, 2007.

5.2.- Síntesis y amplificación del cDNA

La síntesis del cDNA se realizó según las indicaciones del kit comercial Protoscript® First Strand cDNA Syntesis Kit, New England Biolabs, usando 3 μ g de RNA total y oligos dT23. La amplificación de los genes chi-L1 y chi-L2 se llevó a cabo en 50 μ L de reacción usando la DNA polymerase Phusion® High-Fidelity, 5 μ L de cDNA y una concentración final de 0.5

μM de cada uno de los oligonucleótidos CHI-f y CHI-r (Tabla 1). Además se amplificaron las secuencias codificantes para los dominios individuales de cada una de las proteínas HbPTQ1 y HbPTQ2 usando como molde de DNA chi-L1 y chi-L2 respectivamente y usando los pares de oligonucleótidos CBD-f y CBD-r para los DUQs y Cat-f y Cat-r para los DCats (Tabla 1). Todos los productos de reacción de PCR fueron obtenidos en el termociclador (TC-512, TECHNE) con un paso inicial de desnaturalización de 95 °C por 30 minutos, 30 ciclos (98 °C por 10 segundos y 72°C por 30 segundos), seguidos por un paso final de extensión de 5 minutos a 72 °C.

Tabla 1. Secuencias de oligonucleótidos usados en este trabajo

Oligonucleótido	Secuencia
CHI-a	5'-ggccatggagcaatgtggaaggcaagct-3
CHI-b	5'-aagcgccgctcacctaataccgaatggcgt-3
CBD-a	5'-ggccatggagcaatgggaaggcaagct-3
CBD-b	5'-cagcgccgctcaaactccaccatcacattggctttggcagc-3
CatD-a	5'-ggccatggagcagcagacaagagtatcatctcaagatcaacgtttgaggag-3
CatD-b	5'-aagcgccgctcacctaataccgaatggcgt-3
CHI/A117E-a	5'-cagacatctcatgaaactacaggagg-3
CHI/A117E-b	5'-ccctcctgtagttcatgagatgtctg-3
Chi-5'-P1	5'-tgtaagcatctcctcaaacgttga-3
Chi-5'-P2	5'-cactgccacaatattcaggtgtgttg-3
Chi-3'-P1	5'-tctccagctgaaatcctggtggcgg-3
Chi-3'-P1	5'-tctataaaaccaatacagatctca-3

5.3.- Hibridación Northern

En un gel de agarosa-formaldehído al 2% se fraccionaron 15 μg de RNA total y se transfirieron a una membrana de nylon¹⁶ (Amersham HybondTM_N⁺). El gen chi-L1 se hibridó por 16 h a 60° C, después de la incorporación de ³²P. La membrana se lavó y se expuso a una película Kodak para su análisis.

5.4.- Clonación y expresión de las HbPTQs

Cada uno de los productos de PCR fueron clonados en el vector pET 32a (Novagen, EMD Biosciences, USA) entre los sitios de restricción Nco I (5' C*CATGG 3') y Not I (5' GC*GGCCGC 3'). Dos residuos (Ala y Met) fueron introducidos de manera adicional, en el extremo N-terminal, a la secuencia de las HbPTQs completas y a los DUQs para garantizar la liberación de las proteínas de interés usando enterocinasa EkMax (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA). Las clonas positivas fueron identificadas por análisis de restricción y secuenciación (Laragen, Inc, Culver City, CA, USA) y para la expresión de las proteínas se transformaron células *E. coli* Rosetta gammi (DE3) pLys con cada uno de los plásmidos que contenía el inserto respectivo.

Las proteínas completas y sus respectivos dominios fueron expresados de manera independiente como se describe a continuación: diez mL de un cultivo overnight fue inoculado en 1 L de medio Luria-Bertani (LB) adicionado con 15 µg/mL de kanamicina, 34 µg/mL de cloramfenicol, 12.5 µg/mL de tetraciclina y 100 µg/mL de ampicilina. Cuando las células alcanzaron una OD₆₀₀ de 0.4 incubadas a 37 °C, se adicionó 0.25 mM de Isopropil β-D tiogalactopiranosido (IPTG) y se incubaron nuevamente disminuyendo la temperatura a 18 °C. Finalmente las células fueron cosechadas después de 12 horas por centrifugación a 15, 300 g.

5.5.- Purificación de las HbPTQs y sus respectivos dominios

Los extractos proteicos se obtuvieron por sonicación del botón de células sedimentadas en amortiguador de lisis (Tris-HCl 50 mM pH 7.5 y 300 mM NaCl) y centrifugación a 10,000 g

por 30 min para clarificación del lisado celular. Los sobrenadantes se aplicaron a una columna de afinidad a níquel HisTrap (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) y las proteínas de fusión fueron eluidas usando un gradiente de imidazol. Posteriormente se llevó a cabo una proteólisis con enterocinasa EkMax (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) y finalmente se usó una cromatografía de afinidad a níquel para su purificación. Los DUQs y DCats fueron purificados hasta este punto. Las proteínas completas fueron sometidas a un paso extra de purificación usando una columna de intercambio iónico Mono Q (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA); la elución se hizo con un gradiente de 1 M de NaCl. Los pasos de purificación se siguieron usando geles de acrilamida SDS-PAGE y la concentración se determinó usando el coeficiente teórico de extinción molar y midiendo la absorbancia a 280 nm.

5.6.- Espectrometría de masas y determinación del pI

Las proteínas completas se suspendieron en una matriz de ácido sinapínico y los espectros de masas fueron adquiridos con un equipo de MALDI-TOF, Microflex LTTM en modo lineal positivo.

El punto isoelectrónico (pI) de las HbPTQs se determinó usando un gel de isoelectroenfoque (IEF) Phastgel con un gradiente de 4.0-6.5 en el equipo Phast System (Amersham™) como describe el fabricante y usando como referencia el marcador Broad range pI (pH 3-10). Los valores teóricos de masas y pI fueron calculados en el servidor ExPASy ProtParam tool.

5.7.- Cristalización de HbPTQ1 y sus dominios

Los ensayos para encontrar las condiciones de cristalización de las diferentes proteínas (HbPTQ1, DCat1 y DUQ1) se llevaron a cabo usando el robot Nano-Drop™ ExtY (Innovadyne Technologies Inc.) y los kits comerciales: Screen I y II, INDEX Screen de Hampton Research, PACT Suite, JCSG Suite y JBS Classic de Qiagen, abarcando 900 condiciones diferentes. Los ensayos iniciales se realizaron por el método de difusión en fase de vapor, en la modalidad de gota sedente, a 291 K en microplacas Innovaplate SD-2 (Innovadyne Technologies Inc.) mezclando cantidades iguales (250 nL) de proteína y solución precipitante. Las gotas fueron equilibradas con 80 µL de solución madre en el pocillo.

Las condiciones en las cuales se obtuvieron cristales proteicos fueron optimizadas usando variaciones en el pH y en la concentración de agente precipitante. Se obtuvieron cristales de buena calidad para DCat1 (7.0 mg/mL) en 0.1 M de Tris-HCl pH 8.3, 0.2 M MgCl₂ y 30% PEG 4000 y para DUQ1 (11.0 mg/mL) en 0.1 M MES pH 7.0, 1.6 M (NH₄)₂SO₄ y 4% 1,4-dioxano usando el método de gota sedente (proporción 1:1 volumen) mezclando 1 µL de la proteína con 1 µL de solución precipitante y equilibrando con 400 µL de solución madre.

Los cristales de DCat1 con GlcNAc se obtuvieron incubando la proteína con una solución concentrada de este oligosacárido por 2 horas a temperatura ambiente y usando la misma condición antes descrita para este dominio.

Finalmente, para HbPTQ1 se realizaron varios ajustes en la concentración de proteína y fue a 5.0 mg/mL, donde se obtuvo un cristal único de muy buena calidad para los experimentos de difracción de rayos X en la condición 27 de Crystal Screen 2 (0.01 M ZnSO₄, 0.1 M MES pH 6.5 y 25% PEG monometil éter 550).

5.8.- Colecta de datos, determinación de estructura y afinamiento

Los datos de difracción de rayos X de los cristales del DUQ1 fueron colectados a 1.60 Å con radiación sincrotrón en el European Synchrotron Radiation Facility (ESRF), Grenoble, Francia; usando como crioprotector una solución saturada de Li₂SO₄. Los cristales del DCat1 se difractaron en el Swiss Light Source (SLS) Villigen, Suiza y la colecta de datos se hizo a una resolución de 1.60 Å. Para el DCat1 en complejo con GlcNAc los cristales se difractaron en el equipo Rigaku del Laboratorio Nacional de Estructura de Macromoléculas (LANEM) del Instituto de Química de la UNAM a una resolución de 2.05 Å y finalmente los datos de difracción del cristal de HbPTQ1 fueron colectados en el Advanced Photon Source (APS), Argonne National Laboratory, Chicago, EUA a una resolución de 1.35 Å. Para el DCat1 y HbPTQ1 no hizo falta un crioprotector adicional. Todos los datos se procesaron y escalaron con XDS (Kabsch, 2010) y SCALA (Winn *et al.*, 2011) respectivamente.

Las cuatro estructuras se resolvieron por reemplazo molecular usando el programa Phaser en Phenix (Adams *et al.*, 2010) y como modelos de búsqueda: la estructura de la heveína (PDB 1Q9B) que tiene 68% de identidad con el DUQ1 y la quitinasa de papaya (PDB 3CQL) que muestra un 84% de identidad con DCat1. Para HbPTQ1 y DCat1 en complejo con

el GlcNAc se usaron como modelos de búsqueda los dominios DUQ1 y DCat1 afinados en este trabajo. Los mapas de densidad electrónica (2Fo-Fc y Fo-Fc) fueron examinados con COOT (Emsley & Cowtan, 2004) y los modelos fueron afinados con Phenix-Refine (Afonine *et al.*, 2012). Las comparaciones estructurales se hicieron con el servidor DALI (Holm & Rosenström, 2010) y las figuras con el programa PyMOL (DeLano, 2002).

5.9.- Producción de mutantes HbPTQ1-A117E y HbPTQ2-A147E

Para la producción de las mutantes activas se uso mutagénesis sitio dirigida por PCR inversa (Urban *et al.*, 1997). Los oligonucleótidos usados para introducir las mutaciones (CHI-AEf y CHI-AEr) se describen en la Tabla 1. Las mutantes se produjeron exitosamente y se purificaron usando la metodología descrita para las proteínas nativas.

5.10.- Determinación de actividad catalítica

La actividad endoquitinasa se determinó con el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) usando tres sustratos diferentes: quitina de camarón (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), perlas de quitina (New England BioLabs, Ontario, Canada) y quitina coloidal la cual fue preparada como se describe en el trabajo de Khan *et al.*, 2010.

Los ensayos cuantitativos para las mutantes se realizaron usando azul-quitina (2 mg/mL) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) en amortiguador acetatos-citratos a dos valores de pH ácidos: 4.0 y 5.0 y a un pH básico usando amortiguador Tris-HCl pH 8.0. Las mezclas se incubaron por 72 horas a 37 °C con agitación constante, después se centrifugaron a 14,000 g durante 5 minutos. Una unidad de enzima se definió como el cambio en la absorbancia a 575

nm (ΔA_{570}) de 1 en 72 horas (Thompson *et al.*, 2001). Todas las mediciones se realizaron por triplicado y como control negativo se usaron las HbPTQs inactivas.

5.11.- Ensayos de unión a quitina

Cincuenta μg de cada una de las HbPTQs en amortiguador 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 se pasaron por una columna preparada con perlas de quitina (1 mL) previamente equilibrada con este mismo amortiguador. Después de varios lavados se comenzó la elución usando: 1 M de NaCl, 0.1 M y 1 M de ácido acético.

5.12.- Ensayos de inhibición de crecimiento fúngico en placa

La evaluación de la actividad antifúngica de las HbPTQs se realizó usando al hongo *Alternaria alternata* y probando tres diferentes concentraciones de proteína (25, 50 y 75 μg) en 7 μL de amortiguador 50 mM Tris-HCl, pH 7.5. Estas alícuotas se aplicaron a discos de papel estériles de 5 mm que se colocaron en los extremos de una caja Petri de 9 cm de diámetro, la cual fue previamente inoculada en el centro con un botón de 5 mm³ de agar conteniendo el micelio de cuatro días de cultivo de *A. alternata*. Los discos con las proteínas se colocaron a una distancia de 20 mm del botón con micelio y se incubaron por 72 horas a temperatura ambiente.

5.13.- Experimentos de fluorescencia

Para estimar las constantes de afinidad de la unión de las HbPTQs y cada uno de sus dominios con (GlcNAc)₃ se midió el cambio de la fluorescencia de los triptófanos, en la región de 300 a 400 nm, después de la adición del ligando a una solución de proteína de 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ en

amortiguador de fosfatos 100 mM pH 7.4 usando un espectrofluorómetro Olis® DM45 (Olis Inc., Bogart, GA, USA) y una longitud de excitación de 290 nm. Las mediciones de fluorescencia se hicieron dos minutos después de mezclar el oligosacárido con la proteína para permitir el equilibrio. Los cambios en las intensidades de fluorescencia a la máxima longitud de emisión ($\lambda_{\text{max}} \sim 330$ nm) se usaron para trazar un gráfico contra la concentración del ligando. Las curvas fueron ajustadas usando la siguiente ecuación:

$$\Delta F = \frac{\Delta F_{\text{max}}[\text{ligando}]}{K_d + [\text{ligando}]}$$

Donde ΔF es la diferencia en la intensidad de fluorescencia de las proteínas con y sin oligosacárido, ΔF_{max} es la diferencia de fluorescencia cuando todos los sitios de la proteína están saturados por el ligando y k_d es la constante de disociación del ligando del complejo proteína-ligando. Todos los datos representan de dos a tres mediciones realizadas independientemente.

5.14.- Acoplamiento molecular

Se realizaron experimentos de acoplamiento *in silico* usando la estructura cristalográfica del DCat1 determinada en este trabajo y como ligando al oligosacárido (GlcNAc)₆ obtenido en SMILES (Weininger, 1988). Ambos se minimizaron en CHIMERA (Pettersen *et al.*, 2004) y sin definir una región de unión, se realizó el acoplamiento molecular con el servidor Swissdock (Grosdidier, 2011). Seleccionamos el mejor modelo con base en la función de menor energía y finalmente, al modelo de acoplamiento molecular se le incluyeron las aguas

cristalográficas experimentales. Por convención, los monosacáridos de (GlcNAc)₆ se enumeraron -4, -3, -2, -1 y +1, +2 comenzando desde el extremo no reductor.

Para el DUQ1 se realizó un alineamiento estructural con la heveína en complejo con (GlcNAc)₃ (PDB 1T0W), el modelo DUQ1-(GlcNAc)₃ se obtuvo incluyendo el oligosacárido en la misma orientación que la presente en la estructura de RMN (PDB 1T0W). Finalmente, este modelo fue sujeto a varios ciclos de minimización usando CHIMERA.

5.15.- Determinación de termoestabilidad usando Dicroísmo Circular (DC)

Los espectros de DC basales se obtuvieron usando un espectropolarímetro Jasco-J700 (Jasco Inc., Easton, MD, USA) equipado con un sistema de control de temperatura Peltier a 20 °C y una celda de cuarzo de 1 cm de paso de luz. Las HbPTQs y sus dominios fueron dializadas en amortiguador de fosfatos 20 mM, pH 7.5 y filtradas. Para cada proteína en una concentración de 20 µg/µL se promediaron tres barridos de espectros obtenidos la región del UV lejano desde 190 a 260 nm.

Los perfiles de desnaturalización térmica se obtuvieron en límites de temperatura de 20-90 °C con una velocidad de cambio de 50 °C/h. El registro de los cambios de elipticidad para las proteínas completas y sus DCats se realizó a 222 nm y para los DUQs a 196 nm, de acuerdo a los espectros de DC basales. La fracción de proteína desplegada se calculó por la diferencia entre el valor de DC de la zona de post y pre-transición y con este valor se trazó una gráfica en función de la temperatura. La temperatura media de desplegamiento (T_m) se obtuvo interpolando la fracción 0.5 entre la proteína plegada y desplegada en la gráfica anterior.

5. 16.- Extracción de DNA genómico y amplificación 5' y 3' RACE

La extracción de DNA de las hojas de *H. brasiliensis* se realizó siguiendo la metodología descrita por Kotchoni & Gachomo, 2009. El DNA fue usado como molde de PCR usando los oligonucleótidos CHI-a y CHI-b (Tabla 1) para amplificación de las secuencias chi-L1 y chi-L2. Los productos de PCR fueron clonados en el vector pET32a y secuenciados.

El RNA (extraído como se describió en la sección 5.1) fue amplificado en los extremos 5' y 3' RACE usando el SMART RACE cDNA Amplification Kit (Clontech Laboratories, Mountain View, CA, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Dos pares de oligonucleótidos se usaron para la amplificación (chi-5'-P1, chi-5'-P2 y chi-3'-P1 y chi-3'-P2), los productos de PCR fueron clonados en el vector pGEM-T Easy (Promega Corporation, Madison, WI, USA) y posteriormente secuenciados.

5.17.- Western blot

Las fracciones proteicas del suero B (vacuolas) y C (citosol) se separaron corriendo un gel al 12% SDS-PAGE y se transfirieron en una membrana de PVDF (Millipore). La membrana se bloqueó durante dos horas a temperatura ambiente con una solución de bloqueo (5% de leche descremada+Tween 20 al 0.05% en PBS), después se lavó tres veces durante 5 minutos con PBST (PBS+Tween 20 al 0.05%) y se incubó durante dos horas a temperatura ambiente con el anticuerpo primario anti-quitinasa de conejo (PR-3 polyclonal antibody 1:10,000 Agrisera). Después de extensivos lavados, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario IgG de cabra anti-conejo acoplado a peroxidasa (1:50,000) por 1 hora y se lavó con PBST. La inmunoreactividad se visualizó por aumento en la quimioluminiscencia (Super Signal® West

Pico, Thermo Scientific) y la membrana se expuso a una película Kodak XAR-5 FILMS (Sigma Aldrich). Las dos HbPTQs recombinantes fueron usadas como control positivo.

6.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1.- Clonación y expresión de las HbPTQs y sus respectivos dominios

Dos fragmentos de cDNA fueron amplificados a partir de RNA total de las hojas y látex de dos clones diferentes del árbol (GV-42 y RIMM600), uno de aproximadamente 888 pb y otro más de 978 pb; los cuales se denominaron chi-L1 y chi-L2 respectivamente. (Fig. 4). El fragmento chi-L1 fue idéntico en tamaño al cDNA de la quitinasa de clase I reportada en estudios previos (O’Riordain *et al.*, 2002); no obstante los dos fragmentos fueron clonados y secuenciados.

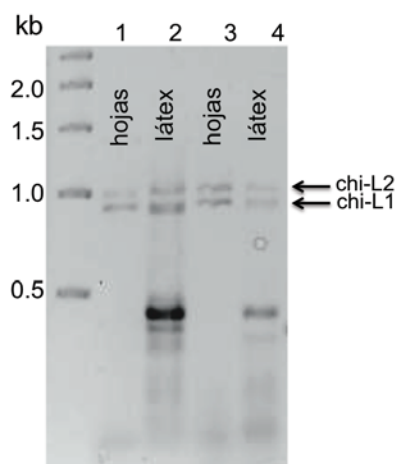


Figura 4. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Productos de amplificación chi-L1 (888 pb) y chi-L2 (978 pb). Los carriles 1 y 2 corresponden a la clona de *H. brasiliensis* GV-42 y los 3 y 4 a la RIM600.

El análisis de la secuencia de aminoácidos reveló que HbPTQ1 (chi-L1) está compuesta por un dominio de unión a quitina (DUQ1), un conector y un dominio catalítico (DCat1); tal como se ha descrito para las quitinasas de clase I de la familia GH19. Mientras que HbPTQ2 (chi-L2) exhibe un dominio de unión a quitina (DUQ) (Glu1-Val43), un conector (Gly44-Gly53), una repetición de aminoácidos que comprende la mitad del DUQ

hacia el extremo C-terminal (Cys54-Val73) más el conector y un dominio catalítico (DCat2). Al intervalo de aminoácidos (Glu1-Val73) se le denominó dominio de unión a quitina largo (DUQ2) (Fig. 5).



Figura 5. Representación gráfica de los componentes de las HbPTQs recombinantes de *H. brasiliensis*.

El RNA total aislado del látex fue de buena calidad, ya que no presentó degradación ni contaminación de DNA (Fig. 6a). La diferencia en la expresión entre ambos fragmentos (chi-L1 y chi-L2) fue analizada usando hibridación *in situ* Northern blot, en la cual se encontró mRNA para ambos transcritos lo que indica que la expresión de ambos genes es constitutiva, aunque en esta muestra fue mayor la proporción de chi-L2 (Fig. 6b). Este patrón fue confirmado por RT-PCR, donde cada uno de los genes fue amplificado a partir del cDNA (Fig. 6c).

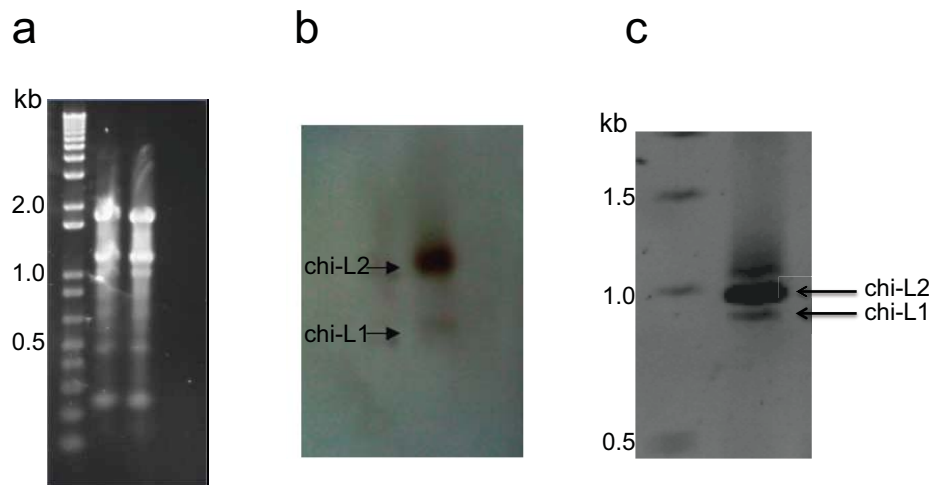


Figura 6. Expresión diferencial de chi-L1 y chi-L2 en el látex de *H. brasiliensis*. (a) Gel de agarosa al 1% donde se muestra el RNA. (b) Ensayo de Northern blott. (c) RT-PCR.

Por otra parte, cuando se compararon muestras de látex colectadas en diferentes épocas del año, se observó una diferencia en la expresión de ambos genes (Fig. 7). Reportes previos sugieren que HbPTQ1 forma parte del grupo de las PRPs, las cuales son expresadas mayoritariamente en el látex en condiciones de estrés (daño mecánico, agentes químicos externos, etc) o por el ataque de patógenos. *H. brasiliensis* es un árbol que sufre daños constantes por repetidas incisiones en la corteza para la extracción del látex y que como consecuencia se encuentra vulnerable a estrés fisiológico o a daño por patógenos. Por lo tanto, es posible que una variación en la expresión de estas dos isoformas se deba a un efecto regulatorio, a la infección por un patógeno o a una actividad específica para cada una de ellas dependiendo de la estación del año, como se ha descrito recientemente para otras enzimas del látex de *H. brasiliensis* (Xiao *et al.*, 2014).

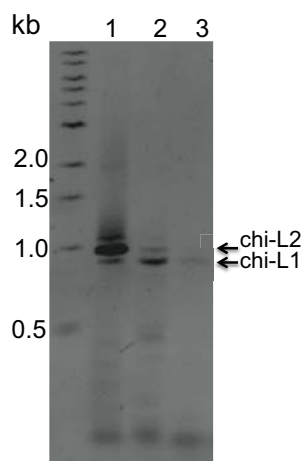


Figura 7. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Análisis de la expresión de chi-L1 y chi-L2 en tres diferentes meses del año. Carril (1), junio; (2), enero y (3), septiembre.

La isoforma HbPTQ1, que está compuesta de 295 aminoácidos, presentó un alto porcentaje de identidad con dos alérgenos del árbol del hule previamente reportados: 100% con el alérgeno Hev b 11.0101 (O’Riordain *et al.*, 2002) y 97% con el alérgeno Hev b 11.0102 (Rihs *et al.*, 2003), los cuales fueron clonados de látex y hojas respectivamente. Por otra parte, para HbPTQ2 no se encontraron secuencias idénticas; esta proteína de 385 aminoácidos mostró una identidad de secuencia del 99% con Hev b 11.0102 cuando los aminoácidos Cys54-Gly83 se eliminaron del análisis (Fig. 8). El alérgeno Hev b 11.0101 que únicamente se había clonado a partir de látex, es idéntico a HbPTQ1 clonado por nosotros a partir de látex y hojas; mientras que el alérgeno Hev b 11.0102 no fue encontrado en este trabajo. Un resultado muy interesante fue la identificación de la nueva isoforma HbPTQ2, ya que ésta presenta una extensión del DUQ que involucra dominio y medio de unión a quitina (DUQ2), lo cual es una característica muy particular ya que hasta la fecha solo se han reportado proteínas con dominios de unión completos, como es el caso de la quitinasa de *Brassica juncea* que posee dos DUQs en tándem (Guan & Chye, 2008).

			20		40		60	
Hev b 11.0101	EQCGRQAGGA	LCPGGLCCSQ	YGWCANTPEY	CGSGCQSQCD	GGGGGEDGGI	-----	50	
HbPTQ1	EQCGRQAGGA	LCPGGLCCSQ	YGWCANTPEY	CGSGCQSQCD	GGGGGEDGGI	-----	50	
Hev b 11.0102	EQCGRQAGGA	LCPGGLCCSQ	YGWCANTPEY	CGSGCQSQCD	GGVGGEGGCV	-----	50	
HbPTQ2	EQCGRQAGGA	LCPGGLCCSQ	YGWCANTPEY	CGSGCQSQCD	GGVGGEGGCV	DLGCANTPEY	60	
			80		100		120	
Hev b 11.0101	-----	-----	DLGSIISRST	FEEMLKHRND	AACPAKGFYT	YDAFISAACA	90	
HbPTQ1	-----	-----	DLGSIISRST	FEEMLKHRND	AACPAKGFYT	YDAFISAACA	90	
Hev b 11.0102	-----	-----	DLGSIISRST	FEEMLKHRNN	AACPAKGFYT	YDAFISAACA	90	
HbPTQ2	CGSGCQSQCD	GGVGGEGGCV	DLGSIISRST	FEEMLKHRNN	AACPAKGFYT	YDAFISAACA	120	
			140		160		180	
Hev b 11.0101	FPAFGTTGDV	DTCKREIAAF	FGQTSHTTGG	GWPTAPDGPY	AWGYCYKEEL	NQASSYCSPS	150	
HbPTQ1	FPAFGTTGDV	DTCKREIAAF	FGQTSHTTGG	GWPTAPDGPY	AWGYCYKEEL	NQASSYCSPS	150	
Hev b 11.0102	FPAFGTTGDV	DTCKREIAAF	FGQTSHTTGG	GWPTAPDGPY	AWGYCHKEEL	NQASSYCSPS	150	
HbPTQ2	FPAFGTTGDV	DTCKREIAAF	FGQTSHTTGG	GWPTAPDGPY	AWGYCHKEEL	NQASSYCSPS	180	
			200		220		240	
Hev b 11.0101	PAYPCAPGKK	YYGRGPIQLS	WNVNYGQCQG	ALGLDLLNPN	DLVATDRVIS	FKAAIWFWM	210	
HbPTQ1	PAYPCAPGKK	YYGRGPIQLS	WNVNYGQCQG	ALGLDLLNPN	DLVATDRVIS	FKAAIWFWM	210	
Hev b 11.0102	PAYPCAPGKK	YYGRGPIQLS	WNVNYGQCQG	ALGLDLLNPN	DLVATDRVIS	FKAAIWFWM	210	
HbPTQ2	PAYPCAPGKK	YYGRGPIQLS	WNVNYGQCQG	ALGLDLLNPN	DLVATDRVIS	FKAAIWFWM	240	
			260		280		300	
Hev b 11.0101	PQFPKPSCHD	VITGQWSPTG	HDISAGRAPG	YGVITNIING	GLECGRGWDA	RVEDRIGFYK	270	
HbPTQ1	PQFPKPSCHD	VITGQWSPTG	HDISAGRAPG	YGVITNIING	GLECGRGWDA	RVEDRIGFYK	270	
Hev b 11.0102	PQFPKPSCHD	VITGQWSPTG	HDISAGRAPG	YGVITNIING	GLECGRGWDA	RVEDRIGFYK	270	
HbPTQ2	PQFPKPSCHD	VITGQWSPTG	HDISAGRAPG	YGVITNIING	GLECGRGWDA	RVEDRIGFYK	300	
			320					
Hev b 11.0101	RYCDMFAVGY	GSNLDCYNQT	PFGLG	295				
HbPTQ1	RYCDMFAVGY	GSNLDCYNQT	PFGLG	295				
Hev b 11.0102	RYCDMFGVGY	GSNLDCYNQT	PFGLG	295				
HbPTQ2	RYCDMFGVGY	GSNLDCYNQT	PFGLG	325				

Figura 8. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de las HbPTQs con Hev b 11.0101 y Hev b 11.0102. En los recuadros se señalan las diferencias entre las secuencias.

Muy recientemente el proyecto preliminar del genoma de *H. brasiliensis* fue publicado (Rahman *et al.*, 2013) y en éste se reporta aproximadamente el 50% de los 2.15 Gb de material genético. Este trabajo se enfocó esencialmente a secuenciar genes que son clave en procesos como la biosíntesis del hule, la resistencia a enfermedades de la planta y aquellos relacionados con proteínas alergénicas. La quitinasa de clase I (Hev b 11) clasificada como proteína de defensa, forma parte de los 14 alérgenos (Hevb 1 a Hevb 14) causantes de la alergia al látex natural (www.allergen.org). En este proyecto preliminar del genoma de *H. brasiliensis* se reportaron once genes para la quitinasa de clase I y entre éstos solamente se encontró una

secuencia idéntica a chi-L2; esto es, a la proteína mas larga con un DUQ atípico, denominada HBM_contig1331506_s434174c2 gene1.

Para la sobre-expresión de las HbPTQs y de sus dominios individuales (DUQ y DCat) se probaron diferentes sistemas en la bacteria *E. coli*, ya que obtuvimos muy poca proteína soluble, estando la mayoría expresada como cuerpos de inclusión (Fig. 9). Debido al alto contenido de cisteínas presente en estas proteínas (18 en HbPTQ1 y 23 en HbPTQ2) los mejores resultados se obtuvieron usando el vector pET 32a y la cepa *E. coli* Rosetta gami DE3 pLys, los cuales son usados para favorecer el plegamiento de proteínas con puentes disulfuro. El uso del vector pET 32a permitió expresar a las proteínas fusionadas con tiorredoxina, lo que favoreció la formación correcta de puentes disulfuro durante el plegamiento debido al uso de un mecanismo redox basado en la oxidación reversible de los grupos tiol a disulfuro. Por su parte, la cepa de Rosetta gami posee las mutaciones *trxB/gor* (tiorredoxina reductasa/glutación reductasa) que facilitan la formación de puentes disulfuro en el citoplasma (De Marco, 2009).

Aún con este sistema de expresión los rendimientos obtenidos fueron bajos (200-500 µg/L de cultivo) para las proteínas completas y sus respectivos DCats; por lo que el uso de un sistema de tipo eucarionte como *Pichia pastoris* podría ayudar a aumentar el rendimiento (Sowka *et al.*, 1998; Vasconcelos *et al.*, 2011).

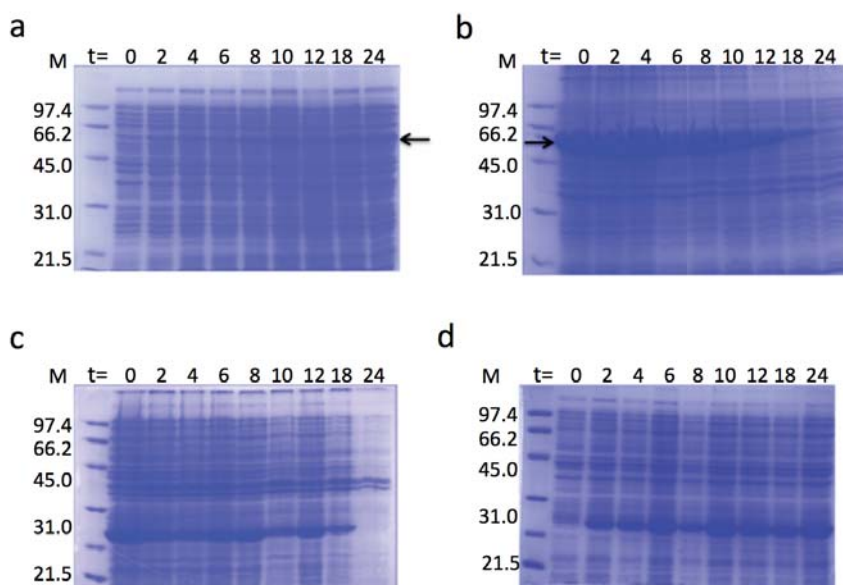


Figura 9. Electroforesis SDS-PAGE donde se muestra la sobre-expresión de HbPTQ2. Cuando se usó la cepa *E. coli* Rosetta gami DE3 pLys y el plásmido pET 32a: (a) sobrenadante, (b) pellet. Cepa *E. coli* BL21, plásmido pET22b: (c) sobrenadante y (d) pellet. Las flechas indican la proteína de fusión HbPTQ2 en el extracto soluble y en el pellet.

6.2.- Purificación y caracterización de las HbPTQs

El uso de la cromatografía de afinidad a níquel por la presencia del péptido de His en el extremo amino terminal de las HbPTQs y de sus dominios nos facilitó la etapa de purificación. En la Figura 10 se muestran los pasos de purificación empleados para las HbPTQs y sus dominios, debido a que éstas fueron obtenidas como proteínas de fusión; también se muestra el paso de corte con la enzima enterocinasa y la liberación de las proteínas deseadas.

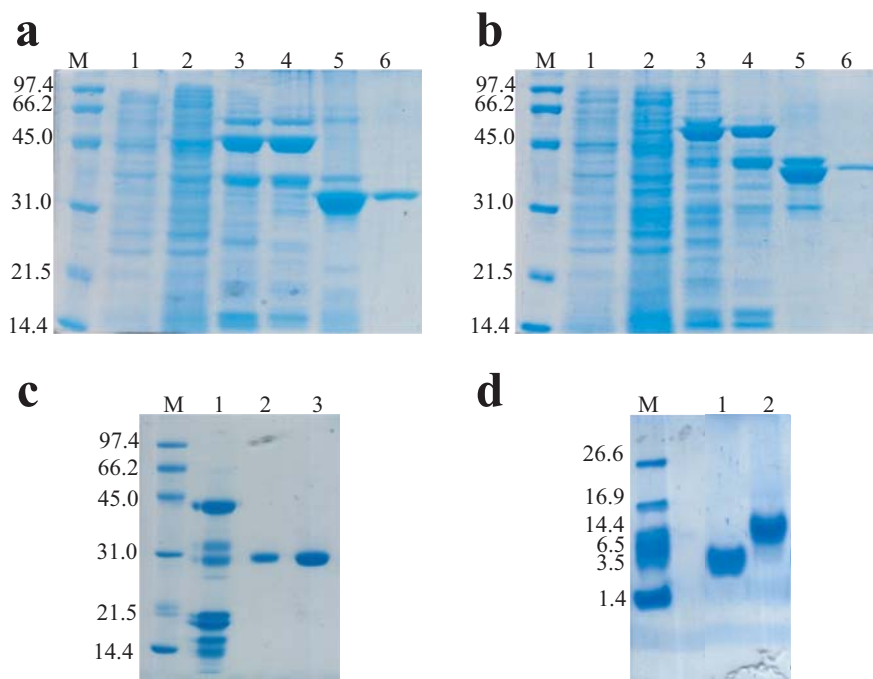


Figura 10. Electroforesis SDS-PAGE donde se muestran los pasos de purificación de las HbPTQs y sus respectivos dominios puros. (a) HbPTQ1, (b) HbPTQ2. M: marcador de peso molecular (kDa), carriles 1 y 2: extractos proteicos antes y después de la inducción con IPTG respectivamente; 3 y 4: proteínas eluidas de la columna de afinidad a níquel; 5: proteínas después del corte con enterocinasa; 6: proteínas puras después de la columna de intercambio iónico. (c) dominios catalíticos. Carril 1: proteína de fusión antes del corte con enterocinasa; 2: DCat1; 3: DCat2. (d) dominios de unión a quitina después del protocolo de purificación descrito en materiales y métodos. Carril 1: DUQ1, 2: DUQ2.

La caracterización de la HbPTQs se realizó usando exclusivamente a las proteínas de interés, liberadas de la tiorredoxina, a diferencia de los reportes previos donde las isoformas Hev b 11.0101 y Hev b 11.0102 se estudiaron siempre como proteínas de fusión unidas a la PUM. En este trabajo determinamos la masa molecular y el pI usando MALDI-TOF y enfoque isoelectrónico, respectivamente, los cuales fueron muy semejantes a los valores teóricos (Tabla 2).

Tabla 2. Valores teóricos y experimentales de pI y masa molecular (M) para las HbPTQs

	M teórica (Da)	M experimental (Da)	pI teórico	pI experimental
HbPTQ1	31849.5	31845.3	5.2	5.0
HbPTQ2	34630.5	34635.5	5.1	4.7

6.3.- Cristalización de HbPTQ1 y sus dominios

Tras varios intentos no exitosos por cristalizar las HbPTQs completas, decidimos intentar cristalizar a los dominios por separado, eliminando el conector de las respectivas construcciones. Para DCat1 y DUQ1 obtuvimos cristales después de probar 900 condiciones diferentes, pero para el DUQ2, que conserva un conector, únicamente obtuvimos microcristales. La condición en la que se obtuvieron cristales del DCat1 fue en 30% PEG 4000, 100 mM Tris-HCl pH 8.5 y 200 mM MgCl₂ y para el DUQ1 fue en 0.1 M MES pH 6.5, 1.6 M (NH₄)₂SO₄ y 10% v/v 1,4-dioxano (Fig. 11).

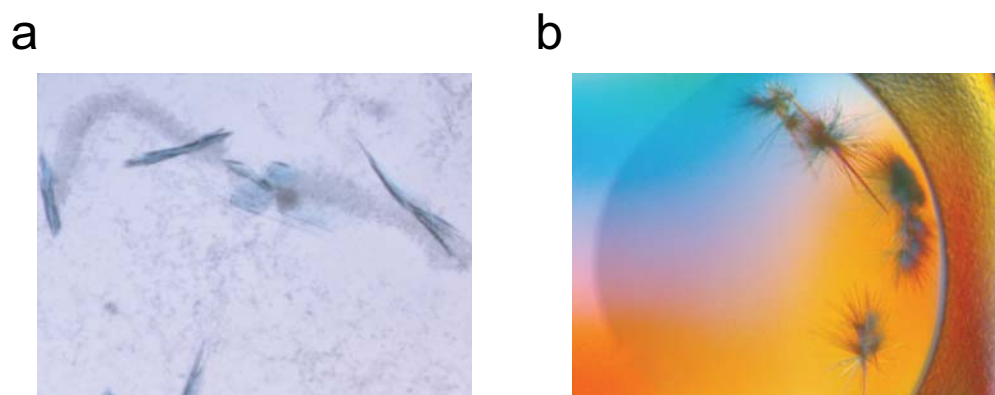


Figura 11. Cristales iniciales para los dominios de HbPTQ1. (a) DCat1, (b) DUQ1.

Para cada dominio (DCat1 y DUQ1) se optimizaron los cristales, variando la concentración del agente precipitante y el pH, hasta que obtuvimos aquellos óptimos para los experimentos de difracción por rayos X (Fig. 12). Las condiciones finales de cristalización

fueron las siguientes: 0.1 M de Tris-HCl pH 8.3, 0.2 M $MgCl_2$ y 30% PEG 4000 para DCat1 (7 mg/mL) y para el DUQ1 (11 mg/mL), 0.1 M MES pH 7.0, 1.6 M $(NH_4)_2SO_4$ y 4% 1,4-dioxano.

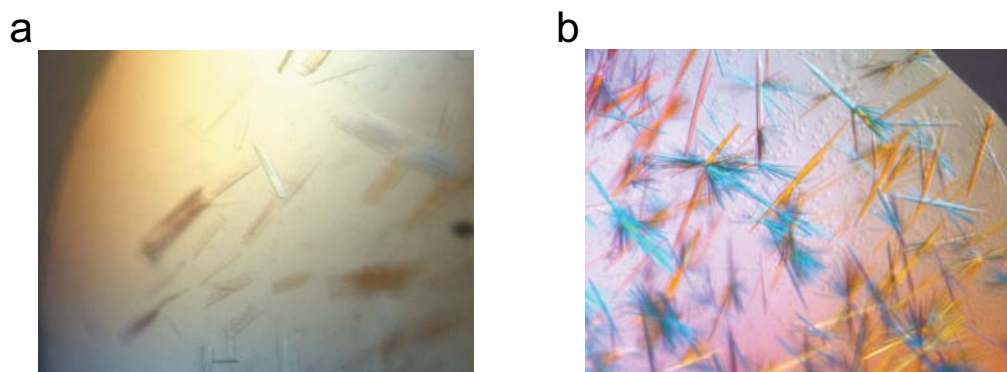


Figura 12. Cristales óptimos para experimentos de difracción de rayos X. (a) DCat1, (b) DUQ1.

Los cristales obtenidos para el complejo DCat1-2GlcNAc fueron parecidos a los obtenidos para este dominio sin el oligosacárido. Finalmente, después de probar diferentes condiciones, se obtuvo un cristal único para HbPTQ1 completa cuando se varió la concentración de la proteína a 5 mg/mL en 0.01 M de $ZnSO_4$, 0.1 M MES pH 6.5 y 25% PEG monometil éter 550. Este cristal no se optimizó ya que fue adecuado para los experimentos de difracción por rayos X (Fig. 13).

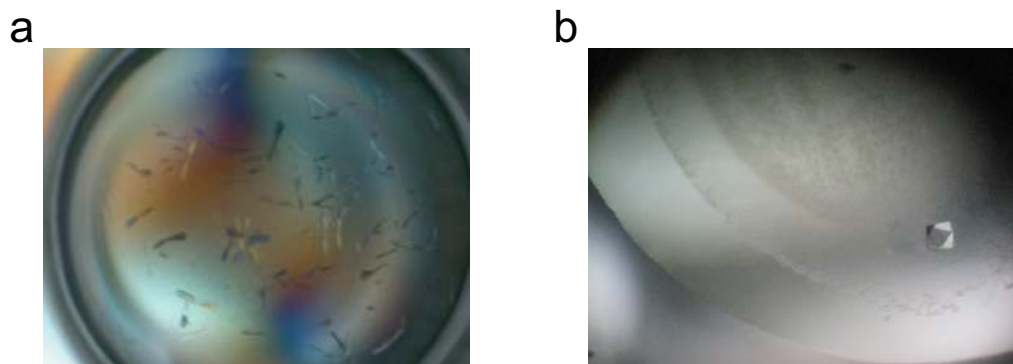


Figura 13. Cristales óptimos para experimentos de difracción de rayos X. (a) DCat1-2GlcNAc, (b) HbPTQ1.

6.4.- Estructura de HbPTQ1 y sus dominios

6.4.1.- DUQ1

La estructura del DUQ1 se determinó a una resolución de 1.65 Å (Fig. 14a). El cristal contenía dos moléculas en la unidad asimétrica con un coeficiente de Matthews (V_M) de 2.23 Å³/Da y un 45% en contenido de solvente; vale la pena señalar que las dos moléculas presentes en la unidad asimétrica solo presentaron una interacción meramente cristalográfica y no la de un dímero biológico de acuerdo al análisis realizado en PISA (Krissinel & Henrick, 2007) cuyo resultado CSS (complexation significance score) fue de 0, lo que indica que no tiene significado en la formación de un dímero biológico. Durante la etapa de interpretación de los mapas de densidad electrónica (2Fo-Fc y Fo-Fc) y la construcción del modelo se observó daño por radiación cuando se usaban más de 800 imágenes colectadas siendo mas evidente el daño en los puentes disulfuro y la descarboxilación de ácidos glutámicos y aspárticos (Fig. 14b). En el modelo final el R_{factor} y R_{free} fue de 17.86% y 21.78%, respectivamente (Tabla 3).

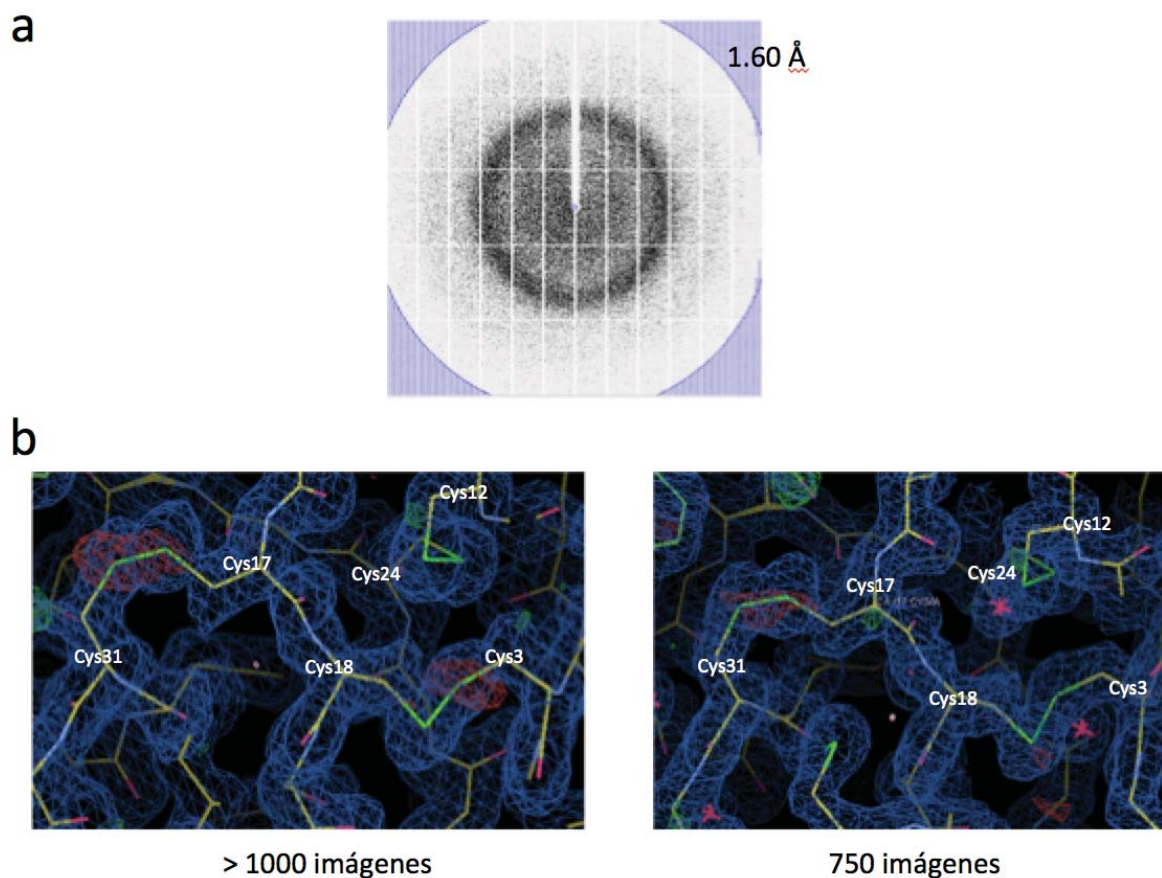


Figura 14. Colecta y procesamiento de datos del DUQ1. (a) patrón de difracción, (b) Mapas de densidad electrónica resultantes del procesamiento de diferente número de imágenes de la colecta de datos de difracción de rayos X. $2F_o-F_c$ (azul), F_o-F_c (rojo – y verde +), σ 1.0 y σ 3.0 respectivamente.

El DUQ1 está compuesto por 45 aminoácidos (-1Ala,0 Met, Glu1-Gly43) y su estructura presenta un plegamiento de tipo heveína (Reyes-López *et al.*, 2004). Este dominio está formado por dos hélices 3/10, una α -hélice y dos hebras β ; además se encuentran conservados los cuatro puentes disulfuro característicos de este tipo de plegamiento (Cys3/Cys18, Cys12/Cys24, Cys17/Cys31 y Cys35/Cys39) (Fig. 15a). Los residuos involucrados en la unión a quitina también se encuentran conservados, éstos son la Ser19 y tres residuos aromáticos: Tyr21, Trp23 y Tyr30; los cuales son idénticos o muy parecidos a

otros dominios tipo-heveína como lo es la heveína (Trp21, Trp23 y Tyr30), pseudoheveína (Tyr21, Trp23 y Tyr30) (Soedjanaatnadjaja *et al.*, 1994) y la cadena B de la aglutinina del germen de trigo que tiene tres residuos de Tyr en el sitio de unión (Wright, 1992) (Fig. 15b). En la estructura cristalográfica del DUQ1 encontramos una molécula de 2-(N-morfolino) ácido etanosulfónico (MES) interaccionando con la Met0 y el Trp23 del monómero A y con la Met0 y el Trp23 del monómero B relacionado por simetría (Fig. 15c). El Trp23 forma parte del sitio de unión con la quitina por lo que es probable que esta interacción simule la unión con oligosacáridos de GlcNAc (Aboitiz *et al.*, 2004).

6.4.2.- DCat1

La estructura cristalográfica del DCat1 fue determinada a 1.93 Å de resolución. En la unidad asimétrica se encontraron dos monómeros relacionados por contactos cristalográficos de acuerdo al análisis de PISA cuyo valor CSS fue de 0, lo que indica que tampoco es un dímero biológico. El V_M fue de 2.29 Å³/Da con un contenido de solvente del 46.2% y el modelo fue afinado a valores finales de R_{work} y R_{free} de 16.77% y 20.69% respectivamente (Tabla 3). El dominio está formado por 242 residuos, los aminoácidos fueron numerados siguiendo la secuencia de la proteína completa (Ser54-Gly295) (Fig. 8).

Tabla 3. Colecta de datos y estadísticas de afinamiento

	DCat1	DUQ1	HbCLP1	DCat1-2GlcNAc
Colecta de datos				
Grupo espacial	<i>I121</i>	<i>P6₁</i>	<i>P6₁</i>	<i>I121</i>
Dimensiones de celda (Å)	111.11, 40.41, 111.85	38.51, 38.51, 100.93	86.23, 86.23, 84.29	107.91, 39.37, 112.68
β (°)	96.73			93.77
Longitud de onda	1.0	0.979	0.979	1.0
Resolución (Å)	41.71-1.93 (2.03-1.93)	33.64-1.60 (1.68-1.60)	38.39-1.42 (1.35-1.35)	40.23-2.05 (2.16-2.05)
No. de reflexiones únicas	37433 (5195)	11080 (1055)	77642 (11130)	30153 (4371)
Completeness (%)	99.30 (95.60)	99.47 (96.26)	99.60 (98.1)	100 (100)
Redundancia	4.7 (4.0)	3.5 (2.7)	6.2 (6.0)	3.7 (3.6)
I/ σ (I)	14.9 (4.4)	21.1 (4.9)	12.0 (3.1)	8.5 (2.9)
R _{merge} ^a (%)	8.8 (51.9)	3.7 (21.6)	6.2 (48.6)	11.3 (41.2)
Estadísticas de afinamiento				
Intervalo de resolución (Å)	41.66-1.93 (2.0-1.93)	33.35-1.60 (1.66-1.60)	34.14-1.35 (1.40-1.35)	37.66-2.05 (2.12-2.05)
R _{factor} ^b /R _{free} ^c (%)	16.77/20.69	17.86/21.78	16.10/17.52	22.60/27.82
No. de átomos				
Proteína	3749	621	1931	3732
Agua	316	86	275	46
Moléculas de ligando		2	4	3
Iones metálicos	2		1	
rmsd longitud de enlace (Å)	0.011	0.016	0.006	0.008
rmsd ángulos de enlace (°)	1.11	1.78	1.01	1.07
B-factor promedio (Å ²)				
Proteína	22.6	18.9	19.20	21.80
Ligando/ion	25.7	30.7	32.40	25.80
Agua	28.5	28.9	29.50	17.70
Ramachandran favorecidos/no permitidos (%)	98/0.4	94/0	98/0.4	98/0.4
Código PDB	4MST	4MPI		

Los datos en paréntesis se refieren a la capa de alta resolución.

^aR_{merge} = $\sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - [I(hkl)]| / \sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)$, donde [I(hkl)] y I_i(hkl) son el promedio y la medición *i*th de intensidad para la reflexión hkl, respectivamente.

^bR_{factor} = $\sum_{hkl} | |F_{obs}| - |F_{calc}| | / \sum_{hkl} |F_{obs}|$.

^cR_{free} es el valor R correspondiente para un 5% de reflexiones elegidas al azar y excluidas del afinamiento.

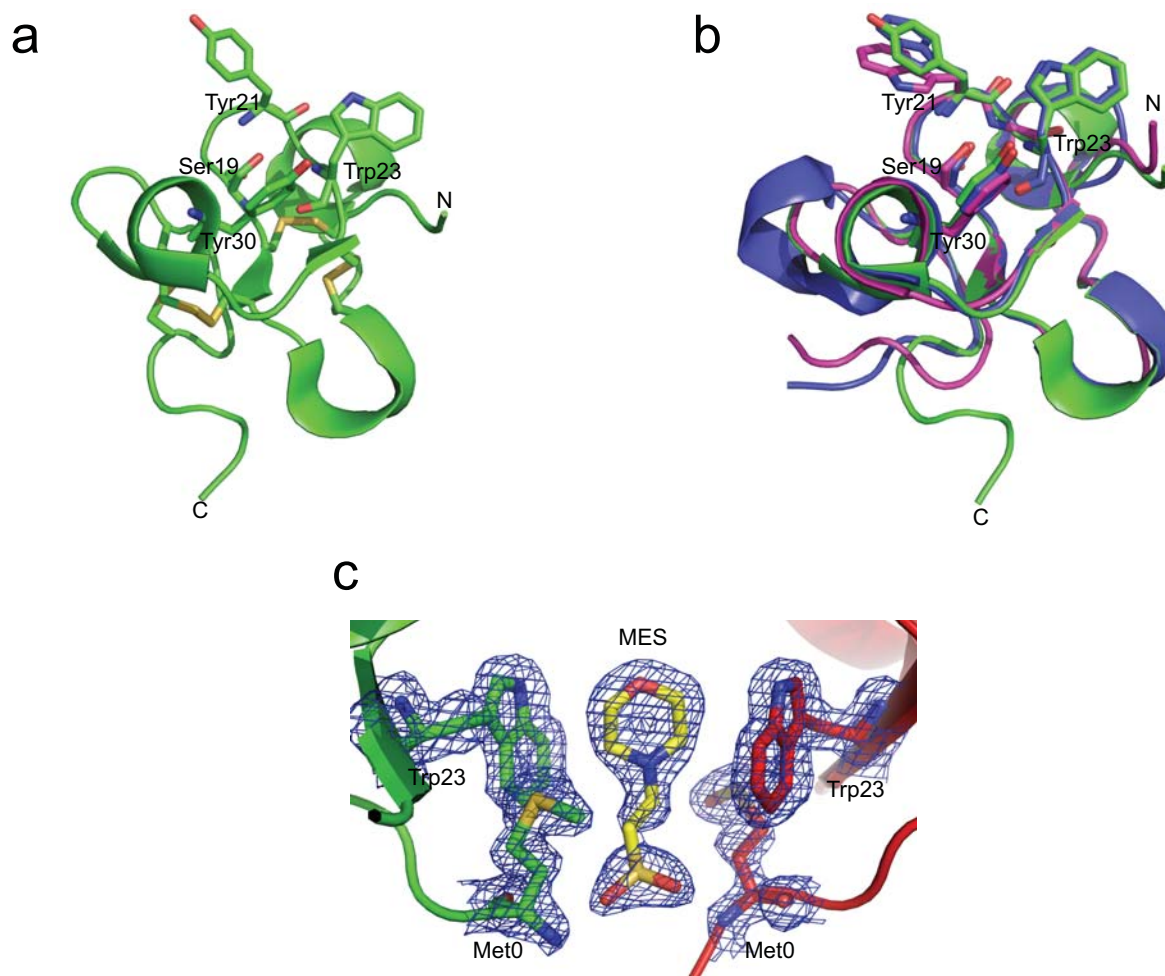


Figura 15. Estructura del DUQ1. (a) representación de listón del DUQ1 donde se muestran los aminoácidos que forman parte del sitio de unión y los puentes disulfuro en amarillo. (b) alineamiento estructural del DUQ1 en verde con la heveína (PDB 1Q9B) en azul y el monómero B del germen de la aglutinina de trigo (PDB 1WGC) en rosa, donde además se resaltan los aminoácidos del sitio de unión. (c) mapa de densidad electrónica 2Fo-Fc, σ 1.0 del Trp23 y Met0 que interactúan con el MES, el monómero A está representado en color verde y el monómero B relacionado por simetría en rojo.

La estructura cristalográfica del DCat1 exhibió un alto contenido de hélices α y cinco asas principales (I-V) tal como se ha reportado para otras quitinasas pertenecientes a la familia GH19 (Huet *et al.*, 2008). Los puentes disulfuro están conservados y son formados por Cys73/Cys135, Cys147/Cys155 y Cys254/Cys286 (Fig. 16a). Un alineamiento estructural del monómero A del DCat1 con otras quitinasas activas de la familia GH19,

reveló que las diferencias estructurales se encuentran en las asas de estas proteínas, siendo mas importantes las diferencias en el asa III (Fig. 16b), la cual está formada por 36 residuos (Tyr136-Trp171) y se encuentra localizado entre el asa II y la hélice α 4. El asa III está estabilizado por uno de los puentes disulfuro y además contiene uno de los aminoácidos catalíticos (Glu139 en HbPTQ1 y Glu169 en HbPTQ2) lo que sugiere la directa participación de esta asa en la unión y catálisis del sustrato (Fig. 16a).

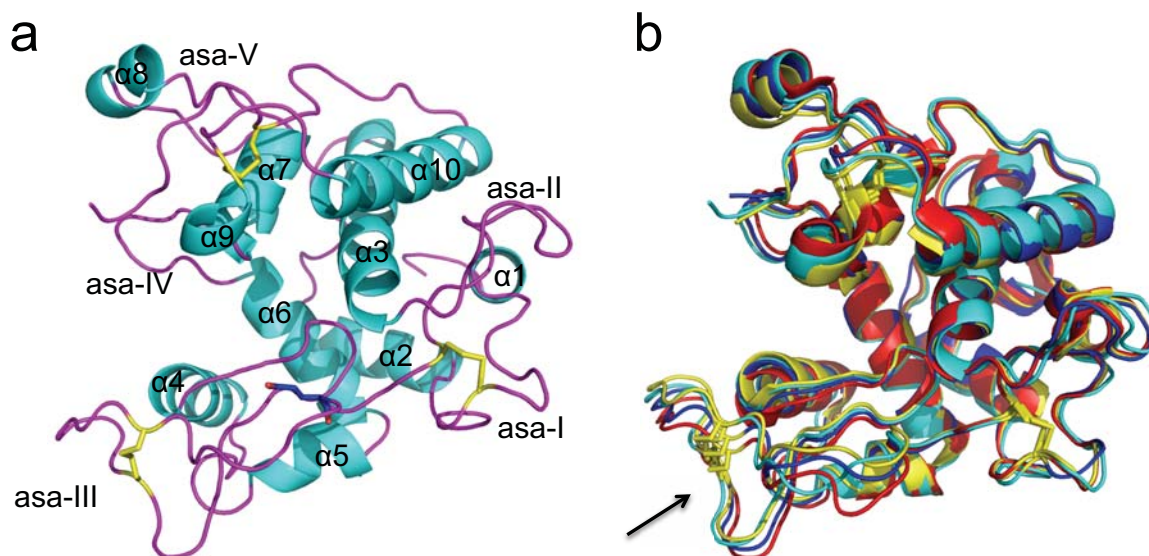


Figura 16. Estructura del DCat1. (a) representación de listón del DCat1 donde se numeran las hélices α y las asas principales, en azul está representado uno de los aminoácidos catalíticos (Glu139) y en amarillo se señalan los puentes disulfuro. (b) alineamiento estructural del DCat1 representado en cian con la quitinasa de centeno en rojo (PDB 4DWX), quitinasa de centeno con dos moléculas de (GlcNAc)₄ en amarillo (PDB 4J0L) y la quitinasa de cebada en azul (PDB 1CNS). Las mayores diferencias estructurales se encontraron en el asa III, la cual está señalada con una flecha.

En estudios previos de quitinasas activas de la familia GH19 se ha propuesto que diferencias estructurales, principalmente en el asa III originan una conformación abierta o cerrada las cuales dependen de la ausencia y presencia de ligando y/o sustrato respectivamente (Ohnuma *et al.*, 2013). En el alineamiento estructural entre los dos

monómeros de DCat1 de la unidad asimétrica se observaron diferencias en el asa III (Fig. 17a), lo que indica una gran flexibilidad de esta región. En nuestra estructura cristalográfica, el monómero A del DCat1 tuvo mayor similitud con las conformaciones cerradas de la quitinasa de centeno en complejo con dos moléculas de (GlcNAc)₄ (PDB 4J0L) (Ohnuma *et al.*, 2013) (Fig. 17b) y con la quitinasa de papaya con dos moléculas de GlcNAc (PDB 3CQL) (Huet *et al.*, 2008) (Fig. 17c); mientras que diferencias mayores fueron observadas en las asas III y IV al comparar con la quitinasa de centeno sin ligando (conformación abierta) (PDB 4DWX) (Ohnuma *et al.*, 2012) (Fig. 17d).

La estructura del DCat1 en complejo con dos moléculas de GlcNAc (DCat1-2GlcNAc) se obtuvo a una resolución de 2.05 Å. Los datos estadísticos de colecta y afinamiento se resumen en la Tabla 3. Una clara densidad electrónica se observó para las moléculas de GlcNAc las cuales se posicionaron en los subsitios -1 y -2 (Fig. 18a). La molécula -1 GlcNAc interacciona de manera directa a través de contactos polares con las cadenas laterales de los residuos Glu139, Tyr146, Ser170, Trp171; mientras que la -2 GlcNAc interacciona con las cadenas laterales de Trp171, Asn174, Lys215 y con la cadena principal de la Ile248 (Fig. 18b). Otras interacciones mediadas por moléculas de agua se observan con los aminoácidos Ile167, Gln168, Tyr173, Asn246, Asn249, Gly251, Leu252, Arg261 y Phe292 (Fig. 18c). La estructura del DCat1-2GlcNAc no exhibió diferencias significativas en las asas III y IV cuando fue comparada con la estructura del DCat1 sin ligando; además fue similar a la de la quitinasa de papaya en complejo con 2 moléculas de GlcNAc en los subsitios -2 y +1 (PDB 3CQL) (Huet *et al.*, 2008) (Fig. 18d). Conforme a estas comparaciones es evidente la plasticidad de las asas III y IV, sin embargo con estos

resultados aun no queda clara la relación de la presencia/ausencia de un ligando con una conformación cerrada o abierta en este tipo de estructuras.

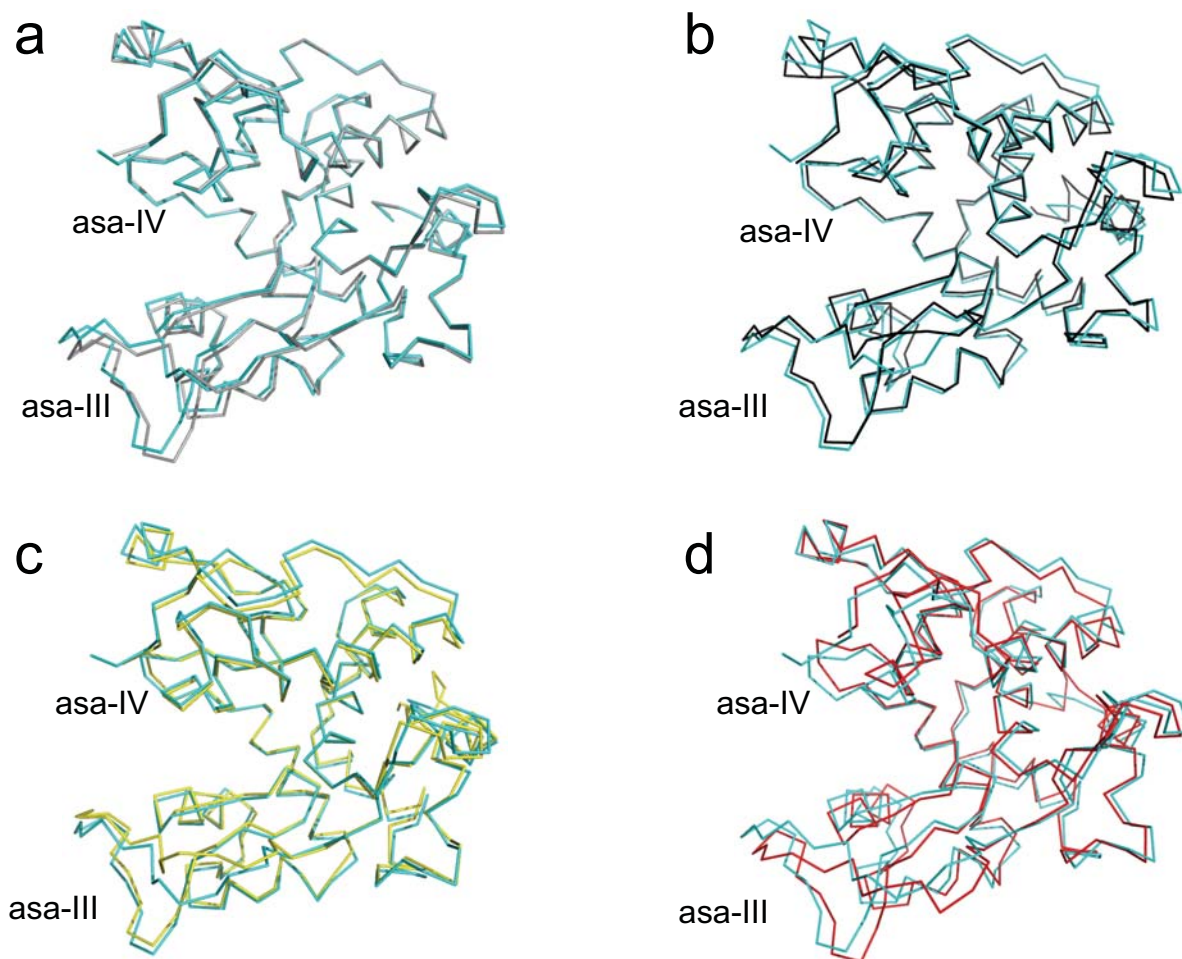


Figura 17. Superposición estructural de las cadenas principales del DCat1 con la quitinasa de cebada y papaya. Las estructuras en cian corresponden al monómero A del DCat1. (a) monómero B del DCat1 (gris). (b) quitinasa de cebada en complejo con dos moléculas de $(\text{GlcNAc})_4$ en negro. (c) quitinasa de papaya en complejo con dos moléculas de GlcNAc en amarillo. (d) quitinasa de cebada sin ligando en rojo.

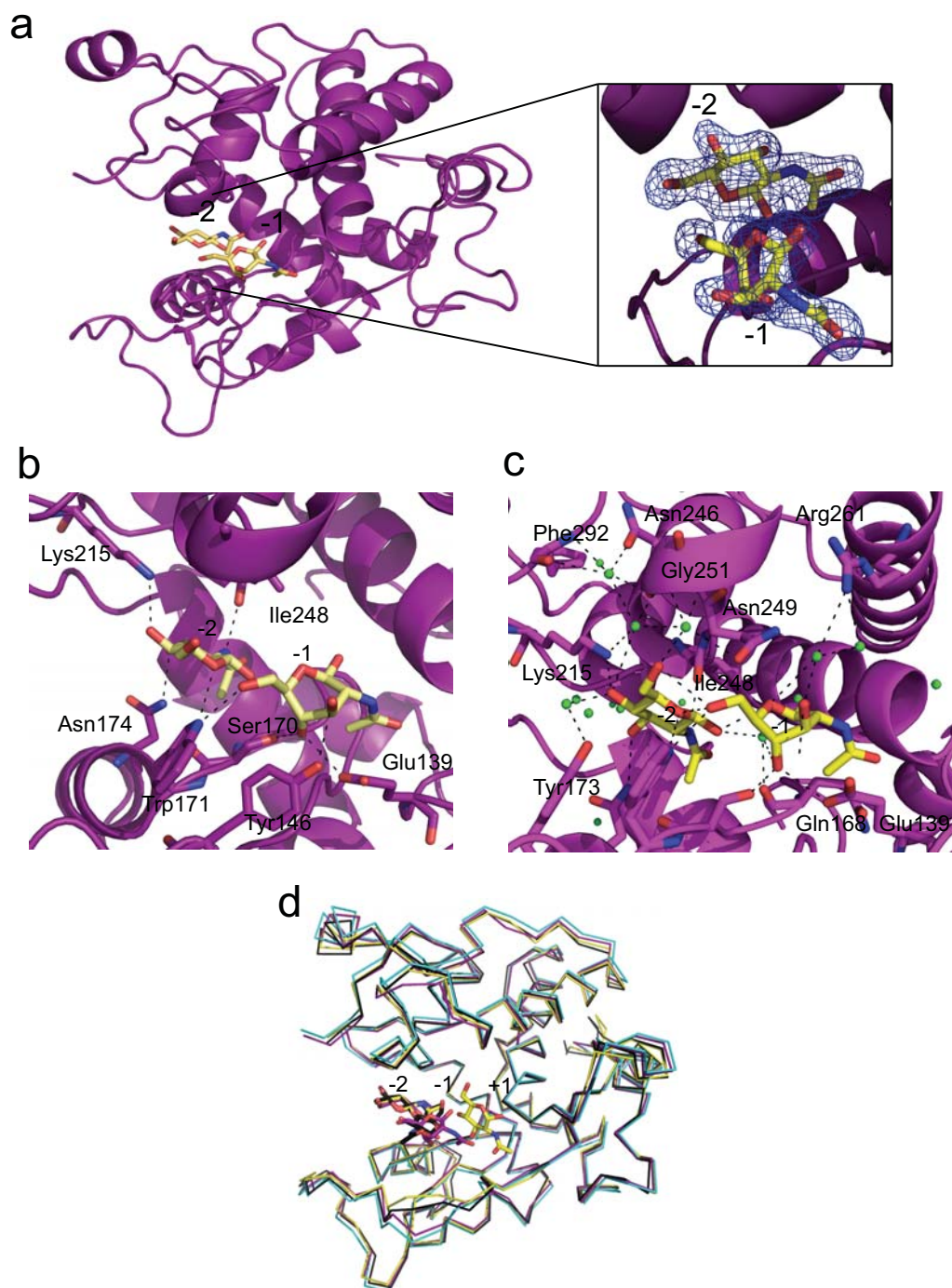


Figura 18. Representación estructural del complejo DCat1-2GlcNAc. (a) diagrama de listón donde se muestran los subsítios de unión de las moléculas de GlcNAc. En el recuadro se muestra una ampliación del mapa de densidad electrónica 2Fo-Fc, σ 1.0 de las moléculas de GlcNAc. (b) aminoácidos que participan en la unión de dos moléculas de GlcNAc mediante interacciones polares directas. (c) aminoácidos que interaccionan a través de moléculas de agua para la unión de las moléculas de GlcNAc. (d) superposición estructural de las cadenas principales del DCat1-2GlcNAc en púrpura con el DCat1 en cian, quitinasa de centeno (PDB 4J0L) en negro y la quitinasa de papaya (PDB 3CQL) en amarillo. Las moléculas de GlcNAc correspondientes a cada estructura cristalográfica están representadas en el mismo color.

6.4.3.- HbPTQ1

La disposición estructural entre los dominios de unión y catalítico de quitinasas pertenecientes a la familia GH19 es pobremente conocida, ya que hasta el momento solo existe un trabajo previo de una quitinasa de arroz donde se reportan dos posibles candidatos de la disposición biológica entre estos dominios (Kezuka *et al.*, 2010). En este trabajo, nosotros obtuvimos un cristal de muy buena calidad de la HbPTQ1 para experimentos de difracción de rayos X, el cual difractó a una resolución de 1.35 Å. En la celda unitaria se encontró un monómero con un V_M de 2.71 Å³/Da y con un contenido de solvente del 54.6%, el modelo fue afinado a valores finales de R_{work} y R_{free} de 16.10% y 17.52% respectivamente (Tabla 3).

La estructura de la HbPTQ1 se intentó resolver usando dos pasos de reemplazo molecular ya que las proteínas con mas de un dominio unidos por un conector flexible, generalmente pueden adquirir mas de una disposición espacial entre sus componentes. Primero se buscó el dominio más grande usando como templete el DCat1 obtenido en este mismo trabajo (PDB 4MST) y después de unos pasos de afinamiento se realizó el segundo reemplazo molecular fijando la solución obtenida en el primero y usando como templete el DUQ1 (PDB 4MPI) para encontrar el dominio de unión, pero desafortunadamente no se encontró una segunda solución.

Para resolver la estructura de la HbPTQ1 se interpretó el mapa de densidad electrónica 2Fo-Fc con la secuencia de aminoácidos del DCat1, observando daño por

radiación que causó la ruptura del puente disulfuro localizado en el asa III (Cys147/Cys155), mientras que los otros dos puentes disulfuro permanecieron intactos. Pese a esto, no se observaron cambios significativos en la conformación del asa III cuando se comparó con la estructura cristalográfica obtenida para el DCat1 (PDB 4MST) en la que los puentes disulfuro permanecieron intactos (Fig. 19a). Para el resto de la proteína, que comprende el conector de diez residuos y el DUQ1, únicamente pudimos construir cinco aminoácidos pertenecientes al conector (Fig. 19b). Desafortunadamente el resto de la cadena polipeptídica no fue observada debido a una evidente carencia de densidad electrónica. En el análisis estructural del monómero de HbPTQ1 con los relacionados por simetría en la celda unitaria se encuentra un espacio en el cual podría estar posicionado el DUQ1, pero que debido a la gran flexibilidad entre los dos dominios no se encuentra densidad interpretable (Fig. 19c). No obstante, el uso de estrategias diferentes para resolver la estructura, como lo son SAD y SAXS podrían ayudar a la localización de los dominios; en especial por el alto contenido de cisteínas presentes en éstos.

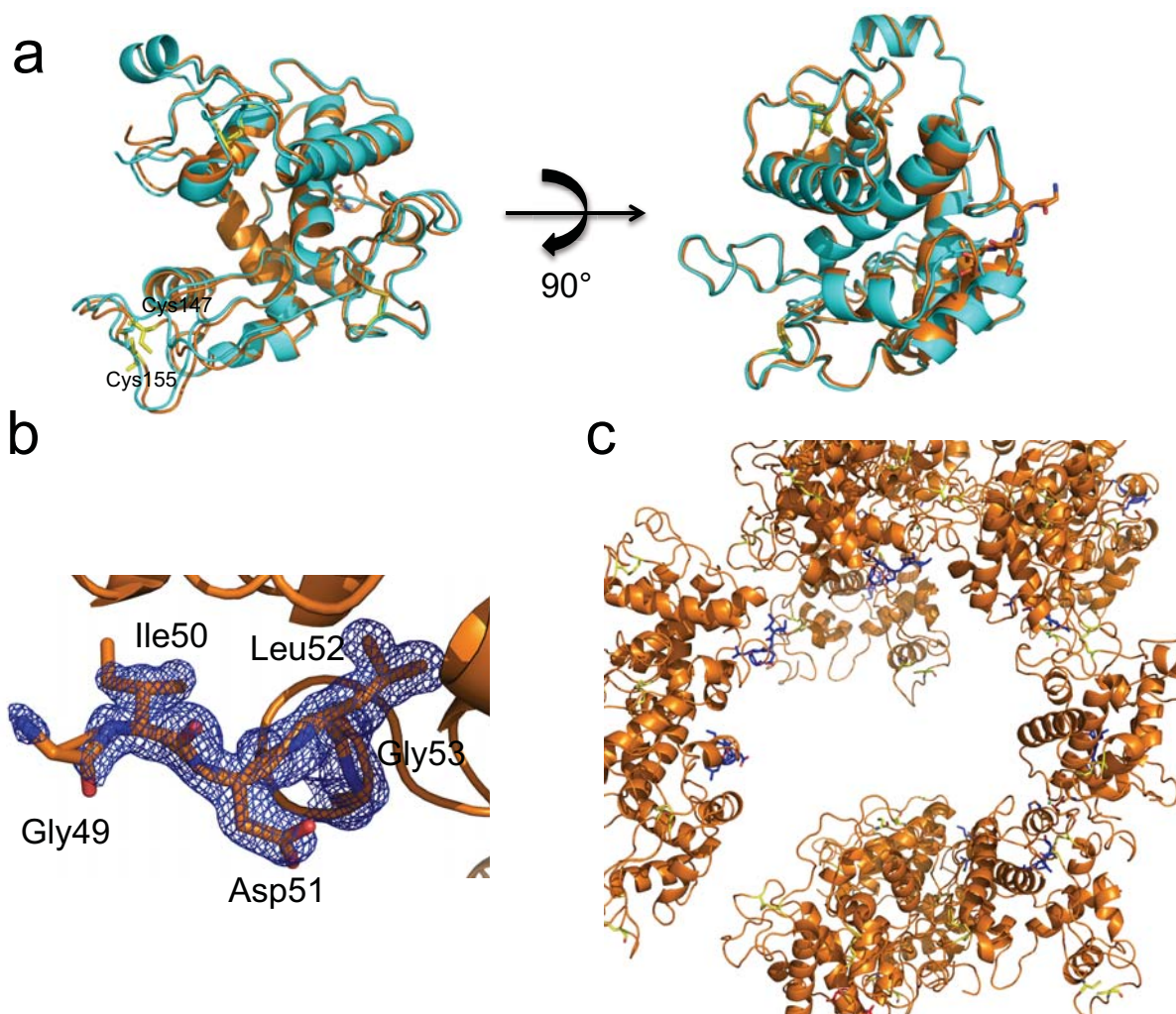


Figura 19. Representación estructural de la HbPTQ1. (a) Superposición estructural de las cadenas principales del Dcat1 de la proteína completa HbPTQ1 en naranja con el Dcat1 (PDB 4MST) en cian. Los puentes disulfuro están representados en amarillo. (b) mapa de densidad electrónica 2Fo-Fc, σ 1.0 de los primeros cinco aminoácidos del conector en la estructura de la HbPTQ1. (c) moléculas relacionadas por simetría del Dcat1 de la HbPTQ1. En azul están representados los aminoácidos pertenecientes al extremo N-terminal, los cuales forman parte del conector.

6.5.- Actividad de quitinasa

Aunque HbPTQ1 originalmente había sido clasificada como quitinasa de clase I (O’Riordain *et al.*, 2002; Rihs *et al.*, 2003), ninguna de las dos proteínas recombinantes estudiadas en este trabajo mostró actividad hidrolítica, aún usando diferentes sustratos. Para algunas quitinasas de plantas pertenecientes a la familia GH19 ya se han descrito los aminoácidos que participan

en la hidrólisis; tal es el caso de la quitinasa de cebada donde el Glu67 participa como donador de protones y el Glu89 como nucleófilo (Andersen *et al.*, 1997). Dichos aminoácidos corresponden a Ala117 y Glu139 en HbPTQ1 y Ala147 y Glu169 en HbPTQ2 (Fig. 20) lo cual indica la pérdida de uno de los aminoácidos catalíticos en ambas HbPTQs.

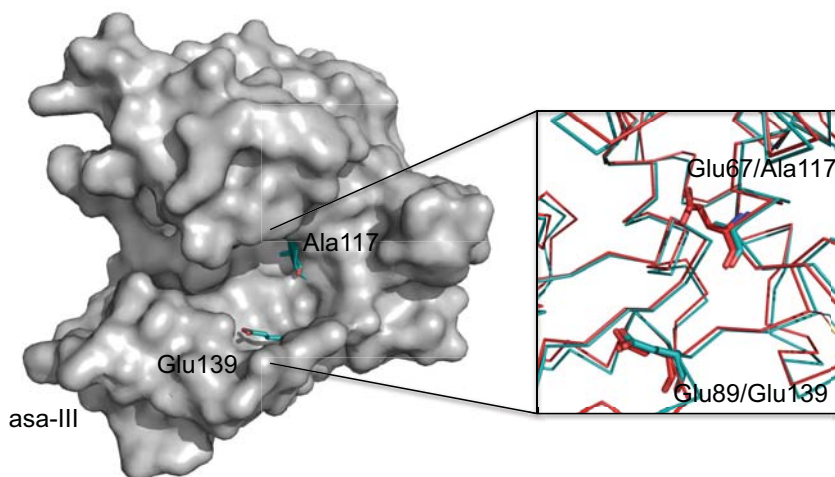


Figura 20. Representación superficial del DCat1 donde se muestra la cavidad de unión al carbohidrato. En azul se resaltan los aminoácidos catalíticos putativos, aunque en quitinasas activas Ala117 corresponde a Glu. En el recuadro se muestra una ampliación de la superposición estructural de la región donde se encuentran los aminoácidos catalíticos de la quitinasa de cebada (rojo) (PDB 1CNS) con el DCat1 (azul).

Las quitinasas de la familia GH19 poseen motivos altamente conservados, tal es el caso de una región que contiene el aminoácido catalítico (QTSHETTGGW) que participa como donador de protones (Glu67 en la quitinasa de cebada) (Fig. 21). Sin embargo, se ha reportado que substituciones de este aminoácido realizadas *in vitro* por Ala o Gln conducen a una pérdida total de la actividad catalítica (Tang *et al.*, 2004; Andersen *et al.*, 1997). La carencia de actividad catalítica ha sido observada de forma natural en PTQs de plantas, las cuales no han dejado de ser funcionales puesto que se han detectado actividades diferentes a la hidrólisis de oligosacáridos de quitina, como lo son la síntesis de celulosa (Zhang *et al.*, 2004) o actividades de receptor tipo cinasa (Kim *et al.*, 2000).

			20		40		60	
HbPTQ1	EQCGRQAGGA	LCPGGLCCSQ	YGWCANTPEY	CGSGCQSQCD	GGGGGEDGGI	DLG-----		53
HbPTQ2	EQCGRQAGGA	LCPGGLCCSQ	YGWCANTPEY	CGSGCQSQCD	GGVGGEGGCV	DLGCANTPEY		60
arroz	EQCGAQAGGA	RCPNCLCCSR	WGWCCTTSD	CGDGCQSQCS	GCGPTPTPTP	PSPSDGVG--		58
cebada	-----	-----	-----	-----	-----	-----		-
centeno	-----	-----	-----	-----	-----	-----		-
		80		100		120		
HbPTQ1	-----	-----	---SIISRST	FEEMLKHRND	AACPAKGFYT	YDAFISAAKA		90
HbPTQ2	CGSGCQSQCD	GGVGGEGGCV	DLGSIISRST	FEEMLKHRNN	AACPAKGFYT	YDAFISAAKA		120
arroz	-----	-----	---SIVPRDL	FERLLHRND	GACPARGFYT	YEAFLAAAAA		95
cebada	-----	-----	SVSSIVSRAQ	FDRMLLHRND	GACQAKGFYT	YDAFVAAAAA		40
centeno	-----	-----	SVSSIIISHAQ	FDRMLLHRND	GACQAKGFYT	YDAFVAAAAA		40
		140		160		180		
HbPTQ1	FPAFGTTGDV	DTCKREIAAF	FGQTS	HATTG	GWPTAPDGPY	AWGYCYKEEL	NQASSYCSPS	150
HbPTQ2	FPAFGTTGDV	DTCKREIAAF	FGQTS	HATTG	GWPTAPDGPY	AWGYCHKEEL	NQASSYCSPS	180
arroz	FPAFGGTGNT	ETRKREVAAF	LGQTS	HETT	GWPTAPDGPY	SWGYCFKQEQ	NPPSDYCSPS	155
cebada	FPGFGTTGSA	DAQKREVAAF	LAQTS	HETT	GWATAPDGAF	AWGYCFKQER	GASSDYCTPS	100
centeno	FPGFGATGST	DARKRDVAAF	LAQTS	HETT	GWATAPDGAF	AWGYCFKQER	GAAADYCTPS	100
		200		220		240		
HbPTQ1	PAYPCAPGKK	YYGRGPIQLS	WNYNYGQCGQ	ALGLDLLNNP	DLVATDRVIS	FKAAIWFWM	210	
HbPTQ2	PAYPCAPGKK	YYGRGPIQLS	WNYNYGQCGQ	ALGLDLLNNP	DLVATDRVIS	FKAAIWFWM	240	
arroz	PEWPCAPGRK	YYGRGPIQLS	FNFNYGPAGR	AIGVDLLSNP	DLVATDATVS	FKTALWFWM	215	
cebada	AQWPCAPGKR	YYGRGPIQLS	HNYNYGPAGR	AIGVDLLANP	DLVATDATVG	FKTAIWFWM	160	
centeno	AQWPCAPGKR	YYGRGPIQLS	HNYNYGPAGR	AIGVDLLRNP	DLVATDPTVS	FKTALWFWM	160	
		260		280		300		
HbPTQ1	PQFPKPSCHD	VITGQWSPTG	HDISAGRAPG	YGVITNIING	GLECGRGWDA	RVEDRIGFYK	270	
HbPTQ2	PQFPKPSCHD	VITGQWSPTG	HDISAGRAPG	YGVITNIING	GLECGRGWDA	RVEDRIGFYK	300	
arroz	PQGNKPSCHD	VITGRWAPSP	ADAAAGRAPG	YGVITNIVNG	GLECGHGPDD	RVANRIGFYQ	275	
cebada	AQPPKPSSHA	VIAGQWSPSG	ADRAAGRVP	FGVITNIING	GIECGHGQDS	RVADRIGFYK	220	
centeno	AQAPKPSSHA	VITGKWSPSG	ADRAAGRAPG	FGVITNIING	GLECGHGQDS	RVADRIGFYK	220	
		320						
HbPTQ1	RYCDMFAVGY	GSNLDCYNQT	PFGLG-----	---	295			
HbPTQ2	RYCDMFGVGY	GSNLDCYNQT	PFGLG-----	---	325			
arroz	RYCGAFGIGT	GGNLDCYNQR	PFNSGSSVGL	AEQ	308			
cebada	RYCDILGVGY	GNNLDCYSQR	PFA-----	---	243			
centeno	RYCDILGVGY	GDNLDCYNQR	PFA-----	---	243			

Figura 21. Alineamiento de aminoácidos de las HbPTQs con quitinasas activas pertenecientes a la familia GH19. En amarillo se resaltan los aminoácidos catalíticos y en rojo los aminoácidos reportados en trabajos previos importantes para la unión y catálisis del sustrato.

En un alineamiento de aminoácidos de las HbPTQs con quitinasas activas pertenecientes a la familia GH19 se observó la conservación de otros aminoácidos clave en la actividad catalítica (Fig. 21), lo cual explicó la restauración de la actividad enzimática de ambas HbPTQs cuando mutamos los residuos A117E y A147E en HbPTQ1 y HbPTQ2 respectivamente. Probando tres diferentes pHs con el sustrato quitina azure, las actividades específicas mayores fueron de 17.9 ± 2.3 U/mg a pH 4.0 para HbPTQ1-A117E y 12.9 ± 1.0 U/mg a pH 5.0 para HbPTQ2-A147E. La actividad específica de HbPTQ1-A117E a pH 8.0

fue aproximadamente tres veces menor que a pH 4.0, mientras que para HbPTQ2-A147E no se encontraron diferencias significativas (Tabla 4).

Tabla 4. Actividades específicas de las mutantes HbPTQs usando como sustrato quitina azure.

	pH 4.0 (U/mg)	pH 5.0 (U/mg)	pH 8.0 (U/mg)
HbPTQ1	0.3 ± 0.2	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.1
HbPTQ1-A117E	17.9 ± 2.3	14.6 ± 1.4	6.7 ± 0.4
HbPTQ2	0.4 ± 0.2	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.2
HbPTQ2-A147E	10.6 ± 1.3	12.9 ± 1.0	8.0 ± 0.6

Los resultados corresponden al promedio ± DS de tres experimentos independientes. Una unidad de enzima se definió como el cambio en la absorbancia a 575 nm (ΔA_{570}) de 1 en 72 horas.

Los aminoácidos Asp70 y la Tyr136 en HbPTQ1-A117E y Asn100 y la His166 en HbPTQ2-A147E ocupan las mismas posiciones en la cavidad de unión de sus respectivos DCats. La predicción del pK_a usando PROPKA (Olsson, 2012) de la mutación *in silico* de Tyr136 por His en la estructura del DCat1 indicó un valor de 5.5, lo que sugiere que este residuo está protonado a valores de pH de 4.0 y 5.0 donde las actividades específicas fueron muy similares y un valor neutro a pH 8.0 en HbPTQ2-A147E. Por el contrario, la Tyr136 presente en HbPTQ1-A117E está protonada a los tres pHs probados. Sin embargo, cuando este aminoácido está presente existe una variación de carga positiva a lo largo de la cavidad de unión, lo que podría provocar diferentes estados de repulsión y de esta forma tener diferencias en la actividad específica con la variación del pH (Fig. 22a,b).

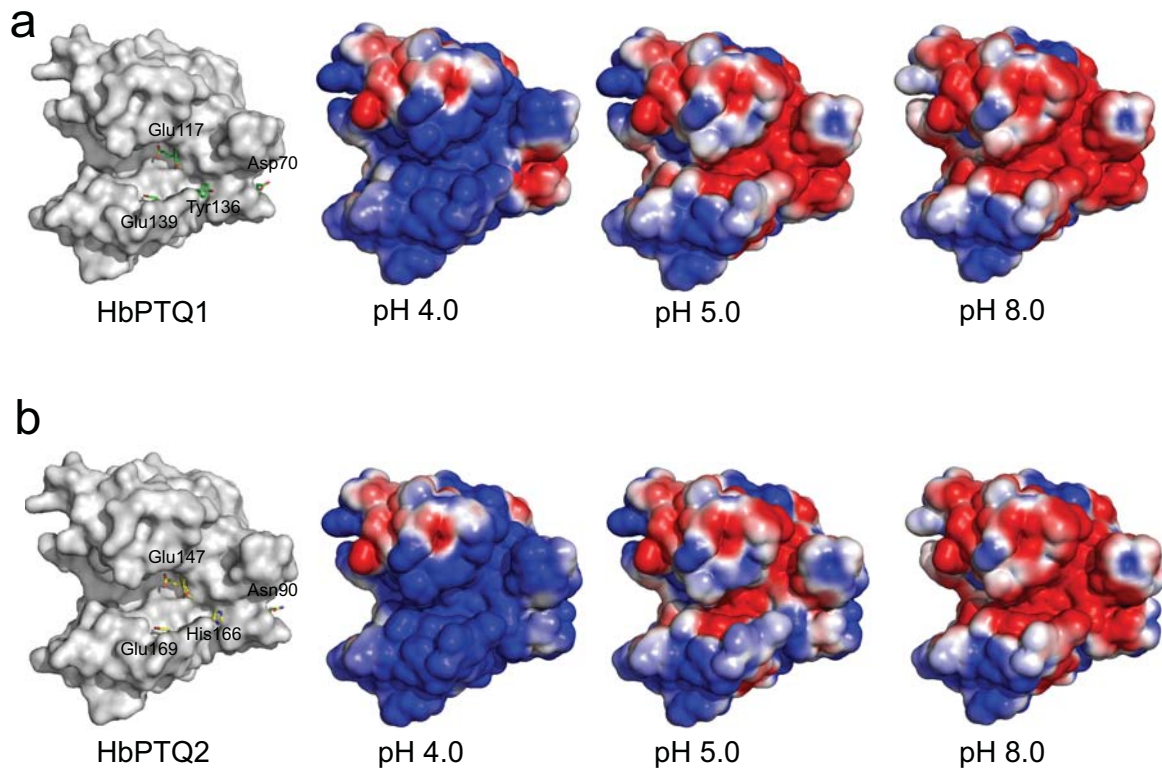


Figura 22. Potencial superficial electrostático de las HbPTQs a diferentes pHs calculado con PyMOL usando APBS. En azul se representan las cargas positivas, en blanco las neutrales y en rojo las cargas negativas. (a) HbPTQ1. (b) HbPTQ2.

6.6.- Unión a quitina y evaluación de actividad antifúngica

A pesar de la carencia de actividad hidrolítica en ambas HbPTQs, éstas retuvieron su habilidad de unión al carbohidrato cuando usamos perlas de quitina. Únicamente pudimos romper estas interacciones cuando las perlas de quitina se sometieron a una electroforesis SDS-PAGE en la presencia de 2-mercaptoetanol (DTT), lo cual indica que la interacción se rompe únicamente cuando las proteínas se desnaturalizan (Fig. 23).

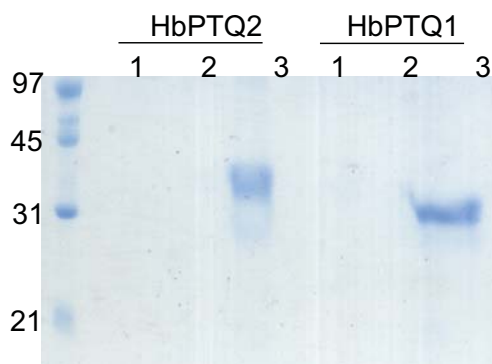


Figura 23. SDS-PAGE donde se muestran las HbPTQs que fueron separadas de las perlas de quitina. Carril 1: elución con 1 M de NaCl, 2: elución con 1 M de ácido acético y 3: perlas de quitina aplicadas al gel después de los experimentos de unión.

Estos resultados contrastan con lo reportado para algunas quitinasas activas, ya que este tipo de columnas se usan como método de purificación usando como eluyentes 1 M de NaCl y 1M de ácido acético (Taira, *et al.*, 2005).

Adicionalmente se observó actividad antifúngica contra *A. alternata* para ambas HbPTQs a diferentes concentraciones, lo que sugiere que estas proteínas pudieran estar involucradas en mecanismos de defensa a través de la unión de oligosacáridos (Fig. 24). Este efecto inhibitorio es atribuido a la habilidad de unión de las proteínas a la quitina naciente en la punta de las hifas (Koo *et al.*, 1998), lo que provoca su acumulación a lo largo de la pared celular produciendo cambios en la morfología del hongo como protuberancias e hifas cortas conduciendo finalmente a la inhibición del crecimiento (Nielsen *et al.*, 1997). Por otra parte, se ha reportado que la inhibición fúngica de las quitinasas activas se debe principalmente a la hidrólisis de la quitina, provocando la ruptura de las hifas (Kawase *et al.*, 2006).

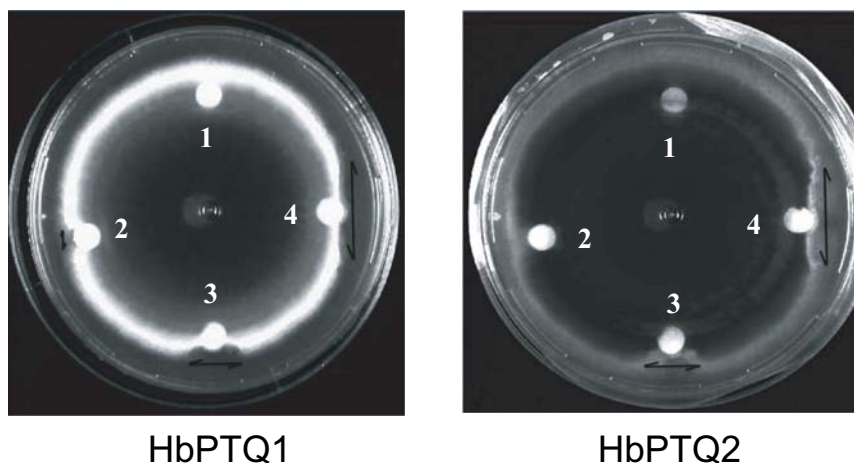


Figura 24. Inhibición del crecimiento de *A. alternata* de HbPTQ1 y HbPTQ2 a diferentes concentraciones. En ambas cajas 1 corresponde al control (Tris-HCl 50 mM); 2, 3 y 4 corresponden a 25, 50 y 75 µg de cada proteína. Las flechas dobles señalan la magnitud de la inhibición fúngica.

6.7.- Afinidad de unión al oligosacárido (GlcNAc)₃

Debido a la fuerte unión de las HbPTQs por la quitina, decidimos evaluar las constantes de afinidad de la unión de HbPTQ1, HbPTQ2 y sus respectivos dominios (DCats y DUQs) al oligosacárido (GlcNAc)₃, mediante experimentos de fluorescencia. Las dos HbPTQs tienen un Trp presente en el DUQ y dos triptófanos en la cavidad de unión de sus respectivos DCats; Trp122 y Trp171 en HbPTQ1 y Trp152 y Trp201 en HbPTQ2 (Fig. 21). Para ambas HbPTQs y sus DCats la titulación con el ligando provocó cambios similares en las curvas de saturación, las cuales presentaron un aumento en la intensidad de la fluorescencia, contrario a lo ocurrido con los DUQs en donde la intensidad de la fluorescencia disminuyó (Fig. 25a). Las curvas del cambio en la intensidad máxima de fluorescencia en función de la concentración de (GlcNAc)₃ se muestran en la Figura 25b y en la Tabla 5 se reportan los valores de las constantes de disociación K_d calculados para las proteínas completas y sus respectivos dominios.

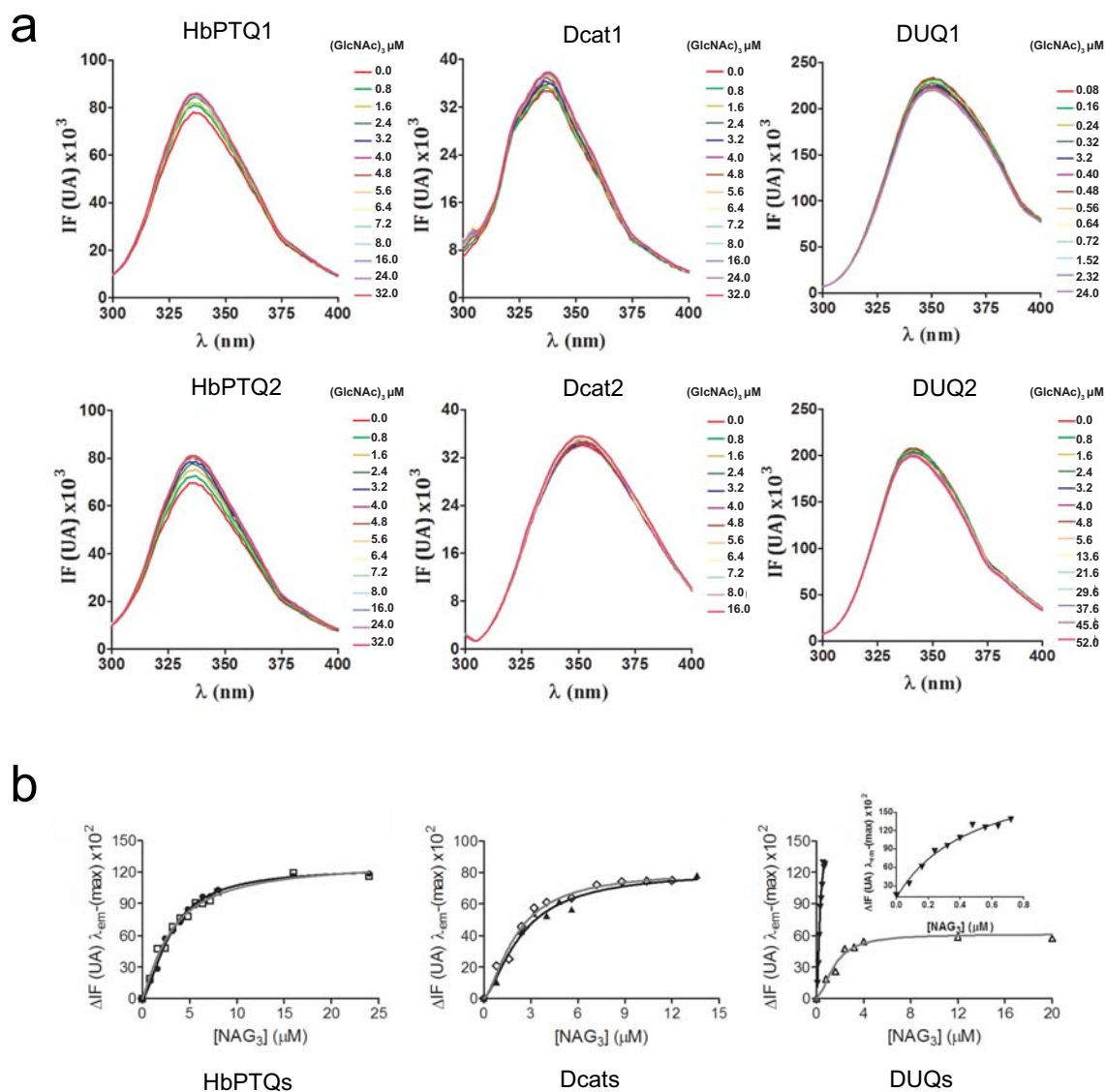


Figura 25. Análisis de la unión de las HbPTQs y sus respectivos dominios a $(\text{GlcNAc})_3$ por fluorescencia intrínseca. (a) experimentos de titulación con $(\text{GlcNAc})_3$. La concentración del ligando (μM) usada se encuentra ubicada de lado derecho de cada experimento (b) regresión no lineal de los cambios relativos en la intensidad de fluorescencia de las HbPTQs y sus dominios en presencia de varias concentraciones de $(\text{GlcNAc})_3$: HbPTQ1 (\bullet), HbPTQ2 (\square), Dcat1 (\blacktriangle), Dcat2 (\diamond), DUQ1 (\blacktriangledown) y DUQ2 (\triangle). El recuadro corresponde a una ampliación de la curva de unión del DUQ1.

Tabla 5. Constantes de disociación (K_d) de las HbPTQs y sus respectivos dominios.

	HbPTQ1	DCat1	DUQ1	HbPTQ2	DCat2	DUQ2
K_d (μM)	3.0 ± 0.13	2.4 ± 0.41	0.48 ± 0.14	3.1 ± 0.33	2.1 ± 0.24	1.49 ± 0.14

Un resultado interesante es que el DUQ1 mostró la mayor afinidad por el trisacárido, inclusive dos ordenes de magnitud menor al reportado para heveína usando ITC (71 μM) (García-Hernández *et al.*, 1997), fluorescencia obtenido en este trabajo (63 μM) y RMN (86 μM) (Asensio *et al.*, 2000) y con pseudoheveína, la cual tiene los mismos residuos en la región de unión (Tyr21, Trp23 y Tyr30) cuyo valor de K_d es de 142 μM determinado por RMN (Asensio *et al.*, 2000). Una posible explicación de la alta afinidad del DUQ1 por quitotriosa, comparada con las de dominios similares, la encontramos cuando realizamos el análisis de la estructura cristalográfica, ya que la Met0, la cual está presente por la construcción de biología molecular, interacciona con una molécula de MES ubicada en el sitio de unión a carbohidrato (Fig. 15c). Este residuo podría interactuar de igual manera con el carbohidrato, lo que podría incrementar su afinidad. En la Figura 26 se presenta un modelo de acoplamiento molecular de la unión de la quitotriosa con el DUQ1 en el que se aprecia que la Met0 establece algunas interacciones con el (GlcNAc)₃ en la posición +1.

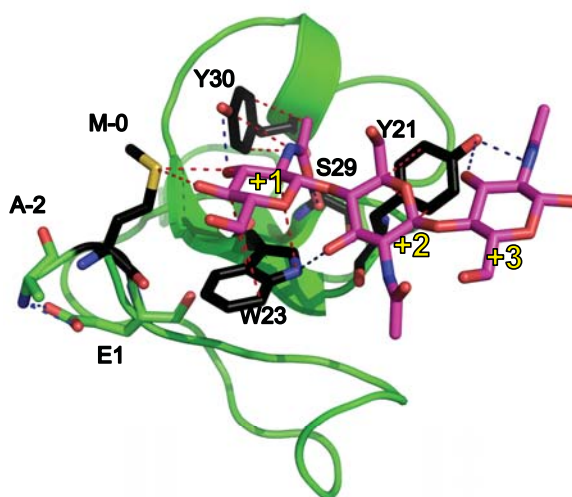


Figura 26. Interacción del modelo de unión de DUQ1 con quitotriosa. En verde está representado el DUQ1, en negro los aminoácidos que interaccionan con el oligosacárido, en rosa el (GlcNAc)₃, interacciones apolares se señalan en rojo y las interacciones polares en azul.

Es importante hacer notar que el DUQ2 que presenta treinta residuos extra (Cys54-Gly83) y también una Met0 debido a la construcción de biología molecular tuvo una K_d un orden de magnitud mayor en comparación con el DUQ1. Esto último sugiere que el medio dominio tipo heveína y el conector adicional afectan la unión del oligosacárido, probablemente por una mayor flexibilidad. En general, estos resultados son difíciles de interpretar debido a la presencia de dos dominios de unión diferentes en cada HbPTQ y más de un subsitio de unión en cada HbPTQ y DCat cuando se analiza la unión con la quitotriosa. De cualquier forma parece ser que la presencia del DUQ en ambas HbPTQs no incrementa la afinidad por oligómeros de GlcNAc de las proteínas completas, lo cual sugiere que estos dominios no presentan un efecto sinérgico en la unión al oligosacárido.

6.8.- Sitios de unión a oligosacáridos de quitina del DCat1

Otro análisis que consideramos interesante dada la fuerte interacción de las HbPTQs con la quitina fue estudiar las posibles interacciones con $(\text{GlcNAc})_6$ mediante acoplamiento molecular *in silico*, ya que la única estructura tridimensional que logramos obtener en este estudio contenía únicamente dos moléculas de N-acetilglucosamina. No obstante, era necesario analizar la interacción con un ligando de mayor tamaño para tener un panorama general de la unión a lo largo de cavidad del DCat1. En el experimento de acoplamiento molecular se seleccionaron y analizaron las primeras cinco soluciones de menor energía y además consideramos las interacciones reportadas previamente con los substratos y productos de quitinasas activas de la familia GH19, ya que hasta antes de este trabajo no existían estructuras reportadas de PTQs pertenecientes a esta familia. En la Figura 27 se

ilustran las interacciones del modelo seleccionado DCat1-(GlcNAc)₆ a lo largo de los subsitios -4 a +2.

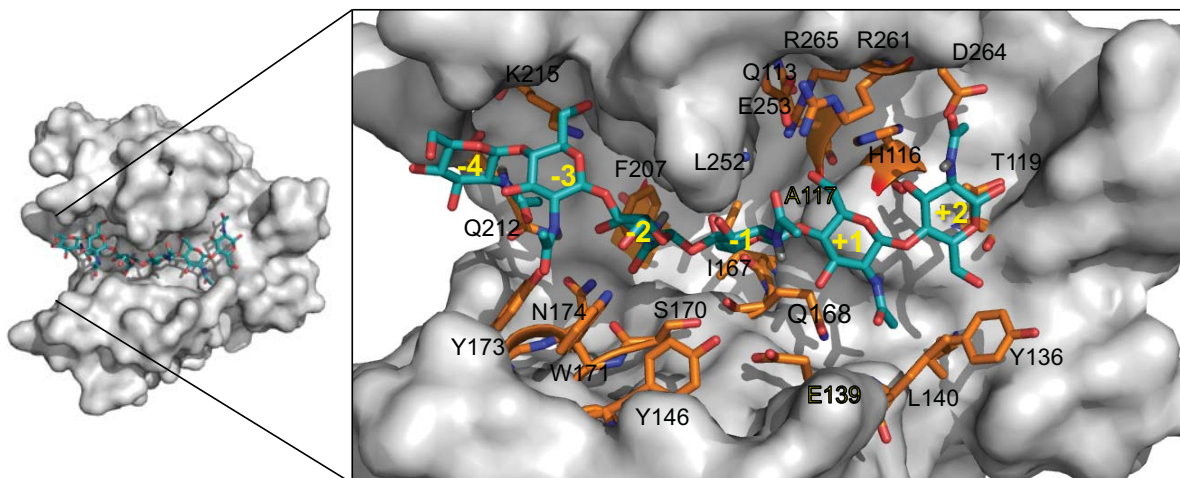


Figura 27. Acomodo estructural del (GlcNAc)₆ en azul a lo largo de la cavidad de DCat1. En el recuadro se muestra una amplificación donde se resaltan los aminoácidos involucrados en la unión.

La superposición estructural del modelo del acoplamiento molecular DCat1-(GlcNAc)₆ con la estructura experimental obtenida en este trabajo DCat1-2GlcNAc y con las estructuras de las quitinasas activas de centeno (PDB 4J0L) y papaya (PDB 3CQL) cristalizadas con dos moléculas de (GlcNAc)₄ y dos de N-acetilglucosamina, respectivamente, mostró un acomodo del (GlcNAc)₆ similar en los subsitios +1 y +2 al de los ligandos en la estructura cristalina; sin embargo se observó mayor variación para los subsitios -4 a -1 (Fig. 28a). Esto se pudo deber a que ninguno de los complejos experimentales alineados se ha cristalizado con un oligosacárido de mayor longitud, ya que sería hidrolizado por la enzima, por lo que se han hecho mutaciones para hacer a la enzima inactiva o bien se cristaliza a la proteína en presencia de oligosacáridos de menor tamaño.

Recientemente fue determinada la estructura cristalográfica de una quitinasa de musgo de la familia GH19 en complejo con $(\text{GlcNAc})_4$, esta proteína pertenece a las quitinasas de clase IV ya que carece de las asas II, IV y V debido a deleciones en este dominio (Ohnuma *et al.*, 2014). El ligando $(\text{GlcNAc})_4$ se encontró en los subsitios -2 a +2; de tal forma que la superposición estructural con el ligando de nuestro modelo *in silico* fue prácticamente el mismo (Fig. 28b).

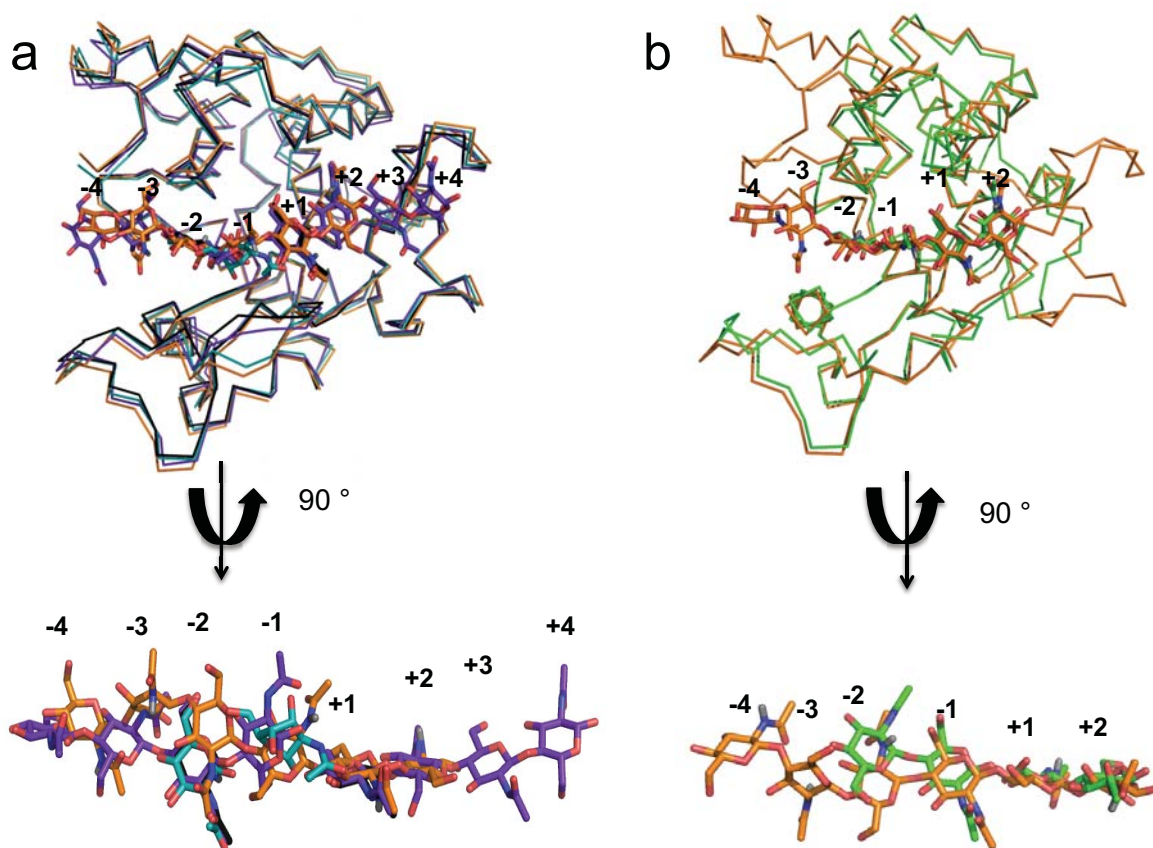


Figura 28. Superposición estructural del modelo obtenido mediante acoplamiento molecular *in silico* representado en naranja con estructuras cristalográficas de la familia GH19. (a) complejo DCat1-2GlcNAc en cian, quitinasa de centeno-2(GlcNAc)₄ en morado (PDB 4J0L) y quitinasa de papaya-2GlcNAc en negro (PDB 3CQL). (b) quitinasa de musgo en verde.

Las interacciones entre los oligosacáridos de quitina y los aminoácidos del dominio catalítico en el modelo *in silico* y en las estructuras cristalográficas se resumen en la Tabla 6. En el modelo *in silico* del complejo con (GlcNAc)₆ los residuos aromáticos de la cavidad de unión reconocen al ligando principalmente en los subsitios -4 a -1 a través de diferentes tipos de interacciones. Uno de ellos es el Trp171, el cual está localizado al final del asa III e interacciona con los residuos de GlcNAc de los subsitios -2 y -1. Este aminoácido se encuentra fuera de las regiones permitidas en el gráfico de Ramachandran, lo que sugiere su participación en la unión del ligando. En este aspecto se ha reportado que aquellos aminoácidos que participan en la unión con ciertos ligandos o se encuentran en sitios catalíticos de enzimas pueden encontrarse en regiones no permitidas del gráfico de Ramachandran (Barbas *et al.*, 1997). Otros residuos involucrados en el reconocimiento a carbohidratos son His116, Tyr146 y Phe207, los cuales están estrictamente conservados en quitinasas de la familia GH19 (Fig. 21).

Las interacciones en los subsitios -4 a +1 involucran principalmente aminoácidos localizados en el asa III: Leu140, Glu139, Tyr146, Gln168, Ser170 y Trp171. A pesar de que la mayoría de estos residuos están conservados en quitinasas de la familia GH19 observamos diferencias en las interacciones en los subsitios -4 a -2 para el DCat1-(GlcNAc)₆, en donde existe una marcada interacción con los residuos aromáticos: Trp171, Tyr173 y Phe207 comparada con quitinasas activas (Fig. 29). Por lo que se refiere a los subsitios -1 a +2, las interacciones directas del DCat1-(GlcNAc)₆ fueron menos que en las quitinasas activas (papaya y centeno), ya que como se muestra en la Tabla 6 uno de los aminoácidos catalíticos (Glu67) ausente en las HbPTQs interacciona con el oligosacárido en los subsitios -1 y +1.

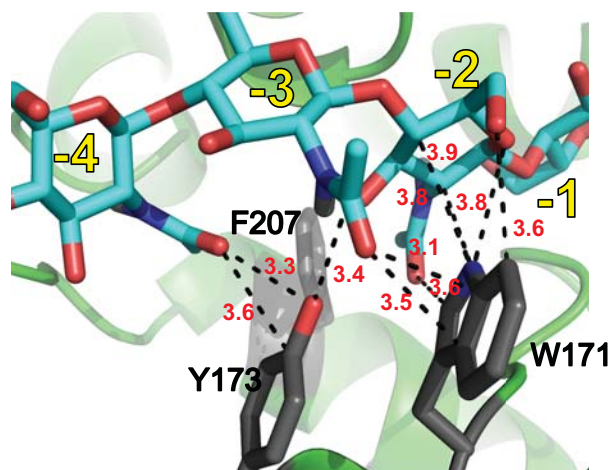


Figura 29. Interacciones de los subsitios -4 a -2 del (GlcNAc)₆ en azul con tres de los aminoácidos aromáticos (gris) presentes en el DCat1.

El modelo DCat1-(GlcNAc)₆ y la estructura cristalográfica de la quitinasa de musgo tienen la mayor proporción de interacciones no mediadas por moléculas de agua (Tabla 6) siendo las estructuras cuya superposición del ligando fue más parecida (Fig. 28b). Sin embargo, en la estructura de la enzima de musgo, que carece del asa IV, no están presentes las interacciones directas con los residuos aromáticos. Esta enzima que carece del DUQ tiene una K_d de $230 \pm 40 \mu\text{M}$ con (GlcNAc)₃ (Ohnuma *et al.*, 2011), la cual es dos órdenes de magnitud mayor al obtenido en este trabajo para las HbPTQs completas y los DCats. Esto último sugiere que las interacciones con los residuos aromáticos en los subsitios -4 a -1 de DCat1, así como la presencia del asa IV son importantes para la unión de oligosacáridos en este tipo de proteínas.

Tabla 6. Relación de aminoácidos presentes en proteínas inactivas (PTQ) y quitinasas activas que participan en la unión a oligosacáridos de quitina.

	DCat1-(GlcNAc) ₆	DCat1-2GlcNAc	centeno-2(GlcNAc) ₄ PDB 4J0L	papaya-2GlcNAc PDB 3CQL	musgo-(GlcNAc) ₄ PDB 3WH1
subsitio -4	Tyr173		<u>Phe242</u> , <u>Gln162</u>		
subsitio -3	Tyr173, Gly251, Lys215, Phe207, <u>Asn246</u> , <u>Phe292</u>		<u>Gln162</u> , Lys165, <u>Asn196</u> , <u>Phe242</u> , <u>Pro166</u> , <u>Phe157</u> , <u>Thr160</u> , <u>Phe157</u> , <u>Trp158</u> , <u>Ser167</u>		
subsitio -2	<u>Trp171</u> , Asn174, <u>Asn249</u> , <u>Gly251</u>	<u>Trp171</u> , Asn174, Lys215, Ile248, <u>Gln168</u> , Ile167, <u>Asn249</u> , <u>Gly251</u> , Leu252, Asn246, <u>Phe292</u> , <u>Tyr173</u>	Ser120, His121, <u>Asn124</u> , Ile198, <u>Gln162</u> , <u>Asn199</u> , <u>Gly201</u> , Leu202, <u>Phe157</u> , <u>Thr160</u> , <u>Pro166</u>	Ser120, Lys165, <u>Asn124</u> , <u>Trp121</u> , Ile198, <u>Tyr123</u> , Ile197, <u>Gly200</u> , <u>Gly201</u> , <u>Asn199</u>	Ser102, Trp103, Asn106, Ile163, Ile162, <u>Gly166</u> , Leu167
subsitio -1	<u>Asn249</u> , <u>Gln113</u> , <u>Arg265</u>	<u>Glu139</u> , Tyr146, Ser170, Trp171, <u>Arg261</u> , Ile167, <u>Gln168</u>	<u>Glu67Gln</u> , <u>Glu89</u> , Ser120, <u>Asn199</u>		Ile163, Asn164, <u>Ile99</u> , <u>Asn57</u> , <u>Arg184</u>
subsitio +1	Leu140, Gln168, Glu253, Arg265, Ser170, <u>Glu139</u> , <u>Gln113</u> , <u>Tyr146</u>		Arg90, His66, Arg215, Glu203, Gln118, <u>Asn199</u> , <u>Glu89</u>	His66, Arg215, <u>Glu203</u> , <u>Glu67</u> , <u>Gln118</u> , Arg90, <u>Thr69</u> , <u>Gln211</u> , <u>Glu89</u>	<u>Glu168</u> , Gln60, Gln100, Gln71, <u>Glu61Ala</u> , <u>Gln71</u> , <u>Glu70</u>
subsitio +2	His116, <u>Thr119</u>		Thr69		Gln60, Asn183, Gln180, <u>Tyr187</u> , <u>Ile59</u> , <u>Gln71</u>

Los aminoácidos en negro representan las interacciones directas mediadas por puentes de hidrógeno. En azul las mediadas por moléculas de agua y subrayados los aminoácidos catalíticos.

Cabe señalar que ciertas mutaciones adaptativas, como lo es la mutación puntual de Glu por Ala presente en estas HbPTQs pueden generar cambios en el reconocimiento del ligando y/o su afinidad. Por ejemplo, en un estudio filogenético de quitinasas de mamíferos de la familia GH18, se sugiere que las quitinasas activas con diferentes especificidades son el resultado de un primer evento de duplicación. Después, en un segundo evento se produjeron mutaciones que tuvieron como consecuencia la pérdida de la actividad enzimática, lo que permitió la evolución de las proteínas tipo quitinasas (Adrangi & Ali, 2013). Por lo tanto, mutaciones adaptativas similares podrían estar ocurriendo en *H. brasiliensis* produciéndose las HbPTQs que dan lugar a la pérdida de la actividad hidrolítica para cambiar su función a la de únicamente unión, como son las lectinas.

6.9.- Estabilidad térmica de las HbPTQs

Las quitinasas de plantas son generalmente estables a altas temperaturas ($> 60\text{ }^{\circ}\text{C}$); por lo tanto, para comprender si existe un efecto en la estabilidad de las HbPTQs debido a su carencia de actividad se registró la señal de DC aumentando la temperatura. Las curvas de desplegamiento de las HbPTQs y de sus dominios catalíticos inactivos y los de unión a carbohidrato separados se registraron a dos diferentes mínimos de longitud de onda: 222 nm para las proteínas completas y sus DCats y 196 nm para los DUQs (Fig. 30a,b). Para ambas HbPTQs y DCats las transiciones de desplegamiento fueron irreversibles. La temperatura media de desplegamiento (T_m) para HbPTQ1 fue de $71.4 \pm 0.3\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Fig. 30c), mientras que dos transiciones fueron observadas para HbPTQ2 con valores de T_m de $65.7 \pm 1.1\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $73.6 \pm 0.2\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Fig. 30 d). Resultados similares fueron observados para los DCats, con un T_m de $68 \pm$

0.1°C para DCat1 y dos transiciones para DCat2 con valores de T_m de $60.4 \pm 0.7^\circ\text{C}$ y $73.2 \pm 0.2^\circ\text{C}$ (Fig. 30c,d).

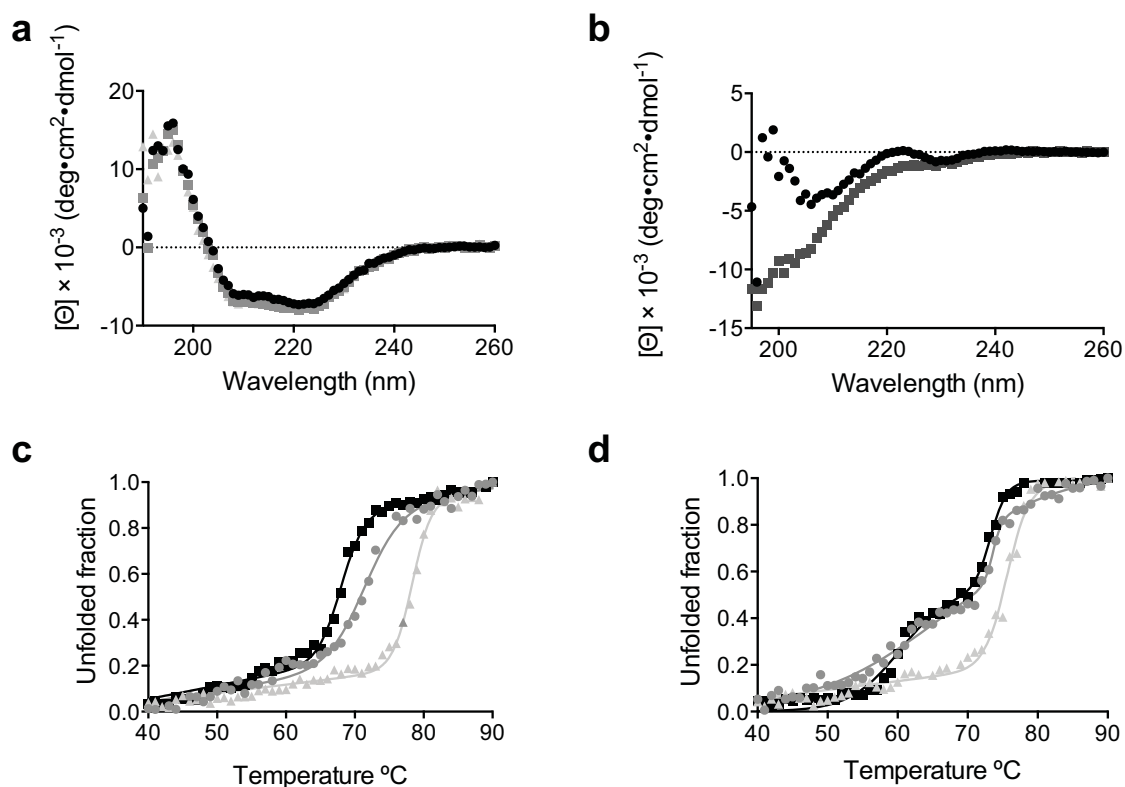


Figura 30. Curvas de desnaturalización térmica de las HbPTQs, sus mutantes activas y sus respectivas DCats. Espectro CD en la región UV-lejano para (a) DCat1 (●), HbPTQ1 (▲), HbPTQ2 (■); (b) DUQ1 (●), DUQ2 (■). Las transiciones se siguieron usando una señal de DC a 222 nm. Las líneas sólidas indican las curvas teóricas obtenidas usando un modelo de dos estados de transición. (c) DCat1 (■), HbPTQ1 (●) y HbPTQ1-A117E (▲). (d) DCat2 (■), HbPTQ2 (●) y HbPTQ2-A147E (▲).

Para los DUQs de ambas proteínas no se detectó ninguna transición a las temperaturas usadas en este experimento (20-90 °C). Este tipo de dominios presentan una alta identidad de secuencia con la heveína (68%), el cual es un alérgeno (Hev b 6.02) extremadamente resistente a la desnaturalización con un valor de T_m de 90.1°C a pH de 3.6. Es posible que las transiciones de los DUQs no se hayan detectado bajo las condiciones de este experimento (pH

7.5). Estos resultados sugieren que la presencia de los DUQs no afectan los valores de T_m en las proteínas completas; sin embargo, la existencia de mas de dos estados de transición es complicado de interpretar (Fig. 30d).

Finalmente, se determinaron los valores de T_m de las mutantes HbPTQ1-A117E y HbPTQ2-A147E, los cuales fueron de 78.3 ± 0.1 °C y 75.6 ± 0.1 °C, respectivamente (Fig. 30c,d). Estos valores fueron mayores a los de las HbPTQs sugiriendo que el cambio de actividad de lectina a hidrolasa incrementa la T_m ya que con base a nuestro modelo cristalográfico, Glu117 y Glu147 pueden establecer interacciones iónicas con Arg265 y Arg295 respectivamente, incrementando los valores de T_m por 7 °C y 2°C (Fig. 31). En las HbPTQs nativas esta interacción no existe sugiriendo que es menor la estabilidad en la cavidad y por lo tanto los valores de T_m son menores.

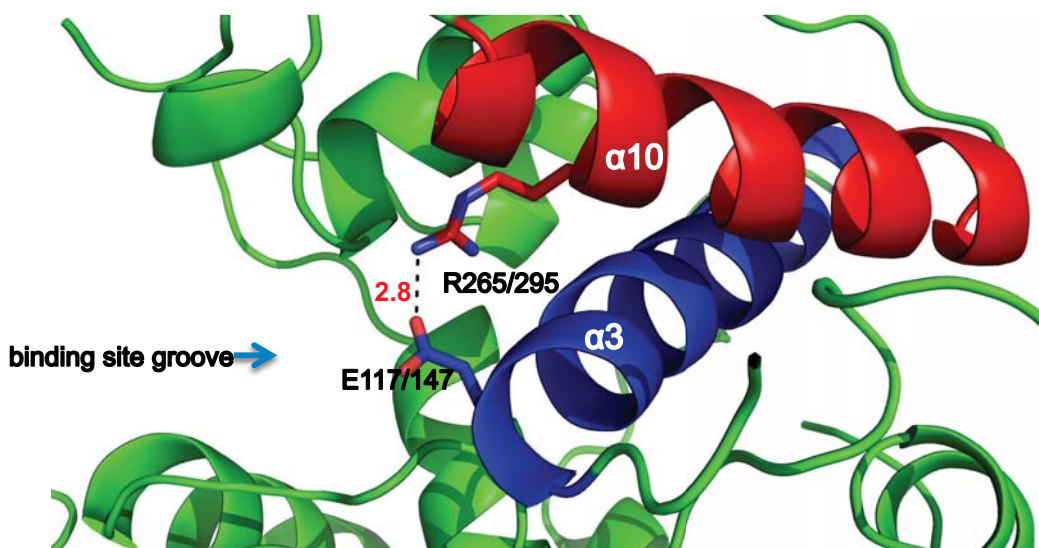


Figura 31. Interacción iónica entre Glu117/147 y Arg265/295 presentes en las mutantes de las HbPTQs.

6.10.- Localización celular de las HbPTQs en *H. brasiliensis*

En general, las quitinasas de plantas presentan un péptido señal en el extremo C-terminal que indica su localización en vacuola (Melchers *et al.*, 1993; Neuhaus *et al.*, 1994). Para el caso de las quitinasas inactivas de *H. brasiliensis* este dato no había sido reportado, por lo que otro resultado interesante en este trabajo fue la inclusión del dicho péptido, el cual fue determinado mediante experimentos de RACE (Fig. 32).



Figura 32. Alineamiento de secuencias de HbPTQ1 y HbPTQ2. Las secuencias de aminoácidos (exones) están representadas en letras mayúsculas, en letras negritas están indicados los nucleótidos correspondientes a los intrones y el péptido señal está enmarcado en rectángulos.

La comparación de esta secuencia con la de las proteínas maduras demostró que tiene un péptido señal que es removido pos-traduccionamente. Sin embargo encontramos evidencias de que estas proteínas no son vacuolares, tal como se había reportado con anterioridad (O’Riordain *et al.*, 2002) ya que la secuencia del extremo C-terminal no contenía el péptido señal vacuolar de algunas quitinasas de clase I. Estos resultados fueron confirmados por Western blot usando suero B o lutoides (partículas vacuolares) aisladas del látex de *H. brasiliensis* y anticuerpos policlonales específicos anti HbPTQ-IgG donde los resultados fueron negativos (Fig. 33), no obstante se encontraron en el citosol sugiriendo que estas proteínas podrían ser extracelulares, debido a la presencia del péptido señal en el extremo N-terminal. Este resultado se confirmó usando el servidor Yloc Interpretable Subcellular Localization prediction (Briesemeister *et al.*, 2010) que indicó un 78.8% de probabilidad de que las HbPTQs son proteínas extracelulares.

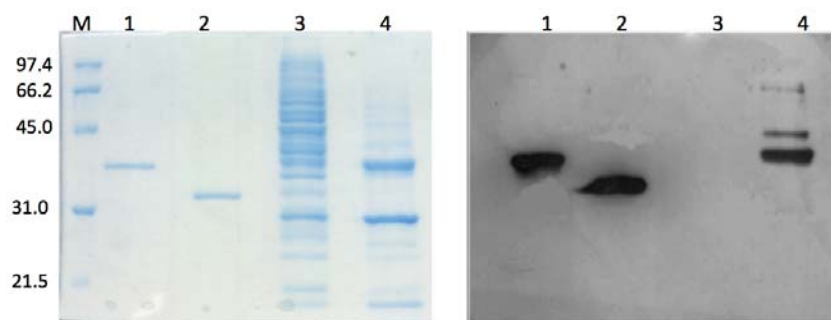


Figura 33. Experimento de Western blot para la localización de las HbPTQs en *H. brasiliensis*. M: marcador molecular, Carril 1: HbPTQ2 recombinante, 2: HbPTQ1 recombinante, 3: suero B o vacuolas y 4: citosol.

Debido a que únicamente encontramos una secuencia idéntica a HbPTQ2 en el genoma de *H. brasiliensis* recientemente publicado y ninguna para HbPTQ1, clonamos ambas proteínas a partir de DNA genómico y verificamos que ambos genes exhibían los dos intrones

característicos de quitinasas de clase I de plantas, lo que sugiere que diferentes genes codifican para cada HbPTQ (Fig. 32). El primer intrón está localizado después de la secuencia consenso SHATTG, mientras que el segundo intron está antes del motivo conservado NYNY, como se ha descrito para quitinasas de clase I de otras plantas. Esto último sugiere un evento evolutivo altamente relacionado de proteínas activas a inactivas con solo una mutación puntual de Glu por Ala.

7.0.- Conclusiones

- Una mutación puntual de Glu (GAA) a Ala (GCA) cambió la función de las HbPTQs de hidrolasas a lectinas, las cuales exhiben una alta afinidad de unión a quitina y quitotriosa.
- Este es el primer reporte de HbPTQ2 en *H. brasiliensis*, la cual interesantemente está compuesta por un DUQ no reportado a la fecha que consiste en un dominio y medio de unión a carbohidrato, separados por un conector.
- La estructura cristalográfica del DUQ1 evidencia que la Met0 interacciona con la molécula de MES en el sitio de unión al carbohidrato, sugiriendo que la presencia de este residuo incrementa significativamente su afinidad por quitotriosa.
- La disminución de la termo-estabilidad de HbPTQ1 y HbPTQ2 comparada con las mutantes activas sugiere que durante la evolución estas proteínas sacrificaron estabilidad por actividad de unión a carbohidrato con alta afinidad.
- Dos HbPTQs fueron clonadas usando el RNA de las hojas y látex de *H. brasiliensis*, las cuales se expresan constitutivamente en diferentes tejidos y proporciones dependiendo de la época de la colecta.
- Aunque la función de las HbPTQs en *H. brasiliensis* es desconocida nuestros estudios sugieren que podrían estar involucradas en los mecanismos de defensa de la planta debido a su actividad anti-fúngica y a su alta afinidad por oligosacáridos; sin embargo, existe la posibilidad de que pudieran estar involucradas en otros procesos.

8.- BIBLIOGRAFÍA

Aboitiz N, Vila-Perelló M, Groves P, Asencio JL, Andreu D, Cañada FJ, Jiménez-Barbero J (2004) NMR and modelling studies of protein–carbohydrate interactions: synthesis, three-dimensional structure, and recognition properties of a minimum hevein domain with binding affinity for chitoooligosaccharides. *Chem Bio Chem* **5**, 1245-1255.

Adams PD, Afonine PV, Bunkóczi G, Chen VB, Davis IW, Echols N, et al (2010) PHENIX: a comprehensive Python-base system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr Sect D* **66**:213-221.

Adrangi, Ali Famarzi M (2013) From bacteria to human: a journey into the world of chitinases. *Biotechnol Adv* **31**, 1786-1795.

Afonine PV, Grosse-Kunstleve RW, Echols N, Headd JJ, Moriarty NW, Mustyakimov M (2012) Towards automated crystallographic structure refinement with *phenix.refine*. *Acta Crystallogr Sect D* **68**:352-367.

Andersen MD, Jensen A, Robertus JD, Leah R, Skriver K (1997) Heterologous expression and characterization of wild-type and mutant forms of a 26 kDa endochitinase from barley (*Hordeum vulgare* L). *Biochem J* **322**, 815-822.

Arakane Y, Muthukrishnan S (2010) Insect chitinase and chitinase-like proteins. *Cell Mol Life Sci* **67**:201-216.

Arakane Y, Taira T, Ohnuma T, Fukamizo T (2012) Chitin-related enzymes in agrobiosciences. *Curr Drug Targets* **13**:442-470.

Asencio JL, Cañada FJ, Siebert H, Laynez J, Poveda A, Nieto PM, Soedjanaamadja UM, Gabius H, Jiménez-Barbero J (2000) Structural basis for chitin recognition by defense proteins: GlcNAc residues are bound in a multivalent fashion by extended binding sites in hevein domains. *Chem Biol* **7**, 529–543.

Barbas CF, Heine A, Zhong G, Hoffman T, Gramatikova S, Bjornestedt R, List B, Anderson J, Stura EA, Wilson IA, et al. (1997) Immune versus natural selection: antibody aldolases with enymes rates but broader scope. *Science* **278**, 2085–2092.

Bargagli E, Margollicci M, Nikiforakis N, Luddi A, Perrone A, Grosso S, et al (2007) Chitotriosidase activity in the serum of patients with sarcoidosis and pulmonary tuberculosis. *Respiration* **74**:548-552.

Barre A, Culerrier R, Granier C, Selman L, Peumans WJ, Van Damme JM, et al (2009) Mapping of IgE-binding epitopes on the major latex allergen Hev b 2 and the cross-reacting 1,3 β -glucanase fruit allergens as a molecular basis for the latex-fruit syndrome. *Mol Immunol* **46**:1595-1604.

- Bernadó P, Svergun DI (2012) Analysis of intrinsically disordered proteins by small-angle X-ray scattering. *Methods Mol Biol* **896**:107-122.
- Bhattacharya D, Nagpure A, Gupta RK (2007) Bacterial chitinases: properties and potential. *Crit Rev Biotechnol* **27**:21–28.
- Briesemeister S, Rahnenführer J, Kohlbacher O (2010) YLoc--an interpretable web server for predicting subcellular localization. *Nucleic Acids Res* **38**:W497-W502.
- Burla MC, Carrozzini B, Cascarano GL, Giacovazzo C, Polidori G (2003) SAD o MAD phasing: location of the anomalous scatterers. *Acta Crystallogr Sect D* **59**: 662-669.
- Bussink AP, Speijer D, Aerts JMFG, Boot RG (2007) Evolution of mammalian chitinase (-like) members of family 18 glycosyl hydrolases. *Genetics* **177**:959-970.
- Dahiya N, Tewari R (2006) Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. *Appl Microbiol Biotechnol* **71**:773-782.
- Davies G, Henrissat B (1995) Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* **3**: 853-859.
- DeLano WL (2002) The PyMOL Molecular Graphics System, Schrodinger LLC, New York.
- De Marco, A (2009) Strategies for successful recombinant expression of disulfide bond-dependent proteins in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact* **8**:26.
- Ebrahim S, Usha K, Singh B (2011) Pathogenesis-related (PR)-proteins: chitinase and β -1,3-glucanase in defense mechanism against malformation in mango (*Mangifera indica* L.) *Sci Hortic* **130**:847-852.
- Emsley P, Cowtan k (2004) Coot: model-building tolos for molecular graphics. *Acta Crystallogr Sect D* **60**:2126-2132.
- García-Hernandez E, Zubillaga RA, Rojo-Domínguez A, Rodríguez-Romero A, Hernández-Arana A (1997) New insights into the molecular basis of lectin-carbohydrate interactions: a calorimetric and structural study of the association of hevein to oligomers of N-acetylglucosamine. *Proteins* **29**, 467–477.
- Grosdidier A, Zoete V, Michielin O (2011) SwissDock, a protein-small molecule docking web service based on EADock DSS. *Nucleic Acids Res* **39**: W270–W277.
- Guan Y, Chye ML (2008) A *Brassica juncea* chitinase with two-chitin binding domains show anti-microbial properties against phytopathogens and Gram-negative bacteria. *Plant Signal Behav* **3**:1103-1105.

- Hassas-Roudsari M, Goff HD (2012) Ice structuring proteins from plants: Mechanism of action and food application. *Food Res Int* **46**:425-436.
- Holm L, Rosenström P (2010) Dali server: conservation mapping in 3D. *Nucleic Acids Res* **38**:W545-W549.
- Hossain MA, Noh HN, Kim KI, Koh EJ, Wi SG, Bae HJ, Lee H, Hong SW (2010) Mutation of the chitinase-like protein-encoding AtCTL2 gene enhances lignin accumulation in dark-grown *Arabidopsis* seedlings. *J Plant Physiol* **167**:650-658.
- Huet J, Rucktooa P, Clantin B, Azarkan M, Looze Y, Villeret V, Wintjens R (2008) X-ray structure of papaya chitinase reveals the substrate binding mode of glycosyl hydrolase family 19 chitinases. *Biochemistry* **47**, 8283–8291.
- Iseli B, Armand S, Boller T, Neuhaus J-M, Henrissat B (1996) Plant chitinases use two different hydrolytic mechanisms. *FEBS Letters* **382**:186-188.
- Kabsch W (2010) XDS. *Acta Crystallogr Sect D* **66**:125-132.
- Kasprzewska A (2003) Plant chitinases-regulation and function. *Cell Mol Biol Lett* **8**:809-824.
- Kawase T, Saito A, Sato T, Kanai R, Fujii T, Nikaidou N, Miyashita K, Watanabe T (2004) Distribution and phylogenetic analysis of family 19 chitinases in *Actinobacteria*. *Appl Environ Microbiol* **70**:1135-1144.
- Kawase T, Yokowawa S, Saito A, Fujii T, Nikaidou N, Miyashita K, Watanabe T (2006) Comparison of enzymatic and antifungal properties between family 18 and 19 chitinases from *S. coelicolor* A3(2). *Biosci Biotechnol Biochem* **70**, 988–998.
- Kezuka Y, Kojima M, Mizuno R, Suzuki K, Watanabe T, Nonaka T (2010) Structure of full-length class I chitinase from rice revealed by X-ray crystallography and small-angle X-ray scattering. *Proteins* **78**, 2295–2305.
- Khan MA, Hamid R, Ahmad M, Abdin MZ, Javed S (2010) Optimization of culture media for enhances chitinase production from a novel strain of *Stenotrophomonas maltophilia* using response surface methodology. *J Microbiol Biotechnol* **20**:1597-1602.
- Kim YS, Lee JH, Yoon GM, Cho HS, Park S, Suh MC, Choi D, Ha HJ, Liu JR, Pai H (2000) CHRK1, a chitinase-related receptor-like kinase in tobacco. *Plant Physiol* **123**, 905–915.
- Koo JC, Lee SY, Chun HJ, Cheong YH, Choi JS, Kawabata S, Miyagi M, Tsunasawa S, Ha KS, Bae DW et al. (1998) Two hevein homologs isolated from the seed of *Pharbitis nil* L. exhibit potent antifungal activity. *Biochem Biophys Acta* **1382**, 80–90.

Kotchoni SO, Gachomo EW (2009) A rapid and hazardous reagent free protocol for genomic DNA extraction suitable for genetic studies in plants. *Mol Biol Rep* **36**, 1633–1636.

Krissinel E, Henrick K (2007) Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J Mol Biol* **372**, 774–797.

Li L, Yi H (2012) Differential expression of *Arabidopsis* defense-related genes in response to sulfur dioxide. *Chemosphere* **87**:718-724.

Martínez-Caballero S, Cano-Sánchez P, Mares-Mejía I, Díaz-Sánchez AG, Macías-Rubalcava ML, Hermoso JA, Rodríguez-Romero A (2014) Comparative study of two GH19 chitinase-like proteins from *Hevea brasiliensis*, one exhibiting a novel carbohydrate-binding domain. *FEBS J* **281**:4535-4554.

McCarter JD, Withers SG (1994) Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. *Curr Opin Struct Biol* **4**:885-892.

Melchers LS, Sela-Buurlage MB, Vloemans SA, Woloshuk CP, Van Roekel JS, Pen J, van den Elzen PJ, Cornelissen BJ (1993) Extracellular targeting of the vacuolar tobacco proteins AP24, chitinase and beta-1,3-glucanase in transgenic plants. *Plant Mol Biol* **21**:583-593

Neuhaus J-M, Sticher L, Meins F, Boller T (1991) A short C-terminal sequence is necessary and sufficient for the targeting of chitinases to the plant vacuole. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**:10362-10366.

Neuhaus JM, Pietrzak M, Boller T (1994) Mutation analysis of the C-terminal vacuolar targeting peptide of tobacco chitinase: low specificity of the sorting system, and gradual transition between intracellular retention and secretion into the extracellular space. *Plant J* **5**:45-54.

Nielsen KK, Nielsen JE, Madrid SM, Mikkelsen JD (1997) Characterization of a new antifungal chitin-binding peptide from sugar beet leaves. *Plant Physiol* **113**, 83–91.

Ohnuma T, Sorlie M, Fukuda T, Kawamoto N, Taira T, Fukamizo T (2011) Chitin oligosaccharide binding to a family GH19 chitinase from the moss *Bryum coronatum*. *FEBS J* **278**:3991-4001.

Ohnuma T, Numata T, Osawa T, Inanaga H, Okazaki Y, Shinya S, Kondo K, Fukuda T, Fukamizo T (2012) Crystal structure and chitin oligosaccharide-binding mode of a ‘loopful’ family GH19 chitinase from rye, *Secale cereale*, seeds. *FEBS J* **279**, 3639–3651.

Ohnuma T, Umemoto N, Kondoh K, Numata T, Fukamizo T (2013) Complete subsite mapping of a ‘loopful’ GH19 chitinase from rye seeds based on its crystal structure. *FEBS Lett* **587**, 2691–2697.

Ohnuma T, Umemoto N, Nagata T, Shinya S, Numata T, Taira T, Fukamizo T (2014) Crystal structure of a 'loopless' GH19 chitinase in complex with chitin tetrasaccharide spanning the catalytic center. *Biochim Biophys Acta* **1844**, 793–802.

Olsson MH (2012) Improving the desolvation penalty in empirical protein pKa modeling. *J Mol Model* **18**:1097-1106.

O'Riordain G, Radauer C, Hoffmann-Sommergruber K, Adhami F, Peterbauer K, Blanco C, et al (2002) Cloning and molecular characterization of the *Hevea brasiliensis* allergen Hev b 11, a class I chitinase. *Clin Exp All* **32**:455-462.

Patil DN, Datta M, Chaudhary A, Tomar S, Sharma AK, Kumar P (2009) Isolation, purification, crystallization and preliminary crystallographic studies of chitinase from tamarind (*Tamarindus indica*) seeds. *Acta Crystallogr Sect F* **65**:343-345.

Patil DN, Datta M, Dev A, Dhindwal S, Singh N, Dasauni P, et al (2013) Structural investigation of a novel N-acetyl glucosamine binding Chi-Lectin which reveals evolutionary relationship with class III chitinases. *PLoS ONE* **8**:e63779.

Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE (2004) UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* **25**:1605-1612.

Peumans WJ, Proost P, Swennen RL, Van Damme JM (2002) The abundant class III chitinase homolog in young developing banana fruits behaves as a transient vegetative storage protein and most probably serves as an important supply of amino acids for the synthesis of ripening-associated proteins. *Plant Physiol* **130**:1063-1072.

Rahman A, Usharraj A, Misra BB, Thottathil GP, Jayasekaran K, Feng Y, Hou S, Ong SY, Ng FL, Lee LS et al. (2013) Draft genome sequence of the rubber tree *Hevea brasiliensis*. *BMC Genomics* **14**: 75.

Reyes-López CA, Hernández-Santoyo A, Pedraza- Escalona M, Mendoza G, Hernández-Arana A, Rodríguez-Romero A (2004) Insights into a conformational epitope of Hev b 6.02 (hevein). *Biochem Biophys Res Commun* **314**, 123–130.

Rihs H-P, Dumont B, Rozynek P, Lundberg M, Cremer R, Brüning T, Raulf-Heimsoth M (2003) Molecular cloning, purification, and IgE-binding of a recombinant class I chitinase from *Hevea brasiliensis* leaves (rHev b 11.0102). *Allergy* **58**:246-251.

Sánchez-Rodríguez C, Bauer S, Hématy K, Saxe F, Ibáñez AB, Vodermaier V, et al (2012) Chitinase-like1/pom-pom1 and its homolog CTL2 are glucan-interacting proteins important for cellulose biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **24**:589-607.

Sarma K, Dehury B, Sahu J, Sarmah R, Sahoo S, Sahu M, Sen P, Modi MK, Barooah M (2012) A comparative proteomic approach to analyse structure, function and evolution of rice chitinases: a step towards increasing plant fungal resistance. *J Mol Model* **18**:4761-4780.

Soedjanaatmadja UM, Hofsteenge J, Jeronimus- Stratingh CM, Bruins AP, Beintema JJ (1994) Demonstration by mass spectrometry that pseudo- hevein have ragged C-terminal sequences. *Biochim Biophys Acta* **16**, 144–148.

Sowka S, Hsieh LS, Krebitz M, Akasawa A, Martin BM, Starrett D, Peterbauer CK, Scheiner O, Breiteneder H (1998) Identification and cloning of Prs a 1, a 32-kDa endochitinase and major allergen of avocado, and its expression in the yeast *Pichia pastoris*. *J Biol Chem* **273**:28091-28097.

Suginta W, Robertson PAW, Austin B, Fry SC, Fothergill-Gilmore LA (2000) Chitinases from *Vibrio*: activity screening and purification of chiA from *Vibrio carchariae*. *J Appl Microbiol* **89**: 76-84.

Taira T, Toma N, Ishihara M (2005) Purification, characterization, and antifungal activity of chitinases from pineapple (*Ananas comosus*) leaf. *Biosci Biotechnol Biochem* **69**, 189-196.

Tang CM, Chye ML, Ramalingam S, Ouyang SW, Zhao KJ, Ubhayasekera W, Mowbray SL (2004) Functional analyses of the chitin-binding domains and the catalytic domain of *Brassica juncea* chitinase BjCHI. *Plant Mol Biol* **56**:285-298.

Tang C, Qi J, Li H, Zhang C, Wang Y (2007) A convenient and efficient protocol for isolating high-quality RNA from latex of *Hevea brasiliensis* (para rubber tree). *J Biochem Biophys Methods* **70**:749-754.

Tews I, Terwisscha van Sceltinga, Perrakis A, Wilson KS, Dijkstra BW (1997) Substrate-assisted catalysis unifies two families of chitinolytic enzymes. *J Am Chem Soc* **119**:7954-7959.

Thompson SE, Smith M, Wilkinson MC, Peek K (2001) Identification and characterization of a chitinase antigen from *Pseudomonas aeruginosa* strain 385. *Appl Environ Microbiol* **67**: 4001–4008.

Urban A, Neukirchen S, Jaeger K-E (1997) A rapid and efficient method for site-directed. *Nucleic Acids Res* **25**:2227-2228.

Van Damme EJ, Culerrier R, Barre A, Alvarez R, Rougé P, Peumans WJ (2007) A novel family of lectins evolutionarily related to class V chitinases: an example of neofunctionalization in legumes. *Plant Physiol* **144**:662-672.

- Vasconcelos AR, Santana CG, Godoy CV, Seixas DS, Silva MS, Moreira RS, et al (2011) A new chitinase-like xylanase inhibitor protein (XIP) from coffee (*Coffea arabica*) affects Soybean Asian rust (*Phakopsora pachyrhizi*) spore. *BMC Biotechnol* **11**:14
- Vicencio AG, Narain S, du Z, Zeng WY, Ritch J, Casadevall A, et al. (2008) Pulmonary cryptococcosis induces chitinase in the rat. *Respir Res* **9**:40.
- Wasano N, Konno K, Nakamura M, Hirayama C, Hattori M, Tateishi K (2009) A unique latex protein, MLX56, defends mulberry trees from insects. *Phytochemistry* **70**:880-888.
- Weininger D (1988) SMILES, a chemical language and information system. 1. Introduction to methodology and encoding rules. *J Chem Inf Comput Sci* **28**:31-36.
- Winn MD, Ballard CC, Cowtan KD, Dodson EJ, Emsley P, Evans PR, et al (2011) Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr Sect D* **67**:235-242.
- Wright CS (1992) Crystal structure of a wheat germ agglutinin/glycophorin-sialoglycopeptide receptor complex. Structural basis for cooperative lectin-cell binding. *J Biol Chem* **267**, 14345–14352.
- Wu B, Zhang B, Dai Y, Zhang L, Shang-Guan K, Peng Y, Zhou Y, Zhu Z (2012) *Brittle Culm15* encodes a membrane-associated chitinase-like protein required for cellulose biosynthesis in rice. *Plant Physiol* **159**:1440-1452.
- Xiao X, Tang C, Fang Y, yang M, Zhou B, Qi J, Zhang Y (2014) Structure and expression profile of the sucrose synthase gene family in the rubber tree: indicative of roles in stress response and sucrose utilization in the laticifers. *FEBS J* **281**:291-305.
- Yeku O, Frohman MA (2011) Rapid amplification of cDNA ends (RACE). *Methods Mol Biol* **703**:107-122.
- Zhang D, Hrmova M, Wan CH, Wu C, Balzen J, Cai W, Wang J, Densmore LD, Fincher GB, Zhang H, et al. (2004) Members of a new group of chitinase-like genes are expressed preferentially in cotton cells with secondary walls. *Plant Mol Biol* **54**, 353–372.

9.- ANEXO

Martínez-Caballero S, Cano-Sánchez P, Mares-Mejía I, Díaz-Sánchez AG, Macías-Rubalcava ML, Hermoso JA, Rodríguez-Romero A (2014)

Comparative study of two GH19 chitinase-like proteins from *Hevea brasiliensis*, one exhibiting a novel carbohydrate-binding domain. *FEBS J* **281**:4535-4554.

Comparative study of two GH19 chitinase-like proteins from *Hevea brasiliensis*, one exhibiting a novel carbohydrate-binding domain

Siseth Martínez-Caballero¹, Patricia Cano-Sánchez¹, Israel Mares-Mejía¹, Angel G. Díaz-Sánchez¹, Martha L. Macías-Rubalcava¹, Juan A. Hermoso² and Adela Rodríguez-Romero¹

¹ Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México

² Departamento de Cristalografía y Biología Estructural, Instituto de Química-Física 'Rocasolano', CSIC, Madrid, Spain

Keywords

antifungal protein; chitin affinity; plant chitinase-like protein; thermostability; X-ray crystal structure

Correspondence

A. Rodríguez-Romero, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, México D. F. 04510, México
Fax: +52 5556162217
Tel: +52 5556224568
E-mail: adela@unam.mx

(Received 15 April 2014, revised 12 July 2014, accepted 6 August 2014)

doi:10.1111/febs.12962

Plants express chitinase and chitinase-like proteins (CLPs) belonging to the glycosyl hydrolases of the GH18 and GH19 families, which exhibit varied functions. CLPs in the GH18 family have been structurally and functionally characterized; however, there are no structures available for any member of the GH19 family. In this study, two CLPs of the GH19 family from the rubber tree *Hevea brasiliensis* (HbCLP1 and HbCLP2) were cloned, expressed and characterized. HbCLP1 was identical to the allergen Hev b 11.0101 previously described by others, while HbCLP2 was a novel isoform exhibiting an unusual half chitin-binding domain before the catalytic domain. Sequence alignments showed that in the two proteins the catalytic residues Glu117 and Glu147 in HbCLP1 and HbCLP2, respectively, were mutated to Ala, accounting for the lack of activity. Nonetheless, both CLPs bound chitin and chitotriose (GlcNAc)₃ with high affinities, as evaluated with chitin-affinity chromatography and tryptophan fluorescence experiments. The chitin-binding domains also bound chitotriose with even higher affinities. The crystal structures of the HbCLP1-isolated domains were determined at high resolution. The analysis of the crystallographic models and docking experiments using (GlcNAc)₆ oligosaccharides provides evidence of the residues involved in sugar binding. Endochitinase activity was restored in both proteins by mutating residues A117E (HbCLP1) and A147E (HbCLP2); the distance between the catalytic proton donor and the catalytic nucleophile in the *in silico* mutated residues was 9.5 Å, as occurs in inverting enzymes. HbCLP1 and HbCLP2 were highly thermostable and exhibited antifungal activity against *Alternaria alternata*, suggesting their participation in plant defense mechanisms.

Database

The atomic coordinates and structure factors have been deposited in the Protein Data Bank with accession numbers [4MST](#) for the catalytic domain (CatD1) and [4MPI](#) for the chitin-binding domain (CBD1). Nucleotide sequence data are available in the GenBank database under the accession numbers [KF648872](#) (chi-L1) and [KF648873](#) (chi-L2).

Abbreviations

CatD1, catalytic domain of HbCLP1; CatD2, catalytic domain of HbCLP2; CatD, catalytic domain; CBD1, chitin-binding domain of HbCLP1; CBD2, chitin-binding domain of HbCLP2; CBD, chitin-binding domain; CLP, chitinase-like protein; GH, glycoside hydrolase; GlcNAc, *N*-acetylglucosamine; HbCLP, chitinase-like protein from *Hevea brasiliensis*; IPTG, isopropyl 1-thio-β-D-galactopyranoside; ITC, isothermal titration calorimetry; MES, 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid; NMR, nuclear magnetic resonance; PRP, pathogenesis-related proteins.

Introduction

Chitinases ([EC 3.2.1.14](#)) and chitinase-like proteins (CLPs) are widely distributed among all kingdoms of life, and they participate in several physiological processes, including pathogenesis, nutrition, growth regulation and immunity, among others [1–3]. Chitinases catalyze the hydrolysis of β -1,4-linkages between *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) residues in chitin, the second most abundant polysaccharide in nature, whereas CLPs lack enzymatic activity due to mutations in one or more of their amino acids required for catalysis but retain their potential to bind chitin oligosaccharides. Plants express chitinases and CLPs, which belong to the glycosyl hydrolase GH18 and GH19 families, constitutively in tissues vulnerable to pathogen attack and inducibly as pathogenesis-related proteins (PRP) [4–6]. Based on sequence similarity, plant chitinases are classified into seven classes (I–VII) [7–9]. Classes represented in the GH19 family are I, II, IV, VI and VII, while classes III and V are members of the GH18 family. Class I endochitinases are characterized by the presence of an N-terminal, hevein-like, chitin-binding domain (CBD) and a C-terminal catalytic domain (CatD), which are connected by a short linker that varies in length and amino acid composition [10]. Class II chitinases only have a CatD, homologous to that of class I chitinases, while class IV chitinases share sequence homology with the members of class I but are smaller due to four deleted sequences. A heavily truncated CBD along with a proline-rich spacer is dominant in class VI chitinases [11] and class VII members lack the CBD but possess a CatD, which is homologous to that present in class IV chitinases [12]. Furthermore, chitinases are also classified as PRP families 3, 4, 8 and 11 [13].

Plant chitinases are able to degrade fungal cell walls [14] and insect exoskeletons [15], but it is not clear whether their increased expression in response to fungal infection or the presence of insects is a pathogen-specific process or if it only reflects a stress-induced response. These enzymes also exhibit several physiological functions that are not related to their hydrolytic activity. Furthermore, some studies have demonstrated the importance of plant CLPs because they are also involved in different regulatory activities; for instance, in *Arabidopsis thaliana* and rice (*Oryza sativa*), these proteins bind emerging cellulose microfibrils affecting their crystallinity [16,17]. In addition, *A. thaliana* chitinase-like lectins (CLL) affect root architecture [18], while in banana (*Musa acuminata*) some CLPs may serve as storage proteins [19]. More recently, two CLPs in oil palm (*Elaeis guineensis*) [20]

and a CLL in tamarind (*Tamarindus indica*) have been reported. The *T. indica* CLL presents sequence and structural similarities to members of the GH18 family but it has a binding site that differs from the ones observed in members of this family [21], while the oil palm CLPs are PRPs [22]. Plant CLPs also show antifungal and insecticidal activity, probably from their ability to inhibit fungal glycoside hydrolases such as the xylanases or by other mechanisms [6,22].

A high prevalence of catalytically inactive enzyme homologues has been reported in a myriad of genome sequences during the past decade, and it has been shown that these ‘dead’ enzymes give rise to proteins with regulatory functions [23]. Given the great diversity of proteins that hydrolyze or simply bind chitin or its oligomers, it has been proposed that chitinases are good examples of gene evolution, which could be related to gene duplication preceding the acquisition of a new function or to acquisition of minor side activities before the gene duplication [24]. Such non-enzymatic side activities have frequently been documented for plant and mammalian chitinases, where the selective pressure to prevent mutations at the active site of the enzyme could be absent.

Higher plants, such as the rubber tree (*Hevea brasiliensis*), express several chitinases, primarily in the course of defense responses to pathogens [25]. Notably, some of these enzymes are allergens that are responsible for the cross-reactivity in humans that results in pollen-latex-fruit syndrome [26,27], and these include two putative class I chitinase isoforms. These two isoforms were cloned and expressed as fusion proteins with the maltose-binding protein [28,29], and they were classified as the allergens Hev b 11.0101 and Hev b 11.0102 belonging to the pathogenesis-related protein-3 (PRP-3) family and to the class I chitinases of the GH19 family. Nevertheless, in those works, the complete fusion proteins were used for immunological assays, and their activity was only evaluated by limited experiments of fungal growth inhibition. Recently, the draft genome of *H. brasiliensis* was published [25], and it showed the existence of 11 class I chitinase genes related to human allergic responses; however, no CLP gene sequences were analyzed.

This is the first report of a structural and biochemical characterization of two recombinant CLPs of the GH19 family that are present in the rubber tree *H. brasiliensis*. The crystal structures of the individual CBD and the inactive CatD of one isoform, designated HbCLP1, were determined at high resolution. Analysis of our crystallographic models and docking experiments using the structures of the domains and GlcNAc

oligosaccharides provide evidence of the residues involved in sugar binding. Endochitinase activity was restored in both proteins by mutating residues A117E (HbCLP1) and A147E (HbCLP2). Interestingly, we found a new isoform (HbCLP2), with a longer CBD not previously described, which exhibits high affinity for chitotriose. We also demonstrate that HbCLP1 and HbCLP2 exhibit antifungal activity against *Alternaria alternata*.

Results and Discussion

Cloning, expression and purification of the HbCLPs

In previous studies, two recombinant chitinase isoforms from the latex and leaves of *H. brasiliensis* were reported [28,29], yet neither of these sequences was found in the recently published draft genome of this tree [25]. In the course of our experiments, fragments of two sizes, designated chi-L1 and chi-L2 (888 and 978 bp, respectively; Fig. 1A), were isolated from total RNA collected from the leaves and latex of two different clones of *H. brasiliensis* (GV-42 and RIMM-600). We found that these transcripts were present in different proportions depending on the collection season (Fig. 1B).

Rubber trees, which belong to one of the most economically important members of the genus *Hevea*, suffer stress when they are tapped and consequently exposed to pathogens and insects. Therefore they express several defense-related proteins that include chitinases and CLPs, and other proteins that could also be involved in different events such as cell division or flower development [30]. In any case, multiple isoforms of either chitinases or CLPs with different functions and characteristics can be expressed under these conditions [1–3].

As shown in Fig. 1C, HbCLP1 contains one hevein-like CBD and one CatD, which are separated by a linker of 10 residues rich in glycine, as has already been reported for plant class I chitinases [31]. Interestingly, HbCLP2 also contains two domains; however, the CBD is longer, as it exhibits the original CBD (Glu1–Val43), a first linker (Glu44–Gly53) plus a peptide that corresponds to the second half of this domain (Cys54–Val73) and a second linker of the same size (Gly74–Gly83; Fig. 1C). To characterize these proteins, in this work we overexpressed and purified both HbCLPs and their respective domains (Fig. 2).

When we analyzed the amino acid sequence alignment of our recombinant proteins (HbCLPs) with the two sequences previously reported [28,29], we found

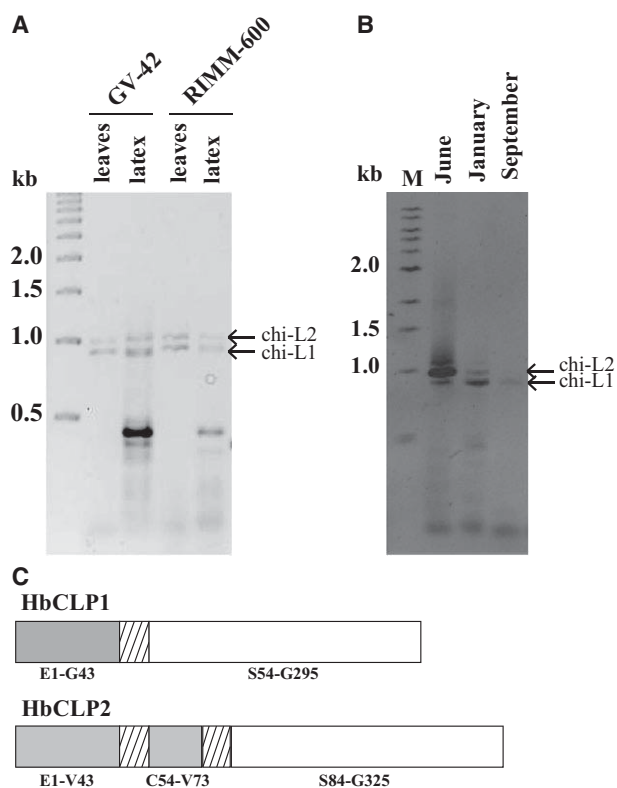


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of the PCR products of HbCLPs using specific oligonucleotides. (A) chi-L1 (888 bp) and chi-L2 (978 bp) from leaves and latex of *H. brasiliensis* trees (clones GV-42 and RIMM600). (B) Amplification of transcripts using total latex RNA collected in different seasons of the year. (C) Diagrams of the different domains present in HbCLP1 and HbCLP2: grey, the chitin-binding domain; diagonal lines, the linkers; white, the catalytic domain. Numbers of residues in each domain are marked.

that they are very similar (Fig. 3). HbCLP1 showed an identical sequence with one of the allergens previously reported as Hev b 11.0101 [28] and displayed 97% identity with Hev b 11.0102 [29]. If only the catalytic domains of the HbCLPs are compared, there are three residues that differ, two along the groove and a third at the end of α -helix 10 (Fig. 3). Intriguingly, no sequences identical to the HbCLP2 or to its longer CBD were found in any database examined; we can therefore say that this type of CBD has not been previously reported. Nevertheless, HbCLP2 exhibits 99% identity with the allergen Hev b 11.0102 when residues Cys54–Gly83 are removed from the analysis (Fig. 3). HbCLP2 is the first protein reported to have one and a half CBDs, a unique characteristic.

The recently published draft genome of *H. brasiliensis* only spans ~50% of the estimated 2.15 gigabase haploid genome [25]. Furthermore, the authors focused on the key genes associated with rubber biosynthesis,

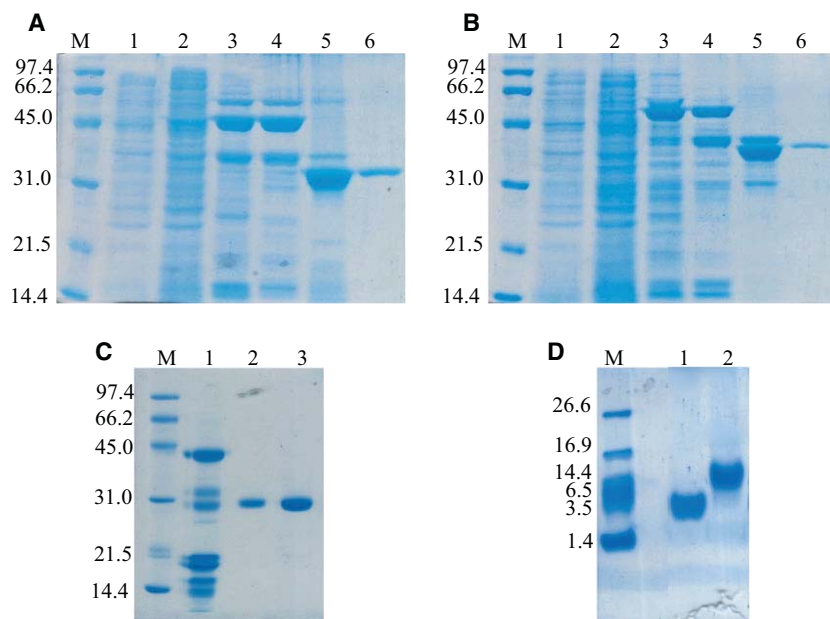


Fig. 2. SDS/PAGE showing the purification steps of HbCLPs and their respective domains. (A) HbCLP1, (B) HbCLP2. Lane M, molecular-weight size markers (kDa); lanes 1 and 2, protein extracts before and after the induction with IPTG, respectively; lanes 3 and 4, bound protein in the affinity chromatographies (nickel); lane 5, elute of the fusion protein from the nickel affinity column after cutting with enterokinase; lane 6, pure proteins after anion exchange chromatography. (C) Catalytic domains: lane 1, fusion protein before cutting with enterokinase; lane 2, CatD1; lane 3, CatD2. (D) Chitin-binding domains after the purification protocol described in Materials and methods: lane 1, CBD1; lane 2, CBD2.

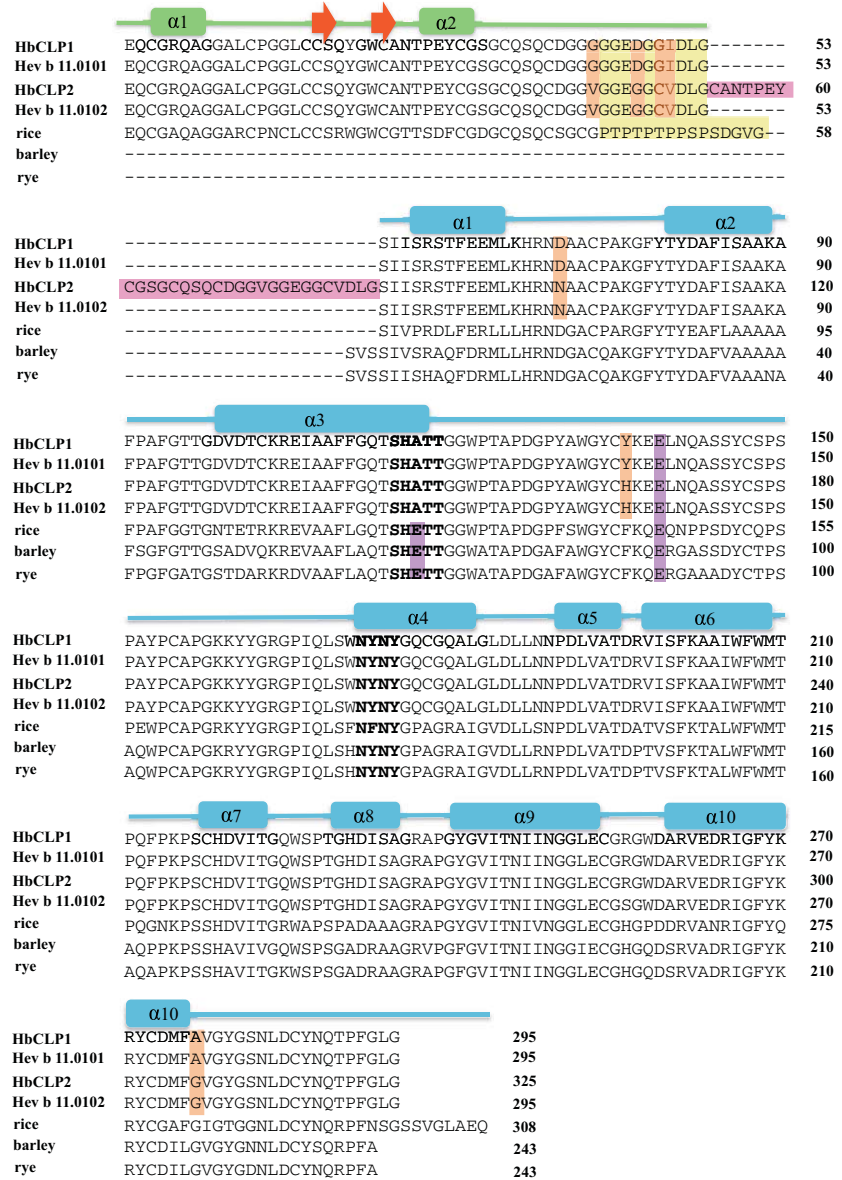
rubberwood formation, disease resistance and allergenicity. Among the genes reported for class I chitinases, we only detected one sequence that was identical to the HbCLP2 sequence, named HBM_contig1331506_s434174c2 gene1 [25]. We therefore cloned the isoforms HbCLP1 and HbCLP2 from genomic DNA and verified that both genes exhibited the two characteristic introns of plant class I chitinases, thus suggesting that different genes encode each isoform in *H. brasiliensis* (Fig. 4). The first intron is localized after the consensus sequence SHATTG, whereas the second intron occurs before the conserved NYNY motif (Fig. 3), as described for class I chitinases from other plants [32].

An interesting result in this work is the inclusion of the N-terminal signal peptide, determined by means of RACE assays (Fig. 4), which had not been previously reported. Comparison of the cDNA-derived amino acid sequence with the N-terminal sequence of the mature CLPs demonstrated that the primary translation product has an amino acid signal peptide, which is removed post-translationally. Furthermore, we found evidence that these proteins are not vacuolar, because the C-terminal sequence did not contain the vacuolar signal peptide or vacuolar sorting determinant characteristic of class I chitinases. This result was confirmed by western blots using lutoids (vacuolysosomal particles) isolated from *H. brasiliensis* latex and specific polyclonal antiCLP-IgG antibodies that gave negative results, in contradiction with previous studies that indicated that one of these isoforms was vacuolar [28].

Overall structure of the HbCLP1 domains

Good quality crystals were obtained only when the individual domains of HbCLP1 were cloned and expressed separately. The complete proteins, alone or in the presence of GlcNAc oligosaccharides, produced crystalline precipitates and microcrystals, which were either not suitable for diffraction experiments or diffracted very poorly.

The overall structure of the CBD1, determined at a resolution of 1.6 Å, comprises 45 amino acids (–1Ala, –2Met, Glu1–Gly43) that exhibit the characteristic folding of hevein-like domains [33]. The crystal contained two molecules in the asymmetric unit with a Matthews coefficient (V_M) of 2.23 Å³·Da^{–1} and 45% solvent content. The final model has R_{factor} and R_{free} values of 17.86% and 21.78%, respectively (Table 1). This structure includes a short antiparallel β sheet, conformed by two β-strands of four residues each, connected by a β turn (β hairpin), and two short segments of α-helix comprising residues Cys3–Gly8 and Thr27–Gly32 (Fig. 5A). The four disulfide bonds are conserved (Cys3/Cys18, Cys12/Cys24, Cys17/Cys31 and Cys35/Cys39). The residues involved in chitin binding are also conserved and include Ser19 and the three aromatic residues Tyr21, Trp23 and Tyr30 (Fig. 5A), which are identical to those present in other hevein-like domains such as hevein (Trp21, Trp23 and Tyr30), pseudohevein (Tyr21, Trp23 and Tyr30) [34], whose structure has not been reported, and chain B of wheat germ agglutinin, which has three Tyr residues in the binding site (Fig. 5B) [35]. It was interesting to



find a 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid (MES) molecule near Trp23 of chain A and the symmetry related B chain in a position that mimics the GlcNAc oligosaccharide interaction with the protein [36]. The MES molecule, located in the carbohydrate-binding site, interacts with the –1Met residue and Trp23. We previously found a 2-methyl-2,4-pentanediol molecule at the carbohydrate-binding site in the hevein structure, which indicates that this domain can bind other molecules in addition to the GlcNAc oligosaccharides [33].

The crystal structure of the 242-residue CatD1 (Ser4–Gly295) was determined at 1.93 Å resolution. Two monomers were found in the asymmetric unit

with a V_M of $2.29 \text{ \AA}^3 \cdot \text{Da}^{-1}$, which corresponds to a solvent content of 46.2%. At this point it is important to mention that the interface of the two monomers in both asymmetric units (CBD1 and CatD1) scored 0.0 in complexation significance score in PISA [37], indicating that the interface for dimer formation is not significant in any case (a score of 1 suggests a stable interface and a score of 0 suggests a nonstable interface, i.e. crystal packing). The CatD1 model was refined to final R_{factor} and R_{free} values of 16.77% and 20.69%, respectively. The refinement and final model statistics are summarized in Table 1. The overall CatD1 structure comprises 10 α -helices connected by five main loops (I, II, III, IV and V), which are the


```

HbCLP2 MKEIVRALEGYPPKDKAA20EQCGRQAGGALCPGGLCCSQY40GW60CANTPEYCGSGCQSQCDG
HbCLP1 MKEIVRALEGYPPKDKAA20EQCGRQAGGALCPGGLCCSQY40GW60CANTPEYCGSGCQSQCDG

HbCLP2 GVGGEGGCVDLGCANTPEYCGSGCQSQCDG80GVGGEGGCVDLGSII100SRSTFEEMLKHRNNA120
HbCLP1 GGGGEDGGIDL80-----100-----120-----SISRSTFEEMLKHRNDA

HbCLP2 ACPAKGFYTYDAFISAAKAFPAFGTGDVDTCKREIAAFFGQ140TS160HATTGctttggttttattac
HbCLP1 ACPAKGFYTYDAFISAAKAFPAFGTGDVDTCKREIAAFFGQ140TS160HATTGctttggttttattcac

HbCLP2 ccctctctttctcatttt180--gagggtttgttttgattaaaactcatttagaactcctaactccaaatctcattgtttta
HbCLP1 ccctctctttctcatttagagggtttgttttgattaaaactcatttagaactcctaactccaaatctcattgtttta

HbCLP2 aaggctactcaaatattattgggtaaaaactcattaattaattaattagctttaattaattaagattaatcaccttaa
HbCLP1 aaggctactcaaatattattgggtaaaaactcattaattaattaattagctttaattaattaagattaatcaccttaa

HbCLP2 ttagtatataaataagtagttaa180ttgagaaattgtgttggtgatgactgtagga180GWFTAPDGPYAWGYCHKE
HbCLP1 ttagtatataaataagtagttaa180ttgagaaattgtgttggtgatgactgtagga180GWFTAPDGPYAWGYCYKE

HbCLP2 ELNQASSYCSPPAYPCAPGKYYGRGPIQLSW200tacgttttctttggcagcataa220ttttgatttaagc
HbCLP1 ELNQASSYCSPPAYPCAPGKYYGRGPIQLSW200tacgttttctttggcagcataa220ttttgatttaagc

HbCLP2 acataaattttttattataataaaaaaaattgaattaattctgcaaatgtaatttaagccatgctgatataa
HbCLP1 acataaattttttattataataaaaaaaattgaattaattctgcaaatgtaatttaagccatgctgatataa

HbCLP2 ttttttttgttaattatataatataatataaatgatgcagg240N240YNYGQCQALGLD240LLNPD240LVATDRVISF
HbCLP1 ttttttttgttaattatataatataatataaatgatgcagg240N240YNYGQCQALGLD240LLNPD240LVATDRVISF

HbCLP2 KAAIWFWMTPTFPFKP260SC280HDVITGQWSPTGHDISAGR300APGYGVITNIINGGLE300CGRWDAR
HbCLP1 KAAIWFWMTPTFPFKP260SC280HDVITGQWSPTGHDISAGR300APGYGVITNIINGGLE300CGRWDAR

HbCLP2 VEDRIGFYKRYCDM320FV340GVGYSNLD340CYNQTPF340FGLG
HbCLP1 VEDRIGFYKRYCDM320FV340GVGYSNLD340CYNQTPF340FGLG

```

Fig. 4. Sequence alignment of the two HbCLPs. The amino acid sequences (exons) are represented in capital letters, bold letters indicate the nucleotides corresponding to the introns and the signal peptides are marked in rectangles.

most prominent features of the class I and II GH19 family of chitinases (Fig. 5C). The numbering refers to the complete polypeptide chain, including the CBD1 and the linker at the N-terminal region; therefore the first residue in this domain is numbered Ser54 (Fig. 3). This monomer also exhibits three conserved disulfide bridges: Cys73/Cys135, Cys147/Cys155 and Cys254/Cys286 (Fig. 5C). Finally, the structure shows the characteristic groove responsible for chitin binding that includes loops II, III and IV and helices 3, 4, 6, 9 and 10 [38]. A C α superposition of the two monomers in the asymmetric unit indicates an rmsd of 0.6 Å, with loop III being the one that shows the largest difference.

The C α structural alignments of the different class I and II (GH19) catalytic domains in plant chitinases with the CatD (chain A) of HbCLP1 revealed that these proteins share a relatively high degree of similarity (Fig. 5D). The closest structural models are from barley class II chitinase (PDB ID [1CNS](#)) with an rmsd of 0.9 Å, rice class I chitinase (PDB ID [2DKV](#), rmsd 1.0 Å), mustard (*Brassica juncea*) class I chitinase (PDB ID [2Z38](#), rmsd 1.0 Å), papaya class II chitinase (PDB ID [3CQL](#), rmsd 1.0 Å) and rye class II chitinase (PDB ID [4DWX](#), rmsd 1.2 Å; PDB ID [4DYG](#), rmsd 1.2 Å; and PDB ID [4J0L](#), rmsd 0.9 Å), which was crystallized alone and in complex with one and two molecules of *N*-acetyl tetraose (GlcNAc)₄, respectively [39,40].

In all the structures, loops I and III are stabilized by disulfide bonds. The most significant differences were observed in the longest loop (III), which comprises 53

residues (Thr118–Trp171, HbCLP1 numbering) and is located between α -helices 3 and 4 (Fig. 5C). This loop adopts various conformations, as has been observed among the different plant chitinases. In addition, it contains one of the catalytic amino acids (Glu89 in barley chitinase and Glu139 in the CatD1; Figs 3 and 5C), which suggests the direct participation of this region in the binding and catalysis of the substrate. Loop III is generally conserved in chitinases of the GH19 family, while loops I, II, IV and V may be absent in bacterial and plant class IV chitinases [41–43]. Based on structural studies of mustard class I chitinase and rye class II chitinase, it has been proposed that the differences in conformation of some of the loops bordering the active-site groove indicate an opening and closing of the enzyme during the catalytic cycle [40]. Structural alignment of loop III, including 20 residues in each end, demonstrated that even though CatD1 was crystallized in the absence of ligands the loop III is in a closer conformation to the one present in the rye structure with bound ligands in the groove [40] (Fig. 5D) (rmsd 0.69 Å), while the rmsd is 1.0 Å when compared with the structure of the rye chitinase without ligand [39]. Loops IV and V showed similar displacements (Fig. 5D) revealing conformational plasticity in the binding region.

Chitinase activity

Even though HbCLP1 was originally classified as a class I chitinase [28], neither of the two proteins studied in this work showed catalytic activity using

Table 1. Data collection and refinement statistics. Data in parentheses refer to the highest-resolution shell.

	CatD	CBD
Data collection		
Space group	<i>I</i> 21	<i>P</i> 6 ₁
Cell dimensions (Å)	111.11, 40.41, 111.85	38.51, 38.51, 100.93
β (°)	96.73	
Wavelength	1.0	0.979
Resolution (Å)	41.71–1.93 (2.03–1.93)	33.64–1.60 (1.68–1.60)
No. unique reflections	37 433 (5195)	11 080 (1055)
Completeness (%)	99.30 (95.60)	99.47 (96.26)
Redundancy	4.7 (4.0)	3.5 (2.7)
$I/\sigma(I)$	14.9 (4.4)	21.1 (4.9)
R_{merge}^a (%)	8.8 (51.9)	3.7 (21.6)
Refinement statistics		
Resolution range (Å)	41.66–1.93 (2.0–1.93)	33.35–1.60 (1.66–1.60)
$R_{\text{factor}}^b/R_{\text{free}}^c$ (%)	16.77/20.69	17.86/21.78
No. atoms		
Protein	3749	621
Water	316	86
Ligand molecules		2
Metal ions (Cl ⁻)	2	
rmsd bond length (Å)	0.011	0.016
rmsd bond angles (°)	1.11	1.78
Mean <i>B</i> -factor (Å ²)		
Protein	22.6	18.9
Ligand/ion	25.7	30.7
Water	28.5	28.9
Ramachandran		
favoured/outliers (%)	98/0.4	94/0
PDB code	4MST	4MPI

^a $R_{\text{merge}} = \sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle| / \sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)$, where $\langle I(hkl) \rangle$ and $I_i(hkl)$ are the mean and the *i*th measurement of intensity respectively for reflection *hkl*. ^b $R_{\text{work}} = \sum_{hkl} | |F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}| | / \sum_{hkl} |F_{\text{obs}}|$. ^c R_{free} is the corresponding *R*-factor value for a randomly chosen 5% of the reflections excluded from the refinement.

substrates such as chitin azure, chitin beads, glycol chitin and shrimp chitin. As previously described for several inverting chitinases belonging to the GH19 family, the catalytic residues are located in a relatively wide groove. This groove contains two conserved residues that are directly responsible for chitin hydrolysis: a proton donor Glu67 and a nucleophile base Glu89 (barley chitinase). These correspond to Ala117 and Glu139 in HbCLP1 and Ala147 and Glu169 in HbCLP2 (Fig. 6A), indicating that one of the catalytic residues is missing in both HbCLPs. Chitinases belonging to the GH19 family exhibit the highly conserved QTSHETTGGW motif (Fig. 3); however, it has been reported that a substitution of the Glu residue with an alanine or glutamine, for example, results in

the loss of catalytic activity [44–46]. This lack of activity has been observed in CLPs from plants in which different functions have been detected such as cellulose synthesis [47] or receptor-like kinase activity [48], among others.

Mutating residues A117E and A147E, respectively, restored the enzymatic activity of HbCLP1 and HbCLP2. Using chitin azure as a substrate, the specific activity of HbCLP1-A117E was $17.9 \pm 2.3 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ at pH 4.0, while for HbCLP2-A147E it was $12.9 \pm 1.0 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ at pH 5.0 (Table 2). The specific activity of HbCLP1-A117E at pH 8.0 was approximately three times lower than that at pH 4.0, whereas for HbCLP2-A147E we found no significant differences in the specific activity at the three different pH values examined (Table 2). Residues Asp70 and Tyr136 in HbCLP1-A117E and Asn100 and His166 in HbCLP2-A147E occupy the same positions along the groove in their respective CatDs, if we consider that CatD2 has the same structure as CatD1. Then by using PROPKA [49], which predicts the pK_a value for the ionizable residues and the *in silico* mutation Tyr136 by His166 in our CatD1 structure, we found that the pK_a value for His166 is ~ 6.8 . This means that this residue is very probably protonated at pH values 4 and 5, where we found differences in specific activities, and neutral at pH 8.0, where the activities were similar. In contrast, the Tyr residue that substitutes His in the HbCLP1-A117E does not vary its protonation state with pH. Moreover, when the His166 is present there is an extensive positive charge along the binding groove, probably provoking repulsion between its boundaries, which could explain the differences in activity with HbCLP2-A147E.

Recently, the crystal structure of a class IV chitinase from corn (*Zea mays*) that lacks the CBD provided evidence of the participation of residues Gln62, Arg177 and Glu165 in chitin hydrolysis and of Ser103 and Tyr106 in substrate binding; however, class IV chitinases have evolved to accommodate shorter substrates [42]. Compared with the chitinases of classes I, II and IV [39,41–43], our CatDs exhibit all of the residues that have been implicated in catalysis, thereby allowing our mutants HbCLP1-A117E and HbCLP2-A147E to recover their chitinolytic activity.

Carbohydrate-binding sites of the catalytic domain

Despite the absence of catalytic activity, the volume of the groove present in the CatD1 (1101.2 \AA^3) is similar to that present in the active barley chitinase (1100.7 \AA^3 ; PDB ID [1CNS](#)), which indicates an

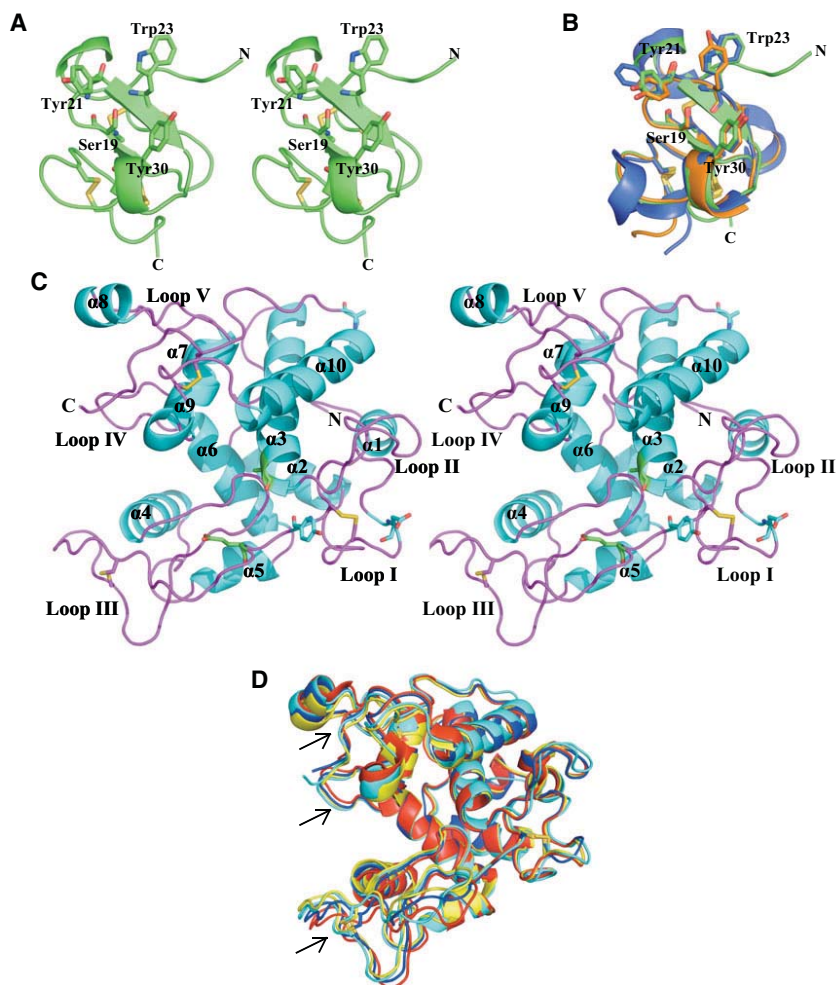


Fig. 5. Overall structures of HbCLP1 domains. (A) Stereo view of the ribbon representation of the CBD1 monomer that shows the conserved residues involved in chitin binding as sticks and disulfide bridges in yellow. (B) C α superposition of CBD1 (green) with hevein (PDB ID [1Q9B](#)) colored in dark blue and wheat germ agglutinin monomer B (orange); also protein residues involved in sugar recognition are represented as sticks. (C) Stereo view of the ribbon diagram showing the CatD1 structure that consists of 10 α -helices, five main loops (I–V) and three conserved disulfide bridges; there are also several β -turns, five of which are located in loop III. The green sticks represent the position of the putative catalytic amino acids and cyan sticks the amino acids that are different between two HbCLPs. (D) C α superposition of CatD (cyan) with active plant chitinases: rye chitinase (red) (PDB ID [4DWX](#)), rye chitinase with two molecules of (GlcNAc)₄ (yellow) (PDB ID [4JOL](#)) and barley chitinase (blue) (PDB ID [1CNS](#)). Major conformational differences are localized in loops III, IV and V, which are indicated with arrows.

appropriate space for the arrangement of a ligand in our protein (Fig. 6B). To provide insight on the ability of the CLPs of *H. brasiliensis* to recognize oligosaccharides, we performed docking simulations to investigate the possible binding interactions of (GlcNAc)₆ with the CatD1. The first five solutions of lower energy were selected and analyzed considering the previously reported experiments on the amino acids involved in interactions with the substrates or products of active chitinases belonging to the GH19 family, as there are no reported structures of CLPs in this family [38,40]. Figure 6C illustrates the network of interactions of the CatD1 with (GlcNAc)₆ when the ligand was positioned throughout the groove in subsites –4 to +2 [40].

Interestingly, one feature observed in our docking model, as well as in other crystallographic reports of chitinases [38,40], is a wide distribution of aromatic residues along the carbohydrate-binding groove that are able to recognize the ligand through different types

of interactions. An interesting one is Trp171, which is located in loop III and interacts with residues –3 and –2 of (GlcNAc)₆, while in other class I and II plant chitinases this residue is replaced by a His or Phe [40,50]. In the CatD1 structure this Trp171 falls outside of the allowed regions of the Ramachandran plot, suggesting its participation in the interaction with the ligand (Fig. 6D) [51].

Another residue that appears to be important for ligand binding is Tyr173 (Fig. 7), whose OH group interacts with the amide group of both the –3 and –2 GlcNAc residues of the hexamer. Other residues involved in carbohydrate recognition are His116, Tyr146 and Phe207, which are strictly conserved and have been described as important for chitin specificity [45,50]. This is not the case for Trp171, which is only present in ~12% of the available sequences. One insight that emerges from our docking analysis is that interactions between the CatD1 and (GlcNAc)₆, primarily at subsites –4 to –2, involve residues located

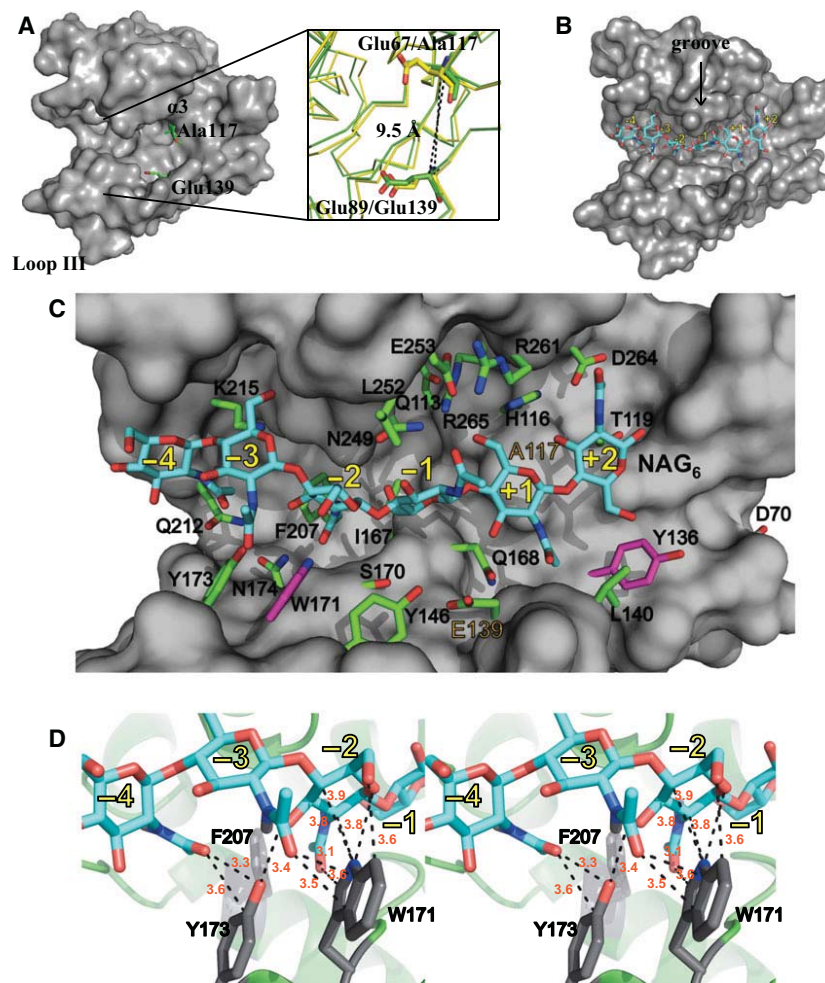


Fig. 6. Surface representation of the CatD1 showing the binding groove. (A) The position of the putative catalytic residues is depicted in green (HbCLP1); the proton donor that should be a Glu residue is an Ala117. In the square is shown a detailed view of the catalytic residues in barley chitinase (yellow) superimposed with the CatD1 structure (green). The distance between the two catalytic residues in active chitinases is 9.5 Å (C α). (B) Docking of (GlcNAc)₆ (blue sticks) in the CatD1 groove. (C) Close-up view of the CatD1 residues involved in the interaction with (GlcNAc)₆. (D) Stereo view of the interactions of the -4 to -2 moieties of (GlcNAc)₆ in the CatD1 binding site. The figure was generated from the docking model. Protein residues making interaction with the ligand are shown as sticks with carbon atoms in grey; the ligand is also depicted as sticks with carbon atoms in cyan, oxygen and nitrogen atoms in red and blue, respectively, for protein and ligand. Interactions are shown as dashed black lines and distances are depicted in Å.

Table 2. Specific activities of HbCLP mutants over chitin azure. Results are the mean value \pm SD from three independent experiments.

	pH 4.0 (U·mg ⁻¹)	pH 5.0 (U·mg ⁻¹)	pH 8.0 (U·mg ⁻¹)
HbCLP1	0.3 \pm 0.2	0.2 \pm 0.1	0.3 \pm 0.1
HbCLP1-A117E	17.9 \pm 2.3	14.6 \pm 1.4	6.7 \pm 0.4
HbCLP2	0.4 \pm 0.2	0.2 \pm 0.1	0.3 \pm 0.2
HbCLP2-A147E	10.6 \pm 1.3	12.9 \pm 1.0	8.0 \pm 0.6

in loop III: Tyr146, Gln168, Ser170, Trp171, Tyr173 and Asn174, the last two being highly conserved in GH19 family members. These residues are conserved between catalytically active chitinases [40,50] and the HbCLPs; nonetheless, there are differences between them, such as the absence of interactions between subsites -1 to +2 with some of the amino acids near Ala117 (His116, Thr119, Gly120 and Trp122) and the polar and apolar interactions of the aromatic residues

(Trp171, Tyr173 and Phe207) present at subsites -4 to -2 (Fig. 6D). Conversely, catalytically active chitinases exhibit weaker interactions in this region or interactions mediated by water molecules [38,43]. Some of the waters in the groove observed in our crystallographic CatD1 structure were included to compare with those present in other chitinase-carbohydrate complexes, and two of them appear to be important, W438 and W511 (Fig. 7). While W438 is conserved in the different chitinases and located in a proper position for the hydrolysis step, W511 occupies a plausible position for the carboxyl group of one of the catalytic Glu residues, which in this case is Ala117, participating in the interaction of Arg265 with position -1 of the carbohydrate. In the (GlcNAc)₆-CatD1 model, GlcNAc moieties in subsites -4 to +1 interact with the protein through multiple polar and non-polar contacts (Fig. 6C). In addition, seven polar contacts mediated by eight different water molecules were observed, as shown in a LIGPLOT+ figure (Fig. 7).

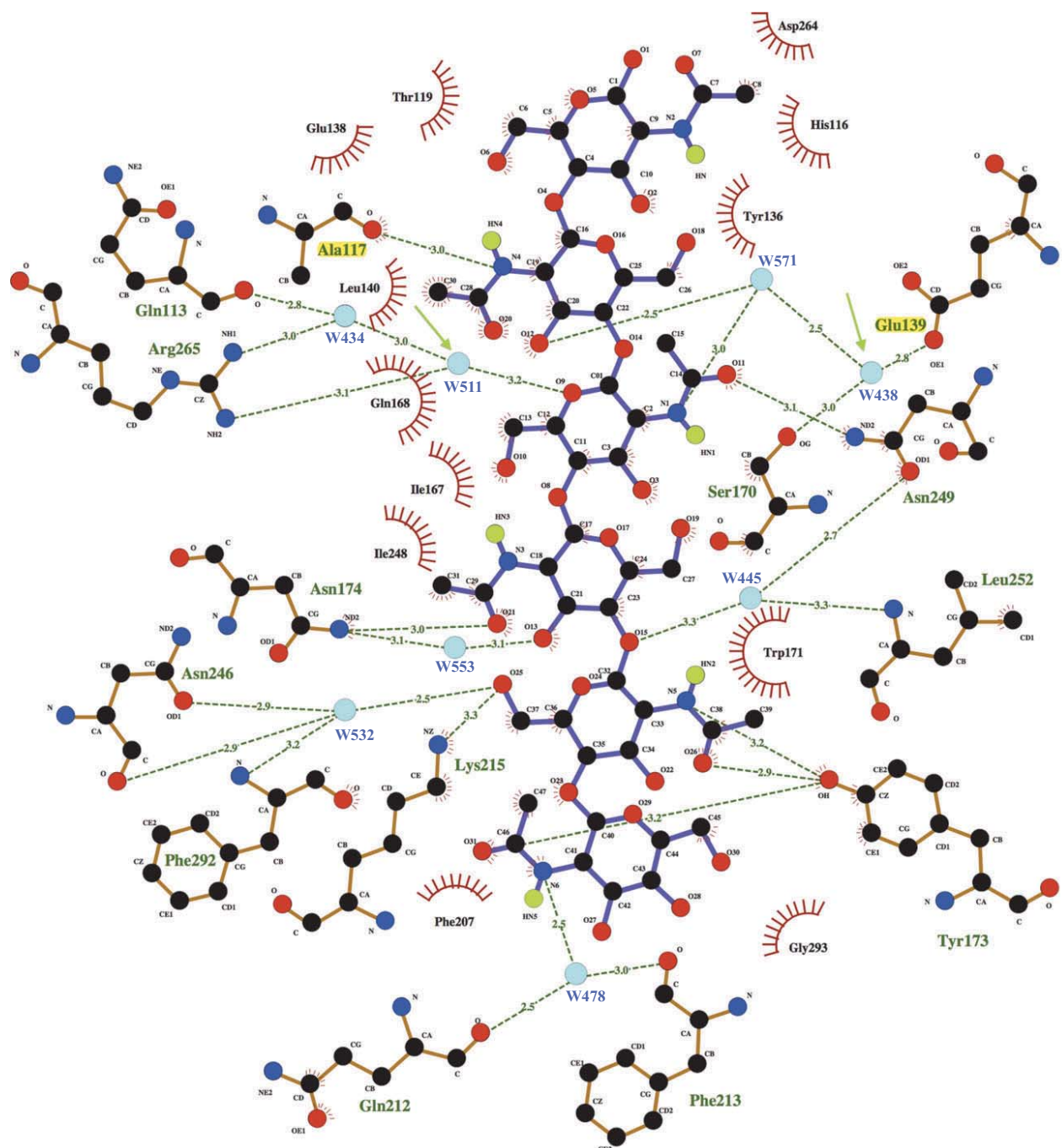


Fig. 7. *In silico* docking results of CatD1 residues interacting with (GlcNAc)₆. The atoms involved in hydrogen bonds (dashed lines) or hydrophobic contacts are depicted. In yellow the two putative catalytic residues are shown, for CLPs the mutated Glu117Ala occupying the position of the Glu proton donor and Glu139, which is the nucleophile base. Arrows show important water molecules that could be involved in the catalytic mechanism (W438 and W511). GlnNAc upper position corresponds to +2. The diagram was generated with the program LIGPLOT+.

It is also noteworthy that a *cis* peptide occurs between Phe213 and Pro214 in loop IV. *Cis* peptides have been associated with structural or functional features, suggesting that Phe213 is also involved in

binding of the substrate (Fig. 7). It has been found that unusual geometry in well-defined regions of electron density most likely signifies an interesting hot spot in the structure (with unusual high-energy

conformations) that could be involved in binding of the substrate [52].

Binding experiments between the HbCLPs and *N*-acetyl-chitotriose [(GlcNAc)₃]

The binding affinities of HbCLP1, HbCLP2 and their respective individual domains (CatDs and CBDs) for (GlcNAc)₃ were determined by fluorescence spectroscopy experiments. Both HbCLPs have one tryptophan

residue (Trp23) located in the CBD and two tryptophan residues in the substrate-binding groove of the CatD, which are Trp122 and Trp171 in HbCLP1 (Fig. 6C) and Trp152 and Trp201 in HbCLP2. For the full-length HbCLPs the ligand produces similar changes after binding, as observed in saturation curves which exhibit an enhanced fluorescence intensity at the λ_{max} of each protein (337.1 nm for HbCLP1 and 335.8 nm for HbCLP2) (Fig. 8A). The same experiments were performed with both CatDs observing that

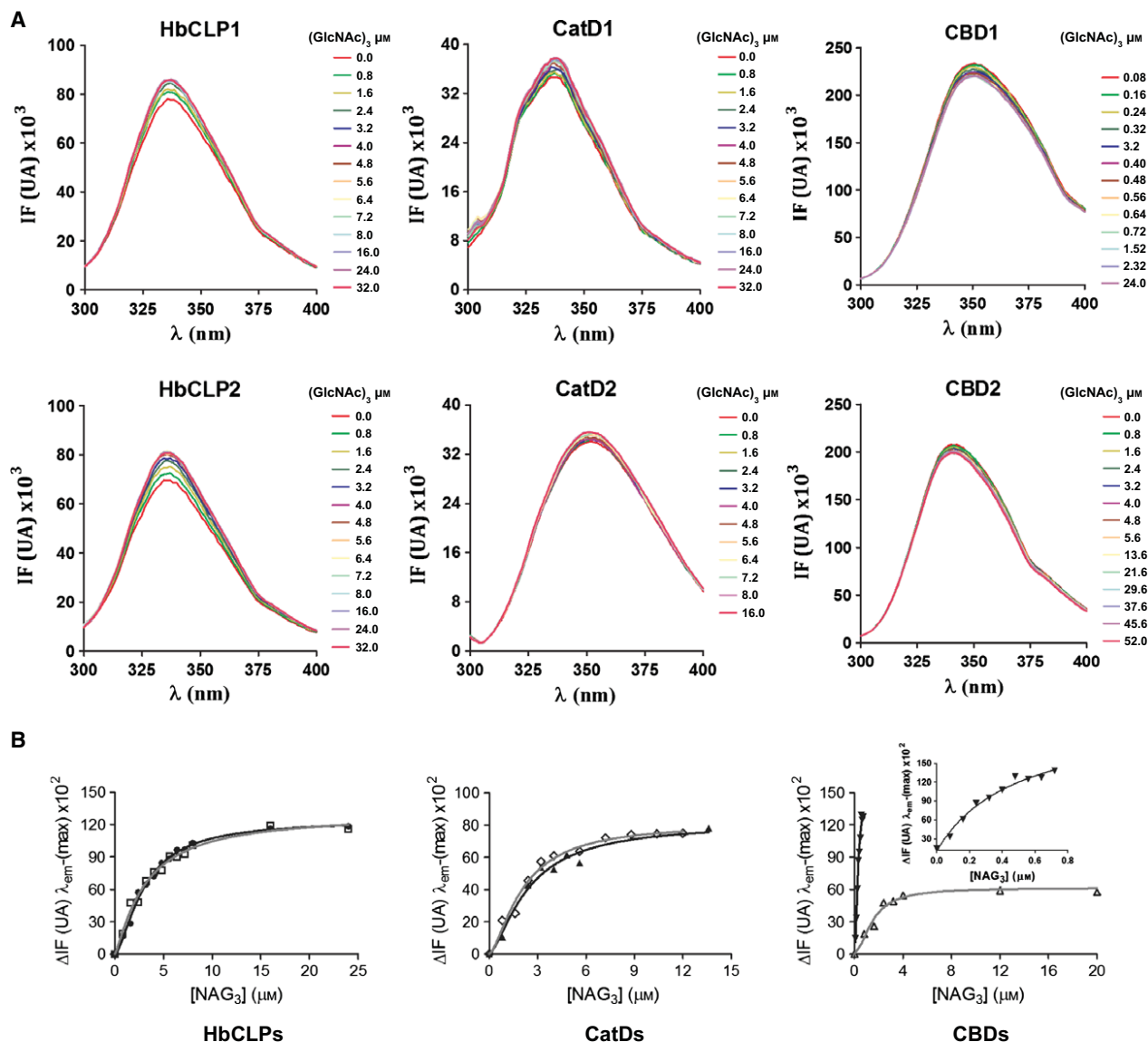


Fig. 8. Chitotriose-binding analysis of the HbCLPs and their respective domains by intrinsic fluorescence. (A) Fluorescence quenching experiments in the titration with (GlcNAc)₃. The concentration used in each experiment (μM) is indicated at the right side of each spectrum. (B) Nonlinear regression analysis of the relative fluorescence intensity changes of the HbCLPs and their domains in the presence of various concentrations of (GlcNAc)₃: HbCLP1 (●) and HbCLP2 (□); CatD1 (▲) and CatD2 (◇); CBD1 (▼) and CBD2 (Δ); the inset corresponds to the CBD1.

the binding of (GlcNAc)₃ produced an increase in the fluorescence intensity in both cases and a slight blue shift in λ_{max} (Fig. 8A). Plots of maximum fluorescence intensity change against the (GlcNAc)₃ concentration are shown in Fig. 8B. The apparent dissociation constants were estimated by a nonlinear regression function analysis of the data using Eqn (1) or (2) (see Materials and methods). The apparent K_d values of HbCLP1 and HbCLP2 for (GlcNAc)₃ were $3.0 \pm 0.13 \mu\text{M}$ and $3.1 \pm 0.33 \mu\text{M}$, respectively, whereas those for CatD1 and CatD2 were $2.4 \pm 0.41 \mu\text{M}$ and $2.1 \pm 0.24 \mu\text{M}$, respectively. Furthermore, we also determined the apparent K_d values for the CBDs that have two extra residues at the N-terminus (–2Ala and –1Met), which were $0.48 \pm 0.14 \mu\text{M}$ and $1.49 \pm 0.14 \mu\text{M}$ for CBD1 and CBD2, respectively. Notably, CBD1 exhibited higher affinity than the complete proteins or their catalytic domains, even higher than the previously reported value for hevein using ITC ($71 \mu\text{M}$) [53], fluorescence methods ($63 \mu\text{M}$ obtained in this work, results not shown) and NMR ($86 \mu\text{M}$) [54] or with pseudohevein that has the same residues in the binding region (Tyr21, Trp23 Tyr 30), which has a K_d of $142 \mu\text{M}$ as determined with NMR [54]. As mentioned above, when we analyzed the CBD1 crystal structure we found that the methionine residue at the N-terminus, which is only present in our molecular biology construction, makes contact with the MES molecule that we found in the carbohydrate-binding site, suggesting that this residue could be involved in protein–carbohydrate interaction increasing the CBD affinities. A docking model of the CBD1 with chitotriose is shown in Fig. 9, which reveals that –1Met establishes several interactions with the GlcNAc moiety at position +1. It is interesting to note that the CBD2 shows a slightly larger K_d suggesting that the 30 additional unfolded

residues could affect the interaction of the oligosaccharide with the hevein-like folded domain. In general, all these results are difficult to interpret, due to presence of two domains that bind (GlcNAc)₃ in each HbCLP. It appears that these proteins and their domains possess high affinity for this oligosaccharide, but the presence of the CBDs, which exhibit the highest value, did not increase the affinity of the complete proteins. This suggests that the two domains do not present a synergistic effect in the binding of this oligosaccharide.

Very recently, the crystal structure of a moss GH19 chitinase was determined in complex with (GlcNAc)₄, and it shows that sugar residues at subsites –2, –1, +1 and +2 interact with several amino acids in the catalytic groove through a number of hydrogen bonds [43]. However, there are no direct interactions with aromatic residues in this structure. This enzyme, which lacks the CBD, has a K_d of $230 \pm 20 \mu\text{M}$ with (GlcNAc)₃ [55], which is two orders of magnitude larger than the K_d values reported here of the complete *H. brasiliensis* proteins or their CatDs. The moss chitinase lacks loop IV, suggesting this loop is also important in the interaction with the carbohydrate.

Binding to chitin beads and antifungal activities

Even though HbCLP1 and HbCLP2 do not exhibit hydrolytic activity, they bound strongly to chitin, as neither of them eluted from the chitin-bead columns using 1 M NaCl or 1 M acetic acid. This result contrasts with data for other class I chitinases, where this type of column is often used for their purification [56]. In this work, we could only disrupt the strong interaction of the HbCLPs with the chitin beads when they were subjected to SDS/PAGE in the presence of 2-mercaptoethanol (Fig. 10A), indicating that the

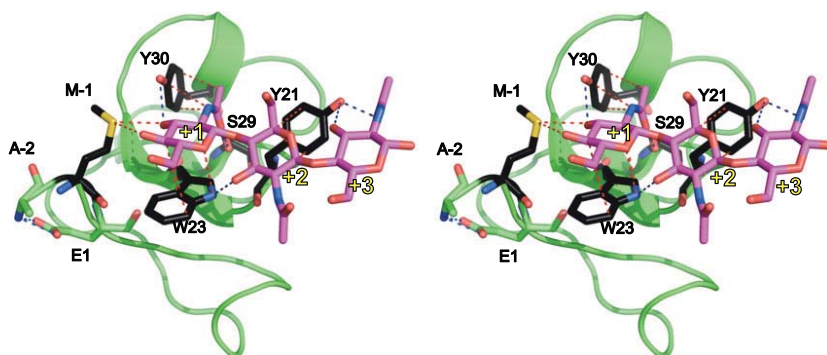


Fig. 9. Stereo view of the CBD1 binding interaction with chitotriose. Protein residues interacting with the ligand are shown as sticks with carbon atoms in black; the ligand is also depicted as stick with carbon atoms in magenta, oxygen and nitrogen atoms in red and blue, respectively, for protein and ligand. Ala-2 and Glu1 are shown as sticks. Apolar interactions are shown as dashed red lines and polar interactions are shown as dashed dark blue lines. (GlcNAc)₃ residues occupy positions +1, +2 and +3.

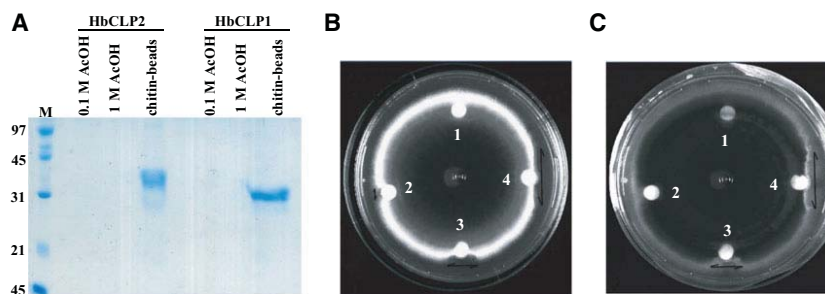


Fig. 10. Chitin-binding and antifungal activities of HbCLPs. (A) SDS/PAGE gel showing the protein bands that were separated from the chitin beads when they were applied to gel after the binding experiments. (B), (C) Plates showing fungal growth inhibition when HbCLP1 and HbCLP2 were used. In both Petri dishes well 1 corresponds to the control (Tris/HCl 50 mM); wells 2, 3 and 4 contained 25, 50 and 75 μg of each of the HbCLPs, respectively. Double arrows show the fungal growth inhibition.

interaction is broken only after denaturation of the proteins. Additionally, antifungal activity towards *A. alternata* was observed for both of the HbCLP isoforms at different concentrations, suggesting that these HbCLPs are involved in defense through a mechanism that only involves carbohydrate binding. This activity on mycelial growth is observed as crescents of inhibition at the rim of the disks containing the complete proteins (Fig. 10B,C). Plant antifungal proteins can be classified into different groups comprising chitinases and CLPs, chitin-binding proteins, lectins etc. The antifungal action of chitinases is due to the hydrolysis of chitin, a major component of fungal cell wall, which results in an impaired cell wall and subsequently brings about cell lysis [57]. Interestingly, the antifungal activity of a tobacco class I chitinase was substantially augmented in the presence of a CBD [58]. These results indicated that a large proportion of the antifungal activity of chitinases was due to chitin binding and not to chitinase activity. The inhibitory effect of chitin-binding proteins on fungal growth is ascribed to their ability to bind to chitin. Since the nascent chitin of the hyphal apex is easily accessible, chitin-binding proteins bind along fungal cell walls and accumulate at septa and hyphal tips [59]. This binding produces changes in morphology including abnormal branching, hyphal swelling and shorter hyphae [60].

Thermal stability of the HbCLPs

Plant chitinases are generally stable at relatively high temperatures ($> 60\text{ }^{\circ}\text{C}$) and also have a wide range of optimum pH values [56]. Therefore, to better understand the effect of the longer CBD on the stability of the HbCLP2, the unfolding curves of both complete proteins and their individual CatDs and CBDs were obtained by monitoring the CD signal at two different

minima: 222 nm for the complete proteins and their CatDs and 196 nm for the CBDs (Fig. 11A,B). For both HbCLPs and CatDs the unfolding transitions were irreversible. The melting temperature (T_m) for HbCLP1 was $71.4 \pm 0.3\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Fig. 11C), whereas for HbCLP2 two transitions were observed with T_m values of $65.7 \pm 1.08\text{ }^{\circ}\text{C}$ and $73.6 \pm 0.22\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Fig. 11D). Similar results were observed for the CatDs with a T_m of $68 \pm 0.14\text{ }^{\circ}\text{C}$ for CatD1 and also two transitions for CatD2 with T_m values of $60.4 \pm 0.7\text{ }^{\circ}\text{C}$ and $73.2 \pm 0.2\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Fig. 11C,D). For the CBDs of both isoforms, which exhibit a high sequence identity to hevein (68%), no transitions were detected at the temperatures used in the experiment (20–90 $^{\circ}\text{C}$). Hevein is an allergen (Hev b 6.02) that is extremely resistant to denaturation, exhibiting a T_m value of 90.1 $^{\circ}\text{C}$ at a pH of 3.6 [61]; it is therefore possible that the unfolding transition of the CBDs was not observed under the conditions used in the experiment. Finally, we also determined the T_m values of the mutants HbCLP1-A117E and HbCLP2-A147E, which were $78.3 \pm 0.12\text{ }^{\circ}\text{C}$ and $75.6 \pm 0.15\text{ }^{\circ}\text{C}$, respectively (Fig. 11C,D). These values are larger than those for the HbCLPs, thus suggesting that shifting the activity of the CLP to a hydrolase increased the T_m by several degrees. Based on our crystallographic model, Glu117 and Glu147 may be establishing ionic interactions with Arg265 and Arg295, respectively, increasing their T_m values by 7 $^{\circ}\text{C}$ and 2 $^{\circ}\text{C}$ (Fig. 12). The results suggest that the CBDs do not affect the T_m values of the complete proteins; nonetheless, the detection of more than two states in the thermal denaturation experiments is complicated to interpret. To address this we considered that both CatDs have the same structure, since there are only three different residues in CatD2 compared with CatD1 (Fig. 3). Then analyzing the CatD2-A147E *in silico* model we found evidence that Glu147

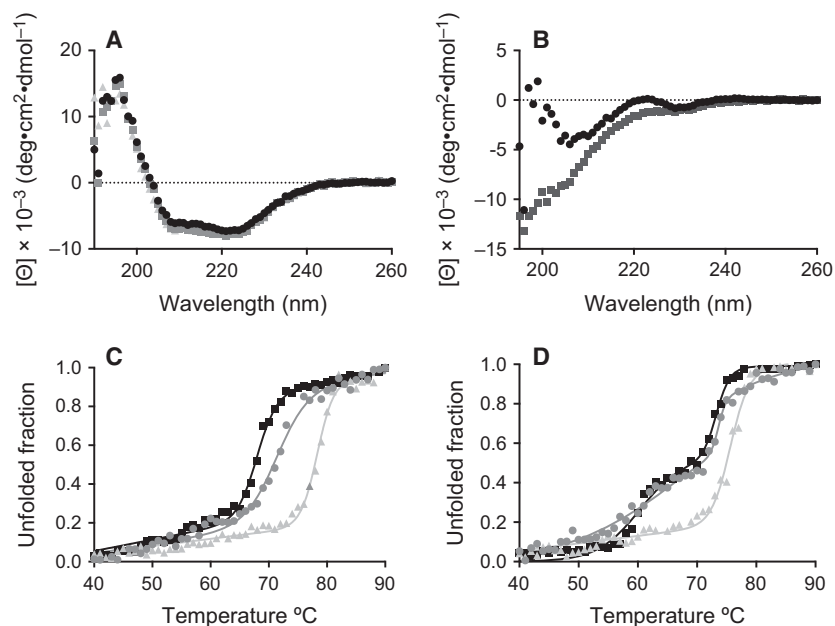


Fig. 11. Thermal denaturation profiles of the HbCLPs, their active mutants and their respective CatDs. CD spectra in the far-UV region for (A) HbCLP1-CatD (●), HbCLP1 (▲), HbCLP2 (■); (B) HbCLP1-CBD (●), HbCLP2-CBD (■). The transitions were followed using the CD signal at 222 nm. Solid lines indicate the theoretical curves obtained using a two-state transition model. (C) CatD1 (■), HbCLP1 (●) and HbCLP1-A117E (▲). (D) CatD2 (■), HbCLP2 (●) and HbCLP2-A147E (▲).

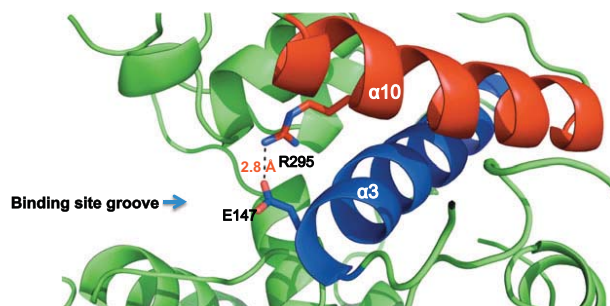


Fig. 12. Ionic interaction between Glu147 and Arg295 present in CatD2-A147E.

that is found at the C-terminus of α -helix 3 may establish an ionic interaction with R295, which is located at the N-terminus of the α -helix 10, therefore stabilizing the domain. In the native HbCLP2 this strong interaction could not exist, suggesting that less stability in the groove and perhaps more conformational states could exist (Fig. 12). Then one possibility for the existence of a three-state transition profile (two T_m values) is the pre-existence of multiple protein conformations with different stabilities and the other possibility is the appearance of an intermediate during thermal denaturation.

In summary, chitinases and CLPs have been considered to play important roles in plant defense responses [1]; nonetheless based on the literature it is far from clear to what extent they participate in these mechanisms. Chitinases and inactive chitinases, such

as CLPs, are produced by a wide variety of plants and are also involved in various physiological processes [24]. Due to their sessile nature, perennial plants such as *H. brasiliensis* are constantly exposed to a multitude of environmental stresses, in addition to the stress produced by the extraction of the latex. Therefore, proteins with diverse functions and evolutionary flexibility are likely to have adaptive value and enable plants to respond to diverse environmental challenges. Adaptive mutations such as those present in chitin-binding proteins can generate beneficial shifts in ligand recognition and/or affinity. For example, in a molecular phylogenetic study of mammalian chitinase-like members of the GH18 family, it was suggested that active chitinases with different specificities resulted from an early duplication event. Then a second duplication event followed by mutations that led to a loss of enzyme activity allowed the evolution of the CLP [24]. Similar adaptive mutations are very likely to occur in plant CLPs, such as those reported for the GH18 family that has been more widely studied [62].

In our study, two recombinant HbCLPs were cloned and expressed using the RNA from *H. brasiliensis* leaves and latex as starting materials. Both proteins are constitutively expressed in varying amounts depending on the season of tissue collection. Interestingly, a point mutation from Glu (GAA) to Ala (GCA) changed their functions from chitinases to CLPs. These HbCLPs are the first examples of naturally occurring plant CLPs belonging to the GH19 family that exhibit strong chitin and chitotriose-binding abilities. HbCLP2

has not been detected before in *H. brasiliensis* and, interestingly, its CBD is longer and exhibits one and a half hevein-like domains plus two linkers. Besides, CBD1 and CBD2 bind chitotriose with higher affinity than hevein or pseudohevein (which has the same residues at the binding site), indicating that the CBD2's N-terminal hevein-like domain is properly folded. Furthermore, the crystal structure of the CBD1 evidenced that –1Met interacts with the MES molecule at the carbohydrate-binding site suggesting that the presence of this residue increases its affinity for chitotriose significantly. Our study further showed that CatD1 has a flexible loop III, which is likely to tolerate moderate structural modifications. On the basis of this observation it was reasoned that adaptive functional diversification of the enzyme or enzyme-like protein families is achieved more often through modifications in the flexible regions than in the rigid structural elements. Modifications in the flexible regions allow for the acquisition of new functions without disrupting the native folded structures. Moreover, HbCLP1 and HbCLP2 are highly thermostable suggesting that during evolution from catalytically active proteins to CLPs they sacrificed activity for stability. Therefore, plants seem to constantly adjust their defensive status to the dynamically changing environment. Although the functions of CLPs in *H. brasiliensis* are still unknown, our studies suggest they are involved in defense mechanisms through their antifungal activity and their high affinity for oligosaccharides; nonetheless, we do not rule out the possibility that they could also be involved in other processes.

Materials and methods

Cloning, expression and purification of HbCLP1, HbCLP2 and their domains

Total RNA was isolated from the latex and young leaves of rubber trees (*H. brasiliensis*) as previously described [63]. Briefly, cDNA was synthesized, and the coding sequences of the chi-L1 (GenBank accession number [KF648872](#)) and chi-L2 (GenBank accession number [KF648873](#)) genes were amplified by PCR using the oligonucleotides CHI-a and CHI-b (all oligonucleotide sequences are detailed in Table S1). Additionally, the coding sequences for the individual CBD and CatD of both proteins (HbCLP1 and HbCLP2) were amplified using the oligonucleotide pairs CBD-a, CBD-b and CatD-a, CatD-b. To improve the cleavage efficiency of the enterokinase EkMax (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA), two residues (Ala and Met) were added at the N-terminus of CBDs. Each of the reaction products were cloned into the pET32a vector (Novagen,

EMD Biosciences, Madison, WI, USA) and sequenced (Laragen, Culver City, CA, USA). *Escherichia coli* Rosetta-gami (DE3) pLysS was transformed with each of these constructs to express the full proteins and their respective individual domains. The cells were grown in Luria–Bertani medium and incubated at 37 °C until an A_{600} of 0.4 was reached, when isopropyl 1-thio- β -D-galactopyranoside (IPTG) was added to a final concentration of 0.25 mM and the incubation temperature was lowered to 18 °C. The cells were harvested by centrifugation at 15 300 g 12 h after the addition of IPTG and resuspended in lysis buffer (50 mM Tris/HCl, pH 7.5; 300 mM NaCl; 0.5 mM dithiothreitol). The cell pellet was lysed by sonication and clarified by centrifugation at 26 000 g for 45 min.

All purification steps were the same for the complete proteins and the individual domains unless otherwise noted. The supernatants were loaded onto HisTrap columns (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA), and the fusion proteins were eluted with gradients of increasing imidazole concentration. The purified fusion proteins were subjected to enterokinase cleavage, and the HbCLPs and their domains were then purified with the HisTrap column. The complete proteins that did not bind to this column were loaded onto a Mono-Q ion exchange column (GE Healthcare) equilibrated with 50 mM Tris/HCl (pH 7.5), and the bound proteins were eluted with an increasing gradient of 1 M NaCl. SDS/PAGE and Coomassie blue staining were used to assess all purification steps. The CBDs and CatDs were pure after the second affinity step using the HisTrap column. In all cases, the protein concentration was determined using the theoretical molar extinction coefficients at 280 nm.

For production of the HbCLP1-A117E and HbCLP2-A147E mutants, site-directed mutagenesis was performed by overlap-extension PCR [64]. The oligonucleotides used to introduce the mutations were CHI/A117E-a and CHI/A117E. The mutants were successfully produced and purified using the same methodology as described for the wild-type proteins.

Genomic DNA extraction and amplification and 5' and 3' RACE

The DNA from the leaves was extracted as described by Kotchoni and Gachomo [65] and used as a PCR template. The CHI-a and CHI-b primers were used to amplify the chi-L1 and chi-L2 DNA sequences, and the PCR products were cloned into a pET32a vector for sequencing. The extracted RNA was subjected to 5' and 3' RACE using the SMART RACE cDNA Amplification Kit (Clontech Laboratories, Mountain View, CA, USA) as described in the manufacturer's instructions. For 5' and 3' RACE, two sets of primers (chi-5'-P1, chi-3'-P1 and chi-5'-P2, chi-3'-P2) were used. The RACE products were cloned into the pGEM-T Easy vector (Promega Corporation, Madison, WI, USA) and subsequently sequenced.

Chitinase and chitin-binding assays

Chitinase activity measurements were performed with the 3,5-dinitrosalicylic acid method [66] using shrimp chitin (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), chitin beads (New England BioLabs, Ontario, Canada) and colloidal chitin prepared as described by Khan *et al.* [67] as the substrates. Protein (100 µg) was added to a 250-µL suspension of chitin azure (2 mg·mL⁻¹) in acetate-citrate buffer at two acidic pH values, pH 4.0 and pH 5.0, and in Tris/HCl buffer at pH 8.0. The reaction mixtures were incubated at 37 °C for 72 h with gentle shaking, followed by centrifugation at 14 000 *g* for 5 min; the blue color that developed was measured at 575 nm. One enzyme unit was defined as a change in the optical density at 570 nm (ΔA_{570}) of 1.0 in 72 h at pH 5.0 [68].

All measurements were run in triplicate, with negative controls comprising samples without the enzymes. The chitin-binding abilities of both HbCLPs were examined using chitin-bead columns (1 mL). Each protein (50 µg in buffer A; 50 mM Tris/HCl, pH 7.5) was loaded onto the chitin-bead columns previously equilibrated with buffer A. After thoroughly washing with the buffer, successive elution buffers were used: 1 M NaCl in buffer A, 0.1 M acetic acid and 1 M acetic acid solution.

Protein crystallization

Diffraction quality crystals of the individual domains of the HbCLP1 isoform were grown using the sitting-drop vapor-diffusion method at 18 °C. For the CBD1 (11 mg·mL⁻¹) crystals grew with 0.1 M MES at pH 7.0, 1.6 M (NH₄)₂SO₄ and 4% 1,4-dioxane; for the CatD1 (7 mg·mL⁻¹) crystals grew using 0.1 M Tris/HCl at pH 8.3, 0.2 M MgCl₂ and 30% PEG 4000. CBD1 crystals diffracted to 1.6 Å resolution and belonged to space group *P61*, while CatD1 crystals diffracted to 1.95 Å resolution and belonged to the monoclinic space group *I121*, as confirmed by POINTLESS [69]. Several attempts were made to obtain suitable crystals of the complete proteins in complex with chitin oligosaccharides, without success. Thus, to analyze the interactions between the CatD1 residues and (GlcNAc)₆, docking experiments were performed as described below.

Data collection, structure determination and structure refinement

Diffraction data for the CatD1 crystal were collected on a Pilatus 6M detector at beamline PX06SA of the Swiss Light Source in Villigen, Switzerland. The CBD1 data were collected on a Pilatus 2M detector at beamline ID 29 of the European Synchrotron Radiation Facility in Grenoble, France. This CBD1 crystal was cryoprotected using a saturated Li₂SO₄ solution, whereas the CatD1 crystal required no extra cryoprotectant. All data sets were processed and

scaled using XDS [70] and SCALE, respectively, of the CCP4 suite v.6.1.2 [71]. The CBD1 hexagonal crystals had unit-cell dimensions of $a = 38.51$, $b = 38.51$, $c = 100.93$ Å, while the CatD1 monoclinic crystals had unit-cell parameters of $a = 111.11$, $b = 40.41$, $c = 111.85$ Å with a β angle of 96.73°. The statistics for both data sets are summarized in Table 1.

Both structures were solved by the molecular replacement method with PHASER in the CCP4 suite [71]. For the CBD1, the template was the structure of hevein (PDB ID [1Q9B](#)) [33], which has 68% sequence identity with the domain of interest. In this case, the solution gave a Z-score of 21.2 and a log-likelihood gain of 1334. For the CatD1, the structure of the papaya chitinase (PDB ID [3CQL](#)) [38], which has an 84% sequence identity, served as the search model. The first solution gave a Z-score of 22.8 and a log-likelihood gain of 5410. In both cases, map inspection and subsequent model building were performed with COOT [72], and the resulting models were refined with PHENIX-REFINE [73].

Structural comparisons were performed with the DALI algorithm [74]. The figures were produced using the program PYMOL [75]. The coordinates of the CatD1 and CBD1 have been deposited in the Protein Data Bank under accession codes [4MST](#) and [4MPI](#), respectively.

Docking simulation

We performed *in silico* molecular-docking experiments of the (GlcNAc)₆ oligosaccharide with our X-ray structure of the CatD1, which were generated with SMILES and minimized in CHIMERA using the web-based SWISSDOCK server [76]. The docking was performed using the default parameters without defining a binding region. We selected the best model based on the energy scores. Compatible crystallographic water molecules in the binding groove of the CatD1 were then included in the final model. The monosaccharides in (GlcNAc)₆ were named -4, -3, -2, -1 and +1, +2, beginning from the non-reducing end. We then identified and analyzed the residues potentially involved in ligand binding using the LIGPLOT+ software [77].

For the CBD, the initial complex was obtained using an alignment of the CBD1 coordinates with hevein-(GlcNAc)₃ (PDB ID [1T0W](#)) and subsequently the CBD1-(GlcNAc)₃ model was obtained after exhaustive energy minimization cycles (step-descent/conjugate-gradient) using USFC CHIMERA (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>) and the AM1-BCC force field.

Fluorescence assays

The binding affinities for (GlcNAc)₃ of both HbCLPs and each of their domains were measured by monitoring the intrinsic tryptophan fluorescence change from 300 nm to 400 nm after addition of the ligand using an Olis[®] DM45

spectrofluorometer (Olis Inc., Bogart, GA, USA). The excitation wavelength was set to 290 nm with a slit width of 5 nm, and the temperature was maintained at 25 °C using a Peltier system. Different amounts of the oligosaccharide were added to the protein solution (10 µg·µL⁻¹) in 100 mM phosphate buffer (pH 7.4) with 1 mM EDTA. Fluorescence was measured 2 min after mixing the solution with the ligand to allow for equilibration. The changes in fluorescence intensities were used to calculate the dissociation constants for the ligands by plotting the change in fluorescence intensity at the wavelength of maximum emission ($\lambda_{\text{max}} \sim 330$ nm) against the ligand concentration. The resulting isotherm was fitted with Eqn (1) or (2) as appropriate:

$$\Delta F = \frac{\Delta F_{\text{max}}[\text{ligand}]}{K_d + [\text{ligand}]} \quad (1)$$

$$\Delta F = \frac{\Delta F_{\text{max}}[\text{ligand}]^h}{K_d^h + [\text{ligand}]^h} \quad (2)$$

In the equations, ΔF is the difference in fluorescence intensity of the protein with and without the oligosaccharide, ΔF_{max} is this difference when all of the binding sites of the protein are saturated with the ligand, K_d is the dissociation constant of the ligand from the protein–ligand complexes and h is the Hill coefficient. The data represent two or three independent measurements.

Fungal growth inhibition assay

Bioassays to test the antifungal activity of HbCLP1 and HbCLP2 were conducted using a disk diffusion test. Three different concentrations (25, 50 and 75 µg) of protein in 7 µL of sterile buffer (50 mM Tris/HCl, pH 7.5) were applied to 5-mm sterile paper disks. These disks were placed on potato dextrose agar in a 9-cm diameter Petri dish with a solid inoculum (5 mm³ agar plug) containing the mycelium of a 4-day-old culture of *A. alternata* at the center of the plate. The disks were placed on the agar at a distance of 20 mm from the growing front of the hyphae, and the plates were incubated for 72 h at room temperature and photographed.

Thermal stability measurements using circular dichroism

CD measurements were performed at 20 °C using a Jasco-J700 spectropolarimeter (Jasco Inc., Easton, MD, USA) equipped with a Peltier temperature control system. HbCLP and CatD solutions were dialyzed in 20 mM phosphate buffer at pH 7.5 and filtered. Far-UV spectra were collected for each sample from 190 to 260 nm in a 1-cm path-length cell. Three scans were averaged to obtain the final spectra of the different proteins at a concentration of 20 µg·µL⁻¹. The thermal denaturation profiles were obtained

over a range of 20–90 °C with a temperature rate change of 50 °C·h⁻¹ by monitoring the ellipticity changes at 222 nm for the complete proteins and the CatDs and at 196 nm for the CBDs. Finally, the samples were cooled to the initial temperature and another far-UV spectrum was obtained for each sample. All the spectra were scaled to molar ellipticities Θ (deg·cm²·dmol⁻¹). The fraction of unfolded protein at each temperature was calculated from the CD value by linearly extrapolating the pre- and post-transition baselines into the transition zone and plotting against the temperature. The midpoint temperatures of the unfolding transition (T_m) were obtained from the transition curves between the folded and unfolded protein.

Acknowledgements

This work was supported by DGAPA-UNAM (Grant IN207613 to A.R.-R.) and CONACYT (Grants 82947 and 166472). We thank Q.F.B. Rocio Patiño-Maya from the Instituto de Química-UNAM for technical assistance. Latex and leaves from rubber trees were obtained from the Experimental Camp ‘El Palmar’, Tezonapa, Ver.

Author contributions

SMC: Planned experiments, performed experiments, analyzed data and wrote the paper; PCS: Planned experiments and performed experiments; IMM: Performed experiments; AGDS: Performed experiments and analyzed data; MLMR: Planned experiments and contributed reagents or other essential material; JAH: Planned experiments and contributed reagents or other essential material; ARR: Planned experiments, analyzed data, contributed reagents or other essential material and wrote the paper.

References

- 1 Van Loon LC, Rep M & Pieterse CMJ (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu Rev Phytopathol* **44**, 135–162.
- 2 Hon WC, Griffith M, Mlynarz A, Kwok YC & Yang DS (1995) Antifreeze proteins in winter rye are similar to pathogenesis-related proteins. *Plant Physiol* **109**, 879–889.
- 3 Ary MB, Richardson M & Shewry PR (1989) Purification and characterization of an insect α -amylase inhibitor/endochitinase from seeds of Job's Tears. *Biochim Biophys Acta* **993**, 260–266.
- 4 Takenaka Y, Nakano S, Tamoi M, Sakuda S & Fukamizo T (2009) Chitinase gene expression in response to environmental stresses in *Arabidopsis*

- thaliana*: chitinase inhibitor allosamidin enhances stress tolerance. *Biosci Biotechnol Biochem* **73**, 1066–1071.
- 5 Ahmed N, Park J, Jung H, Kang K, Hur Y, Lim Y-P & Nou I-S (2012) Molecular characterization of stress resistance related chitinase genes of *Brassica rapa*. *Plant Physiol Biochem* **58**, 106–115.
 - 6 Vasconcelos EA, Santana CG, Godoy CV, Seixas CD, Silva MS, Moreira LR, Oliveira-Neto OB, Price D, Fitches E, Filho EX *et al.* (2011) A new chitinase-like xylanase inhibitor protein (XIP) from coffee (*Coffea arabica*) affects Soybean Asian rust (*Phakopsora pachyrhizi*) spore germination. *BMC Biotechnol* **7**, 11–14.
 - 7 Kasprzewska A (2003) Plant chitinases – regulation and function. *Cell Mol Biol Lett* **8**, 809–824.
 - 8 Patil DN, Datta M, Chaudhary A, Tomar S, Sharma AK & Kumar P (2009) Isolation, purification, crystallization and preliminary crystallographic studies of chitinase from tamarind (*Tamarindus indica*) seeds. *Acta Crystallogr F Struct Biol Cryst Commun* **65**, 343–345.
 - 9 Sarma K, Dehury B, Sahu J, Sarmah R, Sahoo S, Sahu M, Sen P, Modi MK & Barooah M (2012) A comparative proteomic approach to analyse structure, function and evolution of rice chitinases: a step towards increasing plant fungal resistance. *J Mol Model* **18**, 4761–4780.
 - 10 Neuhaus JM, Friting B, Linthorst HJM, Meins F, Mikkelsen JD & Ryals J (1996) A revised nomenclature for chitinase genes. *Plant Mol Biol Rep* **14**, 102–104.
 - 11 Berglund L, Brunstedt J, Nielsen KK, Chen Z, Mikkelsen JD & Marcker KA (1995) A proline-rich chitinase from *Beta vulgaris*. *Plant Mol Biol* **27**, 211–216.
 - 12 Truong NH, Park SM, Nishizawa Y, Watanabe T, Sasaki T & Itoh Y (2003) Structure, heterologous expression, and properties of rice (*Oriza sativa* L.) family 19 chitinases. *Biosci Biotechnol Biochem* **67**, 1063–1070.
 - 13 Neuhaus JM (1999) Plant chitinases (PR-3, PR-4, PR-8, PR-11). In *Pathogenesis-Related Proteins in Plants* (Datta SK & Muthukrishnan S, eds), pp. 77–105. CRC Press, Boca Raton, FL.
 - 14 Taira T, Ohnuma T, Yamagami T, Aso Y, Ishiguro M & Ishihara M (2002) Antifungal activity of rye (*Secale cereale*) seed chitinases: the different binding manner of class I and class II chitinases to the fungal cell walls. *Biosci Biotechnol Biochem* **66**, 970–977.
 - 15 Kitajima S, Kamei K, Taketani S, Yamaguchi M, Kawai F, Komatsu A & Inukai Y (2010) Two chitinase-like proteins abundantly accumulated in latex of mulberry show insecticidal activity. *BMC Biochem* **11**, 1–7.
 - 16 Sánchez-Rodríguez C, Bauer S, Hématy K, Saxe F, Ibáñez AB, Vodermaier V, Konlechner C, Sampathkumar A, Rüggeberg M, Aichinger E *et al.* (2012) Chitinase-like1/pom-pom1 and its homolog CTL2 are glucan-interacting proteins important for cellulose biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **24**, 589–607.
 - 17 Wu B, Zhang B, Dai Y, Zhang L, Shang-Guan K, Peng Y, Zhou Y & Zhu Z (2012) *Brittle Culm15* encodes a membrane-associated chitinase-like protein required for cellulose biosynthesis in rice. *Plant Physiol* **159**, 1440–1452.
 - 18 Hermans C, Porco S, Verbruggen N & Bush DR (2010) Chitinase-like protein CTL1 plays a role in altering root system architecture in response to multiple environmental conditions. *Plant Physiol* **152**, 904–917.
 - 19 Peumans WJ, Proost P, Swennen RL & Van Damme EJM (2002) The abundant class III chitinase homolog in young developing banana fruits behaves as a transient vegetative storage protein and most probably serves as an important supply of amino acids for the synthesis of ripening-associated proteins. *Plant Physiol* **130**, 1063–1072.
 - 20 Yeoh K, Othman A, Meon S, Abdullah F & Ho CL (2013) Sequence analysis and gene expression of putative oil palm chitinase and chitinase-like proteins in response to colonization of *Ganoderma boninense* and *Trichoderma harzianum*. *Mol Biol Rep* **40**, 147–158.
 - 21 Patil DN, Datta M, Dev A, Dhindwal S, Singh N, Dasauni P, Kundu S, Sharma AK, Tomar S & Kumar P (2013) Structural investigation of a novel *N*-acetyl glucosamine binding chi-lectin which reveals evolutionary relationship with class III chitinases. *PLoS One* **8**, e63779.
 - 22 Wasano N, Konno K, Nakamura M, Hirayama C, Hattori M & Tateishi K (2009) A unique latex protein, MLX56, defends mulberry trees from insects. *Phytochemistry* **70**, 880–888.
 - 23 Adrain C & Freeman M (2012) New lives for old: evolution of pseudoenzyme function illustrated by iRhoms. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**, 489–498.
 - 24 Adrangi S & Ali Faramarzi M (2013) From bacteria to human: a journey into the world of chitinases. *Biotechnol Adv* **31**, 1786–1795.
 - 25 Rahman A, Usharraj A, Misra BB, Thottathil GP, Jayasekaran K, Feng Y, Hou S, Ong SY, Ng FL, Lee LS *et al.* (2013) Draft genome sequence of the rubber tree *Hevea brasiliensis*. *BMC Genomics* **14**, 75.
 - 26 Sánchez-Monge R, Blanco C, Perales AD, Collada C, Carrillo T, Aragoncillo C & Salcedo G (2000) Class I chitinases, the panallergens responsible for the latex-fruit syndrome, are induced by ethylene treatment and inactivated by heating. *J Allergy Clin Immunol* **106**, 190–195.
 - 27 Posch A, Wheeler CH, Chen Z, Flagge A, Dunn MJ, Papenfuss F, Raulf-Heimsoth M & Baur X (1999) Class I endochitinase containing a hevein domain is the causative allergen in latex-associated avocado allergy. *Clin Exp All* **29**, 667–672.

- 28 Riordain GO, Radauer C, Adhami F, Peterbauer CK, Blanco C, Scheiner O, Ebner C & Breiteneder H (2002) Cloning and molecular characterization of the *Hevea brasiliensis* allergen Hev b 11, a class I chitinase. *Clin Exp Allergy* **32**, 455–462.
- 29 Rihs HP, Dumont B & Rozynek P (2003) Molecular cloning, purification, and IgE-binding of a recombinant class I chitinase from *Hevea brasiliensis* leaves (rHev b 11.0102). *Allergy* **58**, 246–251.
- 30 Takakura Y, Ito T, Saito H, Inoue T, Komari T & Kuwata S (2000) Flower-predominant expression of a gene encoding a novel class I chitinase in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Mol Biol* **42**, 883–897.
- 31 Xiao YH, Li XB, Yang XY, Luo M, Hou L, Guo SH, Luo XY & Pei Y (2007) Cloning and characterization of a balsam pear class I chitinase gene (Mcchit1) and its ectopic expression enhances fungal resistance in transgenic plants. *Biosci Biotechnol Biochem* **71**, 1211–1219.
- 32 Shinshi H, Neuhaus J, Ryals J & Meins F (1990) Structure of a tobacco endochitinase gene: evidence that different chitinase genes can arise by transposition of sequences encoding a cysteine-rich domain. *Plant Mol Biol* **14**, 357–368.
- 33 Reyes-López CA, Hernández-Santoyo A, Pedraza-Escalona M, Mendoza G, Hernández-Arana A & Rodríguez-Romero A (2004) Insights into a conformational epitope of Hev b 6.02 (hevein). *Biochem Biophys Res Commun* **314**, 123–130.
- 34 Soedjanaatmadja UM, Hofsteenge J, Jeronimus-Stratingh CM, Bruins AP & Beintema JJ (1994) Demonstration by mass spectrometry that pseudo-hevein have ragged C-terminal sequences. *Biochim Biophys Acta* **16**, 144–148.
- 35 Wright CS (1992) Crystal structure of a wheat germ agglutinin/glycophorin-sialoglycopeptide receptor complex. Structural basis for cooperative lectin-cell binding. *J Biol Chem* **267**, 14345–14352.
- 36 Aboitiz N, Vila-Perelló M, Groves P, Asencio JL, Andreu D, Cañada FJ & Jiménez-Barbero J (2004) NMR and modelling studies of protein-carbohydrate interactions: synthesis, three-dimensional structure, and recognition properties of a minimum hevein domain with binding affinity for chitoooligosaccharides. *Chem Bio Chem* **5**, 1245–1255.
- 37 Krissinel E & Henrick K (2007) Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J Mol Biol* **372**, 774–797.
- 38 Huet J, Rucktooa P, Clantin B, Azarkan M, Looze Y, Villeret V & Wintjens R (2008) X-ray structure of papaya chitinase reveals the substrate binding mode of glycosyl hydrolase family 19 chitinases. *Biochemistry* **47**, 8283–8291.
- 39 Ohnuma T, Numata T, Osawa T, Inanaga H, Okazaki Y, Shinya S, Kondo K, Fukuda T & Fukamizo T (2012) Crystal structure and chitin oligosaccharide-binding mode of a ‘loopful’ family GH19 chitinase from rye, *Secale cereale*, seeds. *FEBS J* **279**, 3639–3651.
- 40 Ohnuma T, Umamoto N, Kondoh K, Numata T & Fukamizo T (2013) Complete subsite mapping of a ‘loopful’ GH19 chitinase from rye seeds based on its crystal structure. *FEBS Lett* **587**, 2691–2697.
- 41 Ubhayasekera W, Tang CM, Ho SWT, Berglund G, Bergfors T, Chye ML & Mowbray SL (2007) Crystal structures of a family 19 chitinase from *Brassica juncea* show flexibility of binding cleft loops. *FEBS J* **274**, 3695–3703.
- 42 Chaudet MM, Naumann TA, Price NPJ & Rose DR (2014) Crystallographic structure of ChitA, a glycoside hydrolase family 19, plant class IV chitinase from *Zea mays*. *Protein Sci* **23**, 586–593.
- 43 Ohnuma T, Umamoto N, Nagata T, Shinya S, Numata T, Taira T & Fukamizo T (2014) Crystal structure of a ‘loopless’ GH19 chitinase in complex with chitin tetrasaccharide spanning the catalytic center. *Biochim Biophys Acta* **1844**, 793–802.
- 44 Tang CM, Chye ML, Ramalingam S, Ouyang S, Zhao KJ, Ubhayasekera W & Mowbray SL (2004) Functional analyses of the chitin-binding domains and the catalytic domain of *Brassica juncea* chitinase BjCHI1. *Plant Mol Biol* **56**, 285–298.
- 45 Andersen MD, Jensen A, Robertus JD, Leah R & Skriver K (1997) Heterologous expression and characterization of wild-type and mutant forms of a 26 kDa endochitinase from barley (*Hordeum vulgare* L.). *Biochem J* **322**, 815–822.
- 46 Iseli-Gamboni B, Boller T & Neuhaus J (2007) Mutation of either of two essential glutamates converts the catalytic domain of tobacco class I chitinase into a chitin-binding lectin. *Plant Sci* **134**, 45–51.
- 47 Zhang D, Hrmova M, Wan CH, Wu C, Balzen J, Cai W, Wang J, Densmore LD, Fincher GB, Zhang H *et al.* (2004) Members of a new group of chitinase-like genes are expressed preferentially in cotton cells with secondary walls. *Plant Mol Biol* **54**, 353–372.
- 48 Kim YS, Lee JH, Yoon GM, Cho HS, Park S, Suh MC, Choi D, Ha HJ, Liu JR & Pai H (2000) CHRK1, a chitinase-related receptor-like kinase in tobacco. *Plant Physiol* **123**, 905–915.
- 49 Olsson MHM, Sondergaard CR, Rostkowski M & Jensen JH (2011) PROPKA3: consistent treatment of internal and surface residues in empirical pKa predictions. *J Chem Theory Comput* **7**, 525–537.
- 50 Kezuka Y, Kojima M, Mizuno R, Suzuki K, Watanabe T & Nonaka T (2010) Structure of full-length class I chitinase from rice revealed by X-ray crystallography and small-angle X-ray scattering. *Proteins* **78**, 2295–2305.
- 51 Barbas CF, Heine A, Zhong G, Hoffman T, Gramatikova S, Bjornestedt R, List B, Anderson J,

- Stura EA, Wilson IA *et al.* (1997) Immune versus natural selection: antibody aldolases with enzymes rates but broader scope. *Science* **278**, 2085–2092.
- 52 Lu KP, Finn G, Lee TH & Nicholson LK (2007) Prolyl *cis*–*trans* isomerization as a molecular timer. *Nat Chem Biol* **3**, 619–629.
- 53 García-Hernández E, Zubillaga RA, Rojo-Domínguez A, Rodríguez-Romero A & Hernández-Arana A (1997) New insights into the molecular basis of lectin–carbohydrate interactions: a calorimetric and structural study of the association of hevein to oligomers of *N*-acetylglucosamine. *Proteins* **29**, 467–477.
- 54 Asensio JL, Cañada FJ, Siebert H, Laynez J, Poveda A, Nieto PM, Soedjanaamadja UM, Gabius H & Jiménez-Barbero J (2000) Structural basis for chitin recognition by defense proteins: GlcNAc residues are bound in a multivalent fashion by extended binding sites in hevein domains. *Chem Biol* **7**, 529–543.
- 55 Ohnuma T, Sørlie M, Fukuda T, Kawamoto N, Taira T & Fukamizo T (2011) Chitin oligosaccharide binding to a family GH19 chitinase from the moss *Bryum coronatum*. *FEBS J* **278**, 3991–4001.
- 56 Taira T, Toma N & Ishihara M (2005) Purification, characterization, and antifungal activity of chitinases from pineapple (*Ananas comosus*) leaf. *Biosci Biotechnol Biochem* **69**, 189–196.
- 57 Kawase T, Yokowawa S, Saito A, Fujii T, Nikaidou N, Miyashita K & Watanabe T (2006) Comparison of enzymatic and antifungal properties between family 18 and 19 chitinases from *S. coelicolor* A3(2). *Biosci Biotechnol Biochem* **70**, 988–998.
- 58 Iseli B, Boller T & Heuhaus JM (1993) The N-terminal cysteine-rich domain of tobacco class I chitinase is essential for chitin binding but not for catalytic or antifungal activity. *Plant Physiol* **103**, 221–226.
- 59 Koo JC, Lee SY, Chun HJ, Cheong YH, Choi JS, Kawabata S, Miyagi M, Tsunasawa S, Ha KS, Bae DW *et al.* (1998) Two hevein homologs isolated from the seed of *Pharbitis nil* L. exhibit potent antifungal activity. *Biochem Biophys Acta* **1382**, 80–90.
- 60 Nielsen KK, Nielsen JE, Madrid SM & Mikkelsen JD (1997) Characterization of a new antifungal chitin-binding peptide from sugar beet leaves. *Plant Physiol* **113**, 83–91.
- 61 Hernández-Arana A, Rojo-Domínguez A, Soriano-García M & Rodríguez-Romero A (1995) The thermal unfolding of hevein, a small disulfide-rich protein. *Eur J Biochem* **228**, 649–652.
- 62 Juge N, Payan F & Willimson G (2004) XIP-I, a xylanase inhibitor protein from wheat: a novel protein function. *Biochim Biophys Acta* **1696**, 203–211.
- 63 Tang C, Qi J, Li H, Zhang C & Wang Y (2007) A convenient and efficient protocol for isolating high-quality RNA from latex of *Hevea brasiliensis* (para rubber tree). *J Biochem Biophys Methods* **70**, 749–754.
- 64 Urban A, Neukirchen S & Jaeger KE (1997) A rapid and efficient method for site-directed mutagenesis using one-step overlap extension PCR. *Nucleic Acids Res* **25**, 2227–2228.
- 65 Kotchoni SO & Gachomo EW (2009) A rapid and hazardous reagent free protocol for genomic DNA extraction suitable for genetic studies in plants. *Mol Biol Rep* **36**, 1633–1636.
- 66 Miller GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* **31**, 426–428.
- 67 Khan MA, Hamid R, Ahmad M, Abdin MZ & Javed S (2010) Optimization of culture media for enhanced chitinase production from a novel strain of *Stenotrophomonas maltophilia* using response surface methodology. *J Microbiol Biotechnol* **20**, 1597–1602.
- 68 Thompson SE, Smith M, Wilkinson MC & Peek K (2001) Identification and characterization of a chitinase antigen from *Pseudomonas aeruginosa* strain 385. *Appl Environ Microbiol* **67**, 4001–4008.
- 69 Evans P (2006) Scaling and assessment of data quality. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **62**, 72–82.
- 70 Kabsch W (2010) XDS. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**, 125–132.
- 71 Winn MD, Charles C, Cowtan KD, Dodson EJ, Leslie AGW, McCoy A, Stuart J, Garib N, Powell HR, Randy J *et al.* (2011) Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **67**, 235–242.
- 72 Emsley P & Cowtan K (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**, 2126–2132.
- 73 Afonine PV, Ralf W, Headd JJ, Thomas C, Urzhumtsev A, Zwart PH & Adams PD (2012) Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **68**, 352–367.
- 74 Holm L & Rosenström P (2010) Dali server: conservation mapping in 3D. *Nucleic Acids Res* **38**, W545–W549.
- 75 DeLano WL (2002) The PyMOL Molecular Graphics System. DeLano Scientific LLC, San Carlos, CA.
- 76 Grosdidier A, Zoete V & Michielin O (2011) SwissDock, a protein–small molecule docking web service based on EADock DSS. *Nucleic Acids Res* **39**, W270–W277.
- 77 Laskowski RA & Swindell MB (2011) LigPlot+: multiple ligand–protein interaction diagrams for drug discovery. *J Chem Inf Model* **51**, 2778–2786.

Supporting information

Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web site:

Table S1. Oligonucleotide sequences.