



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

INSTITUTO DE QUÍMICA

**CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL Y ESTRUCTURAL DE ENZIMAS
GLICOHIDROLÍTICAS INVOLUCRADAS EN LOS MECANISMOS DE
DEFENSA DE *Agave azul tequilana***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

YUSVEL SIERRA GÓMEZ

TUTOR PRINCIPAL:

DRA. ADELA RODRÍGUEZ ROMERO
Instituto de Química, UNAM.

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DRA. ALEJANDRA HERNÁNDEZ SANTOYO
Instituto de Química, UNAM.

DR. ALFREDO TORRES LARIOS
Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

CIUDAD DE MÉXICO, ABRIL DE 2021



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.

PDCB/AOR/IQ/CD52/2020

C.P. AGUSTÍN MERCADO

Director de Certificación y Control Documental
Dirección General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Nos permitimos informarle que el Comité Académico de Doctorado en Ciencias Biomédicas, en su reunión **467** celebrada el 29 abril de 2020, designó el siguiente jurado para examen de grado **DOCTOR EN CIENCIAS** de **Sierra Gómez Yusvel**, con número de cuenta **513452682**, con la tesis titulada: ***“Caracterización funcional y estructural de enzimas glicohidrolíticas involucradas en los mecanismos de defensa del Agave azul tequilana***, dirigida por la Dra. Adela Rodríguez Romero.

Presidenta: Dra. Rosario Muñoz Clares
Secretaria: Dra. Adela Rodríguez Romero
Vocal: Dr. Enrique Rudiño Piñera
Vocal Dra. Romina Rodríguez Sanoja
Externo: Dr. Rafael Arturo Zubillaga Luna

Atentamente
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 27 de julio de 2020.



DRA. AUREA OROZCO RIVAS
COORDINADORA

AOR/gamm

A mi hija amada, que sin saberlo me ha impulsado a terminar esta etapa. A mi esposa que es mi apoyo fundamental y a mis padres por su ejemplo de constancia.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

A la Dra. Adela Rodríguez Romero por la paciencia, disposición, apoyo y motivación todo el tiempo para llevar a cabo este proyecto y concluir esta importante etapa de mi formación.

A los miembros de mi comité tutor el Dr. Alfredo Torres Larios por sus valiosas sugerencias siempre y la ayuda para realizar la parte experimental de este trabajo y a la Dra. Alejandra Hernández Santoyo, también por su gran ayuda en la confección de las figuras finales del artículo y la tesis.

A los miembros del jurado por sus valiosos aportes a este documento.

A la Dra. Patricia Cano por todo su apoyo en la parte inicial de este proyecto con la Biología Molecular y por todas las enseñanzas y consejos.

Al Dr. Dirtan Siliqi por su enorme ayuda con el procesamiento de los datos de SAXS.

A la Dra. Annia Hernández por su ayuda en la realización de algunos experimentos de la parte final de este proyecto, así como en la escritura del manuscrito.

Al Dr. Jose Rivera del IQ-UNAM por su ayuda con los experimentos de actividad antifúngica y el Dr. Javier Plasencia de la FQ-UNAM por brindarnos la cepa de *F. oxysporum*.

A los Dres. T. Matsui y T. Weiss la ayuda en la colecta de los datos de SAXS en el sincrotron del SLAC National Accelerator Laboratory de la Universidad de Stanford.

Al Laboratorio Nacional de Estructura de Macromoléculas (LANEM-IQ).

Al CONACyT por el apoyo económico a los Proyectos 221169 y mi beca de doctorado No. 512410 y a DGAPA-PAPIIT por el apoyo al proyecto IN208418 .

A la Quím. Eréndira García, QFB. María del Rocío Patiño y a la M. en C. Georgina Espinoza por el apoyo técnico.

A mis compañeros de laboratorio por los ratos vividos, el apoyo y las enseñanzas y por acogerme como si siempre hubiera estado ahí, en especial a Jéssicca, Isra, Benja, Joha, Efrén y Christian. Al resto de mis compañeros del departamento con los que compartí tanto en Biología Molecular en especial a Homero por su ayuda también con la calorimetría.

A mi familia y amigos por siempre estar al pendiente y animarme a terminar cada día.

ÍNDICE

ÍNDICE	i
LISTADO DE ABREVIATURAS:	iii
RESUMEN	v
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Sistema de defensa de las plantas	1
1.2. Proteínas relacionadas con la patogenicidad (PR)	2
1.3. Quitinasas	4
2. ANTECEDENTES.....	7
3. HIPÓTESIS	8
4.1. Objetivo general.....	8
4.2. Objetivos específicos.	8
5. MATERIALES Y MÉTODOS:.....	9
5.1. Materiales	9
5.2. Métodos	9
5.2.1. Identificación y aislamiento de las quitinasas AtChi1 y AtChi2	9
5.2.2. Expresión heteróloga y purificación de AtChi1 y AtChi2	10
5.2.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS- PAGE) y en agarosa.....	11
5.2.4. Determinación de las masas moleculares, puntos isoelectrónicos y espectros de dicroísmo circular de AtChi1 y AtChi2	12
5.2.5. Ensayo de actividad quitinolítica y preparación del sustrato quitina coloidal.....	13
5.2.6. Determinación del pH óptimo y la estabilidad frente al pH.	14
5.2.7. Ensayos de estabilidad térmica	14
5.2.8. Ensayos de actividad quitinolítica y especificidad de sustratos	14
5.2.9. Ensayos de calorimetría de titulación isotérmica usando quitohexosa como ligando.....	16
5.2.10. Análisis de Dispersión de Rayos-X de Ángulo Pequeño (SAXS, <i>Small Angle X-ray Scattering</i>)	16
5.2.11. Modelado por homología	17
5.2.12. Simulaciones de acoplamiento (Docking)	17
5.2.13. Ensayos de actividad antifúngica	18
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	19

6.1. Obtención de las quitinasas de clase I a partir del transcriptoma y el cADN de plantas de <i>A. tequilana</i>	19
6.2. Caracterización de las enzimas AtChi1 y AtChi2 purificadas	24
6.3. Determinación de la afinidad de unión y caracterización termodinámica.	31
6.4. Estructura en solución y modelado por homología.....	33
6.5. Actividades antifúngicas versus hongos fitopatógenos.	41
6.6. Pruebas de cristalización de las quitinasas de <i>A. tequilana</i>	45
7. CONCLUSIONES	47
8. PERSPECTIVAS	47
9. REFERENCIAS	48
10. ANEXO	58

LISTADO DE ABREVIATURAS:

ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ARN	Ácido ribonucleico
AtChi1	Quitinasa 1 de <i>Agave tequilana</i>
AtChi2	Quitinasa 2 de <i>Agave tequilana</i>
ATSAS	Analysis tools for Small-angle scattering
CatD	Dominio catalítico
CBD	Chitin Binding Domain o Carbohydrate Binding Domain
CSI	Crystal Screen I
DC	Dicroísmo circular
DLS	Dispersión dinámica de la luz
DNS	3,5-dinitrosalicílico
E_0	Concentración inicial de enzima
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
GH	Glicósido hidrolasas
GlcNAc	N-Acetilglucosamina
HR	Reacciones de hipersensibilidad
IMAC	Immobilized metal affinity chromatography
IPTG	Isopropil-1-tio- β -D-galactopiranosido
ITC	Isothermal Titration Calorimetry
<i>k_{cat}</i>	Constante catalítica
<i>K_d</i>	Constante de disociación
<i>K_m</i>	Constante de Michaelis-Menten
LB	Medio Luria Bertani
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization
PCR	Polymerase Chain Reaction
PMSF	Fluoruro de fenil-metil-sulfonil
PR	Relacionadas con la patogénesis
RT-PCR	Reverse-Transcriptase- Polymerase Chain Reaction

SAXS	Small Angle X-ray Scattering
SDS	Dodecil-sulfato de sodio
SEC	Size-exclusion chromatography
T _m	Temperatura media de desnaturalización
UV	Ultravioleta

RESUMEN

Las plantas del género *Agave* son muy importantes para diversas áreas de la economía mexicana. Entre sus múltiples usos se encuentran su empleo como leña, conservación de suelos, en la elaboración de bebidas como tequila y mezcal, y en la producción de insectos comestibles para la industria gastronómica.

Los mecanismos de defensa de las plantas están basados en el denominado "sistema dual" que conforman las barreras físicas, que dificultan la colonización por parte del patógeno, y los métodos bioquímicos de defensa, que pueden ser sustancias tóxicas contra el patógeno o sustancias capaces de inhibir su desarrollo. La acción combinada de ambos tipos de sistemas defensivos (físicos y bioquímicos) son los que determinan el éxito o fracaso de cada planta al enfrentar la causa del estrés.

Entre las defensas bioquímicas se encuentran las proteínas relacionadas con la patogenicidad (PR), tales como las quitinasas. Estas enzimas pertenecen a cuatro de las 18 familias PR reconocidas a la fecha. Las quitinasas de plantas se agrupan en tres familias de glicósido hidrolasas (GH18, GH19 y GH20) y en siete clases (I a la VII), con base en su similitud de secuencias. Las clases I, II, IV, VI, VII y las endoquitinasas de clase V, pertenecen a las GH19, mientras que las clases III y las exoquitinasas de clase V, se agrupan en las GH18. Una endoquitinasa de clase III de una planta carnívora se incluyó en la familia GH20, según la base de datos de glicósido-hidrolasas (GH) CAZy (<http://www.cazy.org/>).

En este trabajo se identificaron, obtuvieron y produjeron de manera recombinante en *Escherichia coli* dos quitinasas de *Agave tequilana* var. Azul, las cuales se purificaron y caracterizaron. Ambas quitinasas, denominadas AtChi1 y AtChi2, presentan un dominio de unión a carbohidratos localizado en el extremo amino terminal y un dominio catalítico unidos por un conector flexible, por lo cual se clasifican como quitinasas de clase I. Ambas mostraron actividad catalítica preferente sobre sustratos poliméricos y conservan los principales residuos involucrados en la unión de sustratos y la catálisis descritos para los miembros de esta familia. Las quitinasas de *A. tequilana* mostraron un pH óptimo de 5.0 sobre el sustrato quitina coloidal y una estabilidad al pH en el intervalo de 3.0 a 10.0. Además, determinamos las constantes K_m y k_{cat} de ambas enzimas frente al sustrato quitina coloidal. Estas enzimas mostraron una alta termoestabilidad en ensayos de desplazamiento térmico. Empleando calorimetría de titulación isotérmica determinamos para ambas enzimas la constante de disociación K_d de la interacción con quitohexosa.

Debido a la presencia del conector flexible interdominios, para esta clase de enzimas existen muy pocos estudios sobre su estructura tridimensional. En este trabajo obtuvimos modelos de la superficie de estas enzimas en solución empleando SAXS, los cuales

superpusimos con los obtenidos por homología. Los resultados obtenidos permiten sugerir una posible explicación teórica a las ligeras diferencias encontradas en los resultados experimentales que obtuvimos por calorimetría y ensayos cinéticos para ambas enzimas.

Además, se realizó un análisis de acoplamiento molecular para obtener información de los residuos en AtChi1 y AtChi2 involucrados en la fijación y catálisis de oligosacáridos. El análisis de nuestros resultados sugiere que a pesar de que ambas enzimas tienen sólo seis residuos diferentes, las ubicaciones de la mayoría de éstos están en el dominio catalítico, cercanos al conector interdominios, lo que podría contribuir a las diferencias funcionales encontradas entre ambas enzimas.

Finalmente, ambas enzimas inhibieron a hongos fitopatógenos como *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus sp.* y *Alternaria alternata*. Sin embargo, no inhibieron el oomiceto *Phytophthora aphanidermatum*, indicando que su actividad antifúngica está asociada a la unión y degradación de la quitina presente en la pared celular de los llamados hongos verdaderos, lo que sugiere su participación en los mecanismos de defensa de *A. tequilana* var. Azul.

ABSTRACT

Plants of the Agave genus are significant for different areas of the Mexican economy. They are used as firewood, as ornamental devices, to production produce beverages such as tequila and mezcal, in soil conservation, and the production of edible insects for the gastronomic industry.

The defense of plants is based on a so-called "dual system" that is made up of physical barriers, which hinder colonization by the pathogen, and the biochemical defense methods, which can be toxic substances against the pathogen able to inhibit its development. The combined action of both types of defensive systems (physical and biochemical) determines each plant's success or failure in facing the cause of stress.

Biochemical defenses include pathogenesis-related proteins (PRP). In turn, the type proteins more represented within PRPs are chitinases, which belong to four of the 18 PR families recognized to date. Plant chitinases are further grouped into three families of glycosyl hydrolases (GH18, GH19, and GH29) and seven classes (I through VII) based on their sequence similarity. Classes I, II, IV, VI, VII, and class V endochitinases belong to the GH19 family. In contrast, classes III and class V exochitinases are grouped into the GH 18 family, according to Glycosyl Hydrolases (GH) CAZy Database (<http://www.cazy.org/>).

In this work, two chitinases from *Agave tequilana* var. Azul were identified, obtained and produced recombinantly in *Escherichia coli*. Both chitinases, called AtChi1 and AtChi2, have a carbohydrate-binding domain located at the amino terminal end and a catalytic domain linked by a flexible linker, for which they are classified as class I chitinases. Both showed preferential catalytic activity on polymeric substrates. They conserve the main residues involved in the binding of substrates and the catalysis described for the members of this family. Chitinases from *A. tequilana* showed an optimum pH of 5.0 on the colloidal chitin substrate and stability at pH in the range of 3.0 to 10.0. We also determined K_m and k_{cat} of both enzymes against the same substrate. These enzymes showed high thermostability in thermal displacement tests. Using isothermal titration calorimetry, we determined for both enzymes the dissociation constant K_d of the interaction with chitohexose.

Due to the interdomain flexible connector in this class of enzymes, there are very few studies on their complete three-dimensional structure. In this work, we carried out a study of the Agave chitinases structure in solution using SAXS. These data allowed us to obtain the enzymes' overall shape and superimpose them with those obtained by homology. We also performed a docking analysis using the homology models to obtain information on the residues involved in the substrates' binding and catalysis. The analysis of our results suggests that although Agave chitinases have only six different residues, the location of most of these in the inter-domain region could contribute to the functional differences found between both enzymes.

Both chitinases inhibit phytopathogenic fungi growth, such as *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus sp.*, and *Alternaria alternate*. However, they did not inhibit the growth *Phytum aphanidermatum*, an oomycete, indicating that its antifungal activity is associated with the binding and/or degradation of chitin present in the cell wall of the so-called true fungi. Furthermore, our results suggest that AtChi1 and AtChi2 can be classified as PR proteins and that they participate in the plant's defense mechanisms.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Sistema de defensa de las plantas

Hoy en día, la contaminación y el cambio climático, entre otros factores, causan el deterioro de los ecosistemas y ponen gran presión sobre los recursos naturales con que cuenta el planeta. En México en particular, uno de los recursos forestales que presenta una importancia relevante, sobre todo en las comunidades de las zonas áridas y semiáridas, que es donde mejor prospera, es el género *Agave*. El maguey, como comúnmente se le conoce, es un pilar fundamental desde el punto de vista agroecológico y socioeconómico por los múltiples usos de que es objeto, dependiendo de la región donde se ubique, que van desde su empleo como leña hasta uso ornamental, pasando por el papel que desempeña en la elaboración de bebidas como tequila y mezcal, la conservación de suelos, su empleo como forraje y la producción de insectos comestibles para la industria gastronómica [1].

Las plantas, en general, incluyendo las especies de *Agave*, se encuentran expuestas a numerosos factores de estrés o agresiones tanto de tipo biótico (insectos, hongos, virus), como de tipo abiótico (disponibilidad de agua, cambios de temperatura, contaminantes atmosféricos, etc.). El hecho de que su naturaleza sésil les impide evadir estos factores ha provocado que tengan que desarrollar poderosos mecanismos de defensa, algunos de los cuales se encuentran muy poco estudiados hasta la fecha [2].

La defensa de las plantas está basada en un denominado "sistema dual" que se compone en primera línea por las barreras físicas que dificultan o impiden la colonización por parte del patógeno y se complementa con métodos bioquímicos de defensa, los cuales pueden ser directamente tóxicos contra el patógeno o inhibir su desarrollo. La acción combinada de ambos tipos de sistemas defensivos (físicos y bioquímicos) son los que determinan finalmente la capacidad de cada planta para enfrentar la causa del estrés. Estos sistemas defensivos van cambiando por una serie de factores como la edad de la planta, el estado nutricional, la condición hídrica, la presión del patógeno, el tiempo de exposición al factor estresante, etc. [3].

Cada una de las dos líneas de defensa de las plantas puede subdividirse en dos grandes grupos: las defensas preexistentes y las inducidas en respuesta a un factor estresante. En las defensas físicas del primer grupo encontramos las ceras, cutícula, paredes celulares, tamaño, forma y ubicación de aperturas naturales, entre otras, y entre las inducidas la

formación de capas de corcho, formación de capas de abscisión, formación de tílides, exudación de goma, necrosamiento de zonas atacadas, depósitos de calosa, lignificación acelerada de tejidos alrededor de zonas afectadas y encapsulamiento de estas [4,5].

Por su parte, en las defensas bioquímicas preexistentes tenemos inhibidores que producen las plantas en forma natural y los liberan al medio para alejar al patógeno o impedir su reproducción. También encontramos en este grupo las restricciones de sustancias bioquímicas o nutrientes requeridos por el patógeno para desarrollar su infección. Las defensas bioquímicas inducidas pueden ser las reacciones de hipersensibilidad (HR), el aumento en la concentración de compuestos fenólicos, la producción de fitoalexinas, así como la síntesis de proteínas PR (relacionadas con la patogenicidad). Dentro de estas últimas se encuentra la producción de enzimas, tales como polifenoloxidasas, peroxidasa, y fenilalanina amoníaco liasa, que oxidan fenoles incrementando su toxicidad y acelerando la síntesis de compuestos como la lignina que fortalecen las paredes celulares. También se presenta la activación de la síntesis de otras sustancias complejas del sistema defensivo de la planta como pectinas y productos cianogénicos (cianuros), entre otros [4].

1.2. Proteínas relacionadas con la patogenicidad (PR)

Dentro de los compuestos de síntesis inducida, las proteínas constituyen una de las principales moléculas de defensa, pues presentan elevada especificidad y eficiencia.

En la literatura se encuentra documentada la participación de enzimas en los mecanismos de defensa de varias plantas, donde en numerosas ocasiones se requiere la acción sinérgica de quitinasas y glucanasas para eliminar a un patógeno [6–8].

Considerando la amplia distribución de estas enzimas y para poder establecer un criterio único, en 1980 se designó como PR: “aquella proteína codificada por la planta cuya expresión se induzca en situaciones de patogenicidad, que por tanto poseen actividad antipatogénica y es usada como parte del sistema de defensa de la planta” [9].

La mayoría de las proteínas PR comparten algunas propiedades bioquímicas como son una masa molecular relativamente baja (6-43 kDa), estabilidad a valores de pH ácido (< 3), termoestabilidad o su alta resistencia a la acción de proteasas.

De acuerdo con la clasificación actual existen 18 familias de PR (PR1-PR18), las cuales se enlistan en la Tabla 1. Como puede apreciarse, muchas de ellas presentan actividad antifúngica [10–12].

Tabla 1. Clasificaciones de las proteínas PR.

Familia	Mr (kDa)	Actividad enzimática (biológica)	Diana biológica
PR-1	14-17	Desconocida (antifúngica)	Membrana celular
PR-2	25-35	1,3-β-Glucanasa (antifúngica)	Pared celular
PR-3	25-40	Quitinasas clases I, II, IV, V, VI, VII (antifúngica)	Pared celular
PR-4	13-19	Quitinasas clases I, II (antifúngica)	Pared celular
PR-5	22-26	Tipo taumatina (antifúngica)	Membrana celular
PR-6	6-13	Inhibidor de proteasas	Proteasas
PR-7	69	Endoproteinasa	Desconocido
PR-8	28-30	Quitinasa clase III (antifúngica)	Pared celular
PR-9	39-40	Peroxidasa de síntesis de lignina	Actividad indirecta
PR-10	17-18	Tipo ribonucleasa (antifúngica)	ARN del patógeno
PR-11	40-43	Quitinasa clase V (antifúngica)	Pared celular
PR-12	5,6	α-Defensina (antifúngica)	Membrana celular
PR-13	14	Tionina (antifúngica)	Membrana celular

PR-14	7-12	Proteína de transferencia de lípidos	Lípidos
PR-15	22-26	Oxalato oxidasa (antifúngica)	Membrana celular
PR-16	22-26	Tipo oxalato oxidasa	Membrana celular
PR-17	27	Metaloproteinasas* (antifúngica)	Desconocido
PR-18	60	Carbohidrato oxidasas (antibacteriana y antifúngica)	Desconocido

Por otro lado, se ha demostrado que muchos genes que codifican para proteínas PR se expresan específicamente en determinados tejidos y desarrollan funciones adicionales a las asociadas a la defensa. Esto sugiere que probablemente estas proteínas PR hayan evolucionado sus funciones para proporcionar un papel protector adicional. Una proteína se puede considerar una PR si cumple con al menos dos condiciones, ser sobre expresada en condiciones de patogénesis y mostrar actividad frente a patógenos ya sea antimicrobiana, antifúngica o a cualquier otro patógeno, aunque el término sigue en constante discusión [13].

Estas interesantes observaciones nos indican que es probable que a la fecha sólo se haya descubierto una pequeña parte de la funcionalidad de las proteínas PR en plantas y deja una puerta abierta al desarrollo de nuevas investigaciones al respecto.

Es importante notar que de las 18 familias de proteínas PR, cuatro presentan actividad de quitinasa, siendo el grupo de enzimas más representadas en las proteínas PR, por lo cual el estudio de estas moléculas puede ser de gran importancia para la comprensión de los mecanismos de defensa de las plantas.

1.3. Quitinasas

Las quitinasas (EC 3.2.2.14) son glicósido-hidrolasas que catalizan la hidrólisis del enlace β -1-4-glicosídico de polímeros de N-acetilglucosamina (GlcNAc) como la quitina

$[(C_8H_{13}NO_5)_n]$. Esta molécula es el segundo polímero más abundante de la naturaleza, presenta una estructura lineal y se encuentra en las paredes celulares de muchos hongos y en el exoesqueleto de la mayoría de los insectos [14]. Las quitinasas se encuentran presentes en organismos de los siete reinos [15], desde Archaea hasta Animalia y se encuentran involucradas en numerosas funciones fisiológicas, desde respuestas al estrés causado por factores abióticos [16], hasta la defensa contra hongos fitopatógenos [17,18].

De acuerdo con el sitio de corte en la quitina, las quitinasas se clasifican en endoquitinasas y exoquitinasas. Las primeras hidrolizan enlaces de sitios internos del polisacárido liberando oligosacáridos de, como mínimo, tres o cuatro monómeros de GlcNAc. Las exoquitinasas, por su parte, hidrolizan los extremos del polímero y se subdividen en quitobiosidasas (EC 3.2.1.29), que escinden el extremo no reductor liberando progresivamente di-acetilquitobiosa y las 1-4- β -glucosaminidasas (EC 3.3.1.30), que producen monómeros de GlcNAc a partir de los oligosacáridos producidos por la acción de endoquitinasas y quitobiosidasas [14].

En la base de datos de glicosido-hidrolasas (GH) CAZy (<http://www.cazy.org/>), la mayoría de las quitinasas se encuentran clasificadas en las familias GH18 y GH19 [19]. Las quitinasas de la familia GH18 se encuentran en la mayoría de los organismos, mientras que las de la familia GH19 se han detectado principalmente en plantas. Las enzimas de la familia GH18 se caracterizan por un plegamiento de tipo barril (β/α)₈ e hidrolizan el enlace glicosídico beta-1,4-N-acetil-D-glucosamina de polímeros de quitina mediante un mecanismo de sustitución nucleofílica de doble desplazamiento, con retención de la configuración del carbono anomérico. Las de la familia GH19 presentan un arreglo estructural con un alto contenido de hélices α e hidrolizan mediante un mecanismo de simple desplazamiento con inversión de la configuración del carbono anomérico [20,21].

Una clasificación alternativa pero sólo para las quitinasas de plantas, se basa también en la similitud de su estructura primaria (Figura 1). Bajo este criterio las quitinasas de plantas se clasifican en siete clases (I-VII) [13,22–25]. Las clases I, II, IV, VI, VII y las endoquitinasas de clase V, pertenecen a las GH19, mientras que las clases III y las exoquitinasas de clase V, se agrupan en las GH18 [10,19]. Las quitinasas de las clases I, IV, VI y VII presentan un dominio catalítico y un dominio de unión a quitina (CBD, carbohydrate binding domain), conectados por una cadena polipeptídica de tamaño y secuencia variable, que generalmente es rica en prolinas, serinas y glicinas [23]. Existe una gran similitud en los dominios catalíticos de estas clases (Figura 1), pero los de las enzimas de clases IV y VII

presentan un grupo de deleciones [14]. Las quitinasas de la clase II, también presentan un dominio catalítico muy similar a los de las clases II, IV, VI y VII, pero carecen del dominio CBD [14]. Las quitinasas de las clases III y V presentan dominios catalíticos con secuencias muy diferentes del resto de las clases y una de las enzimas de clase V presenta dos dominios CBD en tándem [26], pero el resto de los miembros de esta clase carecen de este dominio. Adicionalmente, todas las quitinasas de plantas presentan un péptido señal en el extremo amino y las de clase V y las de la subclase Ia, presentan otro péptido señal en el extremo carboxilo que las direcciona a la vacuola [27]. (Figura. 1).

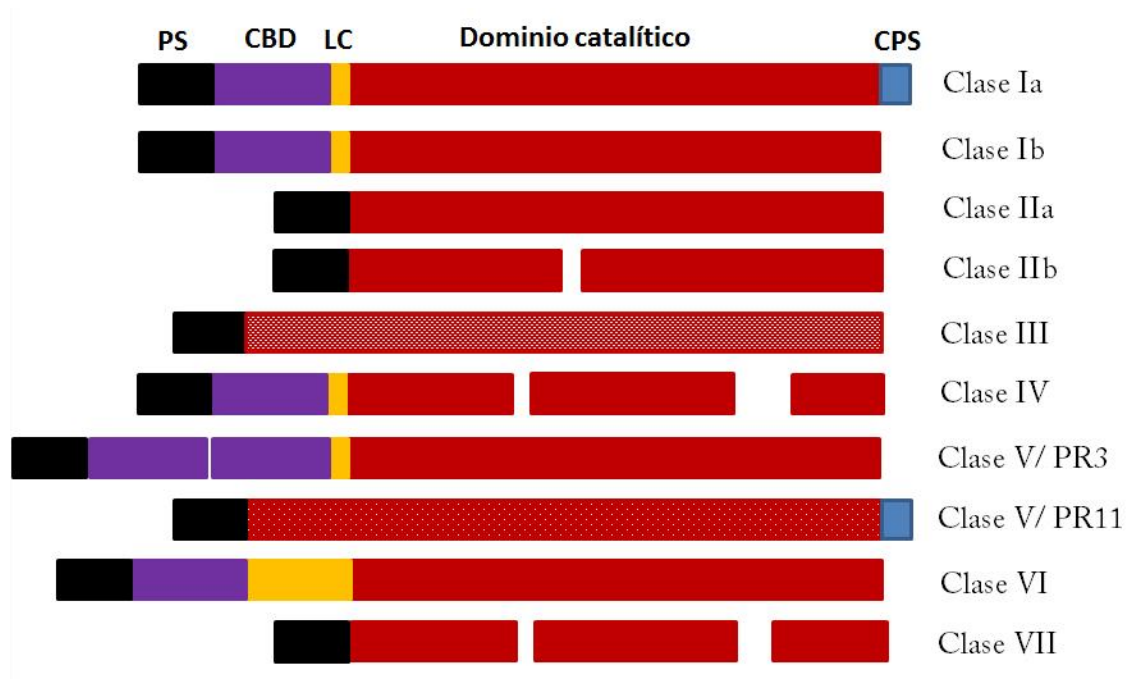


Figura 1. Clasificación de las quitinasas de plantas según su identidad de secuencia. PS: Péptido señal. CBD: Dominio de unión a carbohidratos (del inglés *Carbohydrate Binding Domain*). LC: Asa o conector entre el dominio CBD y el dominio catalítico. CPS: Péptido señal del extremo carboxilo.

Numerosos estudios indican que una planta puede poseer más de una quitinasa que pertenezcan a diferentes clases, o varias isoformas con funciones redundantes para garantizar el cumplimiento de la función biológica [28–31].

La mayoría de las investigaciones sobre la relación estructura-función de las quitinasas de plantas, pertenecientes a las clases I y IV, se han llevado a cabo en dominios catalíticos libres o en complejos con oligosacáridos de GlcNAc de hasta seis unidades [32,33]. Sin embargo, para las enzimas de la clase I no ha sido posible obtener una estructura

cristalográfica completa debido a la flexibilidad de la región conectora que une los dos dominios. Sólo hay un reporte en el que ambos dominios, sin el conector, se observan en la estructura cristalográfica (PDB 2DKV) [34]. Estos dominios parecen contribuir de manera diferente a la actividad de las quitinasas de clase I, incluso en funciones relacionadas con la defensa [18,31]. Por lo tanto, es interesante realizar estudios que brinden información sobre la distribución espacial de ambos dominios y su importancia en la actividad y las propiedades cinéticas de las quitinasas de clase I. La caracterización estructural de las quitinasas de las plantas puede conducir al desarrollo de nuevas enzimas quiméricas que podrían usarse para obtener variedades de plantas más resistentes a los patógenos [35].

2. ANTECEDENTES

A pesar de que es muy conocida la importancia de las quitinasas en las plantas, ninguna ha sido aislada del género *Agave*. Hasta el momento sólo se han identificado cuatro enzimas en el transcriptoma de esta planta, y se aislaron y caracterizaron a partir del ARN total: dos fructosiltransferasas (1-SST y 6G-FFT) y dos tipos de invertasas (pared celular y vacuolar) [36]. Los agaves son plantas monocotiledóneas suculentas nativas de desiertos o ambientes moderadamente secos de América del Norte. El género *Agave* tiene un gran valor socioeconómico y agroecológico, especialmente en las regiones cálidas y propensas a la sequía del mundo. A pesar de su adaptabilidad, las agaveaceas, como el resto de las plantas, son propensas a adquirir enfermedades como las causadas por insectos y hongos. Dentro de este género, *el Agave tequilana* se usa principalmente para la elaboración de bebidas y en la conservación del suelo. Además, estudios recientes han demostrado que esta planta puede ser una fuente importante de materias primas para la obtención de bioenergía lignocelulósica [37–39].

En trabajos previos, nuestro grupo encontró la existencia, en extractos de hojas de la planta *Agave tequilana* Weber, de actividad de tipo quitinasa. Estas actividades se detectaron en plantas infectadas con el hongo *Fusarium oxysporum*, lo que sugiere que puedan estar involucradas en los mecanismos de defensa de esta especie de *Agave*.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, en este trabajo nos planteamos la siguiente hipótesis:

3. HIPÓTESIS

La planta *Agave tequilana* posee quitinasas que presentan actividad antifúngica frente a hongos fitopatógenos, por lo cual pueden ser clasificadas como proteínas relacionadas con la patogénesis.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general.

- Realizar la caracterización bioquímica y estructural de quitinasas de *A. tequilana* con actividad antifúngica frente a hongos fitopatógenos.

4.2. Objetivos específicos.

- 1- Identificar quitinasas en plantas de *A. tequilana* infectadas con *F. oxysporum*.
- 2- Expresar por vía recombinante a dichas quitinasas, posibles constituyentes del sistema de defensa de la planta *A. tequilana* Weber.
- 3- Purificar a homogeneidad las enzimas expresadas.
- 4- Caracterizar bioquímica y estructuralmente a las enzimas purificadas.
- 5- Realizar ensayos de actividad antifúngica *in vitro* frente a hongos patógenos de plantas.
- 6- Montar pruebas de cristalización y en caso de obtener cristales que difracten adecuadamente, determinar las estructuras tridimensionales de las enzimas cristalizadas. Si no se obtienen los cristales adecuados, emplear un método de resolución de estructura en disolución para obtener datos de la estructura 3D de la(s) enzima(s).

5. MATERIALES Y MÉTODOS:

5.1. Materiales

Las cepas DH10 α y Rosseta Gami de *Escherichia coli* empleadas para la expresión de las proteínas recombinantes procedían de Novagen (Wisconsin, USA) y la cepa Shuffle c3029 se compró a New England BioLabs (Massachusetts, USA). El plásmido pJET1.2/blunt provino de Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). Los plásmidos pET32a y pMCSG7 se compraron a Novagen and SnapGene (Wisconsin and Iowa, USA), respectivamente. Para los cultivos celulares se usó el medio Luria Bertani (LB). Las plantas de *A. tequilana* usadas para la extracción de ARN se colectaron en una plantación en Atotonilco el Alto Jalisco, México. Estas plantas se cultivaron en suelo estéril y mantuvieron a temperatura ambiente. Las cepas de *F. oxysporum*, *Alternaria alternata* y *Pythium aphanidermatum* se aislaron de cultivos vegetales infectados. La cepa *Aspergillus sp.* fue el hongo microscópico IQ-051, obtenido de una muestra de suelo de humedal colectada en la región de Tamiahua, Veracruz, México.

5.2. Métodos

5.2.1. Identificación y aislamiento de las quitinasas AtChi1 y AtChi2

Con el objetivo de identificar un gen que codificara para una quitinasa de *A. tequilana*, se realizó un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de quitinasas de diferentes clases, provenientes de plantas también diversas. El alineamiento se realizó en el programa ClustalX versión 2.0 [40]. Una vez que se identificó una región altamente conservada del dominio catalítico, que incluía los dos residuos de ácido glutámico involucrados en la catálisis de este tipo de enzimas, se tradujo este fragmento de secuencia a ARN. Teniendo en cuenta que el genoma de *A. tequilana* no se encuentra descrito y que sólo se encuentra el transcriptoma depositado en forma de lecturas cortas, la secuencia previamente descrita se usó como objeto de búsqueda en las lecturas mencionadas (BioProject PRJNA193469) [41]. Cuando la secuencia se encontró, se continuó el ensamblaje de ésta hacia los extremos 3' y 5' hasta encontrar el codón de inicio y el codón de término del transcrito. Este transcrito se tradujo y se realizó un nuevo alineamiento empleando el servidor PSI-BlastP de Expasy [42]. Este último alineamiento confirmó que habíamos encontrado una quitinasa de clase I, donde los primeros 20 aminoácidos del extremo amino corresponden a un péptido señal según la predicción de los servidores SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)[43] y Phobius (<http://phobius.sbc.su.se/>)[44]. La

secuencia ensamblada a partir de las lecturas cortas del transcriptoma se envió a sintetizar en la compañía GenScript (Nanjing, China) y nombrada AtChi1 (del inglés chitinase from *A. tequilana* 1). Adicionalmente, con la secuencia encontrada se diseñaron oligonucleótidos que nos permitieran aislar el gen que codificaba para esta enzima sin el péptido señal. Las secuencias de los oligonucleótidos fueron las siguientes: 5'-GCTCCCACGCACAGCAATGTGGGAGCC-3' (sentido) y 5'-CTAAAAATGACTCTGGTCCCACAGTCC-3' (antisentido).

Se extrajo el ARN total de las cuatro partes principales (raíz, tallo, piña y hojas) de plantas sanas e infectadas por *Fusarium oxysporum* usando el reactivo Trizol (Massachusetts, USA). Brevemente, las diferentes partes de las plantas se cortaron en pedazos de cerca de 1 cm² y luego de lavarlas se congelaron en nitrógeno líquido y maceraron en mortero previamente enfriado. El polvo obtenido se suspendió en Trizol siguiendo las indicaciones del fabricante. El ADNc se sintetizó mediante el uso del estuche reactivo ProtoScript® II First Strand cDNA Synthesis Kit procedente de New England BioLabs siguiendo las indicaciones del fabricante. Con el objetivo de facilitar la manipulación de los productos de PCR se introdujeron sitios de corte de *EcoRI* y *KpnI* en los oligonucleótidos sentido y antisentido, respectivamente. Sólo se lograron obtener amplificadas a partir de las hojas de las plantas infectadas, los cuales se clonaron en el vector pJET1.2/blunt siguiendo las instrucciones del estuche reactivo ClonJET. Las clonas positivas se confirmaron por secuenciación y la proteína obtenida se nombró AtChi2, por presentar seis cambios de aminoácidos respecto a AtChi1.

En ambas construcciones se introdujo un sitio de corte de TEV entre la etiqueta de histidina conferida por los vectores y la secuencia de las proteínas. Para realizar esto, se diseñaron oligonucleótidos que contenían esta secuencia de corte reconocida por la proteasa y en la amplificación ya se incorporaron esas secuencias en el sitio deseado. Las clonas positivas de ambas construcciones se insertaron³ en los vectores de expresión pET32a y pMCSG7, con los cuales se transformaron mediante choque térmico las cepas Rosseta Gami y Shuffle de *E. coli* para la obtención recombinante de AtChi1 y AtChi2, respectivamente.

5.2.2. Expresión heteróloga y purificación de AtChi1 y AtChi2

Las células de ambas cepas de *E. coli* se cultivaron en medio Luria Bertani (LB). La cepa Rosetta gami que contenía la construcción de AtChi1 se incubó a 37°C hasta que el cultivo alcanzó una absorbancia a 600 nm de 0.6. En ese momento se añadió isopropil-1-tio-β-D-

galactopiranosido (IPTG) hasta una concentración final de 0.5 mM y se incubó a 18 °C por 16 horas. Por otra parte, la cepa SHuffle que contenía la construcción de AtChi2 se incubó a 30°C hasta que el cultivo alcanzó una absorbancia de 0.7 a 600 nm. Se añadió IPTG hasta una concentración final de 1 mM y se incubó a 16 °C por 18 h. Las células de cada una de las cepas se colectaron mediante centrifugación a 15300 x g por 10 minutos y se resuspendieron en amortiguador de ruptura (Tris/ HCl 20 mM, pH 8.0; NaCl 300 mM; PMSF 1 mM). El botón de células se lisó por sonicación y el lisado se separó del debris celular por centrifugación a 30000 x g durante 45 minutos.

Los pasos de purificación empleados fueron los mismos para ambas proteínas. Los sobrenadantes de los lisados celulares se inyectaron en una columna HisTrap de afinidad por iones metálicos (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA), previamente equilibrada con 5 volúmenes de columna de Tris/HCl 20 mM, pH 8.0; NaCl 300 mM; imidazol 20 mM. Las proteínas de fusión se eluyeron incrementando la concentración de imidazol en un gradiente lineal hasta 160 mM. Las proteínas de fusión parcialmente purificadas se sometieron a corte con la proteasa TEV ($[TEV] / [Prot] = 1/100$ en amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 8.0, DTT 1mM, a 4°C durante toda una noche) para eliminarles las etiquetas de histidina y se recircularon después del corte por la misma columna HisTrap. Las fracciones no retenidas en esta segunda cromatografía se concentraron e inyectaron a una columna de exclusión molecular Superdex 75 16/60 equilibrada con 2 volúmenes de columna de Tris/HCl 20 mM, pH 8.0; NaCl 150 mM y montada en un equipo Akta Explorer en sistema FPLC. Después de este paso, ambas proteínas quedaron totalmente puras, lo cual se verificó mediante el análisis de las muestras con MALDI-TOF. Los pasos de purificación se monitorearon por electroforesis en geles de poliacrilamida con tinción de Coomassie [45]. Las concentraciones de proteínas durante todo el proceso de purificación se determinaron empleando los coeficientes de extinción molar teóricos a 280 nm referidos a una concentración proteínas de 1 mg/mL para ambas enzimas cuyos valores fueron de 1.76 y 1.71 mL/cm*g para AtChi1 y AtChi2, respectivamente. Finalmente, la monodispersidad y estado de oligomerización de las muestras se determinaron usando dispersión dinámica de luz en un instrumento Malvern Zetasizer.

5.2.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) y en agarosa

Las SDS-PAGE de proteínas se realizaron al 12.5 % de entrecruzamiento de acrilamida-bisacrilamida, según el procedimiento informado por Laemmli (1970)[45]. Las muestras se

desnaturalizaron mediante calentamiento a 100°C durante 5 min en una mezcla 1:5 de amortiguador de carga compuesto por Tris-HCl 0.06 mol/L, pH 6.8 con SDS 2%, bromofenol Azul 0.025%, glicerol 10% y β -mercaptoetanol 5%, con el bromofenol azul como marcador del frente de corrida. Las corridas electroforéticas se realizaron a voltaje constante (110 mV). Para ello se empleó una fuente de corriente BioRad PowerPac Basic y una cámara Bio-Rad MiniProtean Tetra Cell. La tinción se realizó con una solución de *Coomassie Brilliant Blue* R-250 al 0.1% en una mezcla de agua, metanol y ácido acético (50:40:10, v/v/v) o con plata no amoniacal [46].

Las electroforesis de ácidos nucleicos se realizaron en agarosa al 1%, a un voltaje constante de 90 mV en una cámara Amershan Pharmacia Biotec EPS 301 y se revelaron con bromuro de etidio. Se usó un marcador de peso molecular de 1 Kb.

5.2.4. Determinación de las masas moleculares, puntos isoeléctricos y espectros de dicroísmo circular de AtChi1 y AtChi2

La masa molecular de las proteínas recombinantes se obtuvo utilizando espectrometría de masas de ionización/desorción láser asistida por matriz, con detector de tiempo de vuelo (MALDI-TOF, por sus siglas en inglés) (Microflex, Bruker). Se usaron 20 μ g de cada proteína para el análisis. El estándar para la calibración de masa fue la triosa fosfato isomerasa de conejo (M_r 32.62 kDa). La matriz utilizada fue una disolución saturada de ácido sinapínico en acetonitrilo acuoso al 30% (v/v), ácido trifluoroacético al 0,1% (v/v). Las muestras se analizaron utilizando el software Flex analysis 3.0TM (Bruker).

Los puntos isoeléctricos pI de las AtChi1 y AtChi2 se determinaron usando un gel de isoelectroenfoque (IEF) PhastGel con un gradiente de pH de 3-9 en un equipo PhastSystem (GE Healthcare Life Sciences) siguiendo las indicaciones del fabricante. Se empleó como referencia el marcador Broad range pI (pH 3-10).

Los valores teóricos de masa molecular y pI de cada enzima se calcularon en el servidor ExPASy ProtParam tool [47].

Los espectros de dicroísmo circular (DC) se obtuvieron a 20 °C utilizando un espectropolarímetro Jasco-J1500 (Jasco, MD, EE. UU.) equipado con un sistema de control de temperatura Peltier. Las soluciones de AtChi1 y AtChi2, a una concentración de 0.2 mg/mL, se dializaron contra agua desionizada usando una membrana de diálisis Spectra/Por (MWCO 6000-8000) y se filtraron con filtros de membrana Durapore (tamaño de poro de 0.22 μ m). Se obtuvieron espectros en la región del UV lejano para cada muestra

de 185 a 260 nm en una celda de 1 mm de longitud de trayectoria. Los experimentos se determinaron por triplicado, promediándolos para obtener los espectros finales de las dos proteínas. Todos los valores de absorbancias se convirtieron a elipticidades molares $[\theta]$ ($\text{deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$) empleando la ecuación 1. El servidor BeStSel (Selección de Estructura Beta) [48] se utilizó para analizar los espectros de CD de ambas enzimas.

$$[\theta] = \frac{\theta \cdot 100 \cdot \text{MW}}{c \cdot l}$$

Ecuación 1. Cálculo de elipticidad molar. Donde θ es la medida de la elipticidad en grados, l es el paso óptico de la celda empleada en cm, c es la concentración de proteínas en mg/mL y MW es la masa molecular de la proteína en g/mol.

5.2.5. Ensayo de actividad quitinolítica y preparación del sustrato quitina coloidal.

La actividad endoquitinasa se determinó mediante el método de cuantificación de azúcares reductores con ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). El método consiste en hacer reaccionar el ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), de color amarillo con azúcares reductores para convertirlo en ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, de color rojo. Una vez terminada la reacción enzimática de liberación de los azúcares se añade a la mezcla 1 mL de DNS y se incuba durante 10 min a 100°C. Después de enfriar se mide absorbancia a 550nm [49].

El sustrato empleado para los cálculos de los parámetros cinéticos de ambas enzimas fue la quitina coloidal. Para preparar este sustrato se siguió la metodología descrita por Khan y colaboradores en 2010 [50]. Brevemente, se empleó quitina de camarón comercial (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) y se preparó de la siguiente forma: se pesaron 40 g de la quitina y se pusieron en un vaso de precipitado al que se agregaron 500 mL de HCl concentrado (37 %, equivale a 12-12.5 M) y se agitó la mezcla a 4°C durante una hora para lograr la hidrólisis de la quitina. A continuación, el hidrolizado se lavó con abundante agua destilada para eliminar el ácido hasta alcanzar un pH entre 6.0 y 7.0. Una vez alcanzado este pH se filtró el coloide en papel de filtro a presión reducida y el producto se guardó en forma de pasta a 4°C hasta su empleo. Para los ensayos de actividad esta quitina coloidal se preparó a 2 g/mL, o sea se tomaron 2 g del coloide húmedo y se les agregó 1 mL de amortiguador.

5.2.6. Determinación del pH óptimo y la estabilidad frente al pH.

El pH óptimo de cada enzima se determinó realizando el ensayo de actividad enzimática frente a quitina coloidal a 37 °C en diferentes amortiguadores a concentraciones de 20 mM y valores de pH entre 3.0 y 10.0. Los amortiguadores utilizados fueron: fosfato monobásico de sodio/ ácido fosfórico (pH 3.0), acetato de sodio/ ácido acético (pH 4.0 y 5.0), fosfato dibásico de potasio/ ácido fosfórico (pH 6.0 y pH 7.0), y Tris-base/ ácido clorhídrico (pH 8.0-10.0). Ambas enzimas mostraron mayor actividad a pH 5.0, por lo cual este pH fue establecido como pH óptimo. Para evaluar la estabilidad de las enzimas a estos valores de pH, las enzimas se incubaron en estos amortiguadores durante 48 h a 4 °C. Luego de la incubación, las muestras se pusieron en las condiciones de reacción a 37 °C y pH 5.0 en amortiguador de NaAc/HAc, y se determinaron las actividades enzimáticas residuales de las enzimas frente al sustrato quitina coloidal a una concentración de 2 g/mL.

5.2.7. Ensayos de estabilidad térmica

Los ensayos de estabilidad térmica y determinación de la temperatura media de desnaturalización (T_m) se realizaron mediante fluorimetría diferencial de barrido (Thermal Shift). Se emplearon estuches de variación de pH, estabilidad y solubilidad frente a diferentes fuerzas iónicas y amortiguadores. El experimento se realizó en una placa de PCR de 96 pozos y se utilizó un equipo de RT-PCR. En cajas de 96 pozos, se utilizó un volumen de 20 μ L de las soluciones de enzimas que se añadió al fluoróforo Sypro Orange [51] a una concentración 5x para observar el cambio en la temperatura media de desnaturalización (T_m). El barrido de temperatura se realizó en un gradiente continuo de 25 a 95 °C. El valor de T_m se obtuvo realizando una regresión no lineal, usando la ecuación de Boltzmann, de las secciones sigmoideas de los espectros de fluorescencia. Para tal fin se empleó el programa Graph-Pad.

5.2.8. Ensayos de actividad quitinolítica y especificidad de sustratos

Los ensayos de actividad enzimática de las quitinasas de *Agave tequilana* se realizaron empleando quitina coloidal como sustrato y se cuantificaron con el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) para detectar azúcares reductores [50]. Los ensayos se realizaron en cinética del estado estacionario, en condiciones de velocidades iniciales, para lo cual se emplearon 16 diferentes concentraciones de sustrato entre 0.12 y 19.4 mg/mL. Para determinar estas concentraciones se tomó un volumen de la quitina coloidal preparada y se deshidrató para eliminar el amortiguador y determinar que masa de quitina hay por cada

gramo de sustrato preparado. Con este valor se calcularon las concentraciones para cada punto de la curva. A disoluciones de AtChi1 de 2.73 mg/mL y de AtChi2 de 1.45 mg/mL se les agregaron las diferentes concentraciones de sustrato (0.12-19.4 mg/ml) en amortiguador de acetato de sodio/ ácido acético 50 mM, pH 5.0, hasta un volumen total de 1.4 mL, y se incubó la mezcla de reacción con agitación suave a 37 °C durante 24 h. Es importante mencionar que se verificó que la curva típica mantuviera linealidad, una vez pasadas estas 24 horas. Transcurrido ese tiempo los tubos de reacción se centrifugaron a 14000 x g durante 5 min, se tomaron 0.4 mL de sobrenadante y se les añadieron 0.7 mL de DNS. Esta nueva mezcla se calentó a ebullición durante 15 min y luego se dejó enfriar a temperatura ambiente para medir la absorbancia de cada muestra a 550 nm. Se empleó una curva patrón de N-acetil-glucosamina para la cuantificación de los azúcares reductores producidos por la acción de la enzima. Una unidad de actividad se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar un nmol de N-acetil-glucosamina en una hora en las condiciones del ensayo. Todas las mediciones se realizaron por triplicado y se empleó como control negativo de cada concentración una mezcla sin enzima. Los resultados se representaron gráficamente y se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten empleando el programa Graph-Pad para obtener los valores de K_m y V_{max} de las enzimas.

Para determinar la especificidad por el sustrato se empleó quitotriosa y quitohexosa, y la misma metodología descrita para la quitina coloidal. Se emplearon las mismas concentraciones de enzima que en los ensayos previamente descritos y una concentración de sustrato de 5 mM en amortiguador de acetato de sodio/ ácido acético 50 mM, pH 5.0 hasta un volumen total de 700 μ L y se incubó la mezcla de reacción con agitación suave a 37 °C durante 24 h. Pasado ese tiempo los tubos de reacción se centrifugaron a 14000 x g durante 5 min, se tomaron 0.3 mL de sobrenadante y se les añadieron 0.5 mL de DNS. Esta nueva mezcla se calentó a ebullición durante 15 min y luego de dejar enfriar a temperatura ambiente, se midió la absorbancia de cada muestra a 550 nm.

Para determinar las actividades de quitobiosidasa y exoquitinasa, se realizó un ensayo fluorométrico con 4-metilumbeliferil-N-acetil- β -D-glucosaminida y 4- metilumbeliferil- β -D-N, N'-diacetilcitobiosido (Sigma, St. Louis, EE. UU.). La cantidad de 4-metilumbeliferona (4-MU) liberada se midió por espectrofluorimetría utilizando un espectrofotómetro de fluorescencia (Biotek Synergy HT) (excitación 360 nm y emisión 450 nm). Cada uno de los sustratos se disolvió en 0.5 mL de amortiguador de acetato de sodio/ácido acético 50 mM (pH 5.0) para dar soluciones de sustrato 0.036 mM. Se añadieron 10 μ L de la solución enzimática (1.48

mg/mL) a la solución de sustrato y la mezcla se incubó a 37 ° C. Como control, la solución de sustrato también se incubó en ausencia de quitinasa. Se retiró una porción (0.1 mL) de la mezcla de reacción después de un tiempo de reacción apropiado y se mezcló con 0.5 mL de amortiguador Na₂HPO₄-NaOH 0.4 M, pH 11.9, para terminar la reacción enzimática. La intensidad de fluorescencia de la solución resultante se midió a 450 nm con excitación a 360 nm usando un espectrofluorómetro Biotek Synergy HT. La concentración de 4-MU liberada de los sustratos fluorogénicos se calculó a partir de una curva de calibración obtenida usando soluciones estándares de UMB después de restar el valor de control.

5.2.9. Ensayos de calorimetría de titulación isotérmica usando quitohexosa como ligando

AtChi1 y AtChi2 se dializaron exhaustivamente frente a un amortiguador de fosfatos 20 mM pH 7.0 y se concentraron, usando unidades de filtración Amicon-Ultra 0.5 (MWCO 10 kDa), hasta una concentración final de 100 µM. La quitohexosa se disolvió en el amortiguador de diálisis para obtener una solución de 6.7 mM. Las mediciones de ITC para ambas quitinasas con quitohexosa se realizaron a 290 K usando un NanoITC200 (200 µL en la celda de muestra) (Microcal, GE Healthcare, MA, EE. UU.). El valor del pH y la temperatura (pH 7.0 y 290 K) se seleccionaron para medir esencialmente la unión y no la hidrólisis de la quitohexosa. La reacción de unión se controló registrando la liberación de calor tras pequeñas adiciones de la solución de quitohexosa a cada solución de proteína. En el experimento, se valoraron 33 inyecciones (1.2 µL cada una) de la solución de quitohexosa en la solución de proteína. La solución se agitó a 350 rpm y se midió el calor de reacción resultante. El calor de dilución de la quitohexosa se obtuvo adicionando el ligando en la solución amortiguadora en condiciones idénticas y programa de inyección utilizado con las muestras de enzimas. El cambio de entalpía (ΔH) y la constante de unión (K_a) se determinaron a partir de la curva experimental utilizando el software ORIGIN versión 7.0.

5.2.10. Análisis de Dispersión de Rayos-X de Ángulo Pequeño (SAXS, *Small Angle X-ray Scattering*)

Los experimentos de SAXS se realizaron en la Fuente de Luz de Radiación-Sincrotrón de Stanford, California, EUA. Los datos se colectaron en la estación experimental 4-2, que está equipada con un detector Rayonix MX225HE CCD (charge couple device). Las mediciones se realizaron a utilizando diferentes concentraciones de proteínas de 0.23, 0.46, 0.94, 1.88, 3.75, 7.5 hasta 15 mg/mL en amortiguador MES 50 mM, pH 6.0 a temperatura ambiente (\approx

15 °C). La colecta se realizó empleando un haz de rayos X con una longitud de onda de 1.127 Å a una distancia del detector de 1.7 m que permitió un intervalo de medición de $0.007 < q < 0.5 \text{ \AA}^{-1}$ ($q = 4\pi\sin\theta/\lambda$, donde θ es el ángulo de dispersión y λ es la longitud de onda). La dispersión de fondo generada por el amortiguador se sustrajo de las muestras empleando la suite de ATSAS [52]. El radio de giro (R_g) de cada proteína se calculó usando la aproximación de Guinier con el programa PRIMUS [53]. La función de distribución de pares (Pr) y el diámetro máximo de partículas ($D_{m\acute{a}x}$) se obtuvieron usando el programa GNOM [54]. Para generar los modelos de superficie por métodos *ab initio*, se emplearon 10 ciclos del programa DAMMIF [55] seguidos del programa DAMFILT[56], para obtener un promedio de los modelos de baja resolución obtenidos. El paquete UCSF Chimera se usó para optimizar el ajuste de los modelos por homología obtenidos en Robetta para ambas quitinasas, a las superficies generadas en SAXS mediante minimización. Asimismo, se usaron los visualizadores de Chimera para preparar las figuras de superposición de modelos [57]. El programa CRY SOL [58] se empleó para calcular los ajustes de los modelos por homología a las superficies de SAXS antes y después de las minimizaciones.

5.2.11. Modelado por homología

Los modelos por homología se obtuvieron en el servidor Robetta, el cual busca la estructura cristalográfica de una proteína cuya secuencia aminoacídica tenga mayor identidad con la proteína a modelar. Luego se va generando un plegamiento similar al obtenido en la estructura molde y de los más de 100 modelos que se generan se filtran los mejores resultados por minimizaciones energéticas y se devuelven como respuestas cinco posibles estructuras. Estos cinco modelos se usaron para superponerlos a las superficies moleculares generadas en SAXS.

5.2.12. Simulaciones de acoplamiento (Docking)

Realizamos simulaciones *in silico* de acoplamiento molecular del oligosacárido (GlcNAc)₆ con AutoDock 4.0 [59] utilizando los modelos generados en Robetta de los dominios catalíticos (CatDs) de ambas quitinasas de Agave. Antes del acoplamiento, las coordenadas de quitohexosa se generaron con SMILES y se minimizaron en Chimera [57]. Los monosacáridos en (GlcNAc)₆ se nombraron como -4, -3, -2, -1 y +1, +2, comenzando desde el extremo no reductor. Los hidrógenos y las cargas se asignaron al receptor y los ligandos usando AutoDockTools 1.5.7 [59]. Las simulaciones de acoplamiento se ejecutaron utilizando el algoritmo Lamarckian Genetic, conocido por ser el método más

eficiente y confiable de Auto Dock. Los mapas de cuadrícula se calcularon utilizando AutoGrid. Inicialmente, los posibles sitios de unión se detectaron con base en un acoplamiento a ciegas, en el que la caja era lo suficientemente grande como para cubrir los CatD centrados en sus puntos medios (48.75 Å × 43.5 Å × 38.6 Å) a lo largo de los ejes x, y y z. El siguiente paso fue un acoplamiento enfocado con una caja más pequeña (26.3 Å × 22.5 Å × 22.5 Å), centrada en la hendidura o ranura de unión de carbohidratos del CatD que nos permitió obtener el mejor resultado de energía en los acoplamientos a ciegas. Los mejores modelos se seleccionaron en función de las puntuaciones de energía de unión. Identificamos y analizamos los residuos potencialmente involucrados en la unión del ligando utilizando Chimera [57].

5.2.13. Ensayos de actividad antifúngica

Los ensayos actividad antifúngica de AtCh1 y AtChi2 se realizaron utilizando la prueba de difusión en disco. El efecto inhibitorio de las quitinasas se probó en el crecimiento radial de los hongos fitopatógenos de importancia económica *F. oxysporum*, *A. alternata*, *P. aphanidermatum* (un oomiceto) y *Aspergillus sp.* Para el ensayo frente a los tres primeros hongos mencionados, las quitinasas purificadas se evaluaron a dos concentraciones diferentes (120 y 170 µg) en 7 µl de tampón estéril (MES 20 mM, pH 6.0) que se aplicaron a discos de papel estéril de 5 mm. Estos discos se colocaron en agar de dextrosa de patata en placas de Petri (5.4 cm de diámetro), cada uno con un inóculo sólido (tapón de agar de 5 mm³) en el centro de la placa que contenía el micelio de un cultivo de hongos de 2 días de antigüedad. Los discos se colocaron en el agar 24 horas después de la inoculación a una distancia de 5 mm del frente de crecimiento de las hifas. Las placas se incubaron durante 24 horas a 28 °C y se analizaron. Se usaron discos con H₂O estéril y tampón estéril como controles negativos. Para el ensayo frente a *Aspergillus sp.* se aplicaron también dos cantidades diferentes de quitinasas purificadas, 150 y 300 µg en una solución MES 20 mM estéril, pH 6.0, a discos de papel estériles de 5 mm también sobre agar de patata-dextrosa en placas de Petri (5.4 cm de diámetro), cada una con un inóculo central que contenía el micelio de un cultivo de hongos de un día de antigüedad. Nuevamente los discos se colocaron en el agar 24 horas después de la inoculación a una distancia aproximada de 5 mm del frente de crecimiento de las hifas. Las placas se incubaron durante 48 horas a 22 °C y se analizaron. En este caso se usaron discos con tampón estéril como controles negativos.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Recientemente, el estudio de las quitinasas ha sido un objetivo importante de numerosos proyectos de investigación debido a su enorme potencial de aplicaciones, tales como agentes de control biológico, para desarrollar especies resistentes a las plagas de plantas económicamente importantes [60,61], o por su papel como marcadores moleculares de numerosas enfermedades [62–64], y también son atractivas para estudios de ingeniería de proteínas [65,66]. En el presente trabajo se identificaron, obtuvieron y produjeron las primeras quitinasas del género *Agave* (AtChi1 y AtChi2) en células de *E. coli* y los productos recombinantes se purificaron y caracterizaron.

6.1. Obtención de las quitinasas de clase I a partir del transcriptoma y el cADN de plantas de *A. tequilana*.

Teniendo en cuenta que no se encuentra descrito el genoma de *A. tequilana*, en este trabajo comenzamos ensamblando la secuencia de una quitinasa de clase I a partir de lecturas cortas del transcriptoma. Una vez que el transcrito estuvo completo, la secuencia se tradujo y se realizó un alineamiento de la secuencia aminoacídica empleando BLAST en el servidor de NCBI [42], el cual confirmó que correspondía a una quitinasa de clase I. La secuencia obtenida con esta metodología la llamamos AtChi 1. Esta secuencia ya traducida a secuencia aminoacídica, mostró más del 66 % de identidad con quitinasas de clase I de *Poa pratensis*, *Ananas comosus*, *Zea mays* y *Oryza sativa*. El gen identificado codifica para una proteína de 324 residuos, incluyendo un péptido señal de 20 residuos ubicado en el extremo amino (mostrado en un recuadro verde en la Figura 2). Este péptido señal se confirmó con las predicciones de los servidores SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) [43] y Phobius (<http://phobius.sbc.su.se/>) [44], que indicaron que los primeros 60 pares de base codifican para un péptido señal que dirige a la proteína a secreción.

Después de este péptido señal, los residuos del 1 al 39 corresponden a un dominio de unión a carbohidratos (CBD18, del inglés *carbohydrate binding domain* 18) presente en las quitinasas de clase I, que muestra un plegamiento de tipo heveína [67,68]. Los residuos comprendidos entre la Gly40 y la Ser66 forman un asa flexible (mostrada en un recuadro azul en la Figura 2 y sombreado amarillo en la Figura 3A) que conecta el CBD18 y el dominio catalítico ubicado hacia el extremo carboxilo de la proteína.

Adicionalmente, obtuvimos, empleando RT-PCR, el ADNc de la planta. Empleando este ADN como molde amplificamos un fragmento de gen que codifica una quitinasa de *A. tequilana* de clase I, que carecía del péptido señal, a partir de hojas infectadas con *F. oxysporum*. Los productos de PCR obtenidos de las hojas infectadas se amplificaron y se sometieron a electroforesis en gel de agarosa. Se identificaron tres bandas de aproximadamente 900, 1000 y 1200 pb en el material de las hojas con cuatro semanas de infección (Figura 3B). Curiosamente, de las hojas con siete semanas de infección, sólo la banda de 900 pb era visible todavía. Esta banda se aisló, clonó y expresó (Figura 3B). En contraste con lo esperado, se identificó una nueva proteína que se nombró AtChi2.

La secuencia aminoacídica de esta enzima presenta sólo seis residuos diferentes de los de AtChi1 (que se muestran en verde en la Figura 3A), pero conserva los residuos ácidos Glu129 y Glu151, que se han descrito para otras quitinasas de clase I de plantas como los residuos catalíticos (que se muestran en magenta) (Figura 3A) [32,34,69]).

Estos resultados sugieren que durante la infección se podrían expresar más isoformas de quitinasa en la planta y que los genes de esta enzima responden de manera diferente al estrés biótico [70]. Las quitinasas de plantas se inducen como proteínas PR en respuesta al ataque de insectos u hongos o se expresan constitutivamente en tejidos vulnerables al ataque de patógenos [71–73]. Ambas quitinasas de *A. tequilana* pertenecen a la familia de clase I/GH19 y los residuos diferentes en sus secuencias (Figura 3A), están expuestos al disolvente, ubicados cerca del conector entre ambos dominios de la proteína y opuestos al surco de unión al sustrato. Este resultado es interesante porque se ha informado que la evolución molecular de las quitinasas de clase I está impulsada por la selección de mutaciones ventajosas, lo que provoca usualmente la aparición de numerosos reemplazos de aminoácidos en el sitio activo y en el surco de unión al sustrato [74], que no es el caso.

ChiAt1_Agave tequilana -----MKV-WM-LTIILTLTSSFLCSHAQQCGSQAGGAVCPNGLCCSQFGYCGSTSPYCGN 53
 Chi_Poa pratensis -----FL-VTTILAFALFKNSYRQQCGSQAGGALCSNRLCCSKFGYCGSTDPYCGT 53
 Chi1-like_Ananas comosus -----MRG-LV-VVTILVAAFAVSAHAEQQCGSQAGGATCPNCLCCSKFGFCGTTSDYCGT 58
 Basic endochi A_Ananas comosus -----MRG-VV-VVAMLAFAVSAHAEQQCGSQAGGATCPNCLCCSKFGFCGTTSDYCGT 58
 GH19/CBD1_Cephalotus follicularis MSATVTNT-LI-LMVAILASPLGRALAEQQCGSQAGGATCPNGLCCSKFGYCGSTSAYCGD 52
 Chi_Zea mays subsp. parviglumis MSATVTNT-LI-LIVAILASPLGRALAEQQCGSQAGGATCPNGLCCSKFGYCGSTSAYCGD 55
 Chi partial_Allium sativum M---MRA-LAVVAMVATAFAVPAARAEQQCGSQAGGALCPNCLCCSQFGWCGSTSDYCGS 50
 Chi C_Ananas comosus -----MKFSVFTILLVSTTASLPGVLAQQCGSQAGGALCPGGLCCSQWGYCGDTLPYCGD 55
 Class I Chi_Triticum aestivum -----MR--FW-ALVFLTLVSTLRITMPEQQCGSQAGAVCPGGLCCSKFGYCGSSADYCTN 53
 * :*****.* * .. *****:*:* : **

ChiAt1_Agave tequilana G-CQSQCGGG-SSPTPNPSPGGGGGGGGSGVSI I SSSLFDQMLLHRNDAACPANGFY 111
 Chi_Poa pratensis G-CQSQCGGG-GGGGGG---RGGGGGGGGSGVASI I SSSLFNQMLLHRNDAACPANGFY 108
 Chi1-like_Ananas comosus G-CQSQCNCG-SGPTPV-----TPTPSGGGVSSI VSQSLFEQMLLHRNDAACLAKGFY 110
 Basic endochi A_Ananas comosus G-CQSQCNCG-SGGTPVP-----VPTP-SGGVSSI I SSSLFDQMLLHRNDAACLAKGFY 110
 GH19/CBD1_Cephalotus follicularis GNCQSQCGGG---GGGGG-----GGGGGGSGVASI VSSALFDQMLKHRNENSCPAHGFY 104
 Chi_Zea mays subsp. parviglumis GNCQSQCGGGGGGGGGG-----GGGGGGSGVASI VSSALFDQMLKHRNENSCPAHGFY 109
 Chi partial_Allium sativum G-CQSQCSGS-CGSTPN-----PP---SGGGVASI I SSSLFNQMLLHRNDAACPANGFY 99
 Chi C_Ananas comosus G-CQSQCSFP-PPSPSPSPSPSPSPSPSGGDGVASI VSAALFDELLLHRNDAACPAGHFY 113
 Class I Chi_Triticum aestivum G-CQSNCPGG-SPSTPT-----PTPSGGGDISS LI SPALFDQMLKHRNDAACPAGHFY 105
 * * * : * * * * * . * . . : * * * : * * * : * * * : * * * : * * *

ChiAt1_Agave tequilana TYDAFVAAANAFSGFATTGADTQKREIAAFLAQTSHETTGGWPTAPDGPYSWGYCFLOE 171
 Chi_Poa pratensis TYDAFIAAANSFGGFTTGTIDINAKRELAFAAQAQTSHETTGGYPSAPDGPYAWGYCFKQE 168
 Chi1-like_Ananas comosus TYNAFIAAANSFAGFGTTGSTDVKKREVAFAAFLAQTSHETTGGWPTAPDGPYSWGYCFKQE 170
 Basic endochi A_Ananas comosus NYGAFVAAANSFSGFATTGSTDVKKREVAFAAFLAQTSHETTGGWPTAPDGPYSWGYCFNQE 170
 GH19/CBD1_Cephalotus follicularis TYNAFIAAANSFSGGFTTGDVATQKREIAAFLAQTSHETTGGWPTAPDGPYAWGYCFLOE 164
 Chi_Zea mays subsp. parviglumis TYNAFIAAANSFSGGFTTGDVATQKREIAAFLAQTSHETTGGWPTAPDGPYAWGYCFLOE 169
 Chi partial_Allium sativum TYAGFIAAANAFPGFGTTGAPDVQKRELAFAAFLAQTSHETTGGWATAPDGPYAWGYCFKEE 159
 Chi C_Ananas comosus QYEAFAAANAFVFGFTTGLDTRKREIAAFLAQTSHETTGGWPTAPDGPYAWGYCFLEE 173
 Class I Chi_Triticum aestivum TYDAFIAAAKSYPGFATTGDTDRKREIAAFLGQTSHETTGGWPTAPDGPYAWGYCFLOE 165
 * . * : * * * : * * * * * . : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * *

ChiAt1_Agave tequilana QGNP--GDYCVENDQWPCAPGKYYGRGPIQISYNYNYEPGCNAIRSDLLNNDLVASDP 229
 Chi_Poa pratensis QGNP--SDYCOASAQYPCAPGKYYGRGPIQISYNYNYEPGCNAIHQDLLNNDLVATDP 226
 Chi1-like_Ananas comosus QGAT--SDYCSFSSQWPCAPGKYYGRGPIQISYNYNYEPAGQAIQTDLNNDLVATDP 228
 Basic endochi A_Ananas comosus RGAT--SDYCTPSSQWPCAPGKYYGRGPIQISYNYNYEPAGQAIQTDLNNDLVASDA 228
 GH19/CBD1_Cephalotus follicularis QGNP--PDYCVQSAQWPCAPGKYYGRGPIQISYNYNYEPAGKAI GADLLNNDLVATDP 222
 Chi_Zea mays subsp. parviglumis QGNP--PDYCVQSAQWPCAPGKYYGRGPIQISYNYNYEPAGKAI GADLLNNDLVATDP 227
 Chi partial_Allium sativum QGGASGPDYCEPSAQWPCAPGKYYGRGPIQISYNYNYEPAGQAI GAGILANPDVATDP 219
 Chi C_Ananas comosus VGAT--ADYCVPTQWPCAPGKYYGRGPIQISYNYNYEPAGEALGVLDLNNPDVATDP 231
 Class I Chi_Triticum aestivum QGNP--GDYCVENDQWPCAPGKYYGRGPIQISYNYNYEPAGEAINVGLNNDVAVASDP 223
 * . * * * . * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * *

ChiAt1_Agave tequilana TVSFKTALWFWMTPQSPKPSCHDVITRAWTPSAADQAAGRVPFGVITNI IAGGVECGHG 289
 Chi_Poa pratensis TISFKTAIWFWMTAQSPKPSCHAVATGQWQPSAADQAAGRVPFGVITNI INGGVECGHG 286
 Chi1-like_Ananas comosus TVSFKTALWFWMTPQSPKPSHAVITGQWSPSSADQAAGRVPFGVITNI INGGLECGKG 288
 Basic endochi A_Ananas comosus TVSFKTALWFWMTPQSPKPSHDVITGRWSPSGADQAAGRVPFGVITNI INGGLECGRG 288
 GH19/CBD1_Cephalotus follicularis TISFKTAIWYWMTPQSPKPSCHDVITGQWTPSAADKSAGRLPGYGVITNI INGGLECGHG 282
 Chi_Zea mays subsp. parviglumis TISFKTAIWYWMTPQSPKPSCHDVITGQWTPSAADKSAGRLPGYGVITNI INGGLECGHG 287
 Chi partial_Allium sativum TVSFETAIVFWMTQSPKPSCHDVITGQWTPSAADTAAGRPLPGYGVITNI INGGLECGHG 279
 Chi C_Ananas comosus TISFETALWFWMTPQSPKPSCHDVITDRWTPSAADVSAGRLPGYGVITNI INGGLECGIG 291
 Class I Chi_Triticum aestivum TISFKTAFWFWMTPQSPKPSCHDVITGQWTPSADTQAGRVPFGVITNI INGGIECGKG 283
 * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * *

ChiAt1_Agave tequilana SDSRDEDRVGFYKRYCDILGVSYGDNLDGNSHF----- 324
 Chi_Poa pratensis SDTHVADRIGYKRYCDLLQVGYGDNLDGNSQAHF----- 321
 Chi1-like_Ananas comosus QDNRVADRIGYKRYCDLLGVSYGNNLDCYSQRPFPS----- 325
 Basic endochi A_Ananas comosus QDARVADRIGYKRYCDLLGVSYGDNLDGNSQNRPFPA----- 324
 GH19/CBD1_Cephalotus follicularis SDSRVADRIGYKRYCDILGVSYGDNLDGNSQNRPFPS----- 318
 Chi_Zea mays subsp. parviglumis SDSRVADRIGYKRYCDILGVSYGDNLDGNSQNRPFPS----- 323
 Chi partial_Allium sativum ADSRVADRIGYKRYCDLLGVSYGDNLDGNSQNRPFPS----- 316
 Chi C_Ananas comosus PDSRVADRIGYKRYCDIFGYSYGDNLDGNSQNRPFPS----- 333
 Class I Chi_Triticum aestivum SNSEMEDRIGYKRYCDILGVSYGNNLDCNSQSPFPS----- 320
 : . * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * *

Figura 2. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de PSI-Blast del AtChi1 ensamblado a partir de lecturas cortas del transcriptoma de *A. tequilana*, con siete quitinasas con la identidad de secuencia más alta. Las principales diferencias se encuentran en el péptido señal en la región N-terminal (residuos 1-20) (mostrada en cuadrado verde) o en el conector flexible entre los dominios catalítico y CBD (residuos 60-86, 40-66 en el proteína madura) (mostrada en cuadrado azul). El cuadrado rojo muestra el motivo NYNY presente en la secuencia buscada en el transcriptoma. * Residuos completamente conservados, : Residuos altamente conservados, . Residuos conservados.

Las quitinasas de agave conservan los residuos aromáticos implicados en la interacción con el sustrato y también los residuos catalíticos Glu129 y Glu151 (Figura 3A), incluido el motivo His-Glu-Thr-Thr, que está altamente conservado entre la clase I quitinasas [75]. El CBM18 también conserva los residuos involucrados en las interacciones con los oligosacáridos de GlcNAc (Ser19, Phe21, Tyr23 y Tyr30) [28] (Fig. 3A).

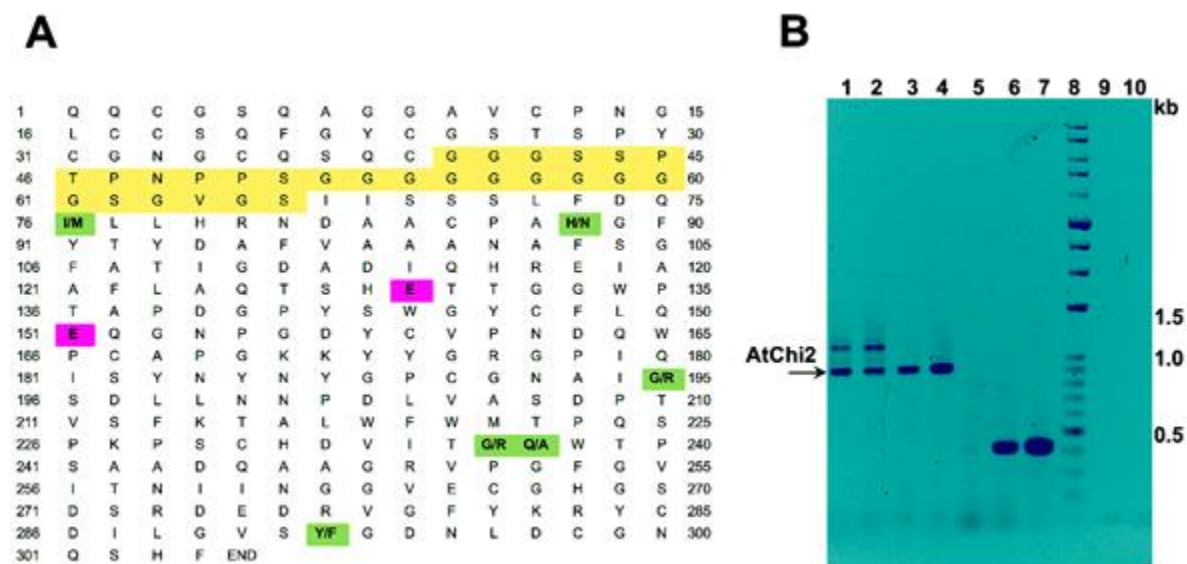


Figura 3. Secuencias de aminoácidos de quitinasas de *A. tequilana*. (A) Comparación de secuencias entre AtChi1 ensamblada a partir de lecturas cortas del transcriptoma de *A. tequilana* y AtChi2 aislada del ARN total de la planta infectada. AtChi1 madura comprende los residuos Gln1 a Cys39 que corresponden al CBD18, el conector entre el CBD18 y el dominio catalítico mostrado en amarillo (residuos Gly40-Ser66) y el dominio catalítico (residuos Ile67-Phe304). Los residuos en verde muestran las diferencias entre las dos isoformas, que están presentes en el dominio catalítico. Los residuos que se muestran en magenta son los Glu129 y Glu151 catalíticos. (B) Gel de agarosa que muestra el gen AtChi2 aislado del ADNc total de las hojas infectadas (plantas de *A. tequilana* después de cuatro y siete semanas de infección con *F. oxysporum*). Carril 1: hojas grandes (BL), cuatro semanas después de la infección; Carril 2: hojas pequeñas (SL), cuatro semanas después de

la infección; Carril 3; BL, siete semanas después de la infección; Carril 4: SL, siete semanas después de la infección; Carril 5: control negativo sin polimerasa; Carril 6: control positivo de PCR, fragmento BL-400 pb de gliceraldehído deshidrogenasa (GDH); Carril 7: SL-GDH; Carril 8: marcador de peso molecular de 1Kb; Carril 9: BL sin infección. Carril 10: SL sin infección.

Es importante mencionar que el gen se encontró también en el bulbo de la planta, pero no en su raíz, lo cual se muestra claramente en un gel de agarosa de los productos de PCR de las tres partes de la planta transcurridas 4 semanas de la infección (Figura 4). La ausencia de infección en la raíz se debe a que a pesar de que la infección entra por esa parte de la planta, los signos de la enfermedad se manifiestan más en las partes aéreas de las plantas y es por eso que las proteínas de defensa se expresan más en esas zonas [71–73]. Sin embargo, la expresión fue más notoria en las hojas al transcurrir el tiempo, por lo cual clonamos las bandas procedentes de esta parte de la planta.

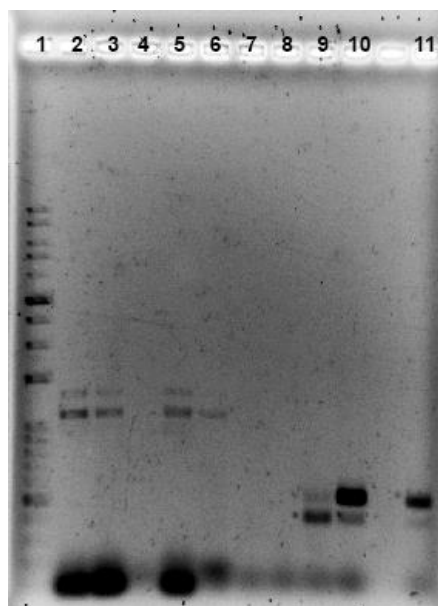


Figura 4. Gel de agarosa que muestra el gen AtChi2 aislado de bulbos y hojas de plantas de *A. tequilana* infectadas con *F. oxysporum* después de cuatro y siete semanas de infección. Carril 1: marcador de peso molecular de 1Kb; Carril 2: bulbo de planta chica, cuatro semanas después de la infección; Carril 3: hoja de planta chica, cuatro semanas después de la infección; Carril 4: raíz de planta chica, cuatro semanas después de la infección; Carril 5: bulbo de planta grande, cuatro semanas después de la infección; Carril 6: hoja de planta grande, cuatro semanas después de la infección; Carril 7: raíz de planta grande, cuatro semanas después de la infección; Carril 8: control negativo sin polimerasa; Carril 9: control positivo de PCR, fragmento BL-400 pb de GDH en raíz. Carril 10: control positivo de PCR, fragmento BL-400 pb de GDH en bulbo. Carril 11: control positivo de PCR, fragmento BL-400 pb de GDH en hoja.

6.2. Caracterización de las enzimas AtChi1 y AtChi2 purificadas

La purificación de AtChi1 y AtChi2 se realizó de manera muy similar. Partimos de cultivos celulares de 16 h de cepas de Rosetta Gami y SHuffle, respectivamente. Estas cepas se seleccionaron porque permiten la correcta formación de enlaces disulfuro, y las quitinasas vegetales de clase I generalmente tienen más de seis (tres en el dominio catalítico y cuatro en el CBD18). En nuestra metodología un paso crucial era el corte con TEV de la proteína para poder separarla con éxito de la mayoría de los contaminantes, pues la cromatografía de afinidad es la más selectiva de las técnicas que combinamos. Un análisis de un SDS-PAGE de la segunda cromatografía de afinidad con metal inmovilizado (IMAC), nos permitió ver que el corte fue efectivo y que la fracción no retenida contenía la proteína de nuestro interés (Figura 5) (La figura corresponde a un gel de purificación de AtChi1 pero ocurrió lo mismo con AtChi2).

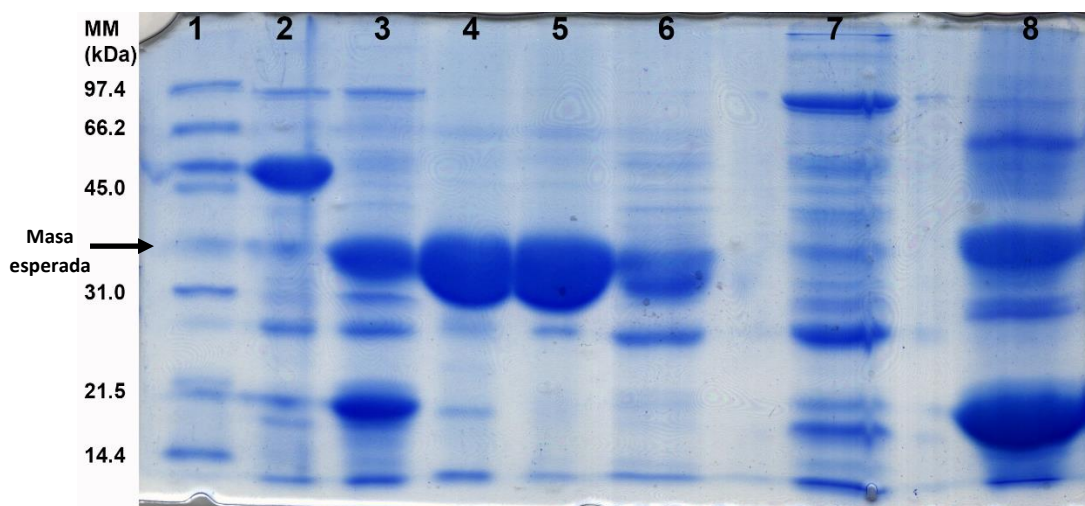


Figura 5. SDS-PAGE de fracciones procedentes de la segunda cromatografía por la columna de afinidad a níquel después del corte de la cola de histidinas y la proteína de fusión. Carril 1: marcador de peso molecular; Carril 2: Fracciones colectadas en lo retenido de la primera cromatografía de afinidad por níquel; Carril 3: Muestra cortada con TEV donde se observa claramente la separación de la proteína de fusión en dos bandas mayoritarias de 32 kDa y 17 kDa aproximadamente; Carriles 4 y 5: Fracciones no retenidas en la recirculación por la columna de níquel; Carril 6: Lavado con 10 mM de Imidazol para eluir lo retenido en la columna; Carril 7: carril vacío; Carril 8: Lavado con 50 mM de Imidazol para eluir lo retenido en la columna; Carril 9: carril vacío; Carril 10: Lavado con 400 mM de Imidazol para eluir lo retenido en la columna.

La combinación de la cromatografía de afinidad con la de exclusión molecular en sistema FPLC nos permitió obtener las dos enzimas con un alto grado de homogeneidad, lo cual se puede apreciar en geles SDS-PAGE, donde aparecen como bandas individuales cerca de 31 kDa (Figura 6A). AtChi1 y AtChi2 recombinantes se purificaron con rendimientos de 4

mg/L y 2 mg/L de cultivo, respectivamente. La enzima AtChi1 madura tiene 304 residuos, incluidas 17 cisteínas en posiciones conservadas de la familia de las quitinasas de clase I, con una masa molecular teórica de 31,7 kDa y pI de 4,7. AtChi2 es una proteína de 304 residuos que también exhibe las posiciones de cisteína conservadas y tiene una masa molecular teórica de 31.9 kDa y pI de 4.82. Estas masas teóricas se calcularon para las proteínas recombinantes con tres residuos adicionales en el extremo amino debido al sitio de corte para TEV, Gly-Gly-Ala para AtChi1 y Ser-Asn-Ala para AtChi2. Las masas de las dos proteínas se confirmaron por espectrometría MALDI-TOF (Figura 6B) con picos base m/z de 31.7 y 31.9 kDa, y los pI experimentales fueron 3.7 y 3.9 respectivamente.

Por otro lado, los espectros de DC en el UV lejano de ambas enzimas fueron muy similares y exhibieron un claro carácter helicoidal (Figura 6C) con dos picos negativos a 222 y 208 nm. Sin embargo, el análisis indicó una gran contribución de asas y regiones sin estructura secundaria. El servidor BeStSel estimó cantidades equivalentes de α -hélices y hebras β , 24.4% y 23.5%, respectivamente para AtChi1, mientras que para AtChi2 estos valores fueron 31.3% de α -hélices y 15% de hebras β . Es importante tener en cuenta que este servidor predijo un alto contenido de giros y regiones sin estructuras secundarias para ambas enzimas: 52.2% para AtChi1 y 53.6% para AtChi2, resultados que están de acuerdo con la presencia de asas y regiones flexibles comunes en las quitinasas de clase I "loopful" (ricas en asas) de plantas (Figura 6C) [33,34,76,77].

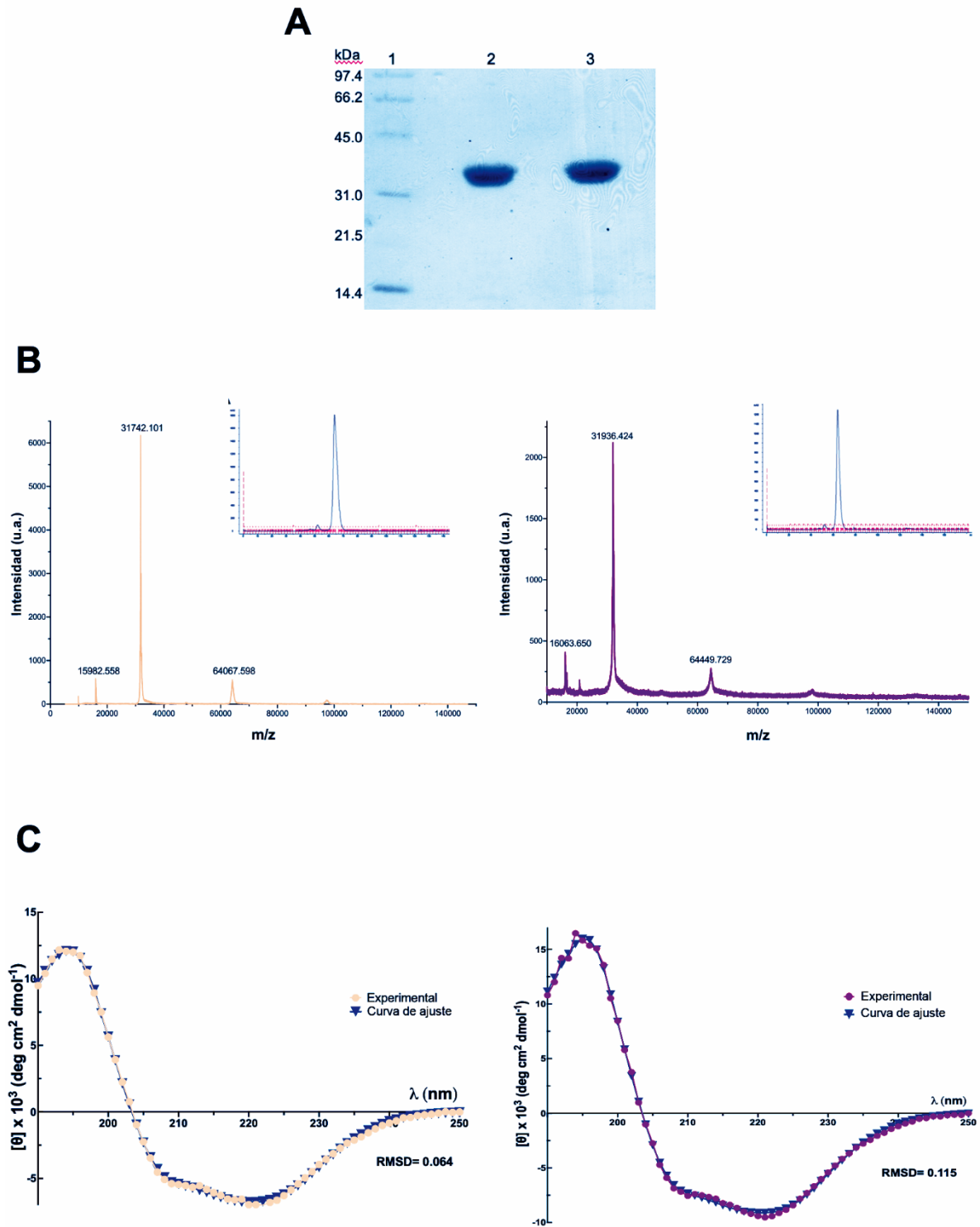


Figura 6. Pureza, determinación de masa y análisis de plegamiento de AtChi1 y AtChi2. AtChi1: lado izquierdo (amarillo) y AtChi2: lado derecho (púrpura). (A) SDS-PAGE de las enzimas purificadas: Carril 1, marcadores de peso molecular (kDa); Carril 2, AtChi1, Carril 3 AtChi2. (B) espectros MALDI-TOF para ambas enzimas; los insertos corresponden al perfil de elución SEC de

las enzimas puras. (C) espectros de DC en la región UV lejana. [AtChi1] = 0.186 mg/mL, [AtChi2] = 0.23 mg/mL.

Se realizó una curva típica para ambas enzimas para verificar que a las 24 horas todavía se encontraban en condiciones de velocidades iniciales. Esta gráfica se muestra en la Figura 7.

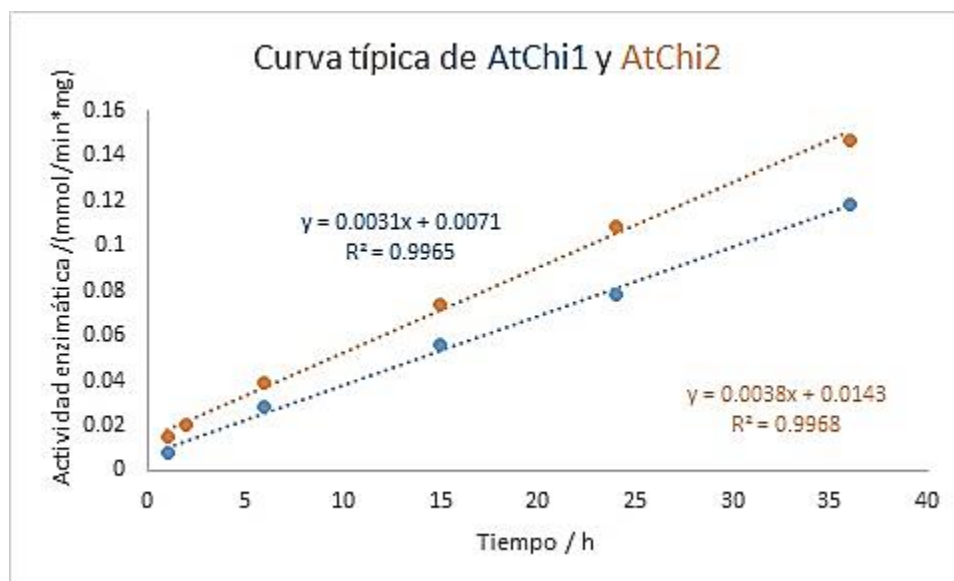


Figura 7. Curvas típicas de AtChi1 y AtChi2. En azul se muestran los puntos y la ecuación de ajuste de AtChi1 y en naranja los de AtChi2.

Notablemente, ambas quitinasas sólo mostraron una actividad importante sobre la quitina coloidal insoluble, dos órdenes de magnitud más alta que la actividad observada cuando los oligosacáridos quitohexosa (GlnNac)₆ y quitotriosa (GlnNac)₃ se usaron en las mismas condiciones (Figura 8). No se detectó actividad con 4- metilmbeliferil-N-acetil-β-D-glucosaminida, y 4- metilmbeliferil-N, N'-diacetil-β-D-quitobiósido. Este resultado sugiere que los centros activos de AtChi1 y AtChi2 son muy espaciosos para acomodar sustratos pequeños, por lo cual estos oligosacáridos quedan alejados de los residuos catilíticos para una eficiente escisión, lo cual sucede también con algunas otras endoquitinasas. Sin embargo, cuando el sustrato tiene más unidades de N-acetilglucosamina entonces la catálisis sí puede transcurrir.

El efecto del pH sobre la estabilidad de las dos quitinasas se midió utilizando diferentes amortiguadores, con valores de pH que oscilaron entre 2.0 y 10.0. Como se muestra en la Fig. 9A, ambas quitinasas mostraron ser más activas a pH 5.0 (37 °C) usando quitina

coloidal como sustrato. Además, ambas enzimas fueron estables en el intervalo de pH de 3 a 10, reteniendo más del 75% de su actividad, incluso después de la incubación durante 48 horas a estos valores de pH. Este pH óptimo y la estabilidad frente a variaciones de pH se han reportado para otras quitinasas de plantas, incluyendo las aisladas de *Trichosanthes dioica* (calabaza puntiaguda), de frutas del género *Diospyrus* (caqui), de hojas de *Annanas comosus* (piña), de *Ficus microcarpa* (banyan chino) y *Limonium bicolor* (lavanda) [31,78,79]. Sin embargo, no todas las quitinasas vegetales muestran esta estabilidad en amplios intervalos de pH, como se ha demostrado para las obtenidas de *Carica papaya*, *Vicia faba* (haba) y *Vitis vinifera* (uva), que fueron inestables al variar el pH [10,80,81].

Las actividades de las dos quitinasas se evaluaron frente a quitina coloidal y los datos de las velocidades iniciales frente a la concentración del sustrato se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten cuyos gráficos se muestran y se calcularon los parámetros cinéticos (Fig. 9B). Para AtChi1, $K_m = 4.8 \pm 0.4$ mg/mL, $k_{cat} = 0.99$ min⁻¹ y $k_{cat}/K_m = 0.21$ mL mg⁻¹min⁻¹ en las condiciones descritas en el capítulo de Materiales y Métodos, mientras que para AtChi2, $K_m = 8.0 \pm 0.7$ mg/mL, $k_{cat} = 1.87$ min⁻¹ y $k_{cat}/K_m = 0.23$ mL mg⁻¹ min⁻¹ en las mismas condiciones (Fig. 9B). Todos los parámetros cinéticos obtenidos se encuentran resumidos en la Tabla 2. Los valores de K_m para estas enzimas son aproximadamente un orden de magnitud inferior a la mayoría de las quitinasas de plantas informadas. Sin embargo son similares a los reportados para algunas quitinasas de plantas cuando se usó el mismo sustrato. Por ejemplo, una quitinasa de clase I del *Diospyros kaki* (caqui) exhibió una K_m de 11.9 ± 0.78 mg/mL [78], y una quitinasa de clase I/GH19 de *Oryza sativa* (arroz) mostró un valor de K_m 1.9 mg/mL [82]. Sin embargo, en estos informes, los valores de k_{cat} no se muestran. También hay un informe de una quitinasa de la cucurbitacea *Trichosanthes dioica* que muestra un valor de K_m de 0.3 mg/mL [79]. Estos resultados son esperados porque el alineamiento de las enzimas Agave con las quitinasas vegetales de clase I mostró una buena conservación de los residuos catalíticos y también de casi todos los residuos involucrados en la unión del sustrato y la catálisis [34,69,76].

Sin embargo, es de vital importancia recordar que la comparación de parámetros cinéticos entre diferentes enzimas de diferentes procedencias o de ensayos diferentes, tiene una limitante fundamental. Los parámetros cinéticos son completamente dependientes de las condiciones de ensayo, pues factores como el pH, la fuerza iónica o la temperatura pueden completamente tanto la fijación del sustrato como la propia catálisis. Por lo tanto estas comparaciones tienen como única finalidad, incluir o no las nuevas enzimas estudiadas, en

los comportamientos generales que se hayan informado previamente siempre y cuando las condiciones de ensayo empleadas no se alejen de manera abrupta de las previamente reportadas. Otra importante limitación es que estos ensayos “in vitro”, en la mayoría de las ocasiones no consideran las condiciones reales “in vivo” de estas enzimas, pues se realizan en las condiciones en que mayor actividad enzimática se detecte y esto puede alejarse muchísimo de las condiciones fisiológicas en las cuales actúan dichas enzimas. Por lo tanto sería un gran error tratar de extrapolar estos resultados a la actividad real de las enzimas en la fuente natural.

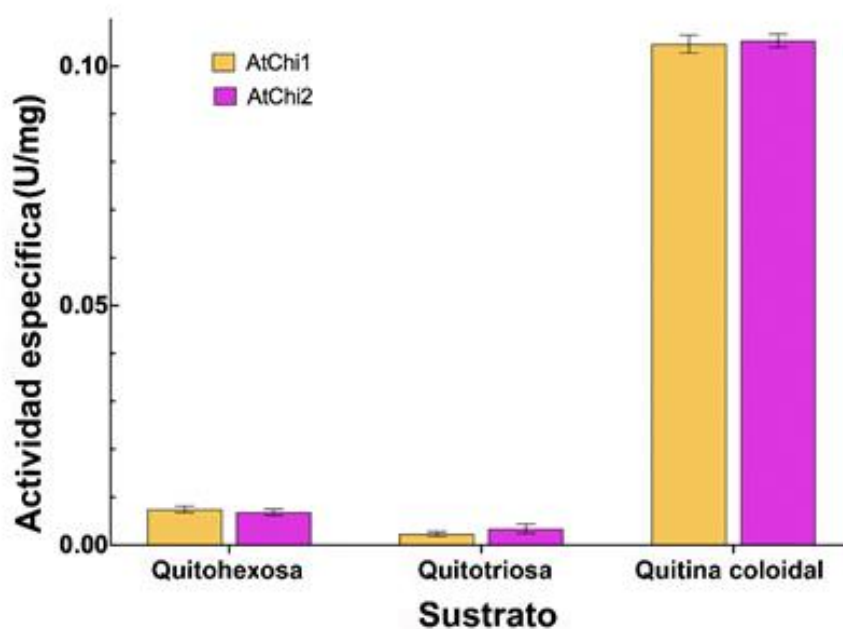


Figura 8. Actividad de AtChi1 (amarillo) y AtChi2 (magenta) frente a quitina coloidal insoluble comparada con la actividad frente a los oligosacáridos quitohexosa (GlnNac)₆ y quitotriosa (GlnNac)₃. Todos los ensayos se realizaron en las mismas condiciones descritas en la sección de Materiales y métodos (amortiguador de acetato de sodio 50 mM pH 5.0, 37 °C, 24 h).

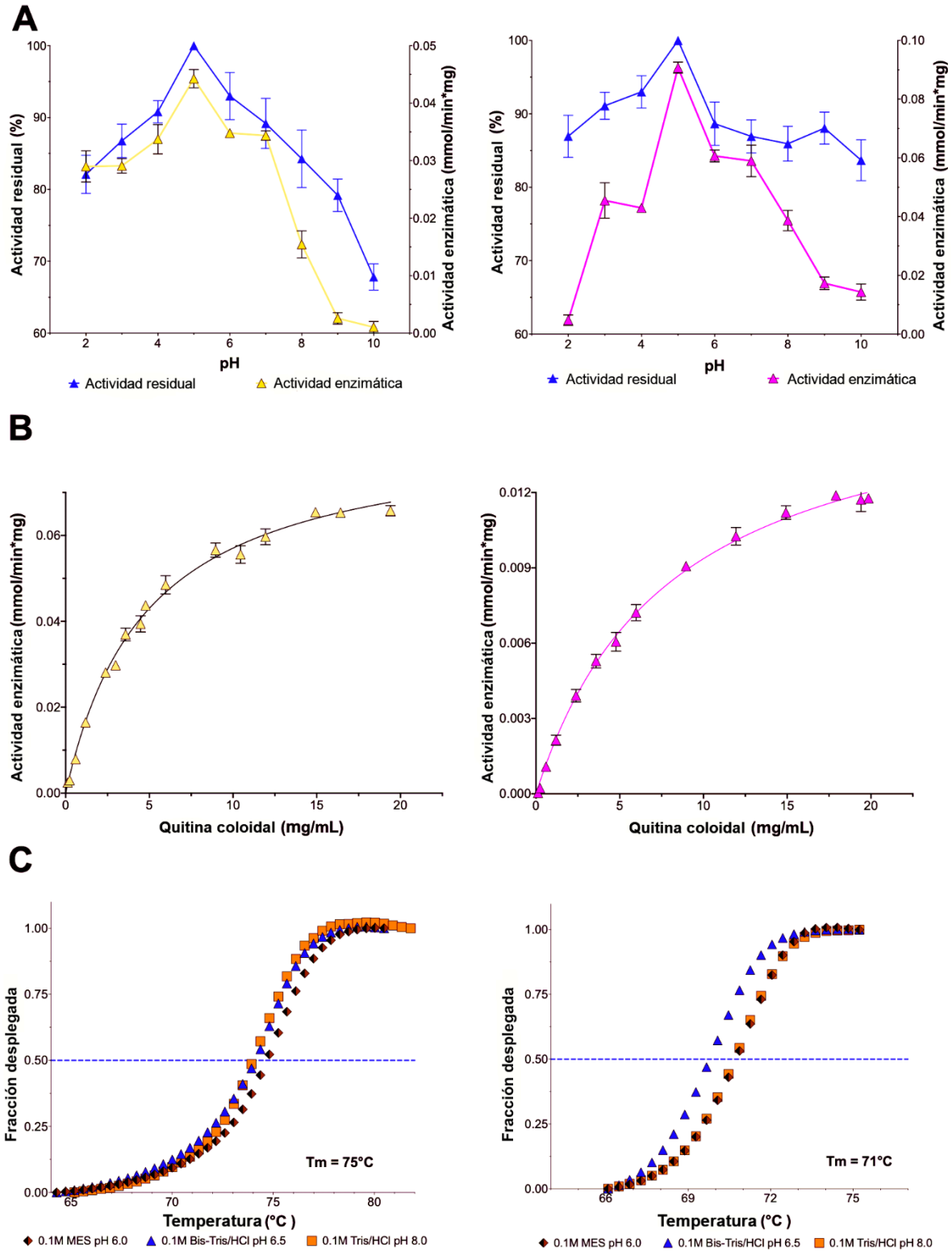


Figura 9. Caracterización de AtChi1 y AtChi2. AtChi1: amarillo y AtChi2: púrpura. (A) pH óptimo para actividad y estabilidad (mostrado en azul) usando quitina coloidal como sustrato. [Quitina coloidal] = 4.78 mg/mL (p/v). Condiciones del ensayo: para actividad, 24 horas a 37 °C; para

estabilidad, 48 horas. (B) Curvas de saturación por el sustrato obtenidas con el software GraphPad. (C) Estabilidades termodinámicas usando ensayos de desplazamiento térmico. En (A) y (B), los datos muestran las medias de tres experimentos independientes y las barras indican las desviaciones estándar.

Por otro lado, AtChi1 y AtChi2 mostraron termoestabilidad alta. El análisis de los ensayos de desplazamiento térmico para las dos quitinasas indicó las temperaturas de fusión (T_m) más altas en valores de pH entre 6.0 y 6.5 (Fig. 9C). Los valores máximos de T_m fueron 75 °C y 71 °C para AtChi1 y AtChi2, respectivamente. Por esta razón, seleccionamos MES pH 6.0 como la condición de máxima estabilidad. Las quitinasas vegetales altamente termoestables no son muy comunes, independientemente de la clase o familia a la que pertenecen [78]. Por ejemplo, las quitinasas aisladas de habas, arándanos y maíz son estables sólo a temperaturas inferiores a 58 °C, 45 °C y 60 °C, respectivamente [80,83,84]. Sin embargo, hay algunos ejemplos de quitinasas que retuvieron sus actividades por encima de 60 °C, como la quitinasa aislada del caqui, o hasta 70 °C para las quitinasas aisladas de piña y de la pera 'Baozhu' [17,31,78].

Tabla 2. Parámetros cinéticos obtenidos para AtChi1 y AtChi2.

Enzima	<i>K_m</i> (mg/mL)	<i>V_{max}</i> (mmol/min mg)	<i>k_{cat}</i> (min ⁻¹)	<i>k_{cat}/K_m</i> (mL/mg min)	<i>E_o</i> (mg/mL)
AtChi1	4.8 ± 0.4	0.085 ± 0.003	0.99 ± 0.01	0.21	2.73
AtChi2	8.0 ± 0.7	0.0169 ± 0.0006	1.87 ± 0.02	0.23	1.45

6.3. Determinación de la afinidad de unión y caracterización termodinámica.

Para medir las afinidades de unión entre las dos quitinasas y la quitohexosa, realizamos experimentos con ITC y determinamos las constantes de disociación de equilibrio (K_d). A pH de 7.0, ambas enzimas se unen a la quitohexosa con una estequiometría de un solo sitio de unión ($n = 1$) y valores de K_d de 208 μ M para AtChi1 y 128 μ M para AtChi2 (Fig. 10A y B). Estos valores de K_d fueron consistentes con las afinidades de unión reportadas para quitinasas GH19 de clase I de *Bryum coronatum* (musgo) usando oligosacáridos de GlcNAc en ITC [77]. Además, los datos mostraron una diferencia de 1.5 veces en la entalpía de formación para el complejo de quitohexosa-quitinasa entre las dos enzimas con un valor más negativo para AtChi1 $\Delta H = -8.6 \pm 0.1$ kcal/mol en comparación con $\Delta H = -5.5 \pm 0.0$ kcal/mol para AtChi2. Estas diferencias en entalpías sugieren que se establecen más contactos en la unión del oligosacárido al centro activo de AtChi1, por lo cual se libera más

energía, aunque ambos procesos están entálpicamente dirigidos. También se registró una diferencia de 10 veces en la variación de entropía entre las dos enzimas con valores de $-T\Delta S = 3.7 \pm 0.1$ kcal/mol para AtChi1 y $-T\Delta S = 0.3 \pm 0.0$ kcal/mol para AtChi2. Las

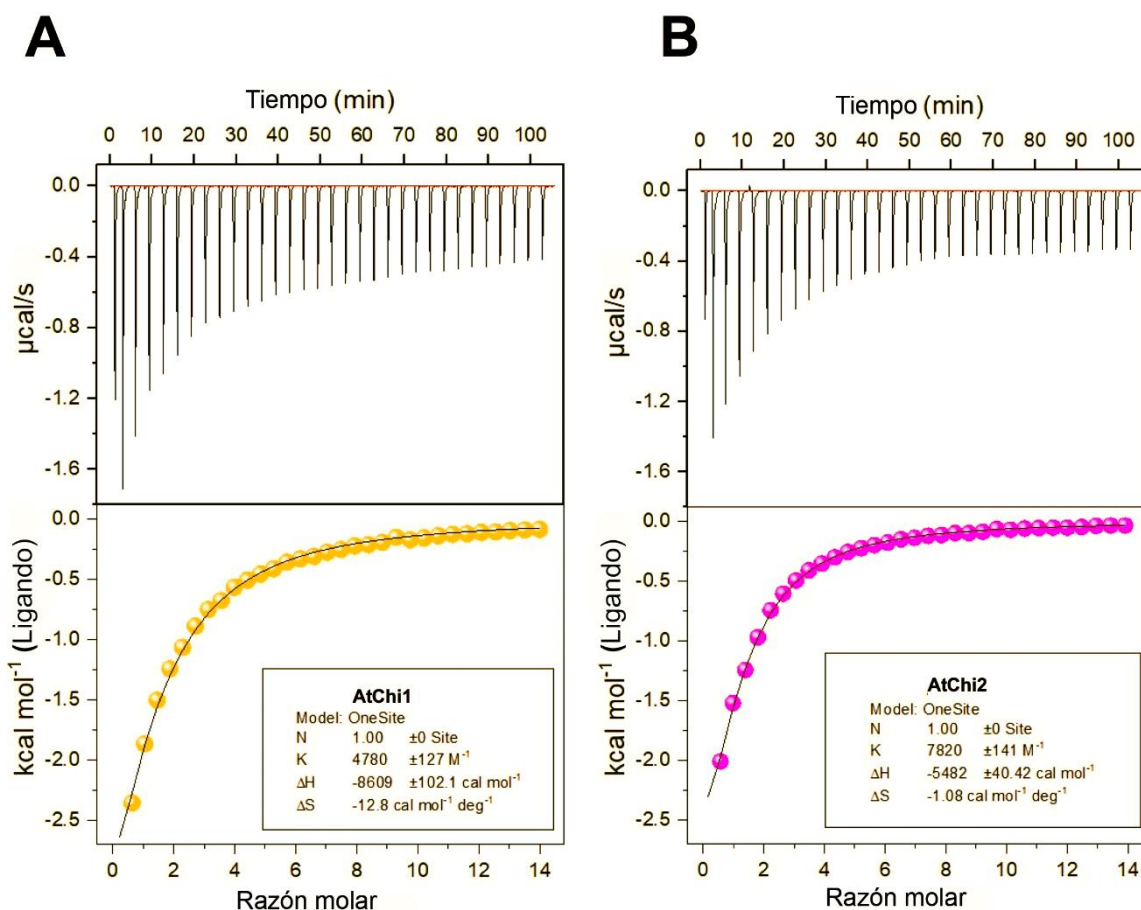


Figura 10. Termogramas de ITC y ajustes teóricos para la unión de quitoheptaosa a AtChi1 (izquierda) y AtChi2 (derecha). Las mediciones se realizaron en amortiguador fosfatos 20 mM, pH 7,0 (18 °C). Los parámetros termodinámicos obtenidos de experimentos individuales se muestran en cuadros.

diferencias encontradas en penalización entrópica, que son considerablemente menores en AtChi2, pudieran ser las responsables de la mayor afinidad de unión encontrada para esta enzima, según el valor de K_d calculado respecto al mismo parámetro en AtChi1. Resulta interesante analizar que el comportamiento para la unión del hexámero en estas enzimas es inverso al mostrado al unir el polisacárido quitina coloidal donde la K_m para AtChi1 fue menor (4.84 ± 0.45 mg/mL) que para AtChi2 (8.01 ± 0.67 mg/mL). Este resultado evidencia que el arreglo espacial de los diferentes sustratos en los centros activos de las enzimas puede ser muy diferente en cada caso, lo que podría verse reflejado en las diferencias en

actividades catalíticas. Es importante mencionar que la actividad de las dos enzimas sobre la quitohexosa fue muy baja en las condiciones del ensayo de ITC (pH 7.0, 18 ° C), con un máximo de 0.04% del sustrato consumido durante el experimento.

6.4. Estructura en solución y modelado por homología.

Hasta la fecha, no hay informes de la estructura tridimensional de las quitinasas de clase I de longitud completa. Algunos estudios describen las estructuras de los dominios CatD y CBD18 de quitinasas de clase I por separado; sin embargo, no ha sido posible obtener un buen mapa de densidad electrónica para interpretar el asa o conector largo y flexible que une a ambos [33,67,85]. Además, algunos autores han sugerido que dichos conectores podrían ser lábiles [76]. A este respecto, la única estructura cristalográfica de una quitinasa de clase I carece de coordenadas para el conector [34]. Por este motivo, nosotros realizamos experimentos de dispersión de rayos X de ángulo pequeño (SAXS) en solución para estimar los modelos de superficies moleculares de baja resolución para ambas enzimas. Los datos obtenidos y los parámetros estructurales para los experimentos se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Datos de colecta de SAXS y parámetros estructurales.

Parámetros de colecta de datos	AtChi1	AtChi2
Detector	Rayonix MX225-HE	Pilatus3 X 1M
Tamaño de la celda (H mm x V mm)	0.3 x 0.3	0.3 x 0.3
Distancia al detector (m)	1.78	1.80
Longitud de onda (Å)	1.127	1.127
Tiempo de exposición (segundos)	10 x 1	10 x 1
Concentración de proteínas (mg/mL)	0.23-15	0.23-7.5
Temperatura (K)	288	288
Parámetros estructurales		
Rg calculado del gráfico de Guinier (nm)	2.6 ± 0.13	2.4 ± 0.047

D_{max} (nm)	9.7	9.8
Volumen de Porod (nm ³)	52	49

Los datos crudos para ambas enzimas, con inserciones de los gráficos de Guinier, se muestran en la Fig. 11A. Para AtChi1 utilizamos la concentración de proteína más baja (0.23 mg/ml) porque observamos cierta agregación durante el experimento a las concentraciones más altas empleadas. Es importante señalar que antes del experimento ambas proteínas eran monodispersas y monoméricas según lo confirmado por cromatografía de exclusión molecular SEC (Fig. 11B, recuadro) y dispersión dinámica de la luz (DLS). Para AtChi2 utilizamos un archivo combinado con las concentraciones de 7.5 y 3.75 mg/ml para el análisis. Todos los datos de dispersión de rayos X de ángulo bajo (SAXS) se depositaron en la base de datos SASBDB [86] con los identificadores SASDDE7 y SASDDA6 para AtChi1 y AtChi2, respectivamente. El radio de giro (R_g) determinado para AtChi1 fue $26.10 \pm 1.3 \text{ \AA}$, mientras que para AtChi2 fue $24.1 \pm 0.47 \text{ \AA}$ (Fig. 11B). El radio de giro es un parámetro que estima la dimensión de la molécula, si la consideramos como una esfera rígida. Estos valores están de acuerdo con los 22.9 \AA obtenidos para la quitinasa de arroz clase I (OsChia1b) [34]. El gráfico de Guinier revela un ajuste lineal que sugiere que no hay interacciones entre partículas a la concentración utilizada para cada proteína. En este punto, es importante mencionar que el análisis de Guinier de ATSAS sólo proporciona coeficientes de fidelidad, no coeficientes de regresión lineal. Además, las curvas experimentales $P(r)$ (función de distribución de distancia de pares) para las enzimas exhiben perfiles asimétricos en forma de campana, con un pequeño máximo adicional cercano a 78 \AA y 58 \AA para AtChi1 y AtChi2, respectivamente (Fig. 11B). Este resultado sugiere que ambas proteínas no son partículas globulares con una distribución esférica simétrica de la masa, y podrían tener múltiples conformaciones en solución, lo que es posible para las proteínas multidominio que están unidos por conectores muy largos y flexibles [87]. Estos gráficos nos permitieron determinar el tamaño máximo de partícula (D_{max}), siendo 97.6 \AA para AtChi1 y 98 \AA para AtChi2. Ambos valores de D_{max} (Fig. 11B) son mayores que los obtenidos para OsChia1b de arroz (D_{max} de 86 \AA) [34].

Los modelos moleculares *ab-initio* de baja resolución de AtChi1 y AtChi2 en solución se generaron utilizando los programas DAMMIF [55] y DAMFILT [56]. También depositamos el mejor modelo generado en DAMMIF para cada enzima en el sitio web de SASBDB.

Ambos modelos indican claramente la presencia de dos lóbulos que están unidos por una región bisagra que corresponde al conector de 27 aminoácidos (Fig. 11C). A pesar de que los modelos macromoleculares de baja resolución de ambas quitinasas en solución mostraron ligeras diferencias en sus formas generales, ambos modelos mostraban superficies alargadas y el resultado más importante obtenido de estos experimentos es la presencia claramente distinguible del conector flexible largo que conecta el dominio catalítico CatD al dominio de unión a carbohidratos CBD18. A pesar de que el conector entre dominios de este tipo de enzimas era muy difícil de localizar íntegramente en mapas de densidad electrónica, con las estructuras de SAXS se demostró que está presente.

Por otra parte, y con el fin de profundizar en el modo de unión de estas enzimas a sus sustratos se generaron modelos tridimensionales por homología de AtChi1 y AtChi2 con el servidor Robetta [88], que utilizó la estructura cristalográfica de la quitinasa de arroz clase I (entrada PDB 2DKV) para modelar el CBD18 para ambas enzimas de Agave. Esta estructura se seleccionó debido a la identidad de secuencia alta, 68% para AtChi1 y 67% para AtChi2. Sin embargo, esta estructura carece del lazo conector entre el dominio catalítico y el CBD. Los dominios catalíticos se modelaron utilizando la estructura de la quitinasa de centeno (entrada PDB 4DWX) (identidad 76.5%), que también carece del conector y del CBD18. Estos modelos AtChi1 y AtChi2 mostraron 99.1% y 99.5% de los residuos en la región más favorecida del diagrama de Ramachandran, respectivamente, y 0.9% y 0.5% en las regiones no permitidas del diagrama de Ramachandran, respectivamente [89]. Para AtChi1 estos residuos corresponden a Gln152 y Tyr183, y para AtChi2 a Tyr183, que se encuentran en el surco de unión a quitina.

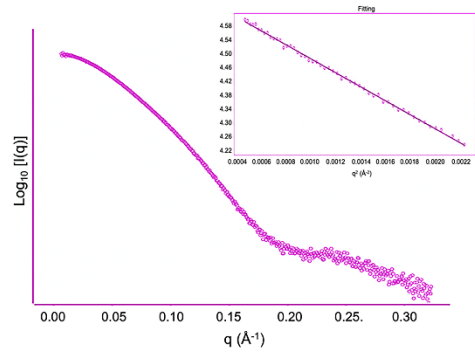
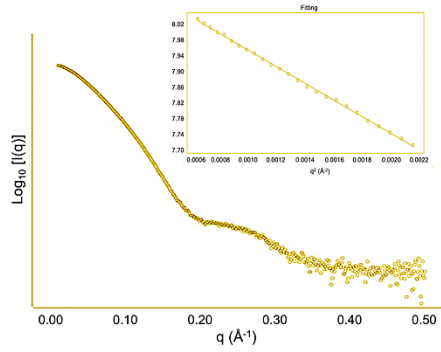
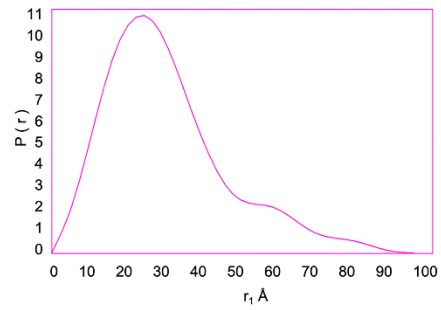
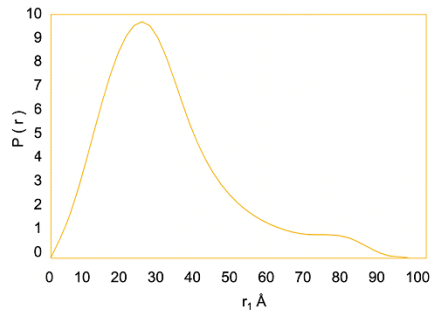
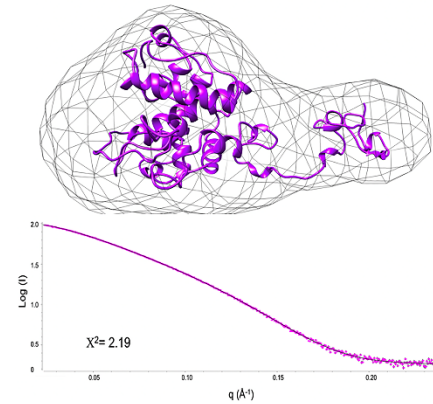
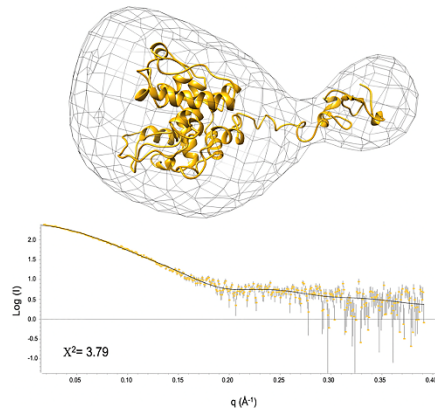
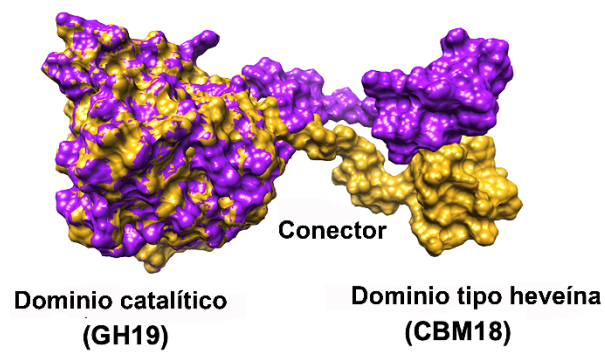
A**B****C****D**

Figura 11. Análisis de SAXS de AtChi1 (izquierda) y AtChi2 (derecha). (A) Dispersión de datos experimentales con una inserción de la gráfica de Guinier. (B) Función de distribución por pares interatómica normalizada $P(r)$. (C) Ajuste estructural de los modelos obtenidos en Robetta para AtChi1 (oro) y AtChi2 (púrpura) en los modelos de superficie obtenidos por SAXS calculados por *ab initio*. El panel inferior muestra las curvas de ajuste obtenidas con el programa CRY SOL. Los valores de Chi-cuadrado (χ^2) se indican para ambas proteínas (D) Superposición de los modelos Robetta para AtChi1 (oro) y AtChi2 (púrpura), en representación de superficie, que incluye CBD18 y CatD.

La presencia de residuos que se encuentran en la región no permitida del diagrama de Ramachandran es común en aminoácidos que se encuentran en sitios activos o de unión a ligandos de enzimas y anticuerpos, los cuales pueden adoptar conformaciones tensas [90].

Los modelos de Robetta se ajustaron a las curvas de dispersión experimental de SAXS con el programa CRY SOL [58]. Los modelos para cada enzima con el mejor ajuste para los datos SAXS se superpusieron en las envolturas de SAXS revelando un buen ajuste global (Fig. 11C). Es importante mencionar que Robetta no considera la flexibilidad del conector. Para AtChi1, los valores de ajuste chi-cuadrada para los tres mejores modelos Robetta fue: 4.09, 3.79, 4.03; y para AtChi2 estos valores fueron 2.44, 2.51 2.19. El mejor ajuste para ambas enzimas se muestra en la Fig. 11C. Los dominios catalíticos de ambas quitinasas fueron casi idénticos con un RMSD de solo 0.263 Å, mientras que el conector y el CBD18 mostraron conformaciones ligeramente diferentes (Fig. 11D). Curiosamente, nuestros modelos sugieren una proximidad espacial ligeramente mayor del CBD18 con el CatD para AtChi2 (Fig. 11D). Recientemente, la estructura de RMN de la quitinasa de clase IV (GH19) CJP-4 del polen de cedro japonés mostró que el CBD18 era responsable de la unión de quitina [76]. Por lo tanto, la separación encontrada entre los CBD18 y los CatD en una conformación abierta hipotética podría contribuir a la disminución de la eficiencia catalítica de estas enzimas. Las formas de los modelos de superficie obtenidos en nuestro trabajo sugieren la presencia de al menos dos conformaciones en solución para estas quitinasas de clase I. Teniendo en cuenta que la mayoría de los diferentes residuos entre AtChi1 y AtChi2 están cerca de la interfaz entre los dos dominios y en el lado opuesto de la ranura catalítica (Fig. 13A), sugerimos que estos residuos pueden participar en la estabilización de las conformaciones abierta y/o cerrada durante la catálisis de las quitinasas de clase I y puede contribuir a la abundancia de cada conformación y sus diferencias funcionales. Es importante mencionar que los mejores modelos de CatDs obtenidos en Robetta se compararon con los CatDs de quitinasas de clase I de plantas depositadas en el PDB y se observan ligeras diferencias en el asa más larga (III), lo cual también ocurre entre los

mismos cinco mejores modelos de cada quitinasa de Agave (Fig. 12), donde se encuentra Glu151. Una superposición de estos modelos mostró valores RMSD que variaron de 0.08 Å (Modelo 1 vs Modelo 2) a 0.16 Å (Modelo 1 vs Modelo 5) para AtChi1, mientras que para AtChi2 estos valores fueron 0.13 a 0.18 Å (Fig. 12).

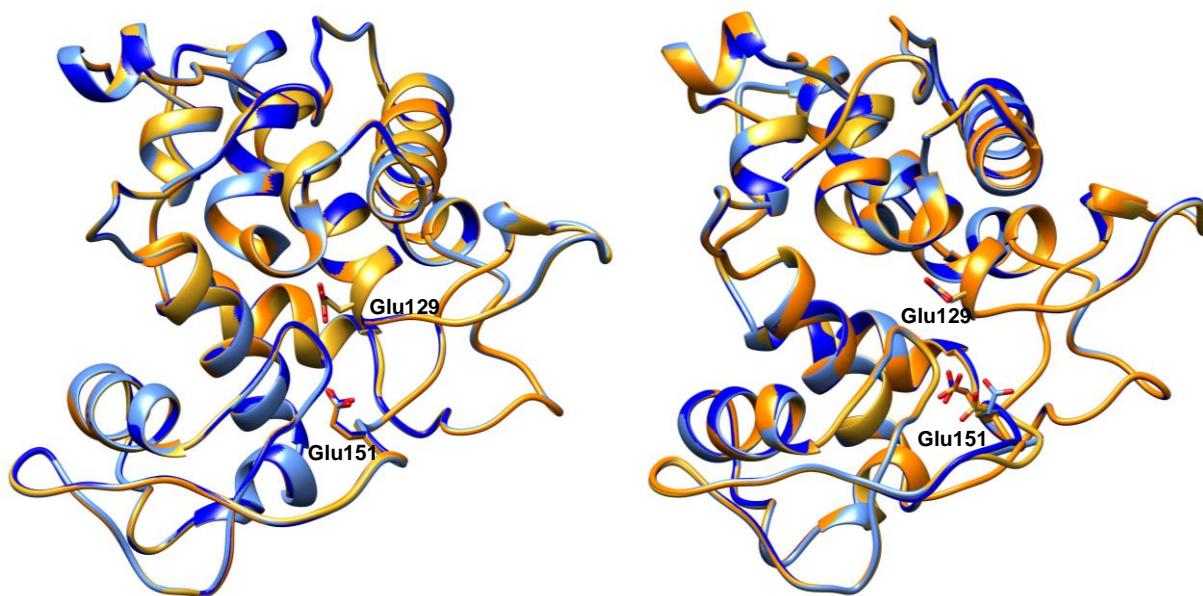


Figura 12. La superposición de los cinco modelos obtenidos en Robetta para los CatD de cada quitinasa muestra muy ligeras diferencias. Cada color diferente representa uno de esos cinco modelos para AtChi1 a la izquierda y para AtChi2 a la derecha de la imagen. RMSD entre 0.08 Å (Modelos 1 vs 2) hasta 0.16 Å (Modelos 1 vs 5) para AtChi1, mientras que para AtChi2 estos valores fueron 0.13 Å a 0.18 Å.

La idea de la posible contribución de los residuos diferentes en ambas enzimas a la estabilización de las conformaciones abiertas o cerradas, se respalda si hacemos un análisis conjunto de los resultados obtenidos en los experimentos de ITC (Fig. 10), donde se midió la termodinámica de la unión del sustrato de quitohexosa en condiciones donde se promoviera una baja actividad catalítica. Los resultados muestran diferencias relevantes entre las dos quitinasas. Primero, la unión de la quitohexosa es favorecida entálpicamente por ambas enzimas; sin embargo, AtChi2 muestra una penalización entrópica 10 veces menor que la de AtChi1. No obstante, no hay una diferencia significativa en la energía libre de unión ΔG , lo que sugiere que los seis residuos GlcNAc de la quitohexosa se asocian al surco o hendidura de unión al sustrato en las dos quitinasas [91]. Además, el oligosacárido se une dos veces más fuertemente a AtChi2 con un valor de $K_d = 128 \pm 0.7 \mu\text{M}$, mientras que AtChi1 muestra una $K_d = 208 \pm 0.8 \mu\text{M}$. En conjunto, estos datos sugieren que los seis residuos diferentes entre las dos quitinasas tienen efectos de largo alcance en el proceso de unión del ligando en el surco respectivo y afectan su afinidad, incluso cuando estos

residuos se encuentran en la superficie de las dos proteínas. Las diferencias en los parámetros termodinámicos indican que cambios sutiles en la secuencia de aminoácidos de las quitinasas pueden causar cambios en el modo de unión de la enzima al sustrato durante la formación del complejo proteína-sustrato, lo cual pudiera explicar las dos conformaciones (abierta y cerrada) sugeridas.

Para obtener datos sobre el modo de unión de la quitohexosa a las quitinasas de *A. tequilana*, utilizamos los modelos por homología de los dominios catalíticos obtenidos usando Robetta, que se ajustaron a los modelos de superficie de baja resolución obtenidos por SAXS, con los valores de χ^2 más bajos.

Se realizaron simulaciones de acoplamiento molecular, sin restringir la flexibilidad de la cadena lateral y, aunque las hendiduras de unión del sustrato parecen casi idénticas a las de otras quitinasas de plantas, mostraron energías de unión ligeramente diferentes: -8.3, -8.4, -8.6, -7.5, -8.2 kcal/mol para los cinco acoplamientos AtChi1, mientras que para AtChi2 estos valores fueron: -8.0, -8.2, -7.5, -7.8, -7.7 kcal/mol (Fig. 13). Este resultado sugiere que la hendidura del sitio activo es diferente en ambas isoformas con más flexibilidad del oligosacárido en el surco de unión de AtChi2 (Fig. 13). Vale la pena recordar que los valores experimentales de ΔH determinados usando ITC fueron -8.61 ± 0.10 kcal/mol para AtChi1 en comparación con -5.48 ± 0.04 kcal/mol para AtChi2, mientras que los valores de ΔG fueron -4.6 kcal/mol y -5.2 kcal/mol para AtChi1 y AtChi2, respectivamente. La Figura 14A indica que el asa III en AtChi1 es conformacionalmente diferente a la misma asa en AtChi2. Esto hace que el residuo catalítico Glu151, que se encuentra en esta asa, esté ligeramente más alejado del ligando en AtChi2. Sin embargo el Glu129, que es el que podría actuar como base general y comenzar la catálisis, se encuentra más cercano en AtChi2 que en AtChi1. Asumiendo un arreglo similar en el centro activo para la región a escindir del polisacárido quitina coloidal, estos resultados podrían explicar las ligeras diferencias en los valores de eficiencia catalítica entre ambas enzimas. Las energías de unión obtenidas en los experimentos *in silico* se corresponden muy bien con las obtenidas experimentalmente por ITC. Por lo tanto, consideramos que nuestras simulaciones son válidas.

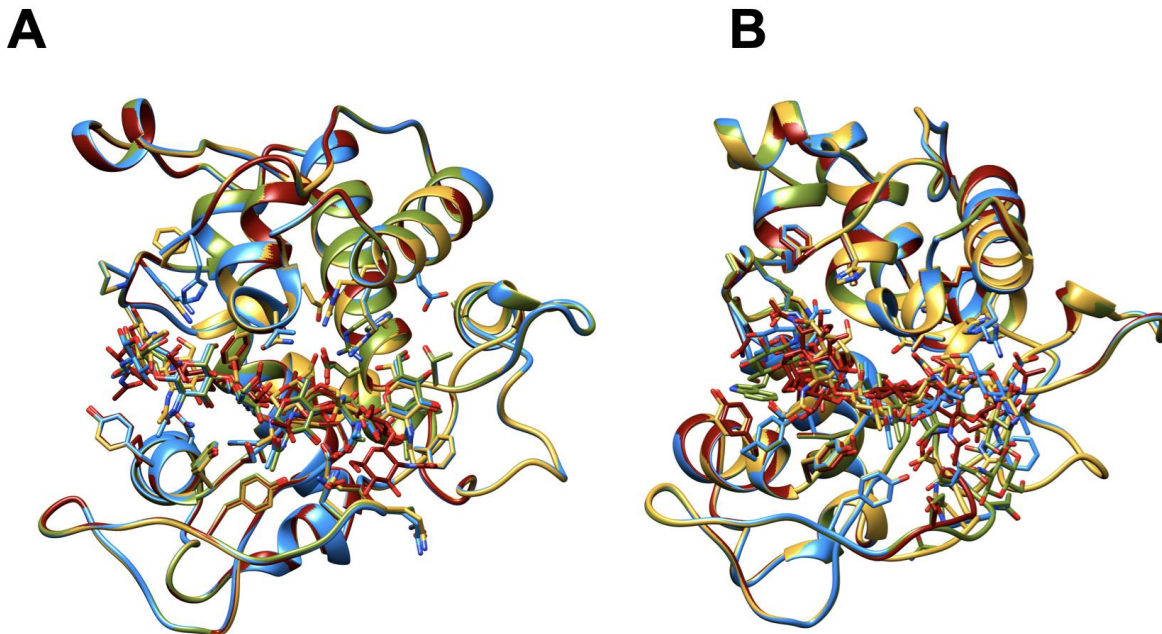


Figura 13. Modos de unión de quitohexosa con los cinco modelos CatDs Robetta según las simulaciones de acoplamiento. A) AtChi1 y B) AtChi2. Hay más variabilidad de las posiciones del oligosacárido en AtChi2 que en AtChi1.

Las primeras cinco soluciones de menor energía se seleccionaron y analizaron teniendo en cuenta los reportes anteriores sobre los aminoácidos involucrados en las interacciones con los sustratos o productos de las quitinasas GH19 activas [32,33,69]. La Figura 14B ilustra la interacción de los residuos catalíticos con $(\text{GlcNAc})_6$ cuando este último se posicionó a lo largo de la ranura en los subsitios -4 a +2. La Figura 14C muestra una vista de la superficie de la hendidura catalítica de ambas enzimas con $(\text{GlcNAc})_6$. Curiosamente, como se muestra en esta figura, la ranura de unión para AtChi2 es ligeramente más ancha que la de AtChi1, y hay más interacciones de AtChi1 con quitohexosa como se estima usando CONTACT en CCP4 [92]. Además, la Fig. 14C muestra todos los residuos en el surco de AtChi1 y AtChi2 que hacen contacto con el oligosacárido, solo unos pocos residuos no se conservan en estas interacciones. Varios residuos (mostrados en transparente) ubicados en los lazos II y V, adoptan una conformación diferente probablemente debido a los seis residuos diferentes en ambas enzimas. Los efectos a larga distancia de estas mutaciones también podrían ser responsables de pequeños cambios en los sitios de unión de las enzimas. En este sentido, se ha reconocido que las mutaciones pueden ejercer efectos a larga distancia sobre la estructura, flexibilidad y estabilidad de las proteínas [93]. Notablemente, en ambas enzimas, la posición del Glu151 catalítico está lejos del enlace

GlnNAc -1 +1 en la molécula de quitohexosa, lo que podría explicar la baja actividad catalítica sobre los oligosacáridos. Las distancias entre el OE1-Glu151 y el enlace GlnNAc -1 +1 son 5.56 Å (AtChi1) y 5.81 Å (AtChi2); y para OE1-Glu129 las distancias son 7.50 Å para AtChi1 y 5.30 Å para AtChi2 (Fig. 14B). Además, medimos la distancia entre el C α del donante catalítico de protones (E151) y la base general (E129) en cada enzima y los valores son 9.48 y 9.31 Å, lo que indica que operan a través de un mecanismo de inversión de la configuración del carbono anomérico.

6.5. Actividades antifúngicas versus hongos fitopatógenos.

La actividad antifúngica de ambas quitinasas frente a dos hongos patógenos, *F. oxysporum* y *A. alternata* se muestra en la Figura 15. AtChi1 exhibió más actividad frente a *F. oxysporum*, a concentraciones cercanas a 120 μ g de proteína por disco, mientras que la inhibición contra *A. alternata* se observó solo a 170 μ g / disco (Figura 15A, B). Este resultado es consistente con el hecho de que *F. oxysporum* es un patógeno directo de *A. tequilana* que afecta el xilema de la planta, mientras que *A. alternata* tiene otros hospederos y no se ha informado que infecte las plantas de Agave. AtChi2 por su parte exhibió un poco más de inhibición sobre ambos hongos que AtChi1 en las mismas concentraciones. Incluso contra *A. alternata*, la inhibición es más visible desde 120 μ g por disco. En todos los casos, la inhibición obtenida aunque fue pobre mostró dependencia de la concentración. En la concentración más alta de cada enzima contra cada hongo, se observa además que el crecimiento deja de ser radial. Es importante tener en cuenta que no hubo inhibición del crecimiento de *P. aphanidermantum*. Esta especie es un oomiceto y, por lo tanto, no tiene quitina en su pared celular (Figura 15C), lo cual muestra que la actividad antifúngica encontrada está asociada a la actividad quitinolítica. La inhibición observada fue menor que la reportada para otras quitinasas de plantas [17,78]. Sin embargo, se sabe que una planta sobreexpresa un conjunto de quitinasas, glucanasas y otras proteínas PR que actúan sinérgicamente para combatir la infección por patógenos [5]. Sin embargo, estos valores de concentración inhibitoria son similares a los reportados para la quitinasa de cebada clase I de 80 y 200 μ g [94].

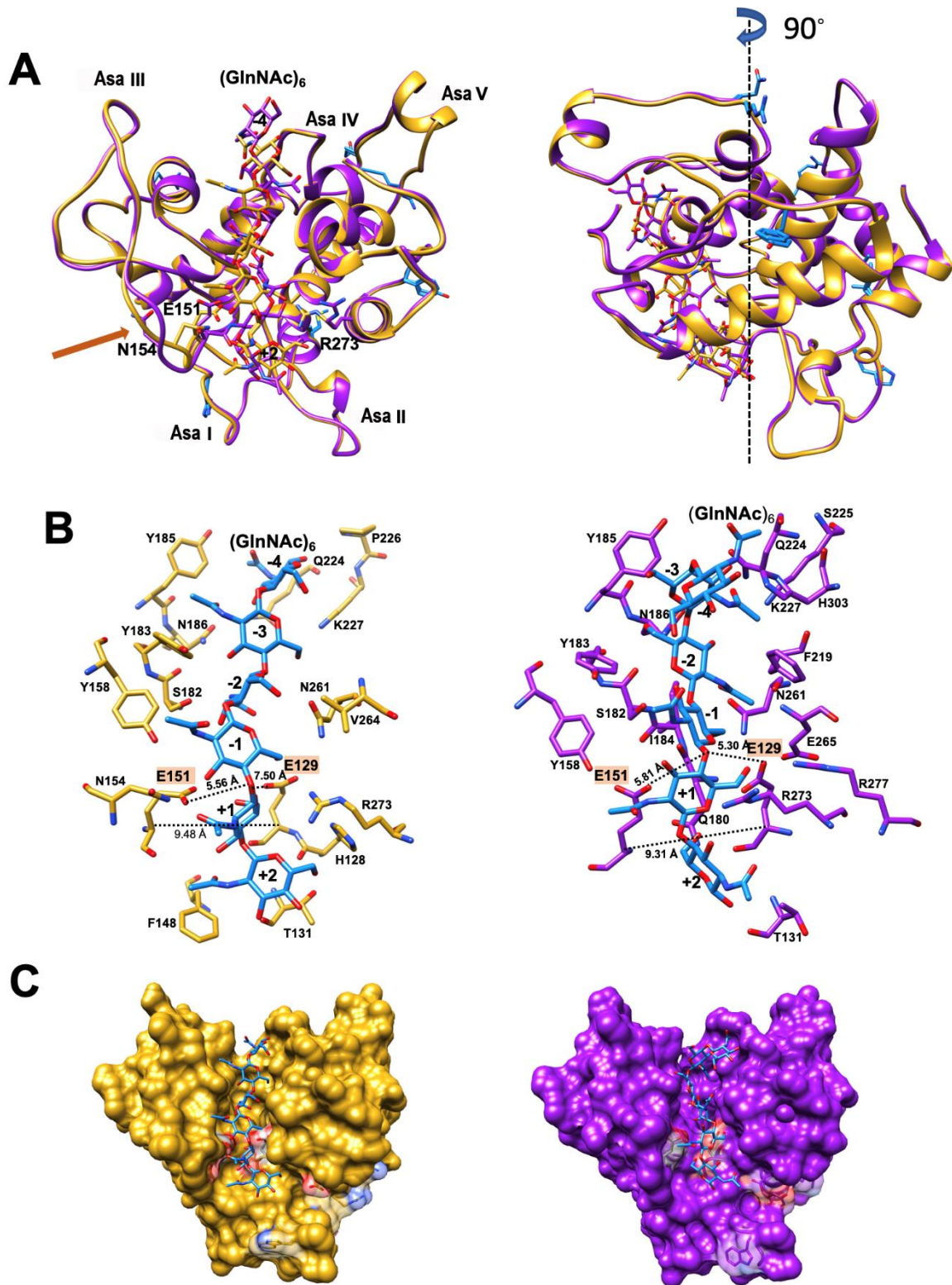


Figura 14. Análisis de las simulaciones de acoplamiento utilizando (GlnNAc)₆ en modelos generados en Robetta de AtChi1 y AtChi2. (A) Lado izquierdo: superposición de los dominios catalíticos que muestran la quitohexosa acoplada. La flecha indica la conformación ligeramente

diferente para el asa III en ambas quitinasas donde se encuentra el residuo catalítico E151. Lado derecho: vista de 90° que muestra los seis residuos diferentes en ambas enzimas como barras azules. (B) Zoom del surco donde los residuos que podrían estar involucrados en la interacción con (GlnNAc)₆ se muestran en AtChi1 (izquierda) y AtChi2 (derecha). (C) Representación superficial del surco catalítico con el oligosacárido. Los residuos en áreas transparentes (W134, D276, Y142, R283, Q75, K282) exhiben una conformación diferente en ambas enzimas debido a las seis mutaciones entre ambas quitinasas. Los colores son los mismos utilizados en la Figura 11, dorado para AtChi1 y magenta para AtChi2.

Es importante recordar que para AtChi2, se observaron tres bandas diferentes en el gel de agarosa a las cuatro semanas después de la infección de la planta y sólo una de ellas, la correspondiente a AtChi2, permaneció después de siete semanas de infección (Figura 3B). Este resultado sugiere que en las primeras etapas de la infección, se sobreexpresa un mayor número de quitinasas, lo que puede causar una mayor actividad antifúngica o puede potenciar las actividades de las otras enzimas debido a la sinergia. Recientemente, se demostró la variación en la inducción temporal y espacial de las quitinasas en respuesta a una infección en garbanzos [70]. Así, posiblemente, en las últimas etapas de la infección, las quitinasas que mantienen su expresión pueden tener funciones fisiológicas adicionales en la planta, no directamente relacionadas con la defensa. Es válido recordar que seleccionamos para su clonaje y expresión una quitinasa cuya expresión se mantenía constante en la semana siete después de la infección, lo cual se corresponde con las etapas infecciosas tardías.

La actividad antifúngica de ambas quitinasas frente al hongo fitopatógeno *Aspergillus sp.* se muestra en la Figura 16. AtChi1 y AtChi2 mostraron actividades antifúngicas frente a *Aspergillus sp.* a concentraciones de 150 µg/disco y 300 µg/disco. En contraste a lo sucedido frente a los otros hongos ensayados, AtChi1 exhibió una mayor actividad antifúngica en ambas concentraciones en comparación con AtChi2 y la inhibición del crecimiento del hongo para ambas enzimas mostró una dependencia de la concentración.

Estos resultados sugieren que las quitinasas de Agave están involucradas en los mecanismos de defensa de la planta. También frente a este hongo, los valores de concentración inhibitoria mostrados por AtChi1 y AtChi2 son similares a los informados para la quitinasa de cebada clase I de 80 y 200 µg [94] y menores que los reportados para otras enzimas [17,78].

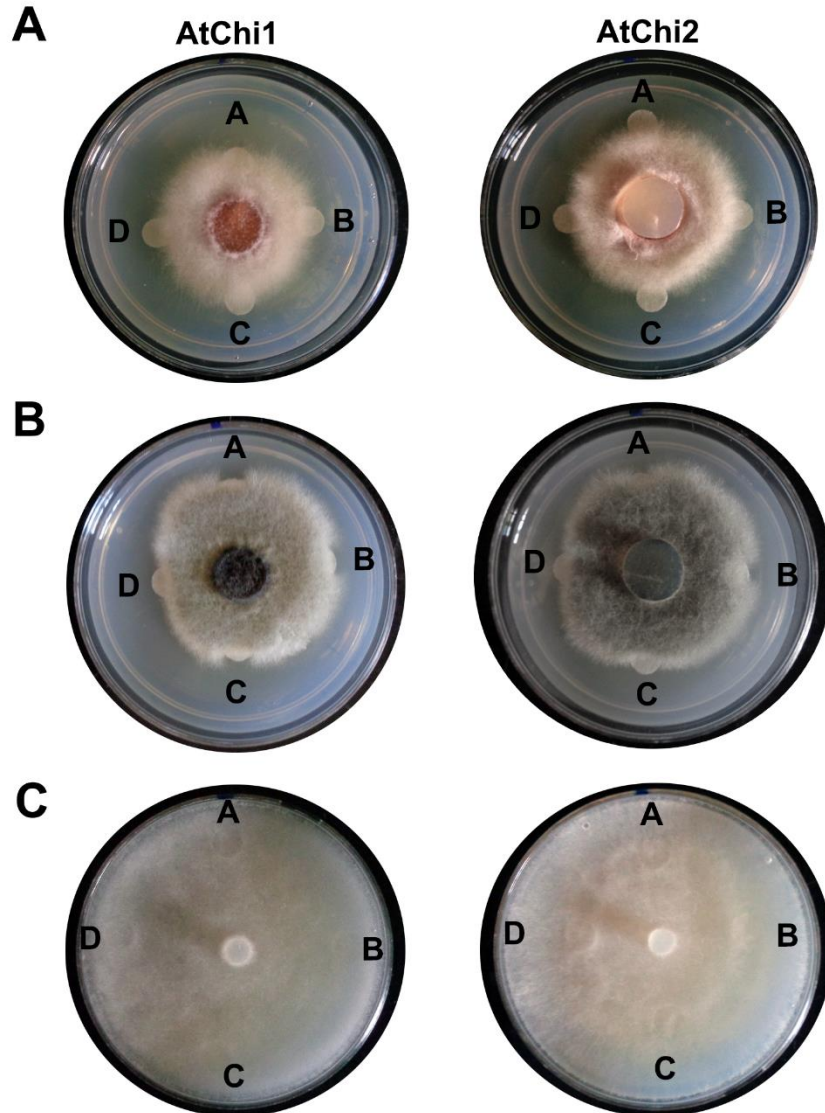


Figura 15. Actividades antifúngicas contra hongos fitopatógenos. Inhibición del crecimiento radial de (A) *F. oxysporum*; (B) *A. alternata*, (C) Oomiceto *P. aphanidermatum* (ausencia de inhibición del crecimiento). En cada placa A: H₂O estéril, B: amortiguador estéril MES 20 mM pH 6.0, C: quitinasa a 120 µg / disco en MES pH 6, D: quitinasa a 170 µg / disco en MES pH 6.

Nuevamente cabe mencionar en este párrafo la consideración que mencionamos previamente de que las actividades de las enzimas en ensayos “in vitro” pueden ser muy diferentes a las que presenten en condiciones fisiológicas. Por lo cual estos resultados deben ser complementados con otros tipos de ensayos para establecer las funciones definitivas de estas proteínas en las plantas.

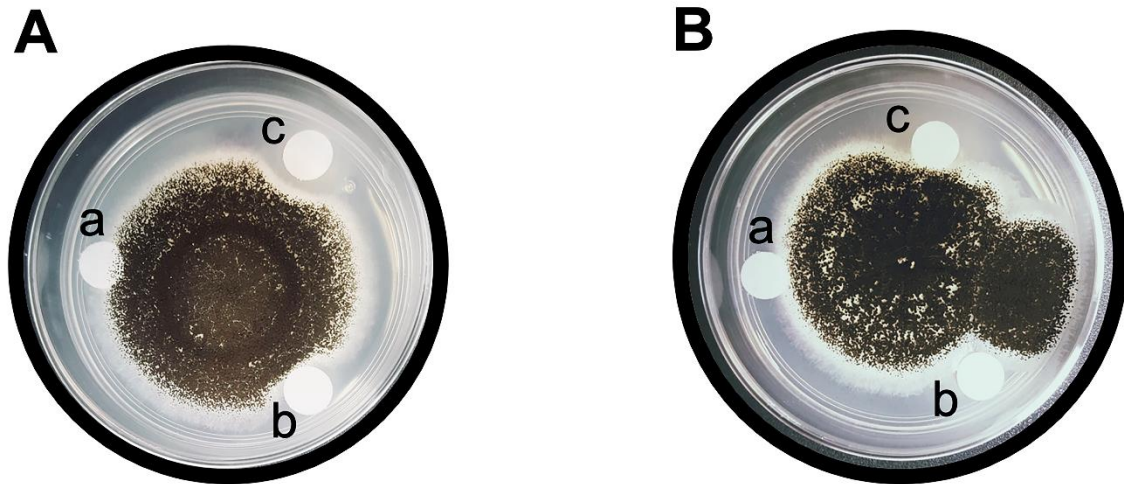


Figura 16. Actividades antifúngicas contra el hongo fitopatígeno *Aspergillus sp.* (A) AtChi1; (B) AtChi2. (a) Se usaron discos (izquierda) que contenían amortiguador estéril como controles negativos. (b) Se aplicaron discos que contenían 150 μg de enzima y (c) discos que contenían 300 μg de enzima en una solución estéril de MES 20 mM, pH 6.0, sobre agar papa-dextrosa en placas de Petri (5,4 cm de diámetro), cada uno con un inóculo central que contenía el micelio de un cultivo de hongos de un día de antigüedad. La inhibición del crecimiento radial se observa claramente para ambas enzimas en las dos concentraciones utilizadas.

6.6. Pruebas de cristalización de las quitinasas de *A. tequilana*.

Se realizaron pruebas de cristalización con ambas enzimas y se obtuvieron cristales en varias condiciones de los paquetes CSI y CSII. Se realizó una optimización de estos cristales por sembrado en las mismas condiciones usando un pelo de gato y después por micro-siembra triturando cristales obtenidos al sembrar con el pelo de gato. También se intentó optimizar cambiando las concentraciones de sulfato de litio y de PEG. En la Figura 17 se muestran algunos de los cristales obtenidos.

Después de los procedimiento señalados, los cristales de AtChi1 difractaron a baja resolución (entre 5 y 6 Å de resolución) eran anisotrópicos y decaían muy rápidamente (Figura 18). Un ejemplo de éstos es el que cristalizó en la condición 50 del CSI de Hampton que contiene 0.5 M de sulfato de litio y 15% de PEG 8000.

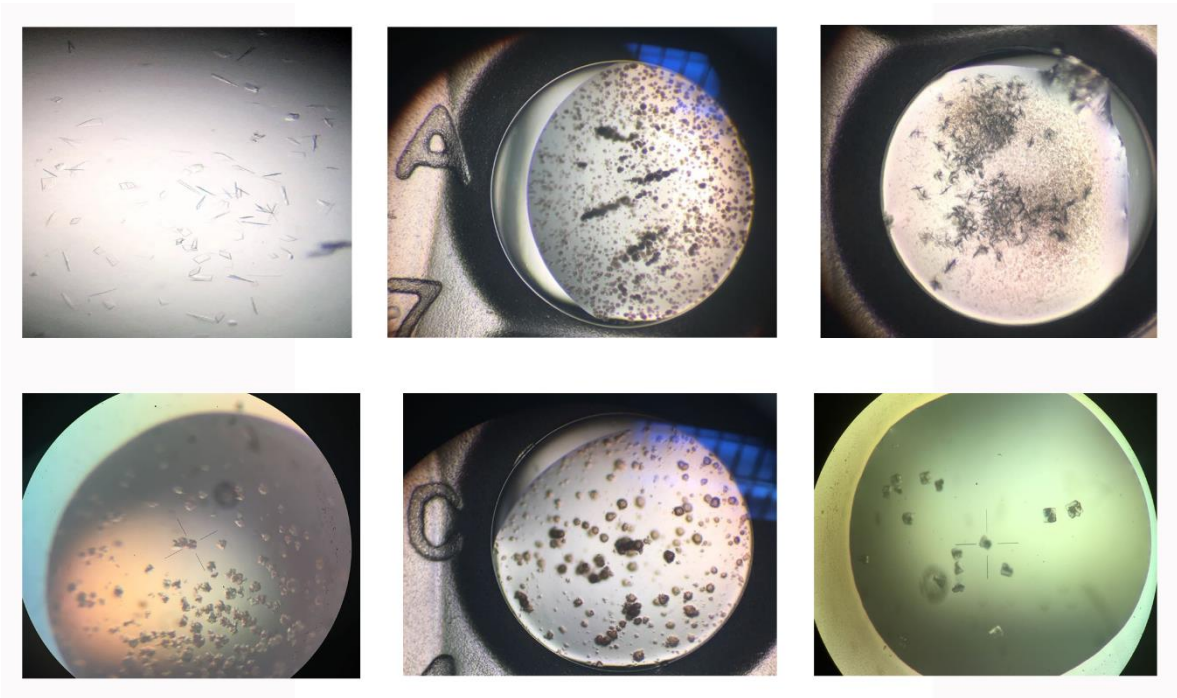


Figura 17. Cristales obtenidos para AtChi1 y AtChi2 en algunas condiciones de los paquetes Cristal Screen I y Cristal Screen II.

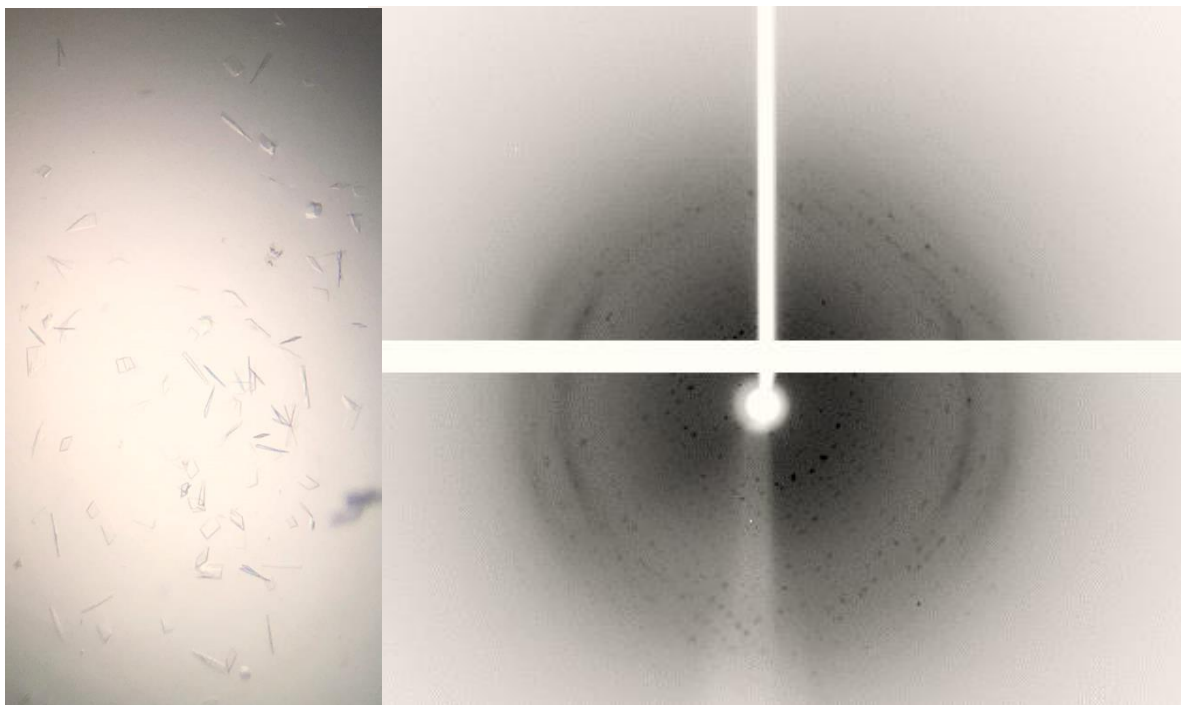


Figura 18. Cristales y patrón de difracción de los cristales de AtChi1 obtenidos en la condición 50 del CSI que contiene 0.5 M de sulfato de litio y 15% de PEG 8000.

7. CONCLUSIONES

La identificación, aislamiento y clonación de dos quitinasas de *A. tequilana* constituyen el primer estudio de enzimas de esta clase en todo el género *Agave*. Dichas enzimas pertenecen a la clase I que consta de un dominio CBD y un dominio catalítico, cuya organización espacial se obtuvo empleando datos de SAXS. Asimismo, por primera vez se mostraron las posibles conformaciones del conector flexible que une a ambos dominios. El análisis conjunto de nuestros resultados experimentales e *in silico* sugieren que la presencia de seis residuos diferentes entre las dos enzimas, ubicados cerca de la región interdominios, podrían ser los responsables de las conformaciones ligeramente disímiles entre ambas quitinasas. Estas características podrían ser responsables de las diferentes propiedades cinéticas y parámetros termodinámicos obtenidos en la formación de los complejos proteína-ligando.

Los parámetros cinéticos y termodinámicos están en el mismo intervalo informado para quitinasas de clase I de otras plantas, lo cual se corresponde con la presencia, en las enzimas de *Agave*, de los residuos involucrados en la fijación del sustrato y la catálisis conservados para los miembros de esta clase. La sobreexpresión de AtChi2 en plantas infectadas con *F. oxysporum*, aunada a la actividad antifúngica mostrada por esta enzima, nos permite clasificar a AtChi2 como una proteína PR. Por la identidad de secuencia entre ambas enzimas y por su actividad antifúngica sugerimos que AtChi1 también lo es. Estos resultados constituyen la primera caracterización de alguna proteína del sistema de defensa de cualquier planta del género *Agave* y podría ayudar a desarrollar especies más resistentes a la patogénesis.

En general, la información aquí presentada podría servir de base para optimizar y mejorar quitinasas de plantas, en cuanto a estabilidad y actividad, mediante ingeniería de proteínas.

8. PERSPECTIVAS

- 1- Expresar los dominios de AtChi1 y AtChi2 por separado para estudiar la contribución diferencial tanto a la unión como a la catálisis de cada dominio con diferentes sustratos.
- 2- Una vez realizado el estudio anteriormente propuesto se pueden construir quimeras intercambiando los conectores entre dominios de ambas enzimas para ver el efecto que tiene sobre las actividades catalíticas y así comprobar el efecto real de las mutaciones encontradas en una respecto a la otra.

3- Continuar haciendo pruebas de cristalización para obtener la estructura cristalográfica de alguna de las enzimas completa, lo cual sólo se ha logrado para una quitinasa de clase I y podría contribuir a complementar el estudio estructural que se describe en este trabajo empleando SAXS y técnicas *in silico*.

4- Emplear las enzimas o quimeras más activas en pruebas de actividad antifúngica y/o antibacteriana frente a otros patógenos incluidos los que afectan al género *Agave* y agregar al estudio otras técnicas para probar esta actividad que no sean sólo las de inhibición del crecimiento radial.

9. REFERENCIAS

- 1 García-Herrera J, Méndez-Gallegos S de J & Talavera-Magaña D (2010) El género *Agave* spp. en México: principales usos de importancia socioeconómica y agroecológica. *Rev. Salud Pública y Nutr.* **2010**, 109–129.
- 2 Pankoke H, Buschmann T & Müller C (2013) Phytochemistry role of plant β -glucosidases in the dual defense system of iridoid glycosides and their hydrolyzing enzymes in *Plantago lanceolata* and *Plantago major*. *Phytochemistry* **94**, 99–107.
- 3 Fenny P (1976) Plant apparency and chemical defense. *Recent Adv. Phytochem.*, 1–40.
- 4 Lundstedt J & Vald R (2013) Mecanismos de defensa de las plantas e inducción de resistencia. *ASP Chile Boletín técnico Marzo*. 1–4.
- 5 Prasannath K (2017) Plant defense-related enzymes against pathogens: A Review. *AGRIEAST J. Agric. Sci.* **11**, 38–48.
- 6 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. (Amsterdam)*. **130**, 847–852.
- 7 Suo Y & Leung DWM (2001) Elevation of extracellular beta-1,3-glucanase and chitinase activities in rose in responds to treatment with acibenzolar-s-methyl and infection by *D. rosae*. *J. Plant Physiol* **158**, 971–976.
- 8 Kombrink E & Somssich I. (2003) Expression, regulation and functional roles of [beta]-1,3-glucanase and chitinase in germinating tomato seeds. *University of California, Davis*, 107–128.

- 9 Antoniw, J.F; Ritter, C.E; Pierpoint, W.S, Van Loon LC (1980) Comparison of Three Pathogenesis-related proteins from plants of two cultivars of tobacco infected with TMV. *J. gen. Virol* **47**, 79–87.
- 10 Ano A, Takayanagi T, Uchibori T, Okuda T & Yokotsuka K (2003) Characterization of a class III chitinase from *Vitis vinifera* cv. Koshu. *J. Biosci. Bioeng.* **95**, 645–647.
- 11 Nagpure A, Choudhary B & Gupta RK (2014) Chitinases : in agriculture and human healthcare. *Crit Rev Biotechnol* **8551**, 215–232.
- 12 Verburg JG & Huynh QK (1991) Purification and characterization of an antifungal chitinase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **95**, 450–455.
- 13 van Loon LC, Rep M & Pieterse CMJ (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* **44**, 135–162.
- 14 Hamid R, Khan MA, Ahmad M, Ahmad MM, Abdin MZ, Musarrat J & Javed S (2013) Chitinases : An update. *J. Pharm. Bioallied Sci.* **5**, 21–29.
- 15 Ruggiero MA, Gordon DP, Orrell TM, Bailly N, Bourgoin T, Brusca RC, Cavalier-Smith T, Guiry MD & Kirk PM (2015) A higher level classification of all living organisms. *PLoS One* **10**, 1–60.
- 16 Goñi O, Sanchez-Ballesta MT, Merodio C & Escribano MI (2013) Two cold-induced family 19 glycosyl hydrolases from cherimoya (*Annona cherimola*) fruit: An antifungal chitinase and a cold-adapted chitinase. *Phytochemistry* **95**, 94–104.
- 17 Han P, Yang C, Liang X & Li L (2016) Identification and characterization of a novel chitinase with antifungal activity from “Baozhu” pear (*Pyrus ussuriensis* Maxim.). *Food Chem.* **196**, 808–814.
- 18 Taira T, Ohnuma T, Yamagami T, Aso Y & 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.
- 19 Lombard V, Golaconda Ramulu H, Drula E, Coutinho PM & Henrissat B (2014) The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res.* **42**, D490–D495.
- 20 Mccarter JD & Withers SG (1994) Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. *Curr.*

Opin. Struct. Biol. **4**, 885–892.

- 21 Iseli B, Armand S, Boller T, Neuhaus J & Henrissat B (1996) Plant chitinases use two different hydrolytic mechanisms. *FEBS Lett.* **382**, 186–188.
- 22 Beintema JJ (1994) Structural features of plant chitinases and chitin-binding proteins. *FEBS Lett.* **350**, 159–163.
- 23 Kasprzewska A (2003) Plant chitinases - regulation and function. *Cell. Mol. Biol. Lett.* **8**, 809–824.
- 24 Neuhaus JM, Fritig B, Linthorst HJM, Meins F, Mikkelsen JD & Ryals J (1996) A revised nomenclature for chitinase genes. *Plant Mol. Biol. Report.* **14**, 102–104.
- 25 Su Y, Xu L, Wang S, Wang Z, Yang Y, Chen Y & Que Y (2015) Identification, phylogeny, and transcript of chitinase family genes in sugarcane. *Sci. Rep.* **5**, 1–15.
- 26 Leners DR & Raikhelq V (1992) The gene for stinging nettle lectin (*Urtica dioica* agglutinin) encodes both a lectin and a chitinase. *J. Biol. Chem.* **267**, 11085–11091.
- 27 Neuhaus J, Stichert 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.
- 28 Legrand M, Kauffmann S, Geoffroy P & Fritig B (1987) Biological function of pathogenesis-related proteins: Four tobacco pathogenesis-related proteins are chitinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 6750–6754.
- 29 Krishnaveni S, Liang GH, Muthukrishnan S & Manickam A (1999) Purification and partial characterization of chitinases from sorghum seeds. *Plant Sci.* **144**, 1–7.
- 30 Hawkins LK, Mylroie JE, Oliveira DA, Smith JS, Ozkan S, Windham GL, Williams WP & Warburton ML (2015) Characterization of the maize chitinase genes and their effect on *Aspergillus flavus* and aflatoxin accumulation resistance. *PLoS One* **10**, 1–22.
- 31 Taira T, Toma N & Ishihara M (2005) Purification, characterization, and antifungal activity of chitinases from pineapple (*Ananas comosus*) leaf. *Biosci. Biotechnol. Biochem. ISSN* **69**, 189–196.
- 32 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.
- 33 Ohnuma T, Umemoto N, Kondo 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.
- 34 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 Struct. Funct. Bioinforma.* **78**, 2295–2305.
- 35 Sandhu JS, Sidhu MK & Yadav IS (2013) *Sustainable Agriculture Reviews*. 163–212.
- 36 Cortés-Romero C, Martínez-Hernández A, Mellado-Mojica E, López MG & Simpson J (2012) Molecular and functional characterization of novel fructosyltransferases and invertases from Agave tequilana. *PLoS One* **7**, 1–13.
- 37 Davis SC, Dohleman FG & Long SP (2011) The global potential for Agave as a biofuel feedstock. *GCB Bioenergy* **3**, 68–78.
- 38 Farías-Sánchez JC, Velázquez-Valadez U, Vargas-Santillán A, Pineda-Pimentel MG, Mendoza-Chávez EA, Rutiaga-Quiñones JG, Saucedo-Luna J & Castro-Montoya AJ (2016) Production of fermentable sugars and hydrogen-rich gas from *Agave tequilana* biomass. *Bioenergy Res.* **9**, 1015–1022.
- 39 Vargas-Maya NI, González-Hernández GA, Padilla-Guerrero IE & Torres-Guzmán JC (2017) Overexpression of smORF YNR034W-A/EGO4 in *Saccharomyces cerevisiae* increases the fermentative efficiency of *Agave tequilana* Weber must. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **44**, 63–74.
- 40 Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ & Higgins DG (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**, 2947–2948.
- 41 Gross SM, Martin JA, Simpson J, Abraham-Juarez MJ, Wang Z & Visel A (2013) De novo transcriptome assembly of drought tolerant CAM plants, *Agave deserti* and *Agave tequilana*. *BMC Genomics* **14**, 1–14.
- 42 Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W & Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389–3402.

- 43 Petersen TN, Brunak S, von Heijne G & Nielsen H (2011) SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat. Methods* **8**, 785–786.
- 44 Käll L, Krogh A & Sonnhammer ELL (2007) Advantages of combined transmembrane topology and signal peptide prediction-the Phobius web server. *Nucleic Acids Res.* **35**, 429–432.
- 45 Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680.
- 46 Morrissey JH (1981) Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Anal. Biochem.* **117**, 307–310.
- 47 Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD & Bairoch A (2005) Protein identification and analysis tools on the ExPASy Server. *Proteomics Protoc. Handb.*, 571–608.
- 48 Micsonai A, Wien F, Kernya L, Lee Y-H, Goto Y, Réfrégiers M & Kardos J (2015) Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, E3095–E3103.
- 49 Miller GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**, 426–428.
- 50 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.
- 51 Lavinder JJ, Hari SB, Sullivan BJ & Magliery TJ (2009) High-throughput thermal scanning: A general, rapid dye-binding thermal shift screen for protein engineering. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 3794–3795.
- 52 Franke D, Petoukhov M V., Konarev P V., Panjkovich A, Tuukkanen A, Mertens HDT, Kikhney AG, Hajizadeh NR, Franklin JM, Jeffries CM & Svergun DI (2017) ATSAS 2.8: A comprehensive data analysis suite for small-angle scattering from macromolecular solutions. *J. Appl. Crystallogr.* **50**, 1212–1225.
- 53 Konarev P V, Volkov V V, Sokolova A V, Koch MHJ & Svergun DI (2003) PRIMUS: a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis. *J. Appl. Crystallogr.* **36**, 1277–1282.

- 54 Svergun DI (1992) Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. *J. Appl. Crystallogr.* **25**, 495–503.
- 55 Franke D & Svergun DI (2009) DAMMIF, a program for rapid ab-initio shape determination in small-angle scattering. *J. Appl. Crystallogr.* **42**, 342–346.
- 56 Volkov V V & Svergun DI (2003) Uniqueness of ab initio shape determination in small-angle scattering. *J. Appl. Crystallogr.* **36**, 860–864.
- 57 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.
- 58 Svergun D, Barberato C & Koch MHJ (1995) CRY SOL a program to evaluate X-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates. *J. Appl. Crystallogr.* **28**, 768–773.
- 59 Trott O & Olson AJ (2009) AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem.* **31**, 455–461.
- 60 Khan A, Nasir IA, Tabassum B, Aaliya K, Tariq M & Rao AQ (2017) Expression studies of chitinase gene in transgenic potato against *Alternaria solani*. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* **128**, 563–576.
- 61 Osman GH, Assem SK, Alreedy RM & El-ghareeb DK (2015) Development of insect resistant maize plants expressing a chitinase gene from the cotton leaf worm, *Spodoptera littoralis*. *Sci. Rep.* **5**, 1–10.
- 62 Xu T, Zhong C, Wang A, Guo Z, Bu X, Zhou Y, Tian Y, Fu XH, Zhu Z & Zhang Y (2017) YKL-40 is a novel biomarker for predicting hypertension incidence among prehypertensive subjects: A population-based nested case-control study in China. *Clin. Chim. Acta* **472**, 146–150.
- 63 Lee CG, Silva CA Da, Cruz CS Dela, Ahangari F, Ma B, Kang M, He C, Takyar S & Elias JA (2011) Role of chitin and chitinase / chitinase-like proteins in inflammation, tissue remodeling, and injury. *Annu. Rev. Physiol.* **73**, 479–501.
- 64 Vastrad B, Vastrad C, Godavarthi A & Chandrashekar R (2017) Molecular mechanisms underlying gliomas and glioblastoma pathogenesis revealed by bioinformatics analysis

- of microarray data. *Med. Oncol.* **34**, 1–30.
- 65 Dahiya N, Tewari R & Hoondal GS (2006) Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: A review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **71**, 773–782.
- 66 Kowsari M, Motallebi M & Zamani M (2014) Protein engineering of chit42 towards improvement of chitinase and antifungal activities. *Curr. Microbiol.* **68**, 495–502.
- 67 Martínez-Caballero S, Cano-Sánchez P, Mares-mejía I, Díaz-Sánchez AG, Macías-Rubalcaba 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.
- 68 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.
- 69 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 - Proteins Proteomics* **1844**, 793–802.
- 70 Datta J & Lal N (2018) Induced temporal and spatial variation in host defence enzymes in response to *Fusarium wilt* in chickpea. *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci.* **7**, 426–431.
- 71 Backiyarani S, Uma S, Nithya S, Chandrasekar A, Saraswathi MS, Thangavelu R, Mayilvaganan M, Sundararaju P & Singh NK (2015) Genome-wide analysis and differential expression of chitinases in banana against root lesion nematode (*Pratylenchus coffeae*) and eumusa leaf spot (*Mycosphaerella eumusae*) pathogens. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **175**, 3585–3598.
- 72 Bagnaresi P, Biselli C, Orrù L, Urso S, Crispino L, Abbruscato P, Piffanelli P, Lupotto E, Cattivelli L & Valè G (2012) Comparative transcriptome profiling of the early response to *Magnaporthe oryzae* in durable resistant vs susceptible rice (*Oryza sativa* L.) genotypes. *PLoS One* **7**, 1–26.
- 73 Samac DA, Hironaka CM, Yallaly PE & Shah DM (1990) Isolation and characterization of the genes encoding basic and acidic chitinase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.*

93, 907–914.

- 74 Bishop JG, Dean AM & Mitchell-Olds T (2000) Rapid evolution in plant chitinases: Molecular targets of selection in plant-pathogen coevolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 5322–5327.
- 75 Passarinho PA & de Vries SC (2002) Arabidopsis Chitinases: a genomic survey. *Arab. B. The Arabidopsis Book* **1**, e0023.
- 76 Takashima T, Ohnuma T & Fukamizo T (2018) NMR analysis of substrate binding to a two-domain chitinase: Comparison between soluble and insoluble chitins. *Carbohydr. Res.* **458–459**, 52–59.
- 77 Ohnuma T, Sørli M, Fukuda T, Kawamoto N & Taira T (2011) Chitin oligosaccharide binding to a family GH19 chitinase from the moss *Bryum coronatum*. *FEBS J.* **278**, 3991–4001.
- 78 Zhang J, Kumar N, Yan Q, Yang S & Jiang Z (2013) Purification and characterisation of a novel chitinase from persimmon (*Diospyros kaki*) with antifungal activity. *Food Chem.* **138**, 1225–1232.
- 79 Rashel S, Rahman M, Tasnim S, Karim R, Khatun N, Hasan I, Amin R, Shohidul S & Asaduzzaman AKM (2016) Purification and characterization of a novel chitinase from *Trichosanthes dioica* seed with antifungal activity. *Int. J. Biol. Macromol.* **84**, 62–68.
- 80 Wang S, Ye X, Chen J & Rao P (2012) A novel chitinase isolated from *Vicia faba* and its antifungal activity. *FRIN* **45**, 116–122.
- 81 Chen Y-T, Hsu L-H, Huang I-P, Tsai T-C, Lee G-C & Shaw J-F (2007) Gene cloning and characterization of a novel recombinant antifungal chitinase from papaya (*Carica papaya*). *J. Agric. Food Chem.* **55**, 714–722.
- 82 Truong NH, Park SM, Nishizawa Y, Watanabe T, Sasaki T & Itoh Y (2003) Structure, heterologous expression, and properties of rice (*Oryza sativa* L.) family 19 chitinases. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **67**, 1063–1070.
- 83 Wang S, Shao B, Fu H & Rao P (2009) Isolation of a thermostable legume chitinase and study on the antifungal activity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **85**, 313–321.
- 84 Moore KG, Price MS, Boston RS, Weissinger AK & Payne GA (2004) A Chitinase from

- Tex6 maize kernels inhibits growth of *Aspergillus flavus*. *Phytopathology* **94**, 82–87.
- 85 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.
- 86 Valentini E, Kikhney AG, Previtali G, Jeffries CM & Svergun DI (2015) SASBDB, a repository for biological small-angle scattering data. *Nucleic Acids Res.* **43**, D357–D363.
- 87 Putnam CD, Hammel M, Hura GL & Tainer JA (2007) X-ray solution scattering (SAXS) combined with crystallography and computation: Defining accurate macromolecular structures, conformations and assemblies in solution. *Q. Rev. Biophys.* **40**, 191–285.
- 88 Kim DE, Chivian D & Baker D (2004) Protein structure prediction and analysis using the Robetta server. *Nucleic Acids Res.* **32**, 526–531.
- 89 Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS & Thornton JM (1993) PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.* **26**, 283–291.
- 90 S. Hovmöller, T. Zhou TO (2002) Conformations of amino acids in proteins research papers. *Biol. Crystallogr.* **D58**, 768–776.
- 91 Ohnuma T, Taira T, Umemoto N, Kitaoku Y, Sørlie M, Numata T & Fukamizo T (2017) Crystal structure and thermodynamic dissection of chitin oligosaccharide binding to the LysM module of chitinase-A from *Pteris ryukyuensis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **494**, 736–741.
- 92 Winn MD, Ballard CC, Cowtan KD, Dodson EJ, Emsley P, Evans PR, Keegan RM, Krissinel EB, Leslie AGW, McCoy A, McNicholas SJ, Murshudov GN, Pannu NS, Potterton EA, Powell HR, Read RJ, Vagin A & Wilson KS (2011) Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **67**, 235–242.
- 93 Rodrigues CHM, Pires DEV & Ascher DB (2018) DynaMut: Predicting the impact of mutations on protein conformation, flexibility and stability. *Nucleic Acids Res.* **46**, W350–W355.
- 94 Toufiq N, Tabassum B, Bhatti MU, Khan A, Tariq M, Shahid N, Nasir IA & Husnain T

(2017) Improved antifungal activity of barley derived chitinase I gene that overexpress a 32 kDa recombinant chitinase in *Escherichia coli* host. *Brazilian J. Microbiol.* **305**, 1–8.



10. ANEXO

Yusvel Sierra-Gómez, Annia Rodríguez-Hernández, Patricia Cano-Sánchez, Homero Gómez-Velasco, Alejandra Hernández-Santoyo, Dritan Siliqi and Adela Rodríguez-Romero (2019)

A biophysical and structural study of two chitinases from *Agave tequilana* and their potential role as defense proteins.

FEBS Journal **286**, 4778-4796.

A biophysical and structural study of two chitinases from *Agave tequilana* and their potential role as defense proteins

Yusvel Sierra-Gómez¹, Annia Rodríguez-Hernández¹, Patricia Cano-Sánchez¹, Homero Gómez-Velasco¹, Alejandra Hernández-Santoyo¹, Dritan Siliqi²  and Adela Rodríguez-Romero¹ 

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

² Istituto di Cristallografia, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Bari, Italy

Keywords

Agave tequilana; antifungal proteins; binding energetics; class I chitinases; SAXS models

Correspondence

A. Rodríguez-Romero, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Coyoacán, Ciudad de México 04510, Mexico

Tel: +5255 56224568

E-mail: adela@unam.mx

(Received 21 December 2018, revised 4 May 2019, accepted 8 July 2019)

doi:10.1111/febs.14993

Plant chitinases are enzymes that have several functions, including providing protection against pathogens. *Agave tequilana* is an economically important plant that is poorly studied. Here, we identified a chitinase from short reads of the *A. tequilana* transcriptome (AtChi1). A second chitinase, differing by only six residues from the first, was isolated from total RNA of plants infected with *Fusarium oxysporum* (AtChi2). Both enzymes were overexpressed in *Escherichia coli* and analysis of their sequences indicated that they belong to the class I glycoside hydrolase family19, whose members exhibit two domains: a carbohydrate-binding module and a catalytic domain, connected by a flexible linker. Activity assays and thermal shift experiments demonstrated that the recombinant *Agave* enzymes are highly thermostable acidic endochitinases with T_m values of 75 °C and 71 °C. Both exhibit a molecular mass close to 32 kDa, as determined by MALDI-TOF, and experimental pI's of 3.7 and 3.9. Coupling small-angle x-ray scattering information with homology modeling and docking simulations allowed us to structurally characterize both chitinases, which notably show different interactions in the binding groove. Even when the six different amino acids are all exposed to solvent in the loops located near the linker and opposite to the binding site, they confer distinct kinetic parameters against colloidal chitin and similar affinity for (GlnNAc)₆, as shown by isothermal titration calorimetry. Interestingly, binding is more enthalpy-driven for AtChi2. Whereas the physiological role of these chitinases remains unknown, we demonstrate that they exhibit important antifungal activity against chitin-rich fungi such as *Aspergillus* sp.

Database

SAXS structural data are available in the SASBDB database with accession numbers SASDDE7 and SASDDA6.

Enzymes

Chitinases (EC 3.2.1.14).

Abbreviations

(GlcNAc)₆, chitohexaose; CatD, catalytic domain; CBM, carbohydrate-binding module; CD, circular dichroism; DLS, dynamic light scattering; GH, glycoside hydrolase; GlcNAc, *N*-acetylglucosamine; ITC, isothermal titration calorimetry; MALDI-TOF, matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight; NMR, nuclear magnetic resonance; PR, pathogenesis-related; SAXS, small-angle x-ray scattering; SEC, size-exclusion chromatography; T_m, melting temperature.

Introduction

Chitinases (EC 3.2.1.14) are enzymes that hydrolyze β -1,4-bonds between *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) residues in chitin ($C_8H_{13}NO_5$)_{*n*}, which is present in the cell walls of fungi, the exoskeleton of most insects, in yeasts, algae, and the shells of crustaceans, among others [1]. This type of enzymes is involved in numerous physiological events such as abiotic stress responses [2], including antifungal activity versus pathological fungus [3,4]. The Carbohydrate-Active Enzyme (CAZy) database classifies most chitinases in the glycosyl hydrolase (GH) families 18, 19 based on primary sequence, three-dimensional structure, and catalytic mechanism [5]. Those belonging to the GH18 family are found in most organisms, whereas the ones in the GH19 family have been detected mainly in plants as part of the defense mechanism against pathogens. Chitinases of the GH19 family consist of two domains, the N-terminal carbohydrate-binding module (CBM18) and a catalytic domain (CatD) that exhibits an α -helix rich/lysozyme-like structure with diverse loop arrangements and they hydrolyze their substrates through a single-displacement mechanism with inversion of the anomeric carbon configuration [6].

Plant chitinases are further classified into seven classes (I–VII) [7–11]. Classes I, II, IV, VI, and VII belong to the GH19 family, whereas classes III and V are grouped in the GH18 family [12]. In class I chitinases, the CatD and CBM18 domains are connected by a flexible linker that varies in length and amino acid composition [9]. The CBM18, or hevein-like domain, is also present in class IV but is absent in class II chitinases [7]. Several studies indicate that one plant can possess numerous chitinases belonging to different classes, or several isoforms with redundant functions in order to guarantee the accomplishment of the biological function [12–15].

Most investigations into the structure–function relationships of plant chitinases, belonging to classes I and IV, have been carried out on empty catalytic domains or in complex with GlcNAc oligosaccharides of up to six units [16,17]. However, for enzymes in class I, it has not been possible to obtain a full-length crystallographic structure due to the flexibility of the linker that binds the two domains. There is only one report in which both domains, without the linker, are observed in the crystal structure (PDB entry 2DKV) [18]. These domains seem to contribute differently to the activity of class I chitinases, even in defense-related functions [4,15]. Therefore, it is interesting to perform studies that provide information regarding the spatial distribution of both domains and its importance in the

activity and kinetic properties of class I chitinases. The structural characterization of chitinases from plants may lead to the development of new chimeric enzymes that could be used to obtain varieties that are more resistant to pathogens [19].

While many chitinases are known to be important in numerous plants, none have been isolated from the genus *Agave*. There are only four enzymes that have been identified in the transcriptome of this plant, and they were isolated and characterized from total RNA: two fructosyltransferases (1-SST and 6G-FFT) and two types of invertases (cell wall and vacuolar) [20]. *Agaves* are succulent monocotyledonous plants native to deserts or moderately dried environments of North America. The genus *Agave* is cultivated to produce fiber, food, beverages, fuel, etc., and has great socio-economic and agroecological value, especially in hot and drought-prone regions of the world; despite its adaptability, these plants suffer from diseases, such as those caused by insects and fungus. Within this genus, *Agave tequilana* is primarily used for the elaboration of beverages, in soil conservation; furthermore, it has also been indicated that this plant can potentially be an important source of lignocellulosic bioenergy feedstocks [21–23].

Here we describe the overexpression, catalytic activity, and binding affinity determinations, as well as a structural characterization in solution of two novel class I chitinases, present in *A. tequilana*. Isothermal titration calorimetry (ITC) using chitohexaose (GlcNAc)₆ and the active enzymes, under very low activity conditions (pH 7.0, 18 °C), allowed us to determine the K_d and the associated thermodynamic parameters. The structural characterization of both chitinases by means of small-angle x-ray scattering (SAXS) analysis and homology modeling showed subtle differences between them. Docking simulations using (GlcNAc)₆ revealed slightly different binding grooves. Finally, these enzymes were found to be highly thermostable and exhibited antifungal activity versus *Aspergillus* sp., implying that they could exert a protective role in the plant.

Results

Class I chitinases obtained from the transcriptome and the cDNA of *Agave tequilana* plants

A class I chitinase from *A. tequilana* was assembled from transcriptome short readings. The whole gene was assembled and submitted for a nucleotide BLAST

alignment using the NCBI server [24], which confirmed that it corresponded to a class I chitinase. The sequence obtained (named AtChi1) corresponds to a class I chitinase that exhibits more than 66% sequence identity with chitinases from *Poa pratensis*, *Ananas comosus*, *Zea mays*, and *Oryza sativa*. The gene identified encodes for a protein of 324 residues, including a signal peptide of 20 residues at the N terminus (Fig. S1). According to the predictions of servers SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) [25] and Phobius (<http://phobius.sbc.su.se/>) [26], the first 60 base pairs encode for a signal peptide for secretion. After the signal peptide, residues 1–39 correspond to the CBM18 present in class I plant chitinases that shows a hevein-like fold [27,28]. Residues Gly40 to Ser66 form the interdomain flexible linker (shown in yellow in Fig. 1A) that connects the CBM18 with the C-terminal CatD.

Moreover, a cDNA fragment encoding an *A. tequilana* class I chitinase that lacks a signal peptide was amplified from total RNA of *Fusarium oxysporum* infected leaves using RT-PCR. The PCR products obtained from infected leaves were subjected to agarose gel electrophoresis; and from leaves with 4 weeks

of infection, three bands of approximately 900, 1000, and 1200 bp were identified (Fig. 1B). However, from the leaves with 7 weeks of infection, only the 900 bp band was still visible. This band was isolated, cloned and expressed (AtChi2) (Fig. 1B). The latter has only six residues different from those in AtChi1 (shown in green in Fig. 1A) but conserves the putative catalytic acidic residues, Glu129 and Glu151, that have been described for other plant class I chitinases (shown in magenta) (Fig. 1A) [18,29].

Characterization of the purified AtChi1 and AtChi2

Both chitinases were purified from 16 h cell cultures of Rosetta Gami and SHuffle strains, respectively. These strains were selected because they allow the correct formation of disulfide bonds, of which class I plant chitinases usually have more than six (three in the catalytic domain and four in the CBM18). The protocol used allowed us to obtain the two enzymes with a high degree of homogeneity, appearing as single bands on SDS/PAGE gels near 31 kDa (Fig. 2A). Recombinant AtChi1 and AtChi2 were purified with yields of 4 and

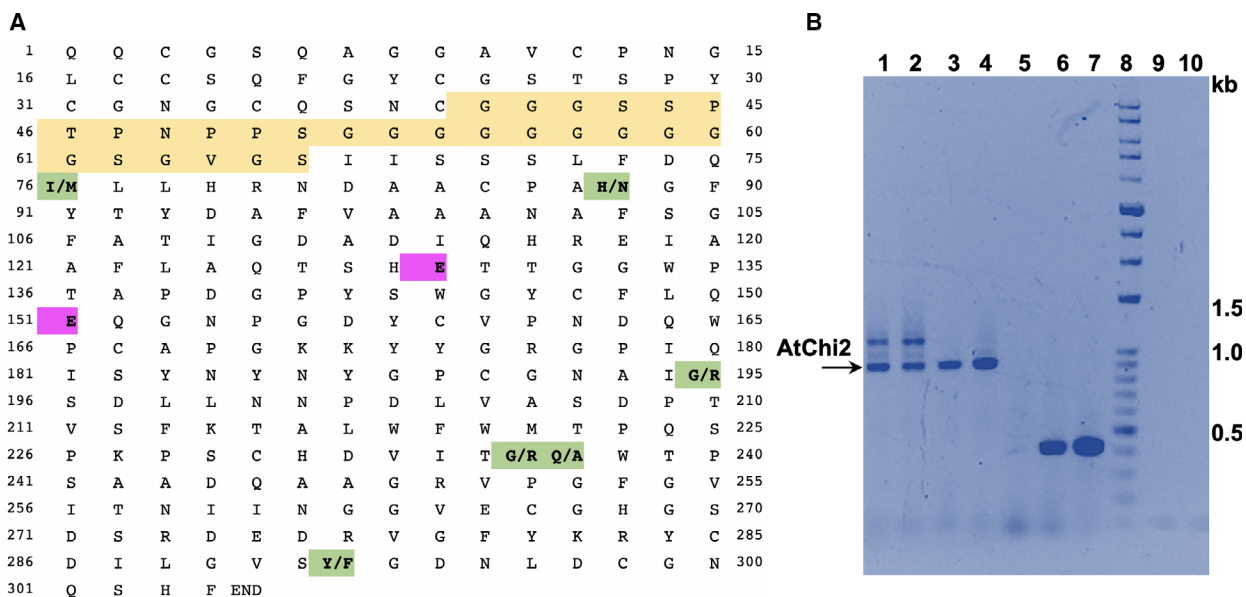


Fig. 1. Amino acid sequences of chitinases from *Agave tequilana*. (A) Sequence comparison between AtChi1 assembled from short reads of *A. tequilana* transcriptome and AtChi2 isolated from infected plant total RNA. Mature AtChi1 comprises residues Gln1 to Cys39 that correspond to the CBM18, the linker between the CBM18 and the catalytic domain shown in yellow (residues Gly40–Ser66), and the catalytic domain (residues Ile67–Phe304). Residues in green show the differences between the two isoforms, which are present in the catalytic domain. Residues shown in purple are the catalytic Glu129 and Glu151. (B) Agarose gel showing the AtChi2 gene from infected leaves total RNA (*A. tequilana* plants after 4 and 7 weeks of infection with *Fusarium oxysporum*). Lane 1: Big leaves (BL), 4 weeks after infection; Lane 2: Small leaves (SL), 4 weeks after infection; Lane 3: BL, 7 weeks after infection; Lane 4: SL, 7 weeks after infection; Lane 5: Negative control without polymerase; Lane 6: PCR positive control, BL-400 bp fragment of glyceraldehyde dehydrogenase (GDH); Lane 7: SL-GDH; Lane 8: 1 kb molecular weight ladder; Lane 9: BL without infection. Lane 10: SL without infection.

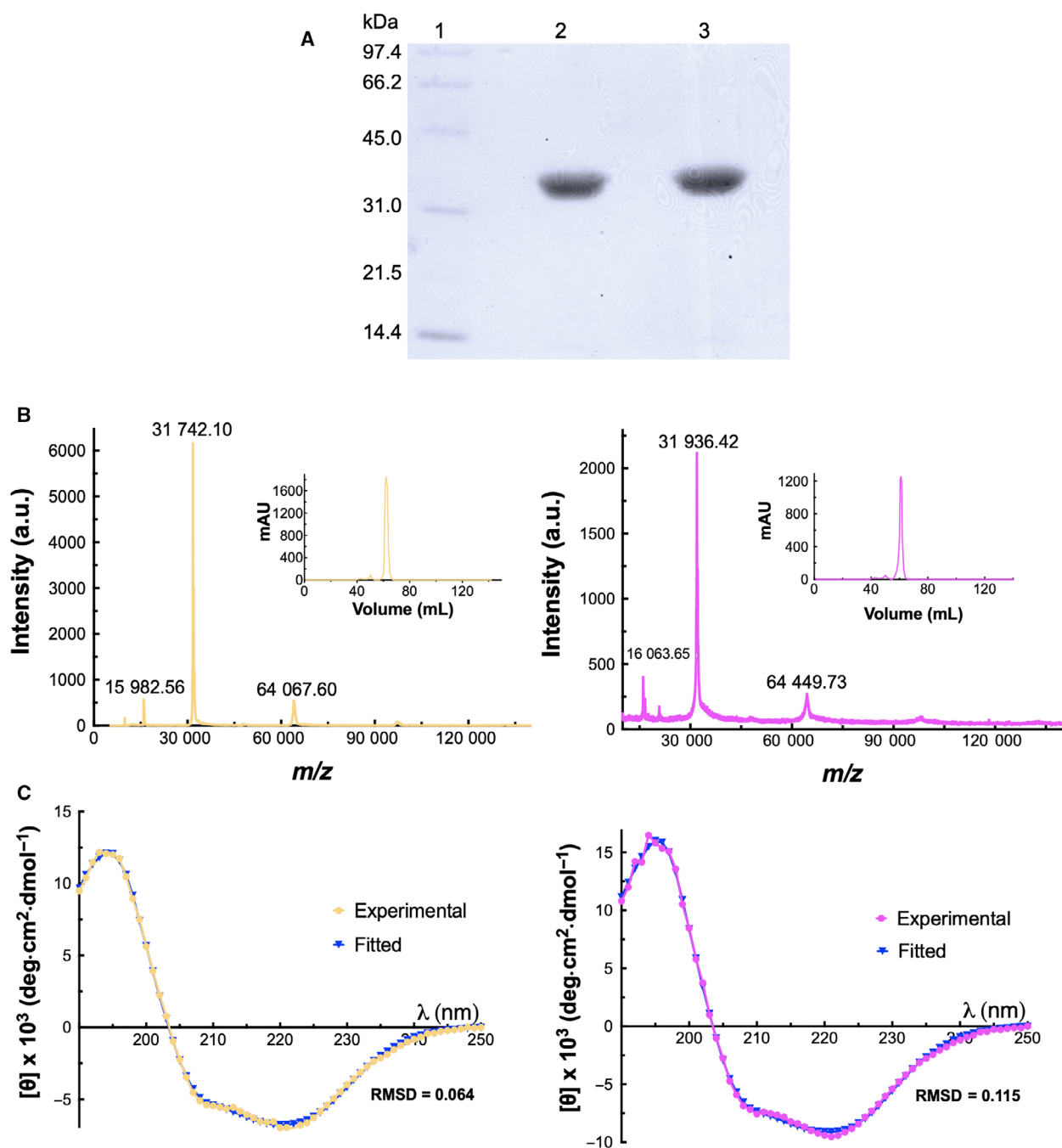


Fig. 2. Purification, mass determination, and folding analysis of AtChi1 and AtChi2. AtChi1: left side (yellow) and AtChi2: right side (purple). (A) SDS/PAGE of the purified enzymes: Lane 1, molecular weight size markers (kDa); Lane 2, AtChi1, Lane 3 AtChi2. (B) MALDI-TOF spectra for both enzymes; insets correspond to the SEC elution profile of the pure enzymes. (C) CD spectra in the far-UV region. [AtChi1] = 0.186 mg·mL⁻¹, [AtChi2] = 0.23 mg·mL⁻¹.

2 mg·L⁻¹ of culture, respectively. The mature AtChi1 has 304 residues, including 17 cysteines in conserved positions of the class I chitinases family, with a theoretical molecular mass of 31.7 kDa and pI of 4.7.

AtChi2 is a protein of 304 residues that also exhibits the conserved cysteine positions and has a theoretical molecular mass of 31.9 kDa and pI of 4.82. These theoretical masses were calculated for the recombinant

proteins with three additional residues at the N terminus due to the cleavage site for TEV, Gly-Gly-Ala for AtChi1 and Ser-Asn-Ala for AtChi2. The masses of the two proteins were confirmed by MALDI-TOF spectrometry (Fig. 2B) with base m/z peaks of 31.7 and 31.9 kDa, and the experimental pIs were 3.7 and 3.9, respectively.

Furthermore, the far-UV circular dichroism (CD) spectra of both enzymes were very similar and exhibited a clear helical character (Fig. 2C) with two negative peaks at 222 and 208 nm. However, the analysis indicated a high contribution of loops and flexible regions. The BeStSel server estimated equivalent amounts of α -helices and β -sheets, 24.4% and 23.5%, respectively for AtChi1, whereas for AtChi2 these values were 31.3% and 15%, respectively. It is important to note that this server predicted a high content of turns and other disordered structures for both enzymes: 52.2% for AtChi1 and 53.6% for AtChi2, results that are in agreement with the presence of loops and flexible regions common in 'loopful' plant class I chitinases (Fig. 2C) [17,18,30,31].

Notably, both chitinases only exhibited important activity over insoluble colloidal chitin, two orders of magnitude higher than the activity observed when the oligosaccharides chitohexaose (GlnNac)₆ and chitotriose (GlnNac)₃ were used under the same conditions (Fig. S2). No activity was detected with 4-Methylumbelliferyl *N*-acetyl- β -D-glucosaminide and 4-Methylumbelliferyl *N,N'*-diacetyl- β -D-chitobioside. The effect of pH on the stability of the two chitinases was measured using different buffers, ranging in pH from 2.0 to 10.0. As shown in Fig. 3A, both chitinases were optimally active at pH 5.0 (37 °C) using colloidal chitin as substrate. Moreover, both enzymes were stable over the pH range 3–10, retaining more than 75% of its activity even after incubation for 48 h at these pH values. Furthermore, the activities of the two chitinases were evaluated on colloidal chitin and data of initial rates versus substrate concentration were adjusted to a Michaelis–Menten plot and kinetic parameters were calculated (Fig. 3B). For AtChi1, $K_m = 4.84 \pm 0.45 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, $k_{\text{cat}} = 0.47 \pm 0.11 \text{ min}^{-1}$, and $k_{\text{cat}}/K_m = 9.7 \times 10^{-2} \text{ mL}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ at the conditions described in the **Materials and methods** section, whereas for AtChi2 $K_m = 8.01 \pm 0.67 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, $k_{\text{cat}} = 0.53 \pm 0.09 \text{ min}^{-1}$, and $k_{\text{cat}}/K_m = 6.6 \times 10^{-2} \text{ mL}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ in the same conditions (Fig. 3B), indicating a higher affinity and catalytic efficiency for AtChi1.

Analysis of thermal shift assays for the two chitinases indicated the higher melting temperatures (T_m) in pH values between 6.0 and 6.5 (Fig. 3C). The maximum T_m values were 75 °C and 71 °C for AtChi1 and

AtChi2, respectively. For this reason, we selected MES pH 6.0 as the condition of maximum stability.

Binding affinity and thermodynamic characterization

To measure the binding affinities between the two chitinases and chitohexaose, we performed ITC experiments and determined the equilibrium dissociation constant (K_d). Both enzymes bound chitohexaose with a stoichiometry of $n = 1$ and K_d values of 208 and 128 μM , respectively (Fig. 4A,B). These K_d values were consistent with the binding affinities reported for a class I GH19 chitinases from *Bryum coronatum* (moss) using ITC and GlcNac oligosaccharides [30]. Moreover, data showed a 1.5-fold difference in the enthalpy of formation for the chitohexaose–chitinase complex with a more negative value for AtChi1 $\Delta H = -8.6 \pm 0.1 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ compared to $\Delta H = -5.5 \pm 0.0 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ for the AtChi2. There is a 10-fold difference in entropy between the two enzymes with values of $-T\Delta S = 3.7 \pm 0.1 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ for AtChi1 and $-T\Delta S = 0.3 \pm 0.0 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ for AtChi2. It is important to mention that the activity of the two enzymes over chitohexaose was very low in the ITC assay conditions (pH 7.0, 18 °C), with a maximum 0.04% of the substrate consumed during the experiment.

Solution structure and homology modeling

We characterized the low-resolution overall shape and maximum particle size of the complete chitinases in solution using SAXS. Data collection and structural parameters for the experiments are reported in Table 1. Raw data for both enzymes, with insets of the Guinier plots, are shown in Fig. 5A. For AtChi1, we used the lowest protein concentration because we observed some aggregation during the experiment at higher concentrations. It is important to note that before the experiment both proteins were monodisperse and monomeric as confirmed by SEC (Fig. 2B, inset) and DLS (results not shown). For AtChi2 we used a merged file with the 7.5 and 3.75 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ concentrations for the analysis. All SAXS data are deposited in the SASBDB database [32] with IDs SASDDE7 and SASDDA6 for AtChi1 and AtChi2, respectively. The radius of gyration (R_g) determined for AtChi1 was $26.10 \pm 1.3 \text{ \AA}$, whereas for AtChi2 it was $24.1 \pm 0.47 \text{ \AA}$ (Fig. 5B). The Guinier plot reveals a linear fit suggesting that there are no inter-particle interactions at the concentration used for each protein. At this point, it is important to

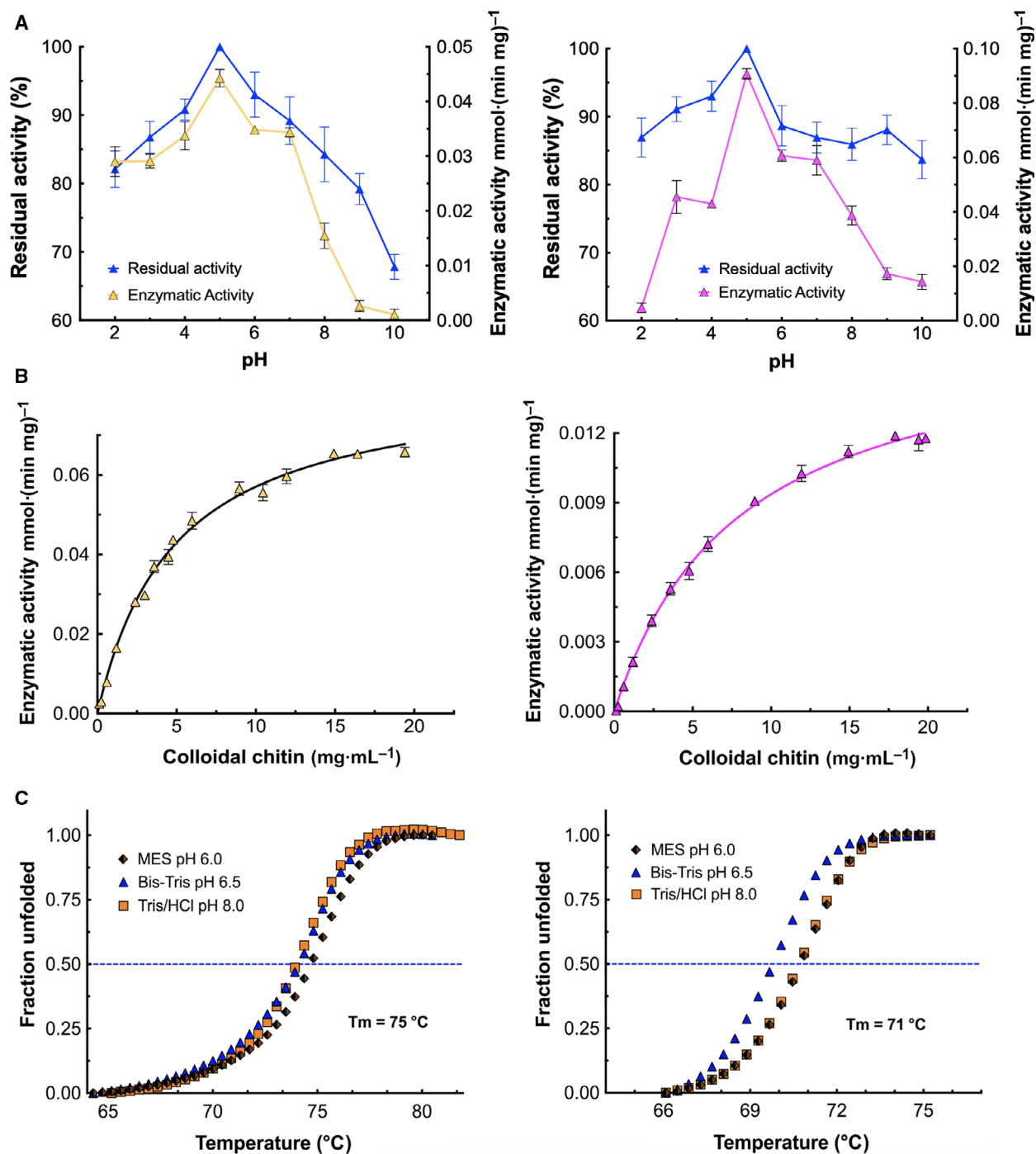


Fig. 3. Characterization of AtChi1 and AtChi2. AtChi1: yellow and AtChi2: purple. (A) Optimum pH for activity and stability (shown in blue) using colloidal chitin as substrate. [Colloidal chitin] = $4.78 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (w/v). Assay conditions: for activity, 24 h at 37°C ; for stability, 48 h. (B) Michaelis–Menten curves obtained using the GRAPHPAD software. (C) Thermodynamic stabilities using Thermal Shift Assays. In (A) and (B), the data show the means of three independent experiments and bars indicate the standard deviations.

mention that the Guinier analysis from ATSAS only gives fidelity coefficients, not linear regression coefficients. The maximum particle dimensions, derived

from the distance distribution function $P(r)$, were 97.6 and 98 Å for AtChi1 and AtChi2, respectively (Fig. 5B).

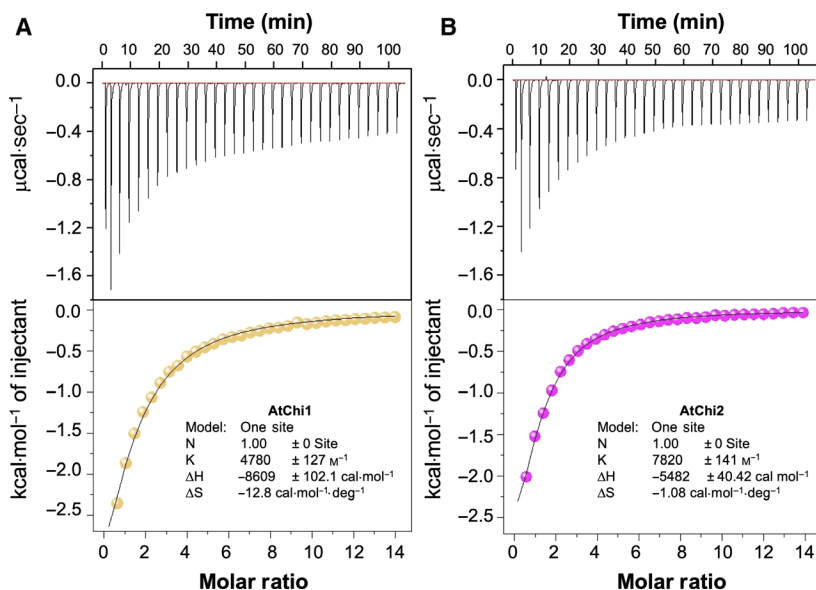


Fig. 4. ITC thermograms and theoretical fits for the binding of chitohexaose to AtChi1 (left) and AtChi2 (right). Titrations were conducted in 20 mM phosphate buffer pH 7.0 (18 °C). Thermodynamic parameters obtained from individual experiments are shown in boxes.

The *ab-initio* low-resolution molecular models of AtChi1 and AtChi2 in solution were generated using DAMMIF [33] and DAMFILT [34]. We also deposited the best model generated in DAMMIF for each enzyme in the SASBDB website. Both models clearly indicate the presence of two lobes that are joined by a hinge region that corresponds to the 27 amino acids linker (Fig. 5C). Three-dimensional models of AtChi1 and AtChi2 were generated with the Robetta server [35] that used the crystal structure of rice class I chitinase (PDB entry 2DKV) to model the CBM18 for both Agave enzymes. This structure lacks the linker between the catalytic domain and the CBM. The catalytic domains were modeled using the structure of the rye chitinase (PDB entry 4DWX) (identity 76.5%), that lacks the CBM18 and the linker. These AtChi1 and AtChi2 models showed 99.1% and 99.5% of the residues in the most favored region of the Ramachandran plot, respectively, and 0.9% and 0.5% in the disallowed regions of the Ramachandran plot, respectively [36]. For AtChi1, these residues correspond to Gln152 and Tyr 183, and for AtChi2 to Tyr 183, which are located in the chitin binding groove. Ramachandran outliers do happen in several enzymes and antibodies indicating strained conformations of residues in active or binding sites [37].

Robetta models were fitted to the experimental scattering curves from SAXS with the CRY SOL program [38]. The models for each enzyme with the best fitting to SAXS data were superimposed into the SAXS envelopes revealing good global fitting (Fig. 5C). For AtChi1 the chi-square goodness of fit for the three best Robetta models was: 4.09, 3.79, 4.03; and for AtChi2

Table 1. SAXS data collection and structural parameters

	AtChi1	AtChi2
Data collection parameters		
Detector	Rayonix MX225-HE	Pilatus3 X 1M
Defining slit size (<i>H</i> mm × <i>V</i> mm)	0.3 × 0.3	0.3 × 0.3
Detector distance (m)	1.78	1.80
Wavelength (Å)	1.127	1.127
Exposure time (s)	10 × 1	10 × 1
Protein concentration (mg·mL ⁻¹)	0.23–15	0.23–7.5
Temperature (K)	288	288
Structural parameters		
<i>R</i> _g from Guinier (nm)	2.6 ± 0.13	2.4 ± 0.047
<i>D</i> _{max} (nm)	9.7	9.8
Porod volume (nm ³)	52	49

these values were 2.44, 2.51 2.19. The best fitting for both enzymes is shown in Fig. 5C. The catalytic domains of both chitinases were almost identical with an RMSD of only 0.263 Å, while the linker and CBM18 exhibited slightly different conformations (Fig. 5D). It is important to mention that the best Robetta CatDs models were compared with the CatDs of plant class I chitinases deposited in the PDB and slight differences are observed in the longest loop (III), where Glu151 is located.

To get insight into the binding of chitohexaose, we used the homology models of the catalytic domains obtained using Robetta, which were fitted onto the SAXS experimental envelopes, with the lowest

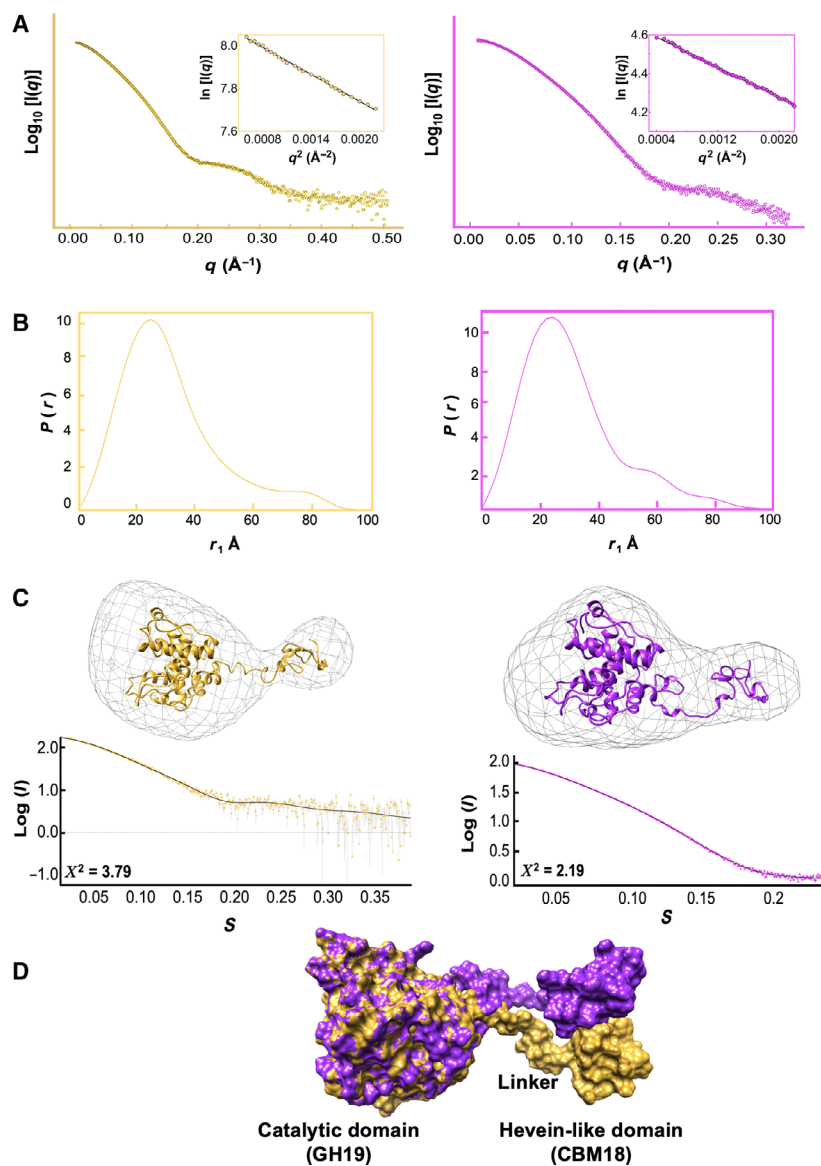


Fig. 5. SAXS analysis of AtChi1 (left) and AtChi2 (right). (A) Scattering experimental data with an inset of the Guinier plot. (B) Normalized inter-atomic pairwise distribution function $P(r)$. (C) Structural fitting of the Robetta models for AtChi1 (gold) and AtChi2 (purple) into the *ab initio* calculated SAXS envelopes. Lower panel shows simulated curves obtained with the *CRYSOLE* program [38]. Chi-squared values are indicated for both proteins (D) Superposition of the Robetta models for AtChi1 (gold) and AtChi2 (purple, in surface representation), which includes the CBM18 and the CatD.

chi-squared values. A superposition of these models showed RMSD values that varied from 0.08 Å (Model 1 versus Model 2) to 0.159 Å (Model 1 versus Model 5) for AtChi1, whereas for AtChi2 these values were 0.134–0.181 Å (Fig. S3). Docking experiments were performed allowing side-chain flexibility and even though the substrate binding clefts look almost identical to those in other plant chitinases, they showed slightly different binding energies ($\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$): -8.3 , -8.4 , -8.6 , -7.5 , -8.2 for the five AtChi1 dockings, whereas for AtChi2 these values were: -8.0 , -8.2 , -7.5 , -7.8 , -7.7 (Fig. S4). It is worth mentioning that the experimental ΔH values determined using ITC were $-8.609 \pm 0.1 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ for AtChi1 compared to $-5.482 \pm 0.0 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ for AtChi2, while ΔG

values were -4.56 and $-5.2 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ for AtChi1 and AtChi2, respectively. The first five solutions of lower energy were selected and analyzed considering the previous reports on the amino acids involved in interactions with the substrates or products of active GH19 chitinases [16,17,29]. Figure 6B illustrates the interaction of the catalytic residues with $(\text{GlcNAc})_6$ when the latter was positioned throughout the groove in subsites -4 to $+2$. Figure 6C shows a surface view of the catalytic cleft of both enzymes with $(\text{GlcNAc})_6$. Interestingly, as shown in this figure the binding groove for AtChi2 is slightly wider than the one in AtChi1, and there are more interactions of AtChi1 with chitohexaose as estimated using CONTACT in CCP4 [39].

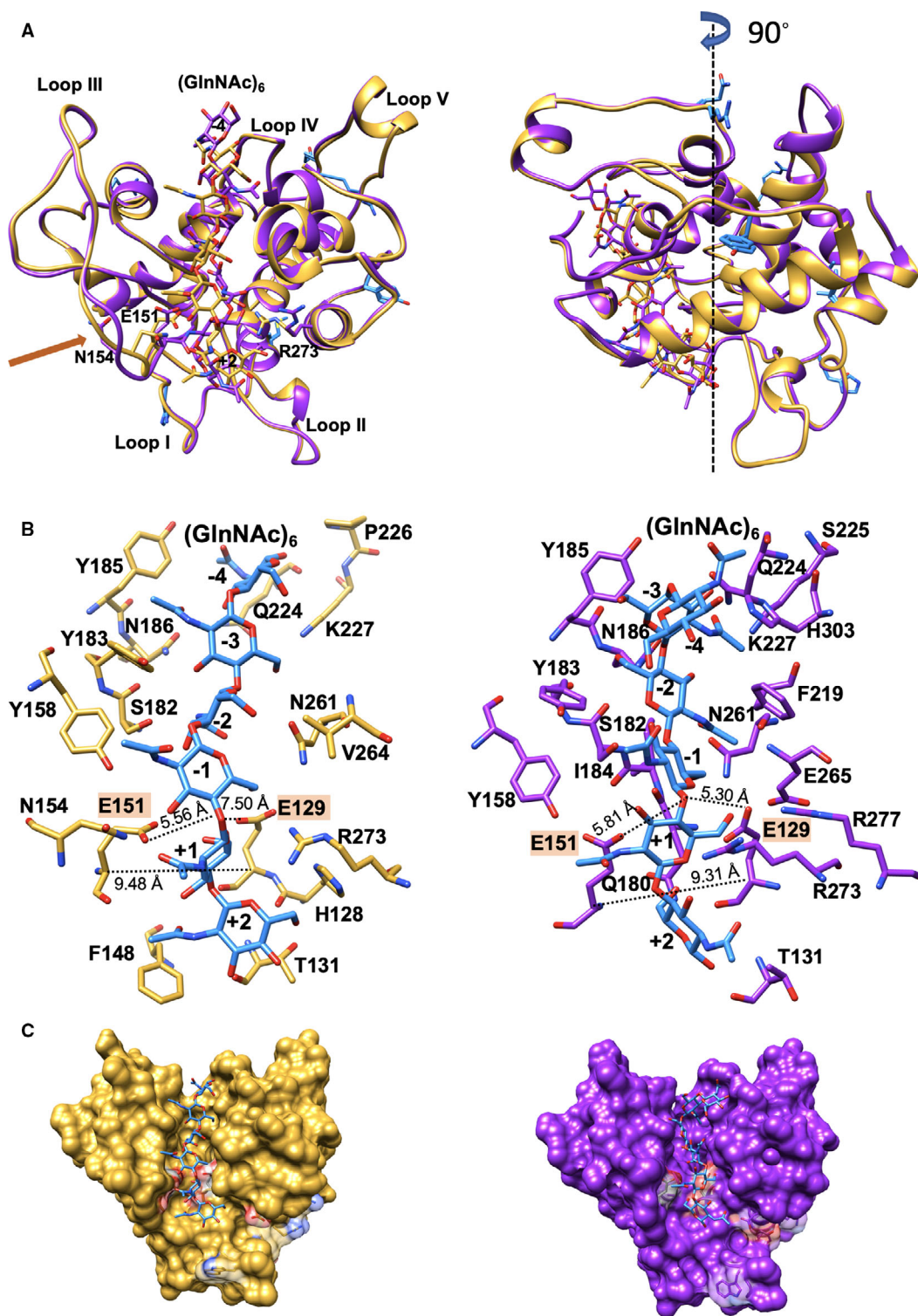


Fig. 6. Docking analyzes using (GlnNAc)₆ on AtChi1 and AtChi2 Robetta models. (A) Left side: Superposition of the catalytic domains showing the docked chitohexaose. The arrow indicates the slightly different conformation for loop III in both chitinases where the catalytic residue E151 is located. Right side: 90° view showing the six different residues in both enzymes as blue sticks. (B) Zoom of the groove where the residues that could be involved in the interaction with (GlnNAc)₆ are shown in AtChi1 (left) and AtChi2 (right). (C) Surface representation of the catalytic groove with the oligosaccharide. Residues in transparent areas (W134, D276, Y142, R283, Q75, K282) exhibit different conformation due to the six mutations between both chitinases. Colors are the same used in Fig. 5.

Antifungal activities versus phytopathogenic fungi

The antifungal activity of both chitinases versus the pathogenic fungi *Aspergillus* sp. is shown in Fig. 7. AtChi1 exhibited higher antifungal activity at both concentrations when compared with AtChi2 and fungal inhibition showed concentration dependence.

Discussion

Recently, the study of chitinases has been an important objective of numerous research projects due to their enormous potential applications, such as biocontrol agents, to develop pest-resistant species of economically important plants [40,41], or for their role as molecular markers of numerous diseases [42–44], and they are also attractive for protein engineering studies [45,46]. In the present study, the first chitinases from the genus *Agave* (AtChi1 and AtChi2) were produced in *E. coli* cells and the recombinant products were purified and characterized. The predicted AtChi1 was identified by inspecting the *Agave* transcriptome, and AtChi2 was amplified from infected leaves RNA using RT-PCR. Three PCR products were obtained after 4 weeks of infection and only one band was observed for the 7 weeks infected plant (Fig. 1B). These results suggest that during infection more isoforms could be expressed in the plant and that the chitinase genes respond differently to biotic stresses [47]. Both chitinases belong to the class I/GH19 family and exhibit only six different residues in their sequences (Fig. 1A), which notably are all exposed to the solvent and located near the hinge region and opposite to the binding groove. This result is interesting because it has

been reported that molecular evolution of class I chitinase is driven by selection for advantageous mutations, causing an excess of amino acid replacements in the active site and substrate binding cleft [48], which is not the case.

Plant chitinases are either induced as PR proteins in response to insect or fungal attack or are constitutively expressed in tissues vulnerable to pathogen attack [49–51]. The *Agave* chitinases are catalytically active and conserve the aromatic residues involved in the interaction with the substrate and also the catalytic residues Glu129 and Glu151 (Fig. 1A), including the His-Glu-Thr-Thr motif, which is highly conserved among class I chitinases [52]. The CBM18 also conserves the residues involved in interactions with GlcNAc oligosaccharides (Ser19, Phe21, Tyr23, and Tyr30) [28] (Fig. 1A). Analysis of the hydrolytic activity of both enzymes on colloidal chitin revealed an optimum pH of 5.0, and they were stable over a wide pH range (2.0–10.0), preserving over 75% of their enzymatic activities when incubated in different buffers for 48 h. These optimum pH and pH stability have been reported for other plant chitinases, including *Trichosanthes dioica* (pointed gourd), fruits from the genus *Diospyrus* (persimmon), leaf from *A. comosus* (pineapple), and *Ficus microcarpa* (Chinese banyan), and *Limonium bicolor* (lavender) [15,53,54]. However, not all plant chitinases show this pH stability, as has been demonstrated for those from *Carica papaya*, *Vicia faba* (fava bean), and *Vitis vinifera* (grapes), which were unstable in a broad pH range [55–57]. Furthermore, AtChi1 and AtChi2 showed high thermostabilities, as determined by thermal shift assays, with apparent T_m of 75 °C and 71 °C, respectively (Fig. 3C). Highly thermostable plant chitinases are not

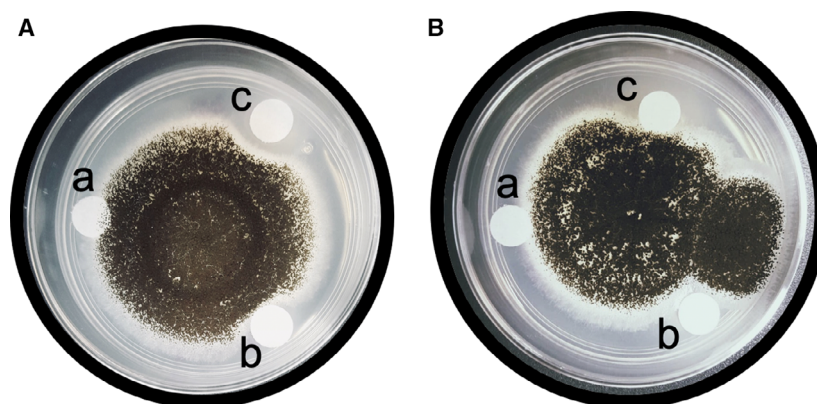


Fig. 7. Antifungal activities against the phytopathogenic fungus *Aspergillus* sp. (A) AtChi1; (B) AtChi2. (a) Left disks containing sterile buffer were used as negative controls. (b) Bottom disks containing 150 µg enzyme and (c) top disks containing 300 µg enzyme in a sterile 20 mm MES, pH 6.0 solution were applied onto potato dextrose agar in Petri dishes (5.4 cm diameter), each with a central inoculum that contained the mycelium of a 1-day-old fungi culture. Radial growth inhibition is clearly observed for both enzymes at the two concentrations used.

very common, regardless of the class or family to which they belong [54]. For instance, chitinases isolated from fava bean, cranberry beans, and maize were stable only at temperatures under 58 °C, 45 °C, and 60 °C, respectively [57–59]. However, there are some examples of chitinases that retained their activities above 60 °C, such as the chitinase isolated from persimmon, or up to 70 °C for the chitinases isolated from the ‘Baozhu’ pear and pineapple [3,15,54].

The kinetic analysis of AtChi1 and AtChi2 using colloidal chitin as the substrate (Fig. 3B), allowed us to obtain the K_m and V_{max} and to calculate k_{cat} and k_{cat}/K_m . The K_m values for these enzymes are about one order of magnitude lower than, or similar to, those reported for other plant chitinases when the same substrate was used. For instance, a class I chitinase from persimmon exhibited a K_m of $11.9 \pm 0.78 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ [54], and a class I/GH19 chitinase from *O. sativa* showed a K_m value $1.9 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ [60]. However, in these reports, the k_{cat} values are not shown. There is one report of a chitinase from the Cucurbitaceae *Trichosanthes dioica* which shows a K_m value of $0.3 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ and a V_{max} of $5.58 \text{ U}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ [53]. These results are expected because the alignment of the Agave enzymes with class I plant chitinases showed good conservation of the catalytic residues and also of almost all the residues involved in substrate binding and catalysis [18,29,31].

To date, there are no reports of the three-dimensional structure of full-length class I chitinases. Some studies describe the structures of the CatD and the CBM18 separately; however, it has not been possible to obtain a good electron density map to interpret the long flexible linker connecting both [27,61,62]. Additionally, it has also been suggested that such linkers could be very labile [31]. In this regard, the only crystallographic structure of a class I chitinase lacks coordinates for the linker [18]. We performed SAXS experiments in solution to estimate the low-resolution molecular envelopes for both enzymes. The estimated radius of gyration (R_g) was 26.1 and 24.1 Å for AtChi1 and AtChi2, respectively. These values are in agreement with the 22.9 Å obtained for rice class I chitinase (OsChia1b) [18]. Furthermore, the experimental $P(r)$ curves for the enzymes exhibit asymmetric bell-shaped profiles, with a small additional maximum near to 78 and 58 Å for AtChi1 and AtChi2, respectively (Fig. 5B). This result suggests that both proteins are not globular particles with a spherically symmetric distribution of mass, and could have multiple conformations in solution, which is possible for multi-domain proteins connected by very long and flexible linkers [63]. These graphics allowed us to determine the maximum particle size (D_{max}), being

97.6 Å for AtChi1 and 98 Å for AtChi2. Both D_{max} values (Fig. 5B) are larger than the one obtained for OsChia1b (D_{max} of 86 Å) [18].

The low-resolution macromolecular shapes of both chitinases in solution showed slight differences in their overall shapes. Both models displayed elongated envelopes and had two lobes that were clearly distinguishable (Fig. 5C). However, the most important result revealed from these experiments is the clearly distinguishable presence of the long flexible linker that connects the CatD to the CBM18.

The theoretical 3D models of the two chitinases generated using the Robetta server were superimposed onto the *ab-initio* envelopes calculated using the SAXS data (Fig. 5C). In general, the conformation of both models is in good agreement with the SAXS envelopes, with slight discrepancies mainly due to the flexibility of the linker. The template used by Robetta to generate the CBMs models was the crystal structure of rice class I chitinase (PDB entry 2DKV), which lacks coordinates for the linker. This structure was selected due to high sequence identity, 68% for AtChi1 and 67% for AtChi2. To build the catalytic domains, the crystal structure of the rye chitinase (PDB entry 4DWX) was used by Robetta due to sequence identity (76.5%). It is important to mention that Robetta does not consider the flexibility of the linker. These models showed 99.1% and 99.5% of the residues in the most favored region of the Ramachandran plot, respectively, and only 0.9% and 0.5% in the disallowed regions, respectively [36]. The residues in the disallowed regions of the Ramachandran plot, two in AtChi1 and one in AtChi2 are located in the chitin binding groove, indicating commonly strained conformations of residues in binding sites [37]. Interestingly, our models suggest a slightly higher spatial proximity of the CBM18 with the CatD for AtChi2 (Fig. 5D). Recently, the NMR structure of the chitinase CJP-4 from the Japanese cedar pollen showed that the CBM18 was responsible for chitin binding [31]; therefore, the separation found between the CBM18s and the CatDs in a hypothetical open conformation could contribute to the decrease in the catalytic efficiency of these enzymes, as was observed for AtChi2 in comparison with AtChi1. The shapes of the envelopes obtained in our work suggest the presence of at least two conformations in solution for this class of enzymes. Considering that most of the different residues between AtChi1 and AtChi2 are close to the interface between the two domains and on the opposite side of the catalytic groove (Fig. 5A,C), we suggest that these residues may participate in the stabilization of the open or the compact conformation during the catalysis of class I chitinases and may

contribute to the abundance of each conformation and its functional differences. This hypothesis is supported with the results from the ITC experiments (Fig. 4), where the thermodynamics of binding for the chitohexaose substrate were measured under conditions promoting low catalytic activity. The results show relevant differences between the two chitinases. First, the binding of chitohexaose is enthalpically driven for both enzymes; however, AtChi2 displays an entropic penalty 10-fold lower than the one for AtChi1. Nonetheless, there is no significant difference in the binding free energy ΔG , suggesting that all six GlcNAc moieties of the chitohexaose associate to the binding cleft in the two chitinases [64]. Furthermore, the oligosaccharide binds twofold more tightly to AtChi2 with a K_d of 128 μM , whereas AtChi1 displays a K_d of 208 μM . These values are well in agreement with a previous report for a class IV chitinase from *Cryptomeria japonica* [31]. Taken together, these data suggest that the six different residues between the two chitinases have long-range effects in the accommodation process of the ligand in the binding groove and affect its affinity even when they are located on the surface of the two proteins. Differences in the thermodynamic parameters indicate that subtle changes in the amino acid sequence of the chitinases promote divergence in the formation of the protein–ligand complex.

The docking experiments suggest that the active site groove is different in both isoforms with more flexibility of the oligosaccharide in the binding groove of AtChi2 (Fig. S4). Figure 6A indicates that loop III in AtChi1 is conformationally different from the same loop in AtChi2. This causes that the catalytic residue Glu151 is farther from the ligand in AtChi2. These results could explain the differences in K_m and K_d values between both enzymes. The calculated docking binding energies are in good agreement with the experimental values obtained in the ITC. Therefore, we consider that our simulations are valid.

Besides, Fig. 5C shows all the residues in the groove of AtChi1 and AtChi2 that make contact with the oligosaccharide, just a few residues are not conserved in these interactions. Several residues (shown in transparent) located in loops II and V, adopt different conformation probably due to the six different residues in both enzymes. Long-distance effects of these mutations could be also responsible for small changes in the binding sites of the enzymes. Notably, in both enzymes, the position of the catalytic Glu151 is far from the $-1 +1$ GlnNAc bond in the chitohexaose molecule, which could explain the low catalytic activity over oligosaccharides. The distances between the OE1-Glu151 to the $-1 +1$ GlnNAc bond is 5.56 Å (AtChi1)

and 5.81 Å (AtChi2); and for OE1-Glu129 the distances are 7.50 Å for AtChi1 and 5.30 Å for AtChi2 (Fig. 6B). Besides, we measured the distance between the C α of the catalytic proton donor and the catalytic nucleophile in each enzyme and the values are 9.48 and 9.31 Å, indicating that they operate through an inverting mechanism of action.

Interestingly, AtChi1 and AtChi2 showed antifungal activities versus *Aspergillus* sp. at concentrations of 150 and 300 μg per disk. This result suggests that the *Agave* enzymes are involved in defense mechanisms. The inhibition observed was lower than that reported for other plant chitinases [3,54]; however, it is known that plants overexpress a pull of chitinases, glucanases, and others PR proteins that act synergistically to fight pathogen infections [65]. These inhibitory concentration values are similar to those reported for barley class I chitinase of 80 and 200 μg [66]. Recently, the variation in the temporal and spatial induction of chitinases in response to infection was demonstrated in chickpea [47]. Therefore, in the late stages of the infection, chitinases that maintain their expression may have additional physiological functions in the plant, not directly related to defense.

Our results are the first into the study of chitinases enzymes of *A. tequilana* and in the whole genus *Agave*. The information provided by the experimental SAXS analysis showed the spatial organization of the two domains, characteristic of class I chitinases. The different residues located near the inter-domain region could be responsible for the slightly different conformations of both chitinases, the differences in the kinetic properties and also the different thermodynamic parameters, which could promote divergence in the formation of the protein–ligand complex. In this regard, it has been recognized that mutations can exert long-distance effects on protein structure, flexibility and stability [67]. Finally, we also demonstrated that both enzymes, one of which (AtChi2) was obtained from RNA of *F. oxysporum*-infected plants, exhibit antifungal activity versus *Aspergillus* sp.; therefore, these enzymes could be considered as pathogenesis-related proteins (PR) with an important role in *Agave* defense.

Materials and methods

Materials

Escherichia coli DH10 α and Rosetta Gami strains were from Novagen (Madison, WI, USA) and SHuffle c3029 strain was purchased from New England BioLabs (Ipswich, MA, USA). The pJET1.2/blunt vector was from Thermofisher (Waltham, MA, USA). The plasmids

pET-32a and pMCSG7 were from Novagen and SnapGene (IA, USA), respectively. Plants of *A. tequilana* used in RNA isolation were collected in an Agave plantation in Atotonilco el Alto Jalisco, Mexico. These plants were cultivated on autoclaved soil and maintained at 23 °C.

Identification of a predicted chitinase

The gene sequence of a class I chitinase was searched on the *A. tequilana* transcriptome (BioProject PRJNA193469) [68] using conserved regions of different plant chitinases with antifungal properties. The whole gene was assembled and submitted for a nucleotide BLAST alignment using the NCBI server [24]. The assembled sequence lacking the signal peptide was synthesized by GenScrip (Piscataway, NJ, USA) and cloned into the pET-32a vector with a TEV protease site, instead of the EK site, to produce the recombinant protein, which was named AtChi1. The TEV protease is produced 'in-house' [69].

Cloning of the chitinase gene (AtChi2)

To verify the presence of the hypothetical chitinase (AtChi1) in the genome of *A. tequilana*, RNA was extracted from leaves, roots, and stems of healthy and *F. oxysporum* infected *A. tequilana* plants. *F. oxysporum* inoculum was produced in sterile rice grains and was mixed with the soil where the *A. tequilana* plant would be transplanted. After 45 days, 50 000 propagules of *F. oxysporum* were obtained per gram of soil and the *A. tequilana* plant was transplanted and left to grow for 4 and 7 weeks. The plant material was washed with DEPC-treated water, cut into small pieces, frozen in liquid nitrogen and macerated using a mortar and then was treated with TRizol (Sigma, St. Louis, MO, USA) according to the manufacturer's instructions. Briefly, 1 mL of TRizol was added to 100 mg of macerated tissue, incubated at 22 °C during 30 min and then centrifuged to eliminate large debris, 200 µL of chloroform was added to the clear supernatant, incubated 10 min at room temperature and then centrifuged for 15 min at 12 000 *g* at 4 °C. RNA was precipitated by adding 0.5 mL of isopropanol to the aqueous phase; the RNA pellet was then washed with 75% ethanol and resuspended with 50 µL RNAase-free water. RNA yield was calculated by absorbance at 260 nm and sample purity was determined by absorbance at 280 nm and RNA agarose gel electrophoresis. A calculated A_{260}/A_{280} ratio of the sample was 1.99.

Once the RNA was isolated, cDNA was synthesized using the ProtoScript® II First Strand cDNA Synthesis Kit (New England BioLabs), 500 µg of total RNA were used in a first strand cDNA synthesis reaction with 50 units of ProtoScript II Reverse Transcriptase and 5 µM of oligo d(t)23VN. Reactions were incubated at 42 °C for 1 h, then 5 min at 80 °C to inactivate the enzyme and then diluted with nuclease-free water to a final volume of 50 µL. The PCR was performed

using KAPA HiFi DNA polymerase in a 50 µL total volume containing, KAPA HiFi HotStart ReadyMix 1X (KapaBiosystems Inc, Wilmington, MA, USA), 0.3 µM of each primer, and 2–5 µL of cDNA. The primer sequences were: 5'-GCTCCCACGCACAGCAATGTGGGAGCC-3' (forward) and 5'-CTAAAAATGACTCTGGTTCCCA CAGTCC-3' (reverse). The PCR was carried out on a Techne cycler under the following conditions: an initial denaturation step at 95 °C for 3 min, followed by 30 cycles at 98 °C for 20 s, 65 °C for 30 s, 72 °C for 2 min, with a final extension at 72 °C for 5 min. PCR products were analyzed by 1% agarose gel stained with ethidium bromide. No amplification of the gene was observed in either sample of the healthy Agave; however, the amplification of the gene was observed in leaves of infected plants.

The gene was cloned into the pJET1.2/blunt vector (Thermo Scientific CloneJET PCR Cloning Kit). The cloning reaction was set to a final volume of 20 µL using 10 µL of 2× reaction buffer, 2 µL of non-purified PCR product, 50 ng of pJET1.2/blunt cloning vector, and 1 µL of T4 ligase; incubation was done at 22 °C for 30 min and 5 µL of the ligation mixture were used for heat-shock transformation of *E. coli* DH5α-competent cells. The positive clones were confirmed by sequencing and after the analysis of the sequences cloned, six differences between the hypothetical protein from bio project and the protein cloned from RNA were found; for this reason, the last one was named AtChi2.

To obtain the recombinant AtChi2 protein, subcloning the gene into the pET-32a vector under the same conditions as AtChi1 was tried. A new pair of primers were designed adding a *KpnI* and TEV sites into the forward primer, and an *EcoRI* restriction site into the reverse primer, unfortunately no positive clone was obtained after several attempts. The expression plasmid for recombinant AtChi2 was constructed via ligation-independent cloning [70]. The pMCSG7 was linearized with *SspI* restriction enzyme. The AtChi1 gene cloned into pJET1.2 vector was amplified with forward primer 5'-TACTTCCAATCCAATGCGCAG CAATGTGGGAGCC-3' and reverse primer 5'-TTATC CACTTCCAATGCTAAAAATGACTCTGGTTCCCA CA GTCC-3'. The single-stranded cohesive ends of the PCR product and linear vector were produced via the treatment of T4 DNA polymerase in the presence of only dCTP or dGTP, respectively, to generate complementary overhangs. The two treated segments were mixed and allowed to anneal without ligase. The vector, designated as pMCSG7-AtChi2, was then heat-shock transformed into *E. coli* DH5α, and positive clones of the recombinant plasmid were identified, propagated and sequenced.

Heterologous expression and purification of AtChi1 and AtChi2

To express AtChi1, the Rosetta gami strain was cultivated in Luria-Bertani media at 37 °C with agitation until an

A_{600} of 0.5 was reached. IPTG was added to a final concentration of 0.5 mM and the incubation temperature lowered to 18 °C for 16 h. Likewise, the SHuffle strain containing AtChi2 was cultivated at 30 °C until an A_{600} of 0.7 was reached. Induction was achieved with the addition of 1 mM IPTG at 16 °C for 18 h. In both cases, the cells were harvested by centrifugation at 15 300 *g* and suspended in the lysis buffer containing 20 mM Tris/HCl, pH 8.0; 300 mM NaCl; 1 mM PMSF. Cell pellets were lysed by sonication and clarified by centrifuging at 30 000 *g* for 45 min.

The purification protocol was the same for both AtChi1 and AtChi2 proteins. The supernatants were loaded onto HisTrap columns (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) equilibrated using five column volumes of 20 mM Tris/HCl, pH 8.0, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole; the columns were washed with equilibration buffer and the proteins eluted using an imidazole concentration gradient (60% of the elution buffer containing 20 mM Tris/HCl, pH 8.0, 0.4 M imidazole). The purified fusion proteins were cleaved overnight at 4 °C, with agitation with TEV protease (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 300 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0.25 mM DTT, and 5% glycerol) and the products were recirculated through the HisTrap column. The unbound fractions were then concentrated and applied to a Superdex 75 16/60 size exclusion column. To assess each purification step, SDS/PAGE and Coomassie blue staining were used [71]. Protein concentration was determined using the theoretical extinction coefficients of 1 mg·mL⁻¹ solutions of AtChi1 and AtChi2 at 280 nm, of 1.76 and 1.71, respectively. Finally, monodispersity and oligomerization of the samples were verified using a Malvern Zetasizer μ V instrument (Malvern Panalytical Ltd, Malvern, UK).

Mass, pI determination, and circular dichroism measurements

To determine the molecular mass of the recombinant proteins, matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry was used (Microflex; Bruker Scientific LLC, Billerica, MA, USA), 20 μ g of each protein was used for the analysis. The standard for mass calibration was rabbit triosephosphate isomerase (M_r , 32.62 kDa). The matrix used was a saturated solution of sinapinic acid in 30% (v/v) aqueous acetonitrile, 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid. Samples were analyzed using FLEX ANALYSIS 3.0™ (Bruker) software. Isoelectric points were determined using a PhastSystem and PhastGel IEF in the pH range 3–9 (GE Healthcare Life Sciences).

CD measurements were performed at 20 °C using a Jasco-J1500 spectropolarimeter (Jasco, Easton, MD, USA) equipped with a Peltier temperature control system. Solutions of AtChi1 and AtChi2, at a concentration of 0.2 mg·mL⁻¹, were dialyzed against deionized water using Spectra/Por dialysis membrane (MWCO 6000–8000) and filtered with Durapore membrane filters (0.22 μ m pore size). Far-UV spectra

were collected for each sample from 185 to 260 nm in a 1-mm path-length cell. Three scans were averaged to obtain the final spectra of the two proteins. All the spectra were scaled to molar ellipticities $[\theta]$ (deg·cm²·dmol⁻¹). The BeStSel (Beta Structure Selection) server was used to analyze the CD spectra of both enzymes [72].

Determination of the optimum pH and pH stability with colloidal chitin

The optimum pH for each chitinase was determined at 37 °C using different buffers at 20 mM concentration and pH values between 3.0 and 10.0. The buffers used were monobasic sodium phosphate/phosphoric acid, sodium acetate (pH 3.0); sodium acetate/acetic acid (pH 4.0 and 5.0); dibasic potassium phosphate/phosphoric acid (pH 6.0 and 7.0); and Tris base/hydrochloric acid (pH 8.0–10.0). To check pH stability, the enzyme was incubated in the above-mentioned buffers at 4 °C for 48 h. After incubation, samples were added into the reaction mixture and the residual activities were measured at the optimum pH (5.0).

Thermal shift assays

The thermodynamic stabilities of the chitinases were determined using fluorescence-based thermal shift assays with kits to screen pH, stability, and solubility using the environmentally sensitive extrinsic dye SYPRO Orange [73]. Assays were performed in 96-well plates using 20 μ L of chitinases that contained SYPRO Orange dye and were recorded with a Q-PCR instrument, while the temperature was increased in a continuous step from 25 to 95 °C.

Chitinase assays and substrate specificity

The chitinase activity assays were performed using colloidal chitin, chitohexaose, and chitotriose as substrates and products were quantified with the 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) method that detects reducing sugars [74,75]. For the steady-state kinetics with colloidal chitin, 1.4 mL final volume reactions were set at 16 different substrate concentrations between 0.12 and 19.4 mg·mL⁻¹, all reactions started with the addition of 200 μ g of enzyme in 50 mM acetate buffer, pH 5.0 at 37 °C with gentle shaking for 24 h, after which the tubes of reaction were centrifuged at 14 000 *g* for 5 min. Then, 0.7 mL of the DNS reagent was added to 0.4 mL of the supernatant and the mixture was boiled for 15 min. After cooling at room temperature, the absorbance at 550 nm was measured. A standard curve was prepared using *N*-Acetyl-D-Glucosamine. One enzyme unit was defined as the quantity of enzyme necessary to release 1 nmol of *N*-Acetyl-D-Glucosamine from colloidal chitin in 1 h under the assay conditions. All measurements were performed in triplicate, with negative controls comprising

mixes without enzyme. The results were adjusted using a Michaelis–Menten equation in the GRAPHPAD software (San Diego, CA, USA) to obtain the K_m and V_{max} values.

For substrate specificity using chitotriose and chito-hexaose the same methodology described for colloidal chitin was used. Besides, to determine chitobiosidase and exochitinase activities, a fluorometric assay with 4-Methylumbelliferyl *N*-acetyl- β -D-glucosaminide and 4-Methylumbelliferyl- β -D-*N,N'*-diacetylchitobioside (Sigma, St. Louis, MO, USA) was used. The amount of 4-methylumbelliferone (4-MU) released was measured spectrofluorometrically by a fluorescence spectrophotometer (Biotek Synergy HT, Biotek Instruments, Winooski, VT, USA) (excitation 390 nm and emission 450 nm). Each of the substrates was dissolved in 0.5 mL of 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) to give 0.036 mM substrate solutions. Ten microlitre of the enzyme solution (1.48 mg·mL⁻¹) was added to the substrate solution and the mixture was incubated at 37 °C. As a control, the substrate solution was also incubated in the absence of chitinase. A portion (0.1 mL) of the reaction mixture was withdrawn after an appropriate reaction time and mixed with 0.5 mL of 0.4 M Na₂HPO₄–NaOH buffer, pH 11.9, to terminate the enzymatic reaction. The fluorescence intensity of the resultant solution was measured at 450 nm with excitation at 360 nm using a Shimadzu RF1500 spectrofluorometer (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan). The concentration of 4-MU released from the fluorogenic substrates was calculated from a calibration curve obtained using authentic solutions of UMB after subtraction of the control value.

Isothermal titration calorimetry assays

ChiAt1 and ChiAt2 were exhaustively dialyzed against 20 mM phosphate buffer pH 7.0 and concentrated, using Amicon-Ultra 0.5 (Millipore Sigma, St. Louis, MO, USA; MWCO 10 kDa) centrifugal filter units, to a final concentration of 100 μ M. Chitohexaose was dissolved in the dialysis buffer to obtain a 6.7 mM solution. ITC measurements for both chitinases with chitohexaose were performed at 290 K using a low-volume (200 μ L sample cell) NanoITC200 (Microcal, Malvern Panalytical Ltd). The pH value and temperature were selected to measure essentially binding and not hydrolysis of chitohexaose. The binding reaction was monitored by recording the heat release upon small additions of the chitohexaose solution to each protein solution. In the experiment, 33 injections (1.2 μ L each) of the chitohexaose solution were titrated into the protein solution. The solution was stirred at 350 r.p.m. and the resulting heat of reaction was measured. The heat of dilution of the chitohexaose was obtained by titrating the ligand into the buffer solution, under identical conditions and injection schedule used with the enzyme samples. The enthalpy change (ΔH) and binding constant (K_a) were determined from the experimental curve using the software ORIGIN version 7.0.

Small angle x-ray scattering analysis

Scattering data were collected at the Experimental Station 4-2 (Stanford Synchrotron Radiation Lightsource). For AtChi1, the detector used was a Rayonix MX225HE CCD and for AtChi2 a Pilatus3 X 1M detector (Dectris, Philadelphia, PA, USA). The measurements were made using protein concentrations of 0.23, to 15 mg·mL⁻¹, in 50 mM MES buffer, pH 6, at 15 °C. This buffer was selected for SAXS experiments because thermal shift assays gave the highest stability of both enzymes in these conditions (Fig. 3C). For data analysis of AtChi1, we used the lowest protein concentration because some aggregation was observed during the experiment. It is important to note that before the experiment, the protein was in a monodisperse and monomeric form, as determined with the DLS instrument. For AtChi2, we used a merged file with the 7.5 and 3.75 mg·mL⁻¹ concentrations for the analysis. The wavelength of the x-rays was 1.127 Å and the sample-detector distance 1.7 m, which gave a measured range of $0.007 < q < 0.5 \text{ \AA}^{-1}$ ($q = 4\pi\sin\theta/\lambda$, where 2θ is the scattering angle and λ is the wavelength). Background scattering was subtracted, and data were analyzed using the ATSAS software package [76]. The radius of gyration (R_g) for each protein was calculated using the Guinier approximation with the program PRIMUS [77]. The pair distribution function $P(r)$, and the maximum particle size (D_{max}) were obtained using the program GNOM [78]. To generate *ab-initio* envelopes, ten cycles of DAMMIF [33] were run and were followed by the program DAMFIL [34] to obtain low-resolution envelopes. The UCSF CHIMERA package was used to fit models generated using Robetta (<http://robeta.bakerlab.org>) for both chitinases into the SAXS envelopes and to prepare figures [79]. The CRYSOLOG program [38] was used for calculating the fitting of each model to SAXS data before and after the minimization.

Docking simulation

We performed *in silico* molecular-docking simulations of the (GlcNAc)₆ oligosaccharide with AUTODOCK 4.0 [80] using the models generated in Robetta of the CatDs of both Agave chitinases. Prior to docking, the chitohexaose coordinates were generated with SMILES and minimized in CHIMERA [79]. The monosaccharides in (GlcNAc)₆ were named as -4, -3, -2, -1 and +1, +2, beginning from the non-reducing end. Hydrogens and charges were assigned to the receptor and the ligands using the AUTODOCKTOOLS 1.5.7 [80]. Docking simulations were run using the Lamarckian Genetic algorithm that is known to be the most efficient and reliable method of Auto Dock. The grid maps were calculated using AutoGrid. Initially, potential binding sites were detected based on a blind docking in which the box was sufficiently large to cover the CatDs centered at their midpoints (48.75 Å × 43.5 Å × 38.6 Å) along the *x*-, *y*-

and z-axes. The next step was a focused docking with a smaller box (26.3 Å × 22.5 Å × 22.5 Å), centered on the carbohydrate-binding groove of the CatD that was the best energy result obtained in the blind docking. The best models were selected based on binding energy scores. We identified and analyzed the residues potentially involved in ligand binding using CHIMERA [79].

Antifungal activity assays

Antifungal activity of AtCh1 and AtChi2 was conducted using the disk diffusion test. The inhibitory effect of the chitinases was tested on the radial growth of the phytopathogenic fungus of economic importance *Aspergillus* sp. Two different amounts of the purified chitinases, 150 and 300 µg in a sterile 20 mM MES, pH 6.0 solution, were applied to 5-mm sterile paper disks onto potato dextrose agar in Petri dishes (5.4 cm diameter), each with a central inoculum that contained the mycelium of a 1-day-old fungi culture. The disks were placed on the agar 24 h after the inoculation at an approximate distance of 5 mm from the growing front of the hyphae. The plates were incubated for 48 h at 22 °C and analyzed. Disks with sterile buffer were used as negative controls.

Acknowledgements

We thank Jose Rivera from the IQ-UNAM for kindly performing the antifungal experiments and Javier Plasencia from FQ-UNAM for donating the *F. oxysporum* strain. We also thank Alfredo Torres Larios from IFC-UNAM for allowing us to use some resources of his laboratory. We thank T. Matsui and T. Weiss for technical support in SAXS data collection using the Stanford Synchrotron Radiation Lightsource. SLAC National Accelerator Laboratory is supported by the U.S. Department of Energy, Office of Science, Office of Basic Energy Sciences under Contract No. DE-AC02-76SF00515. The SSRL Structural Molecular Biology Program is supported by the DOE Office of Biological and Environmental Research, and by the National Institutes of Health, National Institute of General Medical Sciences (including P41GM103393). We also thank LANEM-IQ-UNAM for technical support in crystals characterization. The contents of this publication are solely the responsibility of the authors and do not necessarily represent the official views of NIGMS or NIH. This work was supported by CONACyT (Grant 221169 to AR-R) and DGAPA-PAPIIT (IN208418 to AR-R). Yusvel Sierra Gómez is a doctoral student from the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) who received fellowship 512410 from CONACyT.

Author contributions

YS-G: Planned and performed experiments, analyzed the data, and co-wrote the manuscript; AR-H: performed experiments, analyzed data, and revised the document; PC-S: planned and performed experiments; HG-V: performed ITC experiments; AH-S: performed experiments and analyzed the data; DS: processed and analyzed the SAXS data; AR-R: conceived the idea, planned experiments, analyzed the data, and co-wrote the manuscript.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- 1 Hamid R, Khan MA, Ahmad M, Ahmad MM, Abidin MZ, Musarrat J & Javed S (2013) Chitinases: an update. *J Pharm Bioallied Sci* **5**, 24–29.
- 2 Goni O, Sanchez-Ballesta MT, Merodio C & Escribano MI (2013) Two cold-induced family 19 glycosyl hydrolases from cherimoya (*Annona cherimola*) fruit: an antifungal chitinase and a cold-adapted chitinase. *Phytochemistry* **95**, 94–104.
- 3 Han P, Yang CC, Liang XB & Li LR (2016) Identification and characterization of a novel chitinase with antifungal activity from ‘Baozhu’ pear (*Pyrus ussuriensis* Maxim.). *Food Chem* **196**, 808–814.
- 4 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.
- 5 Iseli B, Armand S, Boller T, Neuhaus JM & Henrissat B (1996) Plant chitinases use two different hydrolytic mechanisms. *FEBS Lett* **382**, 186–188.
- 6 Oyeleye A & Normi YM (2018) Chitinase: diversity, limitations, and trends in engineering for suitable applications. *Biosci Rep* **38**. <https://doi.org/10.1042/BSR20180323>
- 7 Beintema JJ (1994) Structural features of plant chitinases and chitin-binding proteins. *FEBS Lett* **350**, 159–163.
- 8 Kasprzewska A (2003) Plant chitinases – regulation and function. *Cell Mol Biol Lett* **8**, 809–824.
- 9 Neuhaus JM, Fritig B, Linthorst HJM, Meins F, Mikkelsen JD & Ryals J (1996) A revised nomenclature for chitinase genes. *Plant Mol Biol Rep* **14**, 102–104.
- 10 Su YC, Xu LP, Wang SS, Wang ZQ, Yang YT, Chen Y & Que YX (2015) Identification, phylogeny, and transcript of chitinase family genes in sugarcane. *Sci Rep* **5**, 10708.

- 11 van Loon LC, Rep M & Pieterse CMJ (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu Rev Phytopathol* **44**, 135–162.
- 12 Legrand M, Kauffmann S, Geoffroy P & Fritig B (1987) Biological function of pathogenesis-related proteins: four tobacco pathogenesis-related proteins are chitinases. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**, 6750–6754.
- 13 Hawkins LK, Mylroie JE, Oliveira DA, Smith JS, Ozkan S, Windham GL, Williams WP & Warburton ML (2015) Characterization of the maize chitinase genes and their effect on *Aspergillus flavus* and aflatoxin accumulation resistance. *PLoS One* **10**, e0126185.
- 14 Krishnaveni S, Liang GH, Muthukrishnan S & Manickam A (1999) Purification and partial characterization of chitinases from sorghum seeds. *Plant Sci* **144**, 1–7.
- 15 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.
- 16 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.
- 17 Ohnuma T, Umemoto N, Kondo 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.
- 18 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.
- 19 Sandhu JS, Sidhu MK & Yadav IS (2013) Control of fungal disease in agricultural crops by chitinase and glucanase transgenes. In *Sustainable Agriculture Reviews* (LichtfouseEE, ed.), pp. 163–194. Springer, Dordrecht.
- 20 Cortes-Romero C, Martinez-Hernandez A, Mellado-Mojica E, Lopez MG & Simpson J (2012) Molecular and functional characterization of novel fructosyltransferases and invertases from *Agave tequilana*. *PLoS One* **7**, e35878.
- 21 Davis SC, Dohleman FG & Long SP (2011) The global potential for Agave as a biofuel feedstock. *GCB Bioenergy* **3**, 68–78.
- 22 Farias-Sanchez JC, Velazquez-Valadez U, Vargas-Santillan A, Pineda-Pimentel MG, Mendoza-Chavez EA, Rutiaga-Quinones JG, Saucedo-Luna J & Castro-Montoya AJ (2016) Production of fermentable sugars and hydrogen-rich gas from *Agave tequilana* biomass. *Bioenergy Res* **9**, 1015–1022.
- 23 Vargas-Maya NI, Gonzalez-Hernandez GA, Padilla-Guerrero IE & Torres-Guzman JC (2017) Overexpression of smORF YNR034W-A/EGO4 in *Saccharomyces cerevisiae* increases the fermentative efficiency of *Agave tequilana* Weber must. *J Ind Microbiol Biotechnol* **44**, 63–74.
- 24 Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang JH, Zhang Z, Miller W & Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389–3402.
- 25 Petersen TN, Brunak S, von Heijne G & Nielsen H (2011) SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods* **8**, 785–786.
- 26 Kall L, Krogh A & Sonnhammer ELL (2007) Advantages of combined transmembrane topology and signal peptide prediction – the Phobias web server. *Nucleic Acids Res* **35**, W429–W432.
- 27 Martinez-Caballero S, Cano-Sanchez P, Mares-Mejia I, Diaz-Sanchez AG, Macias-Rubalcava ML, Hermoso JA & Rodriguez-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.
- 28 Reyes-Lopez CA, Hernandez-Santoyo A, Pedraza-Escalona M, Mendoza G, Hernandez-Arana A & Rodriguez-Romero A (2004) Insights into a conformational epitope of Hev b 6.02 (hevein). *Biochem Biophys Res Commun* **314**, 123–130.
- 29 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.
- 30 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.
- 31 Takashima T, Ohnuma T & Fukamizo T (2018) NMR analysis of substrate binding to a two-domain chitinase: comparison between soluble and insoluble chitins. *Carbohydr Res* **458**, 52–59.
- 32 Valentini E, Kikhney AG, Previtali G, Jeffries CM & Svergun DI (2015) SASBDB, a repository for biological small-angle scattering data. *Nucleic Acids Res* **43**, D357–D363.
- 33 Franke D & Svergun DI (2009) DAMMIF, a program for rapid ab-initio shape determination in small-angle scattering. *J Appl Crystallogr* **42**, 342–346.
- 34 Volkov VV & Svergun DI (2003) Uniqueness of ab initio shape determination in small-angle scattering. *J Appl Crystallogr* **36**, 860–864.
- 35 Kim DE, Chivian D & Baker D (2004) Protein structure prediction and analysis using the Robetta server. *Nucleic Acids Res* **32**, W526–W531.
- 36 Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS & Thornton JM (1993) Procheck – a program to check the

- stereochemical quality of protein structures. *J Appl Crystallogr* **26**, 283–291.
- 37 Herzberg O & Moult J (1991) Analysis of the steric strain in the polypeptide backbone of protein molecules. *Proteins* **11**, 223–229.
 - 38 Svergun D, Barberato C & Koch MHJ (1995) CRYSOLE – a program to evaluate x-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates. *J Appl Crystallogr* **28**, 768–773.
 - 39 Winn MD, Ballard CC, Cowtan KD, Dodson EJ, Emsley P, Evans PR, Keegan RM, Krissinel EB, Leslie AGW, McCoy A *et al.* (2011) Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr D* **67**, 235–242.
 - 40 Khan A, Nasir IA, Tabassum B, Aaliya K, Tariq M & Rao AQ (2017) Expression studies of chitinase gene in transgenic potato against *Alternaria solani*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* **128**, 563–576.
 - 41 Osman GH, Assem SK, Alreedy RM, El-Ghareeb DK, Basry MA, Rastogi A & Kalaji HM (2015) Development of insect resistant maize plants expressing a chitinase gene from the cotton leaf worm, *Spodoptera littoralis*. *Sci Rep* **5**, 18067.
 - 42 Lee CG, Da Silva CA, Dela Cruz CS, Ahangari F, Ma B, Kang MJ, He CH, Takyar S & Elias JA (2011) Role of chitin and chitinase/chitinase-like proteins in inflammation, tissue remodeling, and injury. *Annu Rev Physiol* **73**, 479–501.
 - 43 Vastrad B, Vastrad C, Godavarthi A & Chandrashekar R (2017) Molecular mechanisms underlying gliomas and glioblastoma pathogenesis revealed by bioinformatics analysis of microarray data. *Med Oncol* **34**, 182.
 - 44 Xu T, Zhong CK, Wang AL, Guo ZR, Bu XQ, Zhou YP, Tian YF, HuangFu XF, Zhu ZB & Zhang YH (2017) YKL-40 is a novel biomarker for predicting hypertension incidence among prehypertensive subjects: A population-based nested case-control study in China. *Clin Chim Acta* **472**, 146–150.
 - 45 Dahiya N, Tewari R & Hoondal GS (2006) Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. *Appl Microbiol Biotechnol* **71**, 773–782.
 - 46 Kowsari M, Motallebi M & Zamani M (2014) Protein engineering of Chit42 towards improvement of chitinase and antifungal activities. *Curr Microbiol* **68**, 495–502.
 - 47 Datta J & Lal N (2018) Induced temporal and spatial variation in host defence enzymes in response to *Fusarium* wilt in Chickpea. *J Microbiol Biotechnol Food Sci* **7**, 426–431.
 - 48 Bishop JG, Dean AM & Mitchell-Olds T (2000) Rapid evolution in plant chitinases: molecular targets of selection in plant-pathogen coevolution. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 5322–5327.
 - 49 Backiyarani S, Uma S, Nithya S, Chandrasekar A, Saraswathi MS, Thangavelu R, Mayilvaganan M, Sundararaju P & Singh NK (2015) Genome-wide analysis and differential expression of chitinases in banana against root lesion nematode (*Pratylenchus coffeae*) and eumusa leaf spot (*Mycosphaerella eumusae*) pathogens. *Appl Biochem Biotechnol* **175**, 3585–3598.
 - 50 Bagnaresi P, Biselli C, Orru L, Urso S, Crispino L, Abbruscato P, Piffanelli P, Lupotto E, Cattivelli L & Vale G (2012) Comparative transcriptome profiling of the early response to *Magnaporthe oryzae* in durable resistant vs susceptible rice (*Oryza sativa* L.) genotypes. *PLoS One* **7**, e51609.
 - 51 Samac DA, Hironaka CM, Yallaly PE & Shah DM (1990) Isolation and characterization of the genes encoding basic and acidic chitinase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **93**, 907–914.
 - 52 Passarinho PA & de Vries SC (2002) *Arabidopsis* Chitinases: a genomic survey. *Arabidopsis Book* **1**, e0023.
 - 53 Kabir SR, Rahman MM, Tasnim S, Karim MR, Khatun N, Hasana I, Amin R, Islam SS, Nurujjaman M, Kabir AH *et al.* (2016) Purification and characterization of a novel chitinase from *Trichosanthes dioica* seed with antifungal activity. *Int J Biol Macromol* **84**, 62–68.
 - 54 Zhang JZ, Kopparapu NK, Yan QJ, Yang SQ & Jiang ZQ (2013) Purification and characterisation of a novel chitinase from persimmon (*Diospyros kaki*) with antifungal activity. *Food Chem* **138**, 1225–1232.
 - 55 Ano A, Takayanagi T, Uchibori T, Okuda T & Yokotsuka K (2003) Characterization of a class III chitinase from *Vitis vinifera* cv. Koshu. *J Biosci Bioeng* **95**, 645–647.
 - 56 Chen YT, Hsu LH, Huang IP, Tsai TC, Lee GC & Shaw JF (2007) Gene cloning and characterization of a novel recombinant antifungal chitinase from papaya (*Carica papaya*). *J Agric Food Chem* **55**, 714–722.
 - 57 Wang SY, Ye XY, Chen J & Rao PF (2012) A novel chitinase isolated from *Vicia faba* and its antifungal activity. *Food Res Int* **45**, 116–122.
 - 58 Moore KG, Price MS, Boston RS, Weissinger AK & Payne GA (2004) A chitinase from Tex6 maize kernels inhibits growth of *Aspergillus flavus*. *Phytopathology* **94**, 82–87.
 - 59 Wang SY, Shao B, Fu H & Rao PF (2009) Isolation of a thermostable legume chitinase and study on the antifungal activity. *Appl Microbiol Biotechnol* **85**, 313–321.
 - 60 Truong NH, Park SM, Nishizawa Y, Watanabe T, Sasaki T & Itoh Y (2003) Structure, heterologous expression, and properties of rice (*Oryza sativa* L.) family 19 chitinases. *Biosci Biotechnol Biochem* **67**, 1063–1070.
 - 61 Ohnuma T, Umemoto N, Taira T, Fukamizo T & Numata T (2013) Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of an active-site mutant of ‘loopless’

- family GH19 chitinase from *Bryum coronatum* in a complex with chitotetraose. *Acta Crystallogr F* **69**, 1360–1362.
- 62 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.
- 63 Putnam CD, Hammel M, Hura GL & Tainer JA (2007) X-ray solution scattering (SAXS) combined with crystallography and computation: defining accurate macromolecular structures, conformations and assemblies in solution. *Q Rev Biophys* **40**, 191–285.
- 64 Ohnuma T, Taira T, Umemoto N, Kitaoku Y, Sorlie M, Numata T & Fukamizo T (2017) Crystal structure and thermodynamic dissection of chitin oligosaccharide binding to the LysM module of chitinase-A from *Pteris ryukyuensis*. *Biochem Biophys Res Commun* **494**, 736–741.
- 65 Prasannath K (2017) Plant defense-related enzymes against pathogens: a review. *AGRIEAST J Agric Sci* **11**, 38–48.
- 66 Toufiq N, Tabassum B, Bhatti MU, Khan A, Tariq M, Shahid N, Nasir IA & Husnain T (2018) Improved antifungal activity of barley derived chitinase I gene that overexpress a 32 kDa recombinant chitinase in *Escherichia coli* host. *Braz J Microbiol* **49**, 414–421.
- 67 Rodrigues CHM, Pires DEV & Ascher DB (2018) DynaMut: predicting the impact of mutations on protein conformation, flexibility and stability. *Nucleic Acids Res* **46**, W350–W355.
- 68 Gross SM, Martin JA, Simpson J, Abraham-Juarez MJ, Wang Z & Visel A (2013) De novo transcriptome assembly of drought tolerant CAM plants, Agave deserti and *Agave tequilana*. *BMC Genom* **14**, 563.
- 69 Blommel PG & Fox BG (2007) A combined approach to improving large-scale production of tobacco etch virus protease. *Protein Expr Purif* **55**, 53–68.
- 70 Stols L, Gu MY, Dieckman L, Raffin R, Collart FR & Donnelly MI (2002) A new vector for high-throughput, ligation-independent cloning encoding a tobacco etch virus protease cleavage site. *Protein Expr Purif* **25**, 8–15.
- 71 Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4. *Nature* **227**, 680–685.
- 72 Micsonai A, Wien F, Kernya L, Lee YH, Goto Y, Refregiers M & Kardos J (2015) Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci USA* **112**, E3095–E3103.
- 73 Lavinder JJ, Hari SB, Sullivan BJ & Magliery TJ (2009) High-throughput thermal scanning: a general, rapid dye-binding thermal shift screen for protein engineering. *J Am Chem Soc* **131**, 3794–3795.
- 74 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.
- 75 Miller GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* **31**, 426–428.
- 76 Franke D, Petoukhov MV, Konarev PV, Panjkovich A, Tuukkanen A, Mertens HDT, Kikhney AG, Hajizadeh NR, Franklin JM, Jeffries CM *et al.* (2017) ATSAS 2.8: a comprehensive data analysis suite for small-angle scattering from macromolecular solutions. *J Appl Crystallogr* **50**, 1212–1225.
- 77 Konarev PV, Volkov VV, Sokolova AV, Koch MHJ & Svergun DI (2003) PRIMUS: a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis. *J Appl Crystallogr* **36**, 1277–1282.
- 78 Svergun DI (1992) Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. *J Appl Crystallogr* **25**, 495–503.
- 79 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.
- 80 Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS & Olson AJ (2009) AutoDock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem* **30**, 2785–2791.

Supporting information

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

Fig. S1. PSI-Blast amino acid sequence alignment of the assembled ChiA1 from short reads of the transcriptome of *Agave tequilana* with seven chitinasas with the higher sequence identity.

Fig. S2. Activity of AtChi1 (yellow) and AtChi2 (purple) over insoluble colloidal chitin compared with the activity over the oligosaccharides chitohexaose (GlnNac)₆ and chitotriose (GlnNac)₃, under the same conditions (50 mM acetate buffer pH 5.0, 37 °C, 24 h) (see methodology).

Fig. S3. A superposition of the five CatD Robetta models, which gave very small differences.

Fig. S4. Binding poses of chitohexaose for the docking simulations of the five CatDs Robetta models.