

PMDCB/1359/2015...2a

**Benjamín García Ramírez**  
**Alumno (a) de la Maestría en Ciencias Bioquímicas**  
**P r e s e n t e**

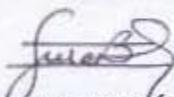
Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día 23 de noviembre del presente año, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **MAESTRO (A) EN CIENCIAS**, con la réplica de la tesis "**Estudio termodinámico y estructural de módulos de unión a carbohidratos**", dirigida por la **Dra. Adela Rodríguez Romero**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado:

PRESIDENTE	Dr. Sergio Sánchez Esquivel
VOCAL	Dr. Rafael Arturo Zubillaga Luna
VOCAL	Dr. Ismael Bustos Jaimes
VOCAL	Dr. Alfredo Torres Larios
SECRETARIO	Dra. Martha Patricia Coello Coutiño

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

**Atentamente**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
**Cd. Universitaria, D.F., a 26 de noviembre de 2015**  
**COORDINADORA DEL SUBCOMITÉ ACADÉMICO**



**DRA. BERTHA GONZÁLEZ PEDRAJO**

C.c.p. Tutor  
C.c.p. Archivo

BGP\*lgg



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

Estudio termodinámico y estructural de módulos de unión a  
carbohidratos

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Benjamín García Ramírez

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Adela Rodríguez Romero  
[Instituto de Química, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Alejandra Hernández Santoyo  
[Instituto de Química, UNAM](#)

Dr. Miguel Costas Basín  
[Facultad de Química, UNAM](#)

Dra. Romina M.P. Rodríguez Sanoja  
[Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM](#)

MÉXICO, D. F. enero, 2016

# Agradecimientos

A todas las personas que con su apoyo técnico y asesoría facilitaron el trabajo

Dra. Adela Rodríguez Romero, Dra. Romina MP Rodríguez Sanoja, Dra. Alejandra Hernández Santoyo, Dra. Carol Siseth Martínez Caballero, Dr. Miguel Costas Basín, Dra. Patricia Cano Sánchez, M. en C. Virginia Gómez Vidales y QFB María del Rocío Patiño Maya

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca y el financiamiento del proyecto 82947 y 166472

Al Posgrado en Ciencias Bioquímicas por el Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) para el 29<sup>th</sup> Symposium of The Protein Society

A mis padres y a mi familia

A mis compañeros del Instituto de Química

A mis compañeros del Instituto de Investigaciones Biomédicas

# I. Índice

<b>II. Resumen</b> .....	1
Abreviaturas.....	2
<b>III. Introducción</b> .....	3
Glicósido hidrolasas (GH) .....	3
Módulos de unión a carbohidratos .....	4
Clasificación de los CBMs en relación con su estructura y función .....	6
Quitinasas y proteínas tipo quitinasas.....	9
Amilasas .....	11
Características importantes de las interacciones proteína-ligando .....	13
Constantes de asociación de los CBMs de unión a quitina y a almidón .....	14
Interacciones débiles en proteínas y en macromoléculas.....	15
<b>IV. Antecedentes</b> .....	19
Proteína tipo quitinasa de <i>Hevea brasiliensis</i> .....	19
Amilasa de <i>Lactobacillus amylovorus</i> .....	20
Objetivo General .....	23
Objetivos particulares.....	23
Justificación .....	24
Hipótesis .....	24
<b>V. Metodología</b> .....	25
<b>VI. Resultados y Discusión</b> .....	30
<b>VII. Conclusiones</b> .....	53
<b>VIII. Perspectivas</b> .....	55
<b>IX. Referencias</b> .....	56

## II. Resumen

Los módulos de unión a carbohidratos (CBMs) se definen como secuencias de aminoácidos contiguos dentro de una enzima con actividad sobre carbohidratos. Han sido clasificados según su similitud dentro de 71 familias. En proteínas con actividad catalítica facilitan la unión a un polisacárido y dirigen la maquinaria catalítica sobre el sustrato para mejorar la eficiencia catalítica, mientras que en otras proteínas sin actividad catalítica facilitan la unión a los polisacáridos. Es importante mencionar que algunos de ellos participan en los mecanismos de defensa de organismos superiores como plantas, animales y hongos.

En este trabajo se estudiaron por ITC y Dicroísmo Circular dos módulos de unión a carbohidratos provenientes de diferentes organismos.

a) Un *HbCBM18* recombinante derivado de una proteína tipo quitinasa y su isoforma que contiene medio modulo adicional, *1.5xHbCBM18*, ambos está presentes en *Hevea brasiliensis*. Se obtuvieron espectros de dicroísmo circular atípicos y una constante de asociación del orden de  $10^2 \text{ M}^{-1}$  con N-acetil-quitotriosa.

b) Un *LaCBM26* recombinante derivado de una  $\alpha$ -amilasa de *Lactobacillus amylovorus*. Este módulo se encuentra presenta como un tándem de cinco módulos de unión a carbohidratos idénticos (*5xLaCBM26*). Se obtuvieron espectros de dicroísmos circulares atípicos y constantes de asociación del orden de  $10^4$  hasta  $10^6 \text{ M}^{-1}$  con  $\alpha$ -ciclodextrina y  $\beta$ -ciclodetrina.

# ***Abreviaturas***

CBM	Carbohydrate Binding Module, en español Modulo de Unión a Carbohidratos
$K_a$	Constante de asociación, con unidades de $M^{-1}$
$\Delta H$	Cambio en la entalpía, con unidades calorías/mol
$\Delta S$	Cambio en la entropía, con unidades calorías/mol·K
$\Delta G$	Cambio en la energía libre de Gibbs, con unidades calorías/mol
ITC	Siglas en inglés de Isothermal Titration Calorimetry, en español Calorimetría de Titulación Isotérmica
GlcNAc	N-acetilglucosamina
$\beta$ -CD	$\beta$ -ciclodextrina
$\alpha$ -CD	$\alpha$ -ciclodextrina

### III. Introducción

#### *Glicósido hidrolasas (GH)*

Las enzimas que catalizan la ruptura de los enlaces glicosídicos en oligosacáridos y polisacáridos se denominan glicósido hidrolasas (GH) y dan lugar a la formación de un hemiacetal del azúcar y la correspondiente aglicona libre. Este tipo de enzimas se clasifican como EC 3.2.1.x, donde x puede tomar valores de 1 hasta el 195, dependiendo del enlace sobre el que actúan. La hidrólisis enzimática del enlace glicosídico es a través de una catálisis ácida que involucra dos residuos críticos: un donador de protones y un nucleófilo/base. Esta hidrólisis se produce a través de dos mecanismos principales que dan lugar a la retención o a la inversión de la configuración anomérica [Henrissat., 1991]. También las GH pueden ser clasificadas respecto a su similitud en la estructura primaria utilizando las siglas GH y el número de familia, hasta el momento existen 131 familias reportadas [Henrissat., 1991 y CAZy, Lombard *et al.*, 2013].

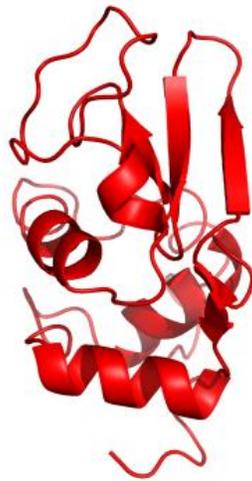


Figura 3.1. Modelo estructural 3D de la lisozima del huevo de gallina. Código PDB 1LYZ [Diamond., 1974].

La primera glicósido hidrolasa cuya estructura 3D fue determinada por difracción de rayos X fue la lisozima de huevo de gallina (Figura 3.1) [Diamond., 1974]. Esta enzima hidroliza peptidoglicanos presentes en las paredes celulares de las bacterias, que están compuestas por residuos alternados de N-acetilglucosamina y

ácido N-acetilmurámico unidos por enlaces  $\beta$ -1-4 [Wohlkönig *et al.*, 2010]. Algunas lisozimas presentan un dominio adicional que les ayuda a unirse de forma no covalente a los peptidoglicanos; como lo es el dominio LysM (motivo lisina), el cual fue descubierto en el extremo carboxilo terminal de la lisozima de *Bacillus phage*  $\phi$ 29, y está compuesto por 44 aminoácidos. El dominio LysM se ha encontrado en una inmensa variedad de proteínas de procariotes y eucariotas [Buist *et al.*, 2008]. Por otra parte, es importante señalar que no solo en la lisozima se ha determinado la existencia de dominios de unión a glicanos, ya que en otras glicósido hidrolasas, así como proteínas tipo quitinasa, también se ha observado la presencia de estos dominios, y se les han llamado módulos de unión a carbohidratos [Machovic y Janecek., 2006].

### ***Módulos de unión a carbohidratos***

El polisacárido más abundante en la tierra es la celulosa, seguido de la quitina y el almidón. Estas moléculas existen en forma insoluble, por lo que su degradación enzimática es una de las reacciones más importantes y estudiadas. En numerosos estudios sobre la hidrólisis de este tipo de polisacáridos insolubles se ha confirmado que las enzimas que llevan a cabo esta reacción requieren de dominios adicionales conocidos como dominios de unión a carbohidratos [Machovic y Janecek., 2006].

Los primeros dominios de unión a carbohidratos reportados fueron aquellos que tenían la capacidad de unirse a celulosa, y originalmente se llamaron CBD's (por sus siglas del inglés, Cellulose Binding Domains). Sin embargo, a medida que se descubrieron otros módulos con especificidad a otros sustratos se decidió llamarlos CBMs (por sus siglas en inglés, Carbohydrate Binding Modules) [Boraston *et al.*, 2004]. En general los CBMs se encuentran definidos como una secuencia de aminoácidos con un plegamiento discreto en la estructura de una proteína multimodular (Figura 3.2). La función de los CBMs es unir el carbohidrato y facilitar que la maquinaria catalítica interactúe con el sustrato para aumentar la eficiencia catalítica. Los CBMs no presentan actividad catalítica, y comúnmente están asociados con las Glicósido Hidrolasas; sin embargo, también han sido identificados en liasas, oxidasas, glicosiltransferasas y expansinas.

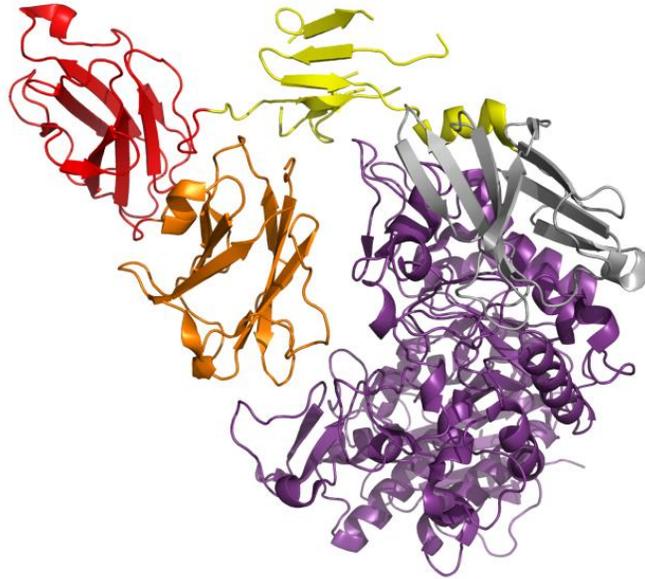


Figura 3.2 Modelo estructural 3D de SpuA, una glicosidasa multimodular de la bacteria patógena *Streptococcus pneumoniae* involucrada en la degradación de glucógeno. En naranja y en rojo se muestra el CBM41-1 y el CBM41-2 respectivamente, en amarillo un conector del que solamente se pudo modelar el 65% de la secuencia, en gris y morado el dominio catalítico barril ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub>. Código PDB 2YA1 [Lammerts van Bueren *et al.*, 2011].

Los CBMs se encuentran distribuidos ampliamente en proteínas de diversos organismos, ya sean plantas, hongos, bacterias o animales. Actualmente los CBMs están clasificados en la base de datos CAZy (Carbohydrate -Active enZYmes database) en 71 familias y hay 274 módulos que aún no han sido clasificados [CAZy, Lombard *et al.*, 2013].

Para referirse a los módulos se ha acordado que primero se antepongan las siglas CBM y después el número de la familia. Por ejemplo, para un módulo de la familia 1 se expresa como CBM1, este número incrementa a medida que se descubren nuevas familias, es decir, una nueva familia correspondería al número 2. También se puede anteponer el organismo de procedencia, por ejemplo para el módulo de la amilasa formadora de maltohexaosa que pertenece a la familia 25 y proviene del microorganismo *Bacillus halodurans* se expresa como *BhCBM25*.

Algunas enzimas, como las glicosidasa hidrolasas, presentan CBMs en tándem, ya sean contiguos o separados por un conector y pueden pertenecer a la misma familia o incluso pueden ser combinaciones de diferentes familias, también pueden encontrarse en el extremo amino o el carboxilo del dominio catalítico [Boraston *et*

*al.*, 2004]. En muchas glicósido hidrolasas se ha observado que la presencia de CBMs en tándem producen un incremento en sus constantes de asociación [Boraston *et al.*, 2002 y Linder *et al.*, 1996]; sin embargo, existen casos en los que no se observa este efecto [Tomme *et al.*, 1996]. También se ha observado que el aumento en el número de CBMs presentes en una glicósido hidrolasa incrementa la capacidad hidrolítica [Boraston *et al.*, 2006 y Obembe *et al.*, 2007].

La presencia de módulos en tándem se atribuye, en algunas ocasiones, a factores de estrés en el organismo de origen, por ejemplo, el incremento en la temperatura ocasiona la pérdida de afinidad de algunas enzimas, y la presencia de más módulos ayuda a compensar la pérdida de afinidad [Boraston *et al.*, 2002].

### ***Clasificación de los CBMs en relación con su estructura y función [Boraston et al., 2004]***

En el aspecto estructural, este tipo de dominios o módulos presentan un número de residuos relativamente pequeño (entre 30-200 aminoácidos), algunos presentan uno o varios puentes disulfuro, así como varios residuos aromáticos expuestos en su superficie. Estos últimos interactúan con las moléculas de carbohidrato a través de puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas e interacciones de tipo CH- $\pi$ . Para darles una clasificación más amplia, se ha sugerido dividirlos en tres tipos de CBMs basado en su estructura y sus similitudes funcionales:

#### ***Tipo A, CBMs de unión a superficie***

En general en este tipo de CBMs los residuos aromáticos se mantienen en el sitio de unión; sin embargo, la conformación que presentan es diferente a los demás tipos, descritos adelante, ya que estos residuos se acomodan dando lugar a una superficie plana, como se muestra en la figura 3.3. Se cree que esta arquitectura es complementaria con los sustratos que une, ya que estos también presentan superficies planas como se ha observado con la celulosa y la quitina cristalina. Este tipo de CBMs tienen la característica de presentar baja o nula afinidad ante los carbohidratos solubles. La interacción de los módulos de este tipo con la celulosa cristalina presenta una entropía positiva. Creagh *et al.*, (1996) han propuesto que

existe un incremento de la entropía del sistema cuando las moléculas de agua son liberadas al momento de la interacción entre la proteína y del ligando. En el caso de los oligosacáridos solubles existe un efecto compensatorio que conlleva a una reducción en la entropía por la restricción conformacional que ocasiona el ligando unido a la proteína.

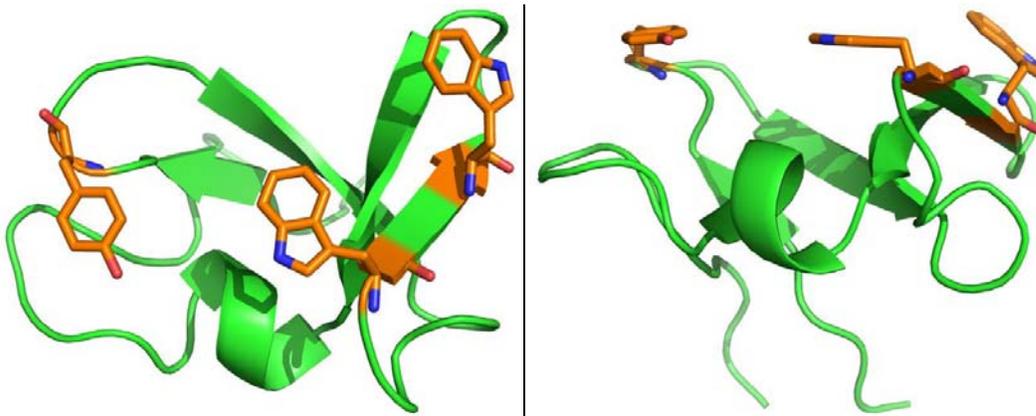


Figura 3.3. Modelo de listón de la estructura 3D del módulo de unión a celulosa (CBM10) de la xilanasa A de *Pseudomonas fluorescens* donde se observa que los residuos de interacción presentan una superficie plana. Código PDB 1E8R [Raghothama *et al.*, 2000].

#### *Tipo B, CBMs de unión a cadenas de glicanos*

Estos módulos se caracterizan por unir cadenas de glicanos en surcos o hendiduras presentes en su superficie, y además exhiben múltiples subsitios de unión capaces de acomodar unidades de azúcar del biopolímero (Figura 3.4). Frecuentemente, se ha observado un incremento en las afinidades cuando se utilizan hexasacáridos y afinidades despreciables cuando se ocupan oligosacáridos de menos de tres unidades. En este tipo de CBMs la disposición espacial de los residuos aromáticos juega un papel importante en la especificidad y esta última es contrastante con la de los CBMs del tipo A. En los CBMs del tipo B, los residuos aromáticos juegan un papel fundamental para la interacción con el ligando, ya que la orientación de éstos determinan la especificidad [Simpson *et al.*, 2000]. En este tipo de CBMs, los puentes de hidrógeno también determinan su afinidad y especificidad al ligando.

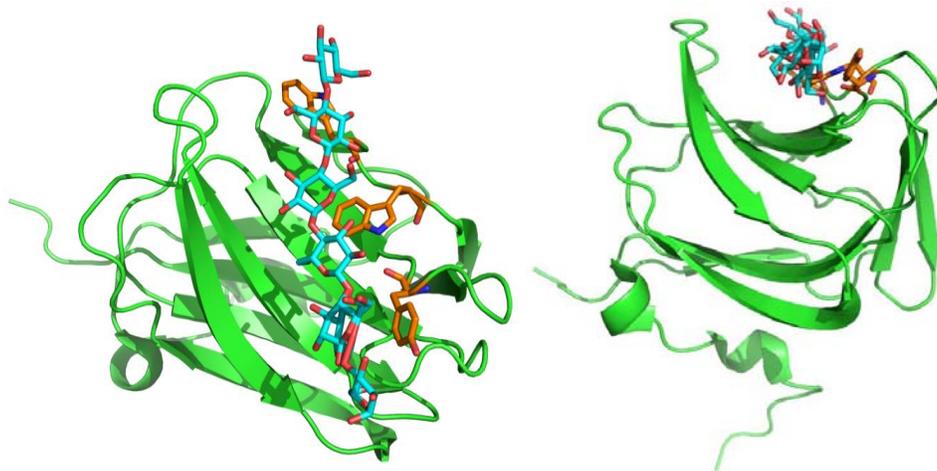


Figura 3.4. Modelo estructural 3D del módulo de unión a carbohidratos (CBM29-2) de la Proteína No Catalítica (NCP-1) de *Piromyces equi*, se observa que los residuos aromáticos envuelven al carbohidrato formando un surco en la proteína. Código PDB 1GWM [Charnock *et al.*, 2002].

*Tipo C, CBMs de unión de azúcares pequeños*

Esta clasificación corresponde a los CBMs tipo lectina los cuales tienen la propiedad de unir preferencialmente a mono- di- o trisacáridos, por lo cual carecen de la hendidura presente en los de tipo B; sin embargo, la red de puentes de hidrógeno que se forma con el ligando es más extensa que en los de tipo B (Figura 3.5).

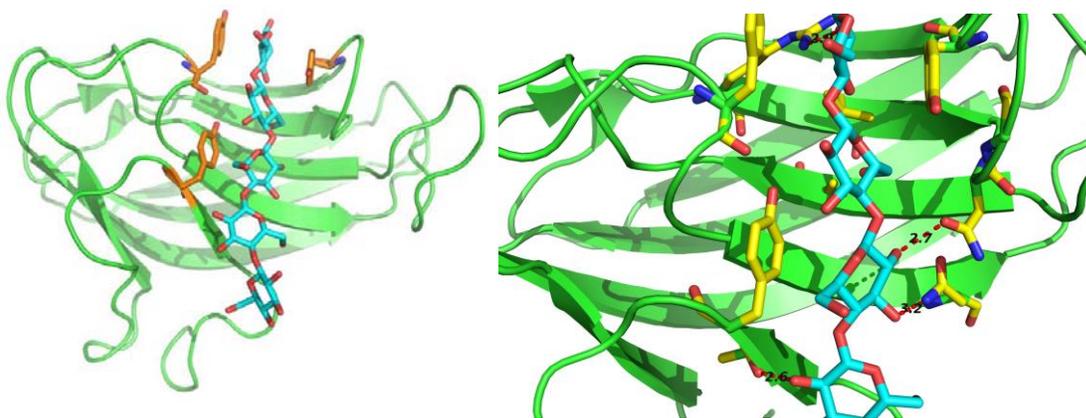


Figura 3.5. Modelo estructural 3D del CBM4 de la endoglucanasa C de *Cellulomonas fimi* Código PDB 1GU3 [Boraston *et al.*, 2002].

En el presente trabajo se seleccionaron como modelos de estudio a dos glicósido hidrolasas que presentan módulos de unión a carbohidratos, una perteneciente a la familia GH19 que es una proteína tipo quitinasa de planta y la otra una amilasa de bacteria de la familia GH13.

## ***Quitinasas y proteínas tipo quitinasas***

La quitina, como se mencionó antes, es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza. Este polisacárido consiste de unidades repetidas de N-acetilglucosamina (GlcNAc) unidas por enlaces  $\beta$  1 $\rightarrow$ 4. Este polisacárido se encuentra en la pared celular de hongos y en el exoesqueleto de artrópodos, además es insoluble debido a la presencia de múltiples puentes de hidrógeno que se establecen entre los grupos N-acetilo del azúcar de forma paralela o antiparalela.

Las enzimas capaces de hidrolizar la quitina se llaman quitinasas y se encuentran en diversos organismos como bacterias, plantas y humanos, incluso se ha encontrado su presencia en virus [Hiramatsu *et al.*, 2000]. Existen también proteínas tipo quitinasa que presentan una alta identidad con la secuencia de aminoácidos de las quitinasas, pero carecen de algún aminoácido esencial para la catálisis. Algunas quitinasas presentan CBMs en su estructura; sin embargo, éstos tienen diferentes mecanismos de reconocimiento de la quitina dependiendo de su estructura. Los CBMs tipo A que reconocen a la quitina en forma cristalina pertenecen a las familias 1, 2, 5 y 37; mientras que los tipo lectina, que reconocen oligosacáridos de menor tamaño, pertenecen a la clasificación tipo C y son los CBMs de las familias 14 y 18. Existe un tercer grupo que aún no ha sido clasificado a los que pertenecen los CBMs de la familia 12 [Hashimoto *et al.*, 2000] y 33 [Vaaje-Kolstad *et al.*, 2005 y Boraston *et al.*, 2007]

Los CBMs tipo A con capacidad de unir quitina se encuentran en las glicósido hidrolasas de reconocimiento y de remodelaje, las cuales son importantes para la generación de nutrientes. El mecanismo de unión fue dilucidado mediante estudios cristalográficos del CBM5 perteneciente a la quitinasa B de *Serratia marcescens* (*SmCBM5*). El *SmCBM5* tiene una estructura compuesta por tres hebras  $\beta$  antiparalelas conectadas con asas largas. Este módulo tiene dos residuos aromáticos expuestos en la superficie (Trp 479 y Tyr 481) en el sitio de unión, así como varios residuos polares que pueden servir para generar puentes de hidrógeno con los grupos N-acetilo de la quitina [van Aalten *et al.*, 2000].

Por otro lado, los CBMs tipo C que unen quitina son dominios de heveína y tipo-heveína que utilizan una extensa red de puentes de hidrogeno en su reconocimiento a quitina, quitooligosacáridos, y N-acetilglucosamina [van Aalten *et al.*, 2000 y Mesnage *et al.*, 2014]. Los CBM14 y CBM18 pertenecen a estas familias, las cuales han sido documentadas como activas en la digestión, la defensa contra hospederos y parasitismo. En humanos se han descrito en la quitotriosidasa [Boraston *et al.*, 2007]. La familia CBM18 se ha reportado presente en quitinasas, así como en proteínas de unión a quitina que existen como módulos simples o unidades en tándem.

Uno de los módulos de unión CBM18 más estudiados es la heveína. Los dominios de heveína y tipo-heveína se caracterizan por tener 3 a 5 puentes disulfuro, los cuales estabilizan la estructura terciaria. Las interacciones CH- $\pi$  pueden explicar la unión al oligosacárido, la cual se da mediante el contacto no polar con los aminoácidos aromáticos Trp 21, Trp 23 y Tyr 30, y es estabilizada por los residuos Ser 19 y Tyr 30 mediante puentes de hidrogeno [Rodríguez-Romero *et al.*, 1991].

El tercer grupo, al cual pertenecen el CBM12 y CBM33, presentan mecanismos de reconocimiento diferentes. En el CBM12 encontrado en la quitinasa A1 de *Bacillus circulans* BcCBM12 se ha observado que carece del arreglo lineal de la triada de aminoácidos aromáticos; sin embargo, algunos autores sugieren que los residuos de treonina y prolina pueden estar involucrados en su unión a la quitina, además de un residuo de triptófano (Figura 3.6) [Ikegami *et al.*, 2000]. En el caso del CBM33 se encontró, mediante el análisis de los genomas de varios microorganismos, que presenta una superficie de residuos expuestos conformada por una tirosina, dos glutámicos, una histidina, un aspártico y una asparagina [Boraston *et al.*, 2007]. Los cuales interaccionan con el carbohidrato mediante interacciones CH- $\pi$  y puentes de hidrógeno.

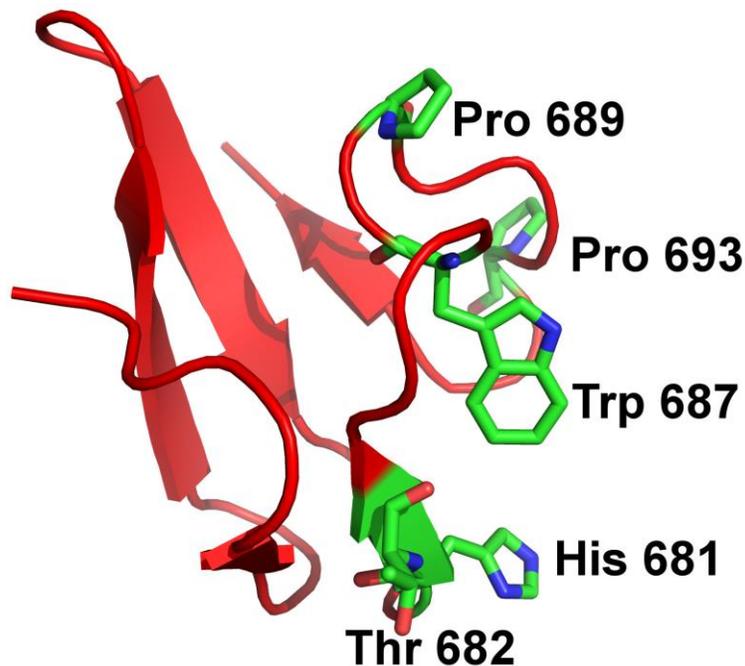


Figura 3.6. Estructura del BcCBM12 donde se observa la carencia del arreglo lineal de la triada de aminoácidos aromáticos del sitio de unión. Pero mantienen residuos polares que pueden favorecer el reconocimiento de la quitina como el Thr 682, His 681, Pro 689 y Pro 693 [Ikegami *et al.*, 2000]

### **Amilasas**

La hidrólisis enzimática del almidón se lleva a cabo mediante amilasas. El almidón es un biopolímero que estructuralmente se encuentra como pequeños gránulos, cuyo tamaño puede variar desde los 0.1  $\mu\text{m}$  hasta los 200  $\mu\text{m}$  [Jane., 2009].

Las dos estructuras que componen mayoritariamente al almidón son la amilosa y la amilopectina. La amilosa es predominantemente lineal, y tiene moléculas de glucosa unidas por enlaces  $\alpha(1-4)$ . La amilopectina son cadenas de glucosas unidas mediante enlaces  $\alpha(1-4)$  con ramificaciones que presentan enlaces  $\alpha(1-6)$  [Belitz y Grosch., 1997].

Mediante estudios de difracción de rayos X se ha determinado que los gránulos de almidón tienen carácter semicristalino. Aproximadamente, el 70% de la masa de un grano de almidón se considera amorfo, mientras que el 30% es cristalino. En las zonas amorfas se localiza la mayor parte de la amilosa, aunque también está presente una fracción considerable de amilopectina. Las zonas cristalinas están

formadas predominantemente por amilopectina y el grado de cristalinidad depende del contenido acuoso [Belitz y Grosch., 1997].

Al igual que las quitinasas algunas de estas enzimas presentan CBMs, y éstos pertenecen a las familias 20, 21, 25, 26, 34, 41, 45, 48 y 53.

Las estructuras cristalográficas de los CBMs 20 [Sorimachi *et al.*, 1996], 21 [Liu., 2007], 25, 26 [Boraston., 2006], 34 [Kamitori *et al.*, 2002], han demostrado que la estructura secundaria que se presenta mayoritariamente dentro de estos módulos es el motivo  $\beta$ -sandwich torcido. El mecanismo de unión de estos módulos al carbohidrato está mediado por aminoácidos aromáticos y es estabilizado por puentes de hidrógeno. Un ejemplo es el del CBM26 de *Bacillus halodurans*, en el que la interacción se lleva a cabo por el efecto de apilamiento de la Tyr 25 y el Trp 36 con la maltosa y es estabilizada por la Tyr 23, Glu 77, Gly 76 y Gln 71 mediante puentes de hidrógeno (Figura 3.7).

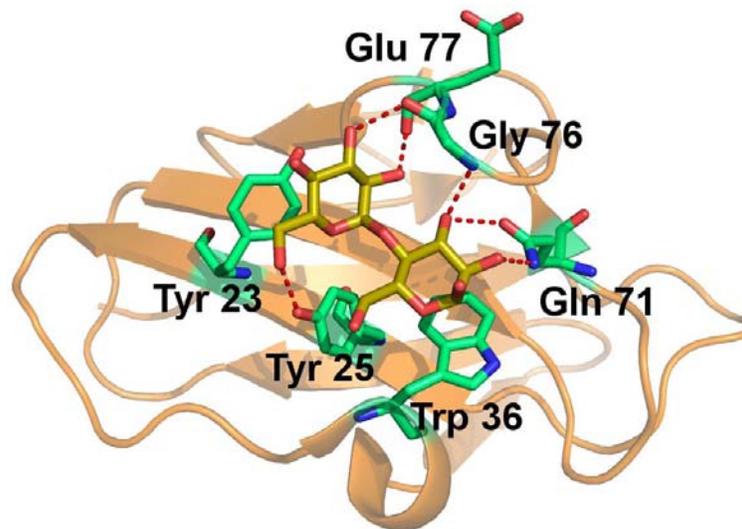


Figura 3.7. Modelo cristalográfico donde se muestra la interacción del *Bh*CBM26 con la maltosa mediante un efecto de apilamiento de la Tyr 25 y el Trp 36 con la maltosa y estabilizada por la Tyr 23, Glu 77, Gly 76 y Gln 71 mediante puentes de hidrógeno.

### ***Características importantes de las interacciones proteína-ligando***

Debido a que las interacciones proteína-ligando se encuentran ampliamente distribuidas en los sistemas biológicos, es importante comprender como se llevan a cabo en términos de sus componentes moleculares. Para estudiar las interacciones hay que caracterizarlas mediante un conjunto de técnicas que implican saber con exactitud las cantidades de proteína y ligando presentes, en el experimento y además cuánto y qué tan estable es el complejo formado.

La cantidad y la estabilidad de los complejos formados influyen sobre las constantes de asociación,  $K_a$ . Tales constantes se expresan como la razón de la concentración del complejo formado [PL], entre el producto de las concentraciones del ligando y de la proteína libre, todo al equilibrio en el caso más sencillo, para interacciones simples (un solo sitio de unión por molécula de proteína (1:1)).

$$K_a = \frac{[PL]}{[L][P]}$$

Las constantes de equilibrio determinadas bajo condiciones de temperatura y presión constante se relacionan con la diferencia entre la energía libre de Gibbs,  $G$ , de las moléculas libres y en complejo en solución. Es decir, con el cambio en la energía libre de Gibbs,  $\Delta G$ , [Williams., 2013 y O'Brien *et al.*, 2000]

$$\Delta G = G_{\text{solución}}^{\text{PL}} - \left( G_{\text{solución}}^{\text{Proteína}} - G_{\text{solución}}^{\text{Ligando}} \right)$$

La relación entre  $\Delta G$  y  $K_a$  está dada por

$$\Delta G_{\text{unión}} = -RT \ln(K_a)$$

Donde  $R$  es la constante universal de los gases y  $T$  la temperatura. Los cambios en  $\Delta G$  con signo negativo indican que las reacciones son espontáneas y favorables. El cambio en la energía libre puede descomponerse en dos términos, el cambio en la entalpía,  $\Delta H$ , y el cambio en la entropía,  $\Delta S$  de la reacción

$$\Delta G_{\text{unión}} = \Delta H_{\text{unión}} - T \Delta S_{\text{unión}}$$

Se ha reportado en múltiples estudios que las interacciones proteína-ligando tienen una energía libre de Gibbs de signo negativo, a consecuencia de un  $\Delta H_{\text{unión}}$  negativo ocasionado por la formación de interacciones débiles y un  $-T\Delta S$  positivo debido a que las interacciones débiles disminuyen los grados de libertad de las moléculas.

Existen múltiples estructuras cristalográficas de complejos proteína-ligando que nos proporcionan un amplio esquema de características que favorecen la interacción, los más destacados son:

- La complementariedad estérica entre la proteína y el ligando
- Una alta complementariedad entre las propiedades de las superficies, es decir, una superficie no polar de un ligando busca las superficies no polares de la proteína. De mismo modo, los grupos polares favorecen la formación de puentes de hidrógeno intramoleculares e intermoleculares, o interacciones iónicas.
- Usualmente las interacciones se dan en conformaciones energéticamente favorables.

La interacción proteína-ligando no es el único evento que ocurre cuando se trabaja en medio acuoso. También existen otros eventos en el sistema como lo son los cambios en la solvatación y cambios en la proteína al momento de unir el ligando. Determinar los parámetros termodinámicos, también llamado huella termodinámica, y de equilibrio de una interacción proteína-ligando nos ayuda a inferir algunas características energéticas de la interacción en una escala microscópica.

### ***Constantes de asociación de los CBMs de unión a quitina y a almidón***

Los CBMs con capacidad de unión a la quitina presentan la misma tendencia, el incremento en el número de unidades de GlcNAc da lugar a un aumento en las constantes de asociación; sin embargo, no presentan afinidades tan grandes. Las magnitudes de estas constantes de asociación varían entre  $10^2$  hasta  $10^5 \text{ M}^{-1}$  [Asensio., 1995; 2000 y García-Hernández *et al.*, 1997] dependiendo de la longitud del oligosacárido. Estas constantes fueron determinadas para interacciones carbohidrato-proteína con azúcares simples, de dos hasta cinco unidades de GlcNAc.

Por otro lado, los CBMs con capacidad de unión al almidón presentan constantes de asociación que varían de acuerdo al incremento en el número de glucosas en el ligando, con magnitudes que van de  $10^3$  a  $10^6$  M<sup>-1</sup>. Sin embargo, se ha observado que la afinidad mayor se da con un análogo estructural del almidón, la β-ciclodextrina [Belshaw y Williamson., 1993; Sigurkjold *et al.*, 1994 y Boraston *et al.*, 2006].

### ***Interacciones débiles en proteínas y en macromoléculas***

Las interacciones no covalentes representan las energías que mantienen las especies supramoleculares juntas. Las interacciones no covalentes, que varían de 2 kJ mol<sup>-1</sup> para las de dispersión a 300 kJ mol<sup>-1</sup> para las interacciones ion-ion, son más débiles que las interacciones covalentes (de 150 kJ mol<sup>-1</sup> a 450 kJ mol<sup>-1</sup>). Sin embargo, cuando estas interacciones se encuentran en una forma cooperativa puede existir un complejo macromolecular estable. El término no covalente involucra un amplia variedad de interacciones y repulsiones que están resumidas en la Tabla 3.1 [Steed *et al.*, 2007].

Tabla 3.1. Interacciones no covalentes en proteínas y macromoléculas

Interacción	Energía (kJ mol <sup>-1</sup> )
Ion-ion	200-300
Dipolo-dipolo	50-200
Puente de hidrógeno	4 a 120
Catión-π	5-80
π-π	0-50
Van der Waals	<5, es variable dependiendo del área de superficie
Hidrofóbica	Relacionado con la interacción disolvente-disolvente

### ***Interacciones iónicas y dipolares [Anslyn and Dougherty., 2006]***

Las interacciones iónicas y dipolares pueden clasificarse en tres categorías: (i) Interacción ión-ión, (ii) Interacciones ion-dipolo, (iii) Interacciones dipolo-dipolo, las

cuales se basan en las atracciones Coulómbicas entre cargas opuestas. La más fuerte de éstas es la interacción ión-ión, la cual llega a ser comparable con las interacciones covalentes. Este tipo de interacciones no requiere de una orientación, mientras que las interacciones ión-dipolo y dipolo-dipolo son dependientes de la orientación, lo que implica que las especies deben de estar alineadas en una dirección adecuada. Debido a la rigidez de las interacciones direccionadas, solamente las especies complementarias pueden unirse, mientras que las interacciones no direccionadas sirven para estabilizar una amplia gama de alineamientos. La fuerza de este tipo de interacciones depende de las especies involucradas. Las interacciones ion-dipolo son más fuertes que las interacciones dipolo-dipolo (50-200 y 5-50 kJ mol<sup>-1</sup>, respectivamente) debido a que los iones tienen una densidad de carga mayor que los dipolos. A pesar de que las interacciones dipolo-dipolo son las más débiles, son las que favorecen el reconocimiento de las especies.

Las interacciones electrostáticas juegan un papel importante en la comprensión de los factores de influencia en las afinidades altas, particularmente en sistemas biológicos en las cuales hay un gran número de procesos de reconocimiento que involucran a éstas, siendo a menudo las primeras que se establecen ya que estas requieren de una orientación específica entre especies.

#### *Puentes de hidrógeno [Jeffery., 1997]*

Los puentes de hidrógeno son las interacciones no covalentes más importantes en el plegamiento de macromoléculas, debido a su fuerza y a su alto grado de direccionalidad. Éstos son un tipo de interacción dipolo-dipolo entre un donador de hidrógeno y un átomo aceptor electronegativo. Existe una gran fuente de especies donantes y aceptoras, por ejemplo, aminoácidos, carbohidratos y nucleótidos.

La fuerza de los puentes de hidrógeno puede ser muy diferente entre varios sistemas y no necesariamente correlacionada con la acidez de Brønsted del donante de protones. La fuerza depende del tipo del átomo electronegativo al cual el átomo de hidrógeno es anclado, además de la geometría que el puente de hidrógeno adopte. Normalmente, el rango de energías va de 4 a 120 kJ mol<sup>-1</sup>, siendo

la mayoría menor a los  $60 \text{ kJ mol}^{-1}$ . Existen otras interacciones secundarias entre los grupos vecinos que deben de ser consideradas. Las cargas parciales adyacentes de los átomos pueden incrementar la fuerza de la unión por la virtud de atracción entre cargas opuestas o decrecer la afinidad debido a las repulsión entre cargas.

La geometría de los puentes de hidrógeno y el tipo de donador y aceptor determinan la fuerza, longitud y naturaleza de la interacción. Los puentes de hidrógeno pueden ser divididos en tres amplias categorías enumeradas en la Tabla 3.2. Una interacción fuerte es parecida en características a un enlace covalente, mediante la cual el átomo de hidrógeno está cerca al punto central de los átomos donador y aceptor. Los puentes de hidrógeno fuertes están formados entre dos bases fuertes, por ejemplo en el ion  $\text{HF}_2^-$ , en el cual se observa una conformación prácticamente lineal entre el átomo de hidrógeno con los átomos de fluoruro  $[\text{F}\cdots\text{H}\cdots\text{F}]^-$ . Los puentes de hidrógeno de fuerza media son formados entre un donador neutral y un aceptor neutral, es decir, vía un par de electrones libres, por ejemplo la libre asociación de los ácidos carboxílicos. Los puentes de hidrógeno de fuerza media no tienen una geometría lineal, sin embargo, la desviación es ligera. Un puente de hidrógeno lineal requiere una posición fija del átomo de hidrógeno con relación al aceptor, mientras que los puentes de hidrógeno no lineales tienen muchas posibles posiciones y presentan una forma cónica alrededor de la posición. Los ángulos de enlace más grandes resultan en un cono más grande, y por lo tanto hay más posiciones posibles para que ocurra el enlace. Los puentes de hidrógeno débiles son menos lineales y en algunos casos pueden formar interacciones perpendiculares, por ejemplo, la interacción C-H- $\pi$  entre los anillos de benceno y los enlaces C-H cuando estos últimos se orientan directamente hacia el sistema conjugado.

Tabla 3.2 Interacciones de enlace con hidrógeno y sus propiedades (A, aceptor, D, donador)

Interacción/propiedad	Fuerte	Moderado	Débil
D-H...A	Principalmente covalente	Principalmente electrostático	Electrostático
Energía de enlace (kJ mol <sup>-1</sup> )	60-120	16-60	<12
Longitud de enlace (Å)			
H...A	1.2-1.5	1.5-2.2	2.2—3.2
D...A	2.2-2.5	2.5-3-.2	3.2-4.0
Ángulo de enlace (grados)	175-180	130-180	90-150
Ejemplo	Complejos HF H <sub>5</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup>	Ácidos Alcoholes, Proteínas ADN/ARN	C-H...A C-H...π

## IV. Antecedentes

### *Proteína tipo quitinasa de Hevea brasiliensis*

La quitinasa proveniente de *Hevea brasiliensis* guarda alrededor del 65% de identidad con otras endoquitinasas de plantas. Recientemente, en el genoma de *Hevea brasiliensis* se reportó la presencia de una isoforma de esta quitinasa, la cual presenta un CBM18 en su N-terminal [Rahman *et al.*, 2013]. Posteriormente se reportó que dicha proteína no presenta actividad hidrolítica ya que el dominio “catalítico” solo une carbohidratos a semejanza con el CBM18, por lo que entra dentro de la clasificación de proteínas tipo quitinasa (*HbCLP1*) y la presencia de otra isoforma que contiene un CBM18 trunco separado por un conector del otro CBM18 (*HbCLP2*) (Figura 4.1) [Martínez-Caballero *et al.*, 2014].

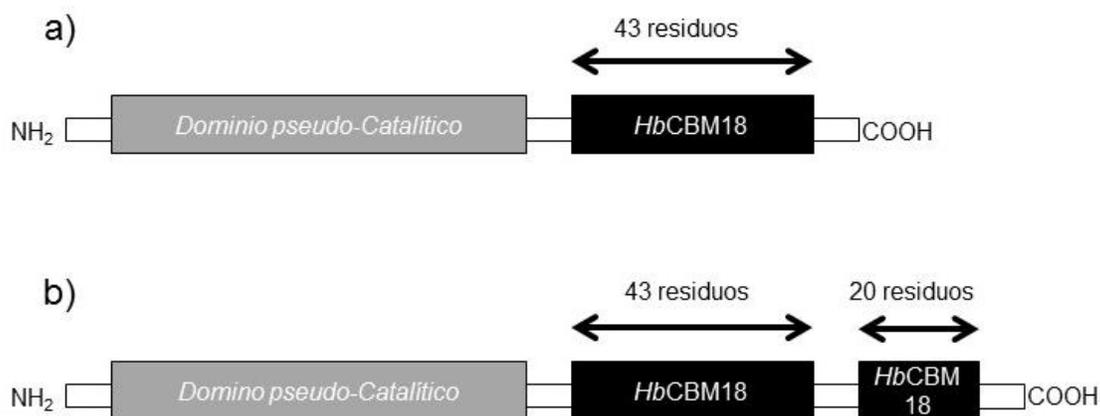


Figura 4.1. Arreglo de la proteína tipo quitinasa de *Hevea brasiliensis* donde se observa a) el dominio pseudo-catalítico, un conector y un *HbCBM18*, (*HbCLP1*), y b) el pseudo-dominio catalítico, un conector, un *HbCBM18* otro conector y medio *HbCBM18*, (*HbCLP2*).

A su vez, en el trabajo del 2014 se determinaron las constantes de asociación del *HbCLP1*, su isoforma *HbCLP2*, el dominio catalítico de la *HbCLP1* (*HbCatD1*), el dominio catalítico de la *HbCLP2* (*HbCatD2*) y los módulos de unión *HbCBM18* y *1.5xHbCBM18* en presencia de N-acetil-quitotriosa usando fluorescencia. Las constantes de asociación se muestran en la tabla 4.1.

Tabla 4.1. Constantes de afinidad del <i>HbCLP1</i> , <i>HbCLP2</i> , <i>HbCatD1</i> , <i>HbCatD2</i> , <i>HbCBM18</i> y <i>1.5xHbCBM18</i> , determinadas por fluorescencia con N-acetil-quitotriosa.	
	Ka [M <sup>-1</sup> ]
<i>HbCLP1</i>	3.3x10 <sup>5</sup>
<i>HbCLP2</i>	3.2x10 <sup>5</sup>
<i>HbCatD1</i>	4.2 x10 <sup>5</sup>
<i>HbCatD2</i>	4.8 x10 <sup>5</sup>
<i>HbCBM18</i>	2.1 x10 <sup>6</sup>
<i>1.5xHbCBM18</i>	6.7 x10 <sup>5</sup>

La notable afinidad presentada en el *HbCBM18*, 2.1x10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup>, fue atribuida a la presencia de una metionina en la posición -1, la cual se ubica cercana al sitio de unión. Se encontró por acoplamiento molecular que está metionina es capaz de establecer interacciones con las cadenas de GlcNAc [Martínez-Caballero *et al.*, 2014].

### ***Amilasa de Lactobacillus amylovorus***

La  $\alpha$ -amilasa de *Lactobacillus amylovorus* cuenta con un arreglo de múltiples dominios, formada por 954 aminoácidos la cual puede ser dividida en dos partes. La primera mitad, N-terminal, corresponde al dominio catalítico. La segunda mitad, C-terminal, está formada por cinco módulos con una secuencia idéntica de 91 aminoácidos cada uno (Figura 4.2) [Giraud y Cuny., 1997]. Se demostró que estos 5 módulos actúan como un dominio de fijación al almidón (*LaDFA*) [Rodríguez-Sanoja *et al.*, 2000]



Figura. 4.2. Arreglo de la  $\alpha$ -amilasa de *Lactobacillus amylovorus* donde se observa el dominio catalítico, y el tándem de los 5xLaCBM26.

En el *LaDFA* se ha visto que la capacidad de adsorción al almidón se incrementa en relación al número de módulos presentes, el incremento observado no es lineal mostrando un efecto sinérgico. Figura 4.3 [Guillén *et al.*, 2007].

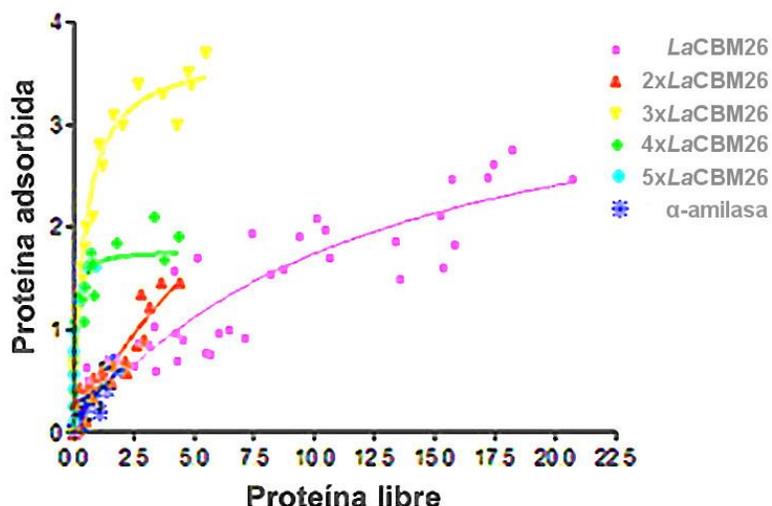


Figura 4.3. Curvas de adsorción de las unidades repetidas, *LaCBM26*, *2xLaCBM26*, *3xLaCBM26*, *4xLaCBM26*, *5xLaCBM26* y la  $\alpha$ -amilasa completa

Se cree que el *LaDFA* se inmoviliza de forma no covalente sobre gránulos de almidón dando pie a la estabilización de las proteínas adsorbidas. Esta inmovilización puede llevarse a cabo de forma semejante a otras proteínas, por adsorción directa sobre superficies hidrofóbicas gracias a las interacciones que son capaces de establecer los aminoácidos sobre este tipo de superficies.

Los resultados obtenidos mediante ensayos de mutagénesis dirigida sobre varios residuos aromáticos del *LaCBM* indicaron que los residuos Tyr 18, Tyr 20 y Trp 32 juegan un rol importante en la interacción del *LaDFA* de la  $\alpha$ -amilasa con el ligando. Siendo la mutación del Trp 32 causa de la abolición de la unión [Rodríguez-Sanoja *et al.*, 2009].

Por otro lado, para corroborar los cambios inducidos por la unión del ligando se obtuvieron espectros de dicroísmo circular (DC) en el UV lejano de *LaDFA* con  $\beta$ -ciclodextrina (*LaDFABCD*) y del *LaDFA* sin ligando. En estos se observó un ligero cambio en el espectro del DC para el dominio con su ligando, como se aprecia en la Figura 4.4. El *LaDFA* muestra un mínimo a 201 nm, un máximo a 221 nm y un hombro a los 237 nm, y el espectro del *LaDFABCD* tiene un mínimo a 201 nm, un máximo a 223 nm y un hombro a 234 nm. A simple vista se puede observar una perturbación en la región que comprende de los 220 a los 240nm. Se sabe que en

la región que comprende de los 225 a los 235 nm los aminoácidos aromáticos, Tyr y Trp, muestran bandas positivas [Woody., 1994]. Por lo que podemos asumir que la interacción entre el *LaDFA* con la  $\beta$ -ciclodextrina ocasiona un cambio en el ambiente de los aminoácidos aromáticos del *LaDFA* con la  $\beta$ -ciclodextrina. [García., 2014. Tesis no publicada]

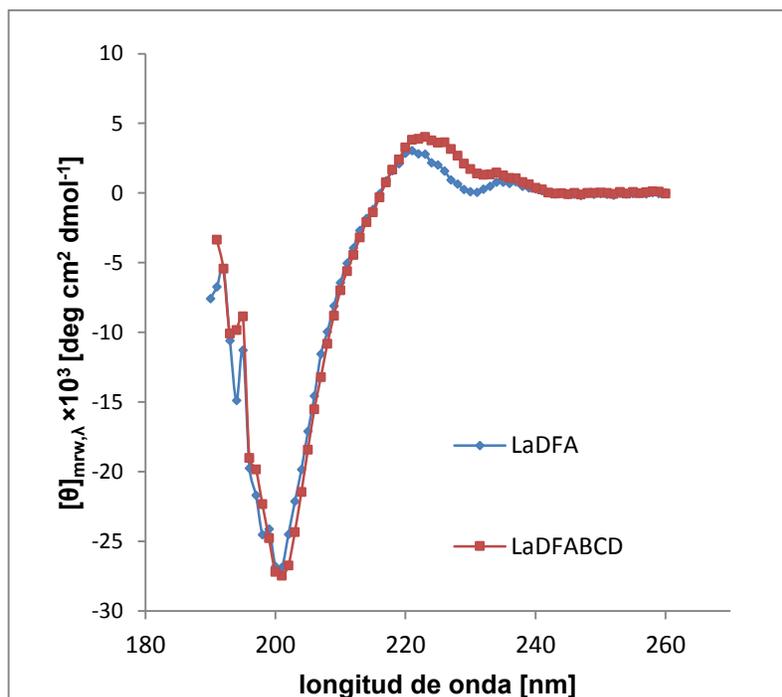


Figura 4.4. Espectros de DC en el UV lejano del *LaDFA* en donde se muestra al *LaDFA* (-♦- azul) y al *LaDFA* con  $\beta$ -ciclodextrina (-■- rojo) (*LaDFABCD*) [García., 2013. Tesis no publicada]

## **Objetivo General**

Aportar información bioquímico-estructural de diferentes módulos de unión a carbohidratos, mediante la caracterización de las interacciones que establecen dichos dominios con diferentes ligandos.

## **Objetivos particulares**

1. Estudio de dominios de unión a quitina, específicamente del *HbCBM18* y *1.5xHbCBM18*.
  - a. Clonar en un vector pET32a con un sitio de corte para la proteasa TEV, sobre-expresar y purificar los *HbCBM18* y *1.5xHbCBM18*
  - b. Caracterizar los efectos de la interacción proteína-carbohidrato sobre la huella termodinámica y las constantes de asociación del *HbCBM18* de la proteína tipo quitinasa de *Hevea brasiliensis* con la N-acetil-quitotriosa mediante ITC.
  - c. Caracterizar cambios en el ambiente de los residuos aromáticos en los espectros de dicroísmo circular durante la unión del ligando.
  
2. Estudio de dominios de unión a almidón, específicamente del 1, 3 y 5 *LaCBM26* en tándem.
  - a. Sobre-expresión y purificación de las construcciones 1, 3 y 5 *LaCBM26*
  - b. Caracterizar los efectos de la interacción proteína-carbohidrato sobre la huella termodinámica y las constantes de asociación del *5xLaCBM26*, *3xLaCBM26* y del *LaCBM26* aislado de  $\alpha$ -amilasa de *L. amylovorus* con  $\alpha$ -ciclodextrina y  $\beta$ -ciclodextrina mediante ITC.
  - c. Caracterizar cambios en el ambiente de los residuos aromáticos en los espectros de dicroísmo circular durante la unión del ligando.

## ***Justificación***

Caracterizar las interacciones proteína-ligando aporta información para entender el mecanismo mediante el cual los organismos llevan a cabo sus funciones vitales. Este tipo de funciones son mecanismos de defensa, metabolismo, estructurales, transporte y señalización.

Una vez caracterizados los mecanismos pueden ser explotados en el ámbito académico e industrial, con el fin de optimizar procesos industriales, desarrollar medicamentos más específicos o en apoyo a los proyectos de investigación.

La caracterización de los CBMs es un tema con un auge importante en los últimos años, debido a que se ha descubierto la presencia de éstos en múltiples proteínas. Los CBMs presentan diversas estructuras y diferentes especificidades, sin embargo, todos mantienen la propiedad de unir carbohidratos mediante interacciones débiles, lo cual les brinda una característica importante como lo es la reversibilidad de estas interacciones.

## ***Hipótesis***

Los parámetros termodinámicos de los *HbCBM18* y *LaCBM26* son dirigidos entálpicamente.

Las constantes de asociación de las mutantes del *HbCBM18* serán mayores que las del módulo nativo. Para los tándems del *LaCBM26* las constantes de asociación serán mayores que las de un solo módulo.

En los espectros de dicroísmo circular en el UV lejano del *HbCBM18* y *LaCBM26* ocurrirán desplazamientos debido a la interacción con el ligando.

## V. Metodología

### Cepas

<i>E. coli</i> Rosetta gami (DE3) pLysS	$\Delta(\text{ara-leu})7697 \Delta\text{lacX74} \Delta\text{phoA}$ <i>PvuII</i> <i>phoR araD139 ahpC galE galK rpsL</i> F'[ <i>lac<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> pro</i> ] <i>gor522::Tn10 trxB</i> pRARE <sup>2</sup> (Cam <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Str <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup> ) <sup>4</sup>
<i>E. coli</i> XL1 Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17</i> <i>supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI<sup>q</sup></i> Z $\Delta$ M15 Tn10 (Tet <sup>R</sup> )].
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	F- $\Phi$ 80/ <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta(\text{lacZYA-argF})$ U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rK-, mK+) <i>phoA supE44</i> $\lambda$ - <i>thi-</i> 1 <i>gyrA96 relA1</i>

### Construcciones

pET32a-*HbCBM18-R5W*  
pET32a-1.5x*HbCBM18-R5W*  
pQE31-*LaCBM26*  
pQE31-3x*LaCBM26*  
pQE31-5x*LaCBM26*

### Construcciones *HbCBM18-R5W* y 1.5x *HbCBM18-R5W*

Los genes del *HbCBM18-R5W* y 1.5x*HbCBM18-R5W* fueron mutados mediante PCR a partir de los vectores pET32a CBDA y pET32a CBDb (Martínez-Caballero *et al*, 2014) y se clonaron en el vector pET32a, agregando un sitio de corte para la proteasa TEV. La sobre-expresión de las proteínas se hizo en la cepa *E. coli* Rosetta gami (DE3) pLysS.

## **Construcciones *LaCBM26*, *3xLaCBM26* y *5xLaCBM26***

Los vectores pQE31-*LaCBM26*, pQE31-*3xLaCBM26* y pQE31-*5xLaCBM26*, previamente contruidos [Guillén et al., 2007], se sobre-expresaron en la cepa *E. coli* XL1Blue.

## **Cultivos**

### *HbCBM18-R5W* y *1.5xHbCBM18-R5W*

La cepa *E. coli* Rosetta gami (DE3) pLysS con el vector pET32a-*HbCBM18-R5W* y el pET32a-*1.5xHbCBM18-R5W* se sobre-expresaron, por separado, en 1 L de medio LB con ampicilina (100 µg/mL) a 37°C con agitación. Cuando se alcanzó una DO a 600nm de 0.8. Se indujo el cultivo con IPTG 0.5 mM por 16 h a 30°C con agitación. Trascurrido este tiempo las células se recuperaron centrifugando por 10 min a 9820 xg a 4°C. El pellet se lavó con amortiguador de TrisHCl 50 mM pH 7.6, Imidazol 25 mM, NaCl 0.5 M.

### *LaCBM26*, *3xLaCBM26* y *5xLaCBM26*

Los vectores pQE31-*LaCBM26*, pQE31-*3xLaCBM26* y pQE31-*5xLaCBM26* se sobre expresaron en la cepa *E. coli* XL1blue en 1 L de medio LB con ampicilina 100 µg/mL hasta una DO a 600nm de 0.8. Se indujo el cultivo con IPTG 0.4 mM por 7, 5 y 4 h, respectivamente para cada construcción. Trascurrido este tiempo las células se recuperaron centrifugando por 10 min a 9820 xg a 4°C. El pellet se lavó con amortiguador de Tris 50 mM pH 7.6, Imidazol 25 mM, NaCl 0.5 M.

## **Purificación**

### *HbCBM18-R5W* y *1.5xHbCBM18-R5W*

Todo el proceso se realizó en hielo. El pellet se resuspendió en 80 mL de amortiguador de lisis (amortiguador 50mM de TrisHCl pH 7.6, 0.5 M de NaCl y 25 mM de Imidazol, 1 mM de PMSF, 0.5 mM de DTT). Las células se lisaron en un frasco de 100 mL en el sonicador Misonix 3000, dando pulsos de 10 s con potencia 5 y 30 s de reposo hasta completar 10 min de pulsos. El lisado se centrifugó a 27001

xg por 20 min a 4°C. El sobrenadante se filtró por una membrana de 0.22 µm y se aplicó a una columna HisTrap de níquel. Posteriormente se dializó la proteína contra amortiguador 50 mM de TrisHCl pH 8 en una bolsa de diálisis con corte de 3 kDa haciendo tres recambios y se adicionó la proteasa TEV, incubando a 4°C por 16 h. Transcurrido el tiempo se aplicó a una columna de His Trap, encontrándose el *HbCBM18* en la fracción que no se unió a la columna. Se adicionó a la fracción no unida NaCl a una concentración final de 0.5 M para ser circulada a través de una membrana de 10000 MWCO.

#### *LaCBM26, 3xLaCBM26 y 5xLaCBM26*

Todo el proceso se realizó en hielo. El pellet se resuspendió en 80 mL de amortiguador de lisis (amortiguador 50 mM de TrisHCl pH 7.6, 0.5 M de NaCl y 25 mM de Imidazol, 1 mM de PMSF). Las células se lisaron en un frasco de 100 mL en el sonicador Misonix 3000, dando pulsos de 10 s con potencia 5 y 30 s de reposo hasta completar 10 min de pulsos. El lisado se centrifugó a 27001 xg por 20 min a 4°C. El sobrenadante se filtró por una membrana de 0.22 µm y se inyectó a una columna HisTrap de níquel. Posteriormente se dializó la proteína contra amortiguador 20 mM de Bis Tris propano pH 5.5 en una bolsa de diálisis con corte de 6 kDa.

El dializado obtenido se aplicó a una columna de intercambio aniónico Mono Q GL acoplada al sistema FPLC, equilibrada con amortiguador 20 mM de Bis Tris propano pH 5.5. La elución de las proteínas se realizó usando un gradiente de 0 a 100% de amortiguador 20 mM de Bis-Tris propano pH 5.5 con 1 M de NaCl.

## **Calorimetría de titulación isotérmica**

### ***HbCBM18-R5W***

La proteína purificada, a una concentración de 24  $\mu\text{M}$ , se dializó por 20 h a 4°C en una membrana con corte de 3000 MWCO contra tres recambios de 100 volúmenes de amortiguador de TrisHCl 50 mM pH 7.6 y 20 mM EDTA con agitación suave.

El ligando se preparó a 208 veces la concentración de la proteína utilizando como disolvente el amortiguador con el que se dializó la proteína.

El ensayo de calorimetría se realizó en un microcalorímetro VP-ITC de Microcal, con una celda de muestra de 1.4 mL. En la celda se colocó la proteína y en el sistema de inyección el ligando. Se realizó la titulación con N-acetil-quitotriosa y se restó el calor de dilución.

### ***LaCBM26***

Las proteínas purificadas, a una concentración de 10  $\mu\text{M}$ , se dializaron por 20 h a 4°C en una membrana con corte de 3000 MWCO contra tres recambios de 100 volúmenes de amortiguador de fosfatos 20 mM pH 7.6 y 20 mM EDTA con agitación suave.

El ligando se preparó a 40 veces la concentración de la proteína utilizando como disolvente el amortiguador con el que se dializó la proteína.

El ensayo de calorimetría se realizó en un microcalorímetro VP-ITC de Microcal, con una celda de muestra de 1.4 mL. En la celda se colocó la proteína y en el sistema de inyección el ligando. Se realizaron titulaciones con  $\alpha$ -Ciclodextrina ( $\alpha\text{CD}$ ) y  $\beta$ -Ciclodextrina ( $\beta\text{CD}$ ), por duplicado. Las isotermas se promediaron, se restó el calor de dilución y se deconvolucionaron para obtener los parámetros termodinámicos y las constantes de asociación usando Origin con las herramientas de Microcal y AFFINImeter.

## Dicroísmo circular (CD)

La estructura secundaria de las proteínas se analizó por dicroísmo circular, en la región del UV lejano en presencia y ausencia de ligando. El ensayo se realizó en un espectropolarímetro Jasco J-720 usando una celda de 0.1 cm de paso de luz. Cada espectro se obtiene por triplicado en la región de 190-260 nm.

*HbCBM18-R5W* y *1.5xHbCBM18-R5W*

La proteína se dializó extensamente en amortiguador de fosfatos 10 mM pH 7.6 y su concentración ajustada al menos a 130 µg/mL.

*LaCBM26*, *3xLaCBM26* y *5xLaCBM26*

La proteína se dializó extensamente en amortiguador de fosfatos 10 mM pH 7.6 y su concentración ajustada al menos a 130 µg/mL. El ligando se disolvió en el amortiguador de diálisis previamente filtrado a una concentración final de 9 mg/mL. Para el espectro de CD en presencia del ligando, a la celda con 400 µL de volumen de muestra se le agregan 2 µL de la disolución de ligando ( $\alpha$ -ciclodextrina o  $\beta$ -ciclodextrina) a 9 mg/mL y se agita invirtiendo la celda durante 20 s. Los espectros de la proteína fueron corregidos mediante la sustracción de la línea base, para la línea base del espectro sin ligando se utilizó solamente amortiguador, y para la línea base del espectro con ligando se utilizó amortiguador y 2 µL del ligando. El ligando se encontraba en una relación final de 4 veces la concentración proteína.

## VI. Resultados y Discusión

### Clonación, Expresión y Purificación de los Módulos de Unión a Quitina

Los genes para las construcciones *HbCBM18-R5W* y *1.5xHbCBM18-R5W* se amplificaron, (Figura 6.1), utilizando como templado las construcciones obtenidas previamente [Martínez-Caballero *et al.*, 2014].



Figura 6.1. Gel de agarosa con los insertos (*HbCBM18-R5W* y *1.5xHbCBM18-R5W*) y el vector (pet 32a) digeridos y purificados, listos para la reacción de ligación. MPM (Marcador); pet32a, *HbCBM18* y *1.5xHbCBM18*

Los productos de PCR obtenidos se ligaron entre los sitios de corte *Not* I y *Nco* I del vector pET32a. El diseño de las construcciones, *HbCBM18-R5W* y *1.5xHbCBM18-R5W*, evita la presencia de la Met -1 insertando un sitio de corte para la proteasa TEV entre el gen de interés y la Metionina, la construcción también tiene un tallo 6xHis y la tiorredoxina (Trx) fusionados río arriba de la Met -1, como se muestra en la figura 6.2 A y B, respectivamente.

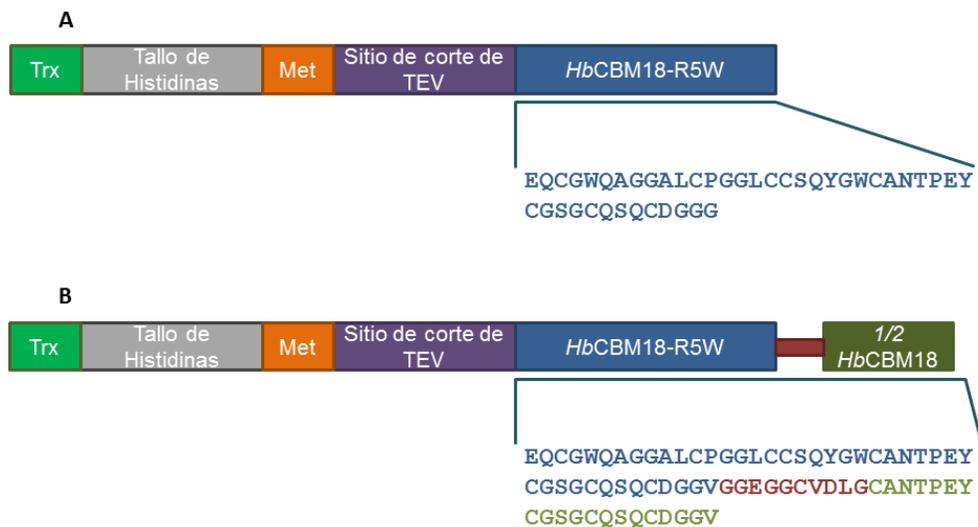


Figura 6.2. Esquema de la construcción **(A)** *HbCBM18-R5W* y **(B)** *1.5xHbCBM18-R5W* con su respectiva secuencia de aminoácidos

Se purificó el plásmido de 3 clonas de cada construcción, seleccionadas aleatoriamente, y se digirió con la enzima *Xmn* I, (Figura 6.3), para el *HbCBM18-R5W* se seleccionaron las colonias 2, 5 y 8; para *1.5xHbCBM18-R5W* las colonias 3, 5 y 8.

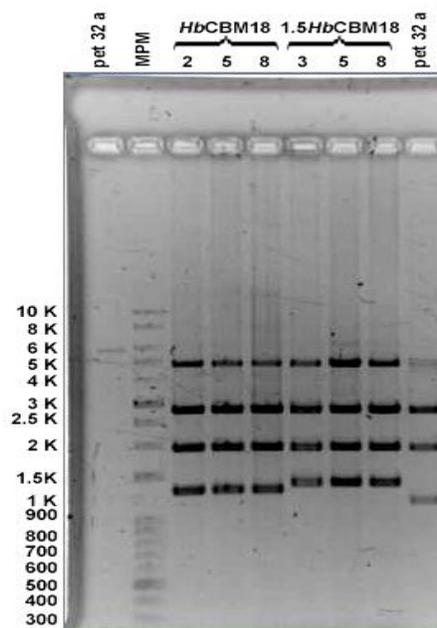


Figura 6.3. Digestión con la enzima *Xmn* I de los plásmidos pET32a, pET32a-*HbCBM18-R5W* de las clonas 2, 5 y 8, y pET32a-*1.5xHbCBM18-R5W* de las clonas 3, 5 y 8. En todas las clonas se observan las bandas esperadas después de la digestión (Tabla 5.1).

**Tabla 6.1 Bandas esperadas tras la digestión con *Xmn* I**

pET32a	<i>HbCBM18-R5W</i>	1.5x <i>HbCBM18-R5W</i>
2792	2792	2792
1934	1934	1934
1174	1309	1387

Tras observar que las 6 colonias seleccionadas presentaban los pesos esperados (tabla 5.1), se enviaron a secuenciar y se observó que las colonias 5 y 8 del *HbCBM18-R5W*, y las colonias 3 y 8 del 1.5x*HbCBM18-R5W* presentan el inserto con las mutaciones pretendidas.

El vector correspondiente a la colonia 8 de ambas construcciones se transformó en células de almacenamiento *E. coli* DH5 $\alpha$  y de expresión *E. coli* Rosetta gami (DE3) pLysS. Las células transformantes se almacenaron por crio-génesis a -70°C.

### ***HbCBM18***

La construcción realizada por Martínez-Caballero *et al.*, [2014] del *HbCBM18*, presenta una Metionina en la posición -1, Met- (-1). La estructura 3D mostró que la Met- (-1) se encuentra cerca del sitio de unión a carbohidratos. También, mediante técnicas de fluorescencia se determinó la constante de asociación,  $K_a$ , con N-acetilquitotriosa, la cual fue de  $2.08 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ , que es considerablemente mayor a la reportada para la Heveína,  $1.47 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  [Galicia *et al.*, 2015], proteína con la que guarda un 68% de identidad (tabla 6.2).

Tabla 6.2. Alineamiento de las secuencias de Heveína, *HbCBM18* y *HbCBM18-R5W*.

```

Heveína      --EQCGRQAGGKLCPNLCCSQWGWCGSTDEYCSPDHNCQSNCKD--
HbCBM18      AMEQCGRQAGGALCPGGLCCSQYGWCANTPEYCGS--GCQSQCDGGV
HbCBM18-R5W  --EQCGWQAGGALCPGGLCCSQYGWCANTPEYCGS--GCQSQCDGGV
              ****  ****  ***  *****:***..*  ***.  ***:*
1: Heveína      100.00
   2: HbCBM18      68.29
   3: HbCBM18-R5W  65.85
    
```

Superponiendo las estructuras del *HbCBM18* (PDB 4MPI), la Heveína (1Q9B) y el *HbCBM18-R5W* mutado *in silico*, con pymol, se observa que las dos estructuras cristalizadas, *HbCBM18* y Heveína, mantienen residuos de la misma naturaleza en el sitio de unión, el *HbCBM18* muestra: Ser 19, Tyr 21, Trp 23 y Tyr 30; la Heveína exhibe: Ser 19, Trp 21, Trp 23 y Tyr 30; en el *HbCBM18-R5W* observamos que Trp 5 se encuentra cercano al sitio de unión. También observamos en el *HbCBM18* la Met -1 cercana al sitio de unión (Figura 6.4).

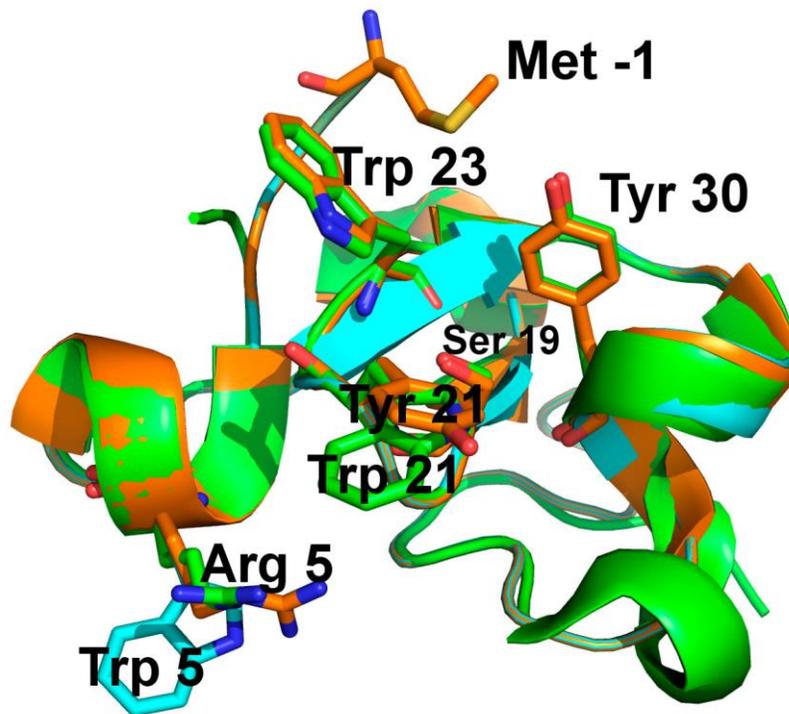


Figura 6.4. Superposición de la heveína (verde), *HbCBM18* (naranja) y *HbCBM18-R5W* (azul) (modelo de homología). Usando los códigos PDB 4MPI [Martínez-Caballero *et al.*, 2014] y 1Q9B [Reyes-López *et al.*, 2004]

Mediante técnicas de acoplamiento molecular del *HbCBM18-R5W* con N-acetilquitotriosa, usando Autodocktools, observamos que la mutación favorece la formación de un nuevo sitio de unión, formado por el Trp 5, Tyr 21 y Trp 23. En el complejo se forman interacciones de tipo CH- $\pi$ , mediadas por el Trp 23, la Tyr 30 y el Trp 5, además, la Gln 20 y la Gln 6 pueden estabilizar la interacción mediante puentes de hidrógeno, Figura 6.5.

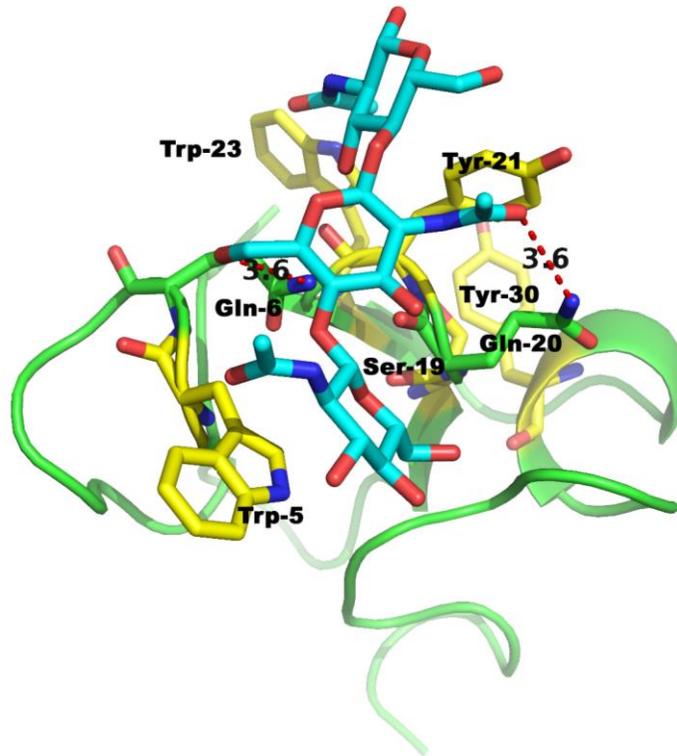


Figura 6.5. Acoplamiento molecular del *HbCBM18-R5W* con N-acetil-quitotriosa. Se observa que el nuevo sitio Trp 5, Tyr 21 y Trp 23 favorece la unión de N-acetil-quitotriosa

Cuando el acoplamiento molecular se hizo con N-acetil-quitohexaosa se observó que el sitio principal y el nuevo sitio pueden participar simultáneamente en la unión de ligandos de mayor tamaño. En el modelo de la figura 6.6, muestra la formación de interacciones de tipo CH- $\pi$ , mediadas por la Tyr-21, el Trp-23, la Tyr-30 y el Trp-5, también, la formación de puentes de hidrógeno con la Gln-20 y la Gln-6 pueden estabilizar la interacción mediante puentes de hidrógeno.

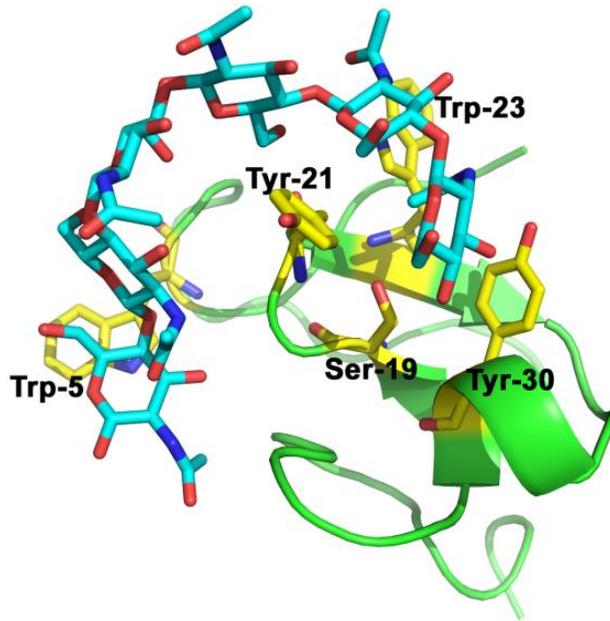


Figura 6.6. Acoplamiento molecular del *HbCBM18-R5W* con N-acetil-quitohexaosa. Se observa que el sitio principal y el nuevo sitio unen simultáneamente al oligosacárido.

Se realizaron cinéticas de sobre-expresión de las construcciones transformadas en células *E. coli* Rosetta gami a 30°C con IPTG 0.5 mM observándose que entre las 12 y 20 h se da la máxima expresión de ambos dominios (Figura 6.7 A y B).

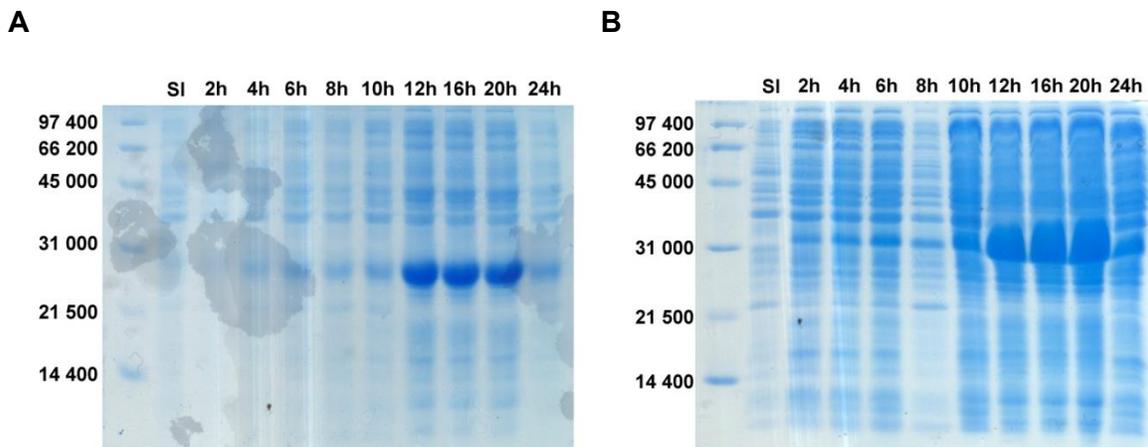


Figura 6.7. Cinética de sobre-expresión a 30°C inducida con 0.5mM de IPTG de **(A)** *HbCBM18-R5W* (22.3 kDa) y **(B)** 1.5x*HbCBM18-R5W* (25.4 kDa).

Ambos dominios fueron sobre-expresados con 0.5 mM de IPTG por 16 h a 30°C. Una vez purificados los dominios con la columna de afinidad a níquel, digeridos con la proteasa TEV, aplicados nuevamente a la columna de níquel y purificadas a través de una membrana de corte de 10 kDa, se realizaron los SDS-PAGE correspondientes para cada dominio. Los SDS-PAGE se muestran en la figura 6.8 (A) el *HbCBM18-R5W* y (B) el *1.5HbCBM18-R5W*

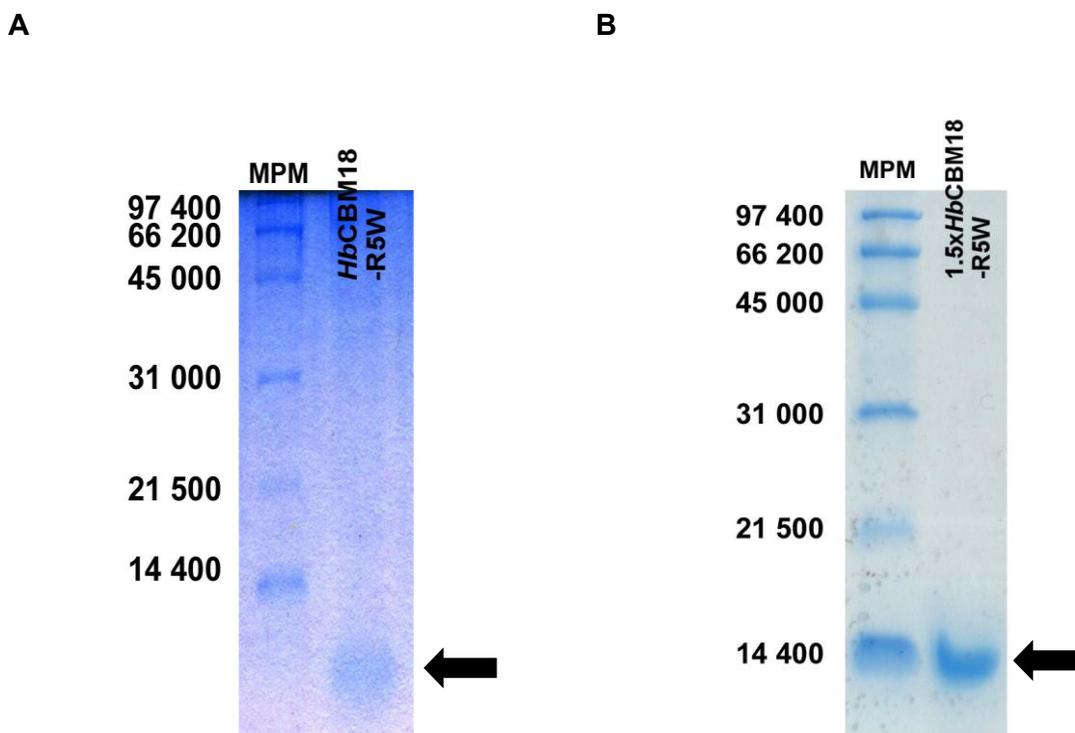


Figura 6.8. A y B SDS-PAGE del (A) *HbCBM18-R5W* y (B) *1.5xHbCBM18-R5W*

### ITC del *HbCBM18-R5W*

La calorimetría de titulación del *HbCBM18-R5W* se realizó a una concentración de 24  $\mu\text{M}$  de *HbCBM18-R5W* y 5 mM de N-acetil-quitotriosa (Figura 6.9). Sin llegarse a la saturación de este dominio, se obtuvo como valor de constante de asociación  $4.28 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ , una entalpía favorable y una entropía desfavorable (Figura 6.10), generalidades vistas en otros dominios. La saturación de la proteína fue del 27%, lo cual nos indica que la delección de la Met -1 afecta la unión del ligando.

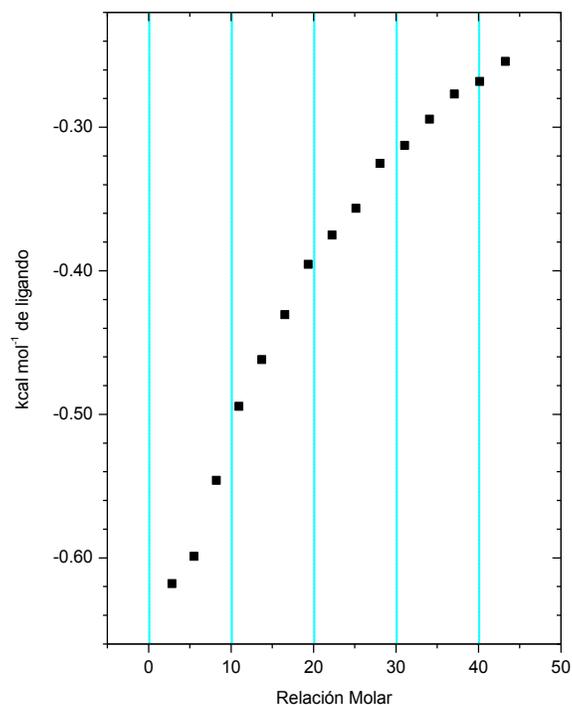


Figura 6.9. Isotherma del *HbCBM18-R5W* titulada con N-acetil-glucosamina donde la saturación fue del 27%, indicando que la delección de la Met -1 afecta la unión.

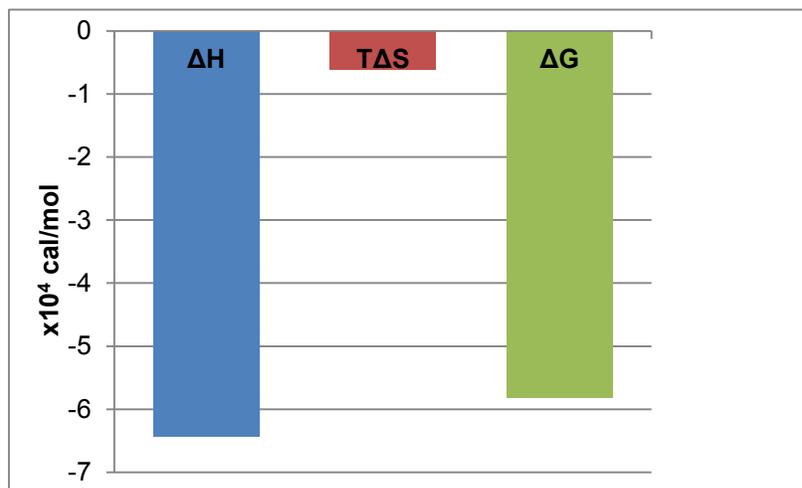


Figura 6.10. Huella termodinámica del *HbCBM18 R5W* titulada con N-acetil-glucosamina. Se observa favorecida entálpicamente y desfavorable entrópicamente.

### Dicroísmo circular de los *HbCBM18-R5W*

Los espectros de dicroísmo circular, figura 6.11, del *HbCBM18-R5W* y  $1.5 \times HbCBM18-R5W$  muestran un mínimo a 207 nm, característico de hebras beta y un máximo a 220 nm, que previamente se había observado con el espectro de la heveína y fue explicado como reflejo de la conformación local alrededor del triptófano y la tirosina [Rodríguez-Romero *et al.*, 1989]. Los espectros con N-acetilquitotriosa no se lograron obtener ya que ésta muestra señal en el UV lejano.

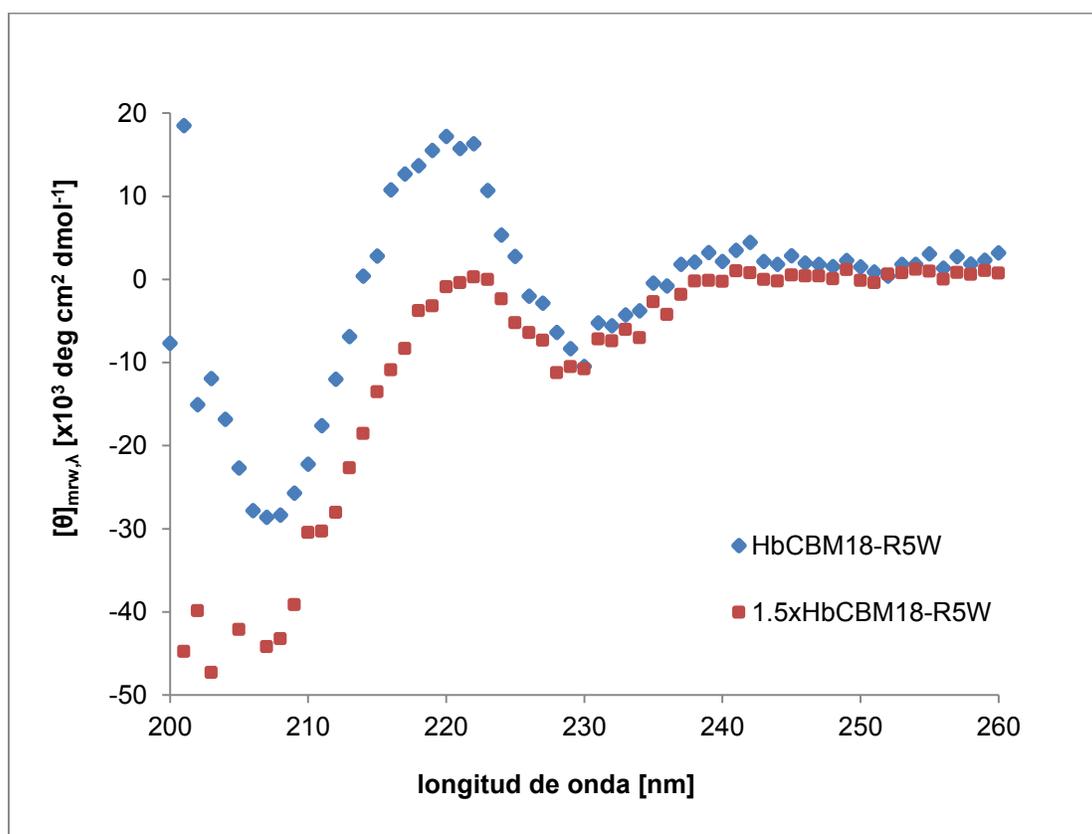


Figura 6.11. Espectro de dicroísmo circular en el UV lejano del *HbCBM18-R5W* y  $1.5 \times HbCBM18-R5W$ , ambos espectros muestran un máximo alrededor de los 220 nm y un mínimo cercano a los 207 nm.

Así mismo, Rodríguez-Romero *et al.*, [1989] mostraron que la heveína presenta un espectro de dicroísmo circular con un máximo alrededor de los 221 nm y un mínimo a 198 nm. Debido a la forma del espectro, lo consideraron como una estructura irregular con presencia de giros  $\beta$  y asas, es decir, un bajo contenido de hélices y hojas  $\beta$  (Figura 6.12a). También se observó la desaparición de este máximo al desnaturalizar a la heveína con Cloruro de Guanidinio y DTT (Figura 6.12b).

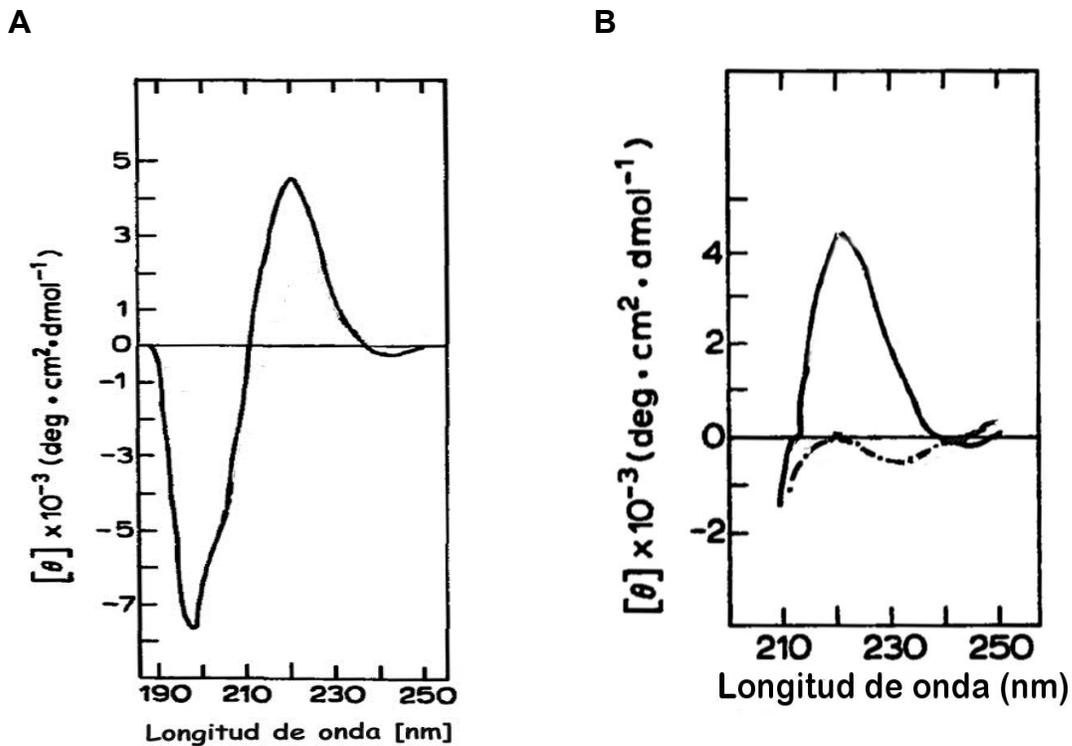


Figura 6.12. Espectro de DC de la heveína A) plegada y B) desnaturalizada con Cloruro de Guanidinio y DTT. (Rodríguez-Romero *et al.*, 1989. Editado).

Mediante técnicas de difracción de rayos X, la estructura de la heveína se determinó [Rodríguez-Romero *et al.*, 1991], y se observó que la estructura se encuentra estabilizada por 4 puentes de disulfuro. Además, como se dijo antes, la heveína guarda un 65% de identidad con el *HbCBM18-R5W*. Los espectros del *HbCBM18-R5W* y la heveína muestran una marcada diferencia en el máximo, siendo mayor la magnitud en los espectros del *HbCBM18-R5W*, lo cual se explica por la presencia de los residuos aromáticos. Se ha reportado que la señal observada entre los 225 a los 235 nm se debe a interacciones  $\pi$ - $\pi$  entre los aminoácidos aromáticos, Tyr y Trp, expuestos al disolvente y presentes en los sitios de unión a carbohidratos de este tipo de proteínas [Woody., 1994].

## LaCBM26

Los dominios de unión a almidón mostrados en la figura 6.13, presentan una migración anómala en los geles SDS-PAGE, esta migración siempre se encuentra por encima del valor que correspondería a su peso molecular. El peso esperado para el *LaCBM26* es 14 kDa, para el *3xLaCBM26* es 36 kDa y para el *5xLaCBM26* es 54 kDa. En muchas proteínas se ha observado que este tipo de migraciones anómalas se debe a la carga neta de las proteínas, ya que la movilidad electroforética está influenciada por factores como el pH, las cantidades y tipos de contra-iones y agentes desnaturizantes presentes en el medio [Garfin, 1990].

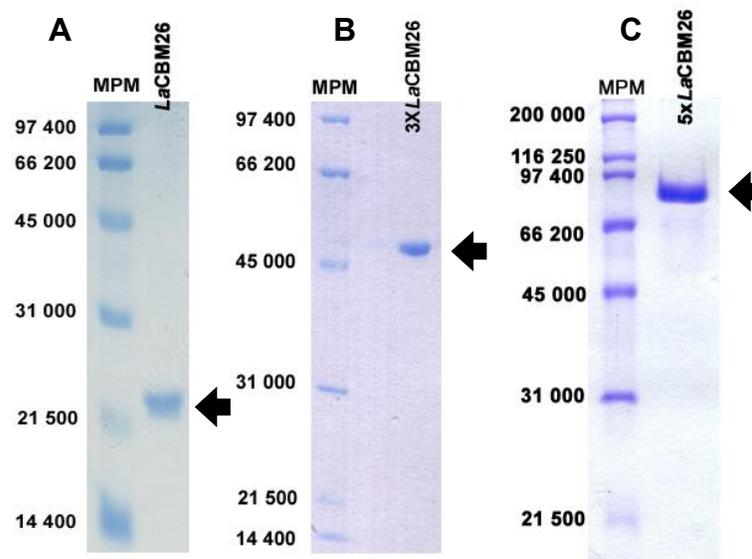


Figura 6.13. SDS-PAGE del (A) *LaCBM26*, (B) *3xLaCBM26* y (C) *5xLaCBM26*, se observa una migración anómala ya que los pesos de cada construcción son 14, 36 y 54 kDa respectivamente.

## Calorimetría de titulación isotérmica

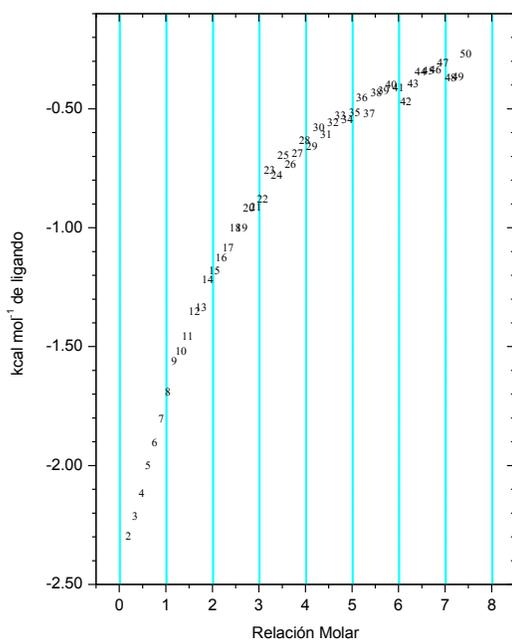
Cada una de las proteínas purificadas, figura 6.13 A, B y C; se titularon por duplicado con  $\alpha$ -ciclodextrina ( $\alpha$ CD) y  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ CD) mediante calorimetría de titulación isotérmica (ITC). Las isothermas fueron promediadas y ajustadas a diferentes modelos usando dos diferentes programas de análisis: Origin (OriginLab, Northampton, MA) y AFFINImeter (Burnouf *et al.*, 2012).

## ITC de los Dominios de Unión al almidón

### LaCBM26

En la figura 6.14 A y B. se observan las isotermas promedio del *LaCBM26* a una concentración de 10.9  $\mu\text{M}$  titulada con  $\alpha\text{CD}$  y  $\beta\text{CD}$  a 436  $\mu\text{M}$ , cada una. Las isotermas fueron ajustadas al modelo de un sitio para obtener las constantes de asociación. Con  $\alpha\text{CD}$  se obtuvo una constante de  $2.71 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  calculada con Origin y  $2.31 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  calculada con AFFINImeter. De igual forma con  $\beta\text{CD}$  fue  $7.70 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  y  $8.54 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ , respectivamente para cada software. Las  $K_a$ 's nos indican que un módulo, *LaCBM26*, es alrededor de 3 veces más afín a la  $\beta\text{CD}$  comparado con la  $\alpha\text{CD}$ . Estos valores se asemejan a los reportados en múltiples estudios termodinámicos, ver antecedentes.

**A**



**B**

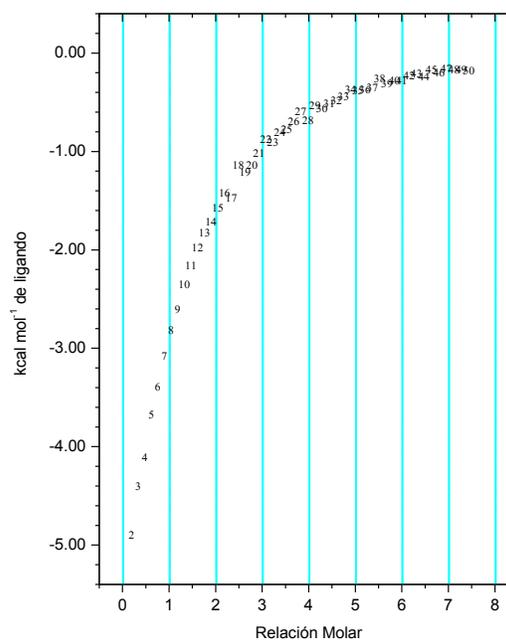


Figura 6.14. Isotermas del *LaCBM26* titulado con **(A)**  $\alpha\text{CD}$  y **(B)**  $\beta\text{CD}$

Por otro lado en el gráfico 5.15, se observan las huellas termodinámicas de unión para las titulaciones con  $\alpha\text{CD}$  y  $\beta\text{CD}$ .

La huella termodinámica nos muestra la misma tendencia observada en otros sistemas de interacción proteína-ligando, donde las interacciones son favorecidas entálpicamente y desfavorecidas entrópicamente.

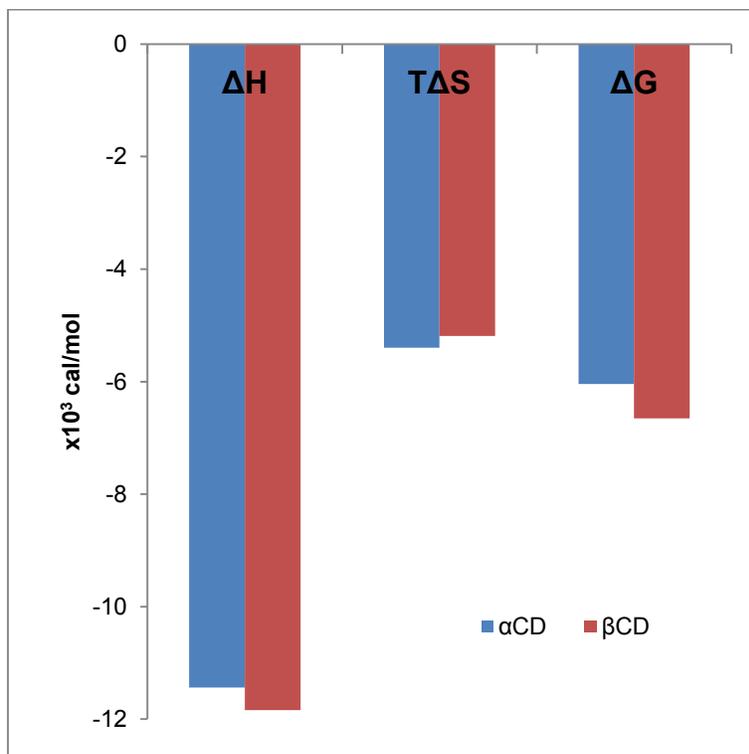


Figura 6.15. Huella termodinámica del *LaCBM26* con  $\alpha$ CD y  $\beta$ CD. Comúnmente los CBMs están favorecidos entálpicamente y desfavorecidos entrópicamente, la energía libre de Gibbs, calculada, indica que la reacción es espontánea.

### 3xLaCBM26

Las figuras 5.16 A y B muestran las isotermas del 3xLaCBM26 a una concentración de 10.6  $\mu\text{M}$  tituladas con  $\alpha\text{CD}$  a 430  $\mu\text{M}$  y  $\beta\text{CD}$  415  $\mu\text{M}$ , vemos que para ambas titulaciones la forma de la curva cambia respecto a un módulo, mostrando en las primeras inyecciones lo que puede ser un efecto cooperativo. Cabe resaltar que los tres módulos son idénticos en secuencia, lo que nos limita a saber cuál de los tres interactúa primero.

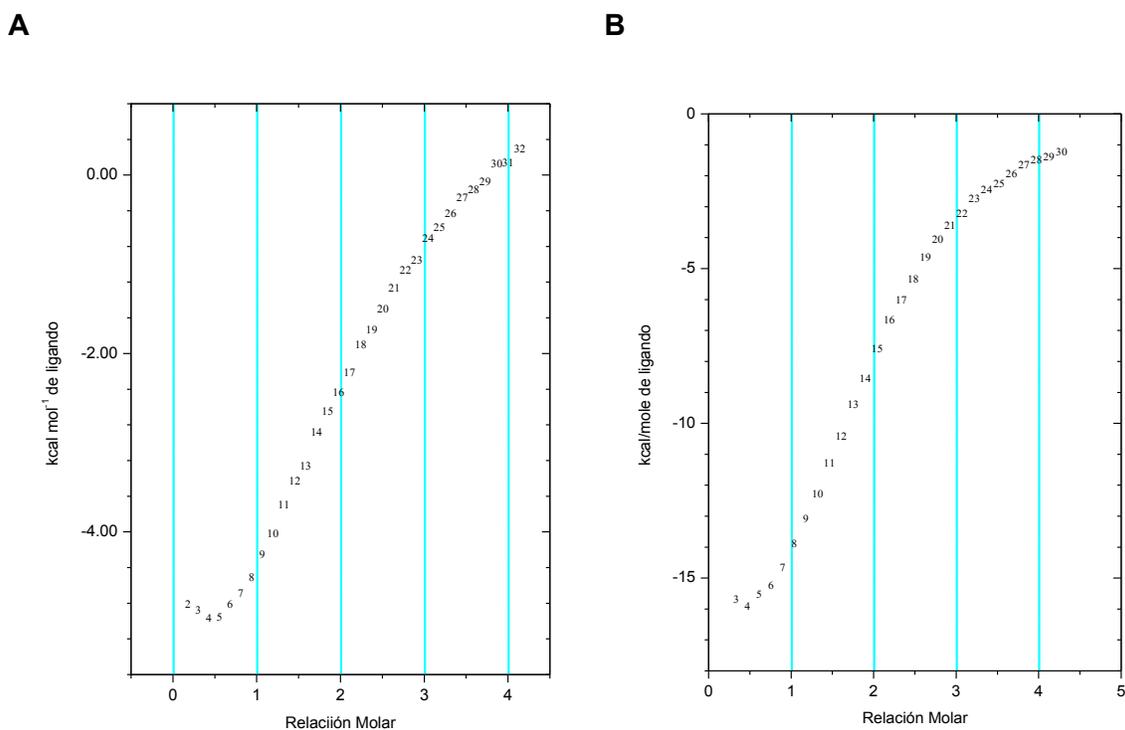


Figura 6.16. Isotermas del 3xLaCBM26 titulada con (A)  $\alpha\text{CD}$  y (B)  $\beta\text{CD}$

La isoterma del 3xLaCBM26 titulada con  $\alpha\text{CD}$  es diferente respecto a la titulada con  $\beta\text{CD}$ , si observamos la figura 6.16A en la inyección 30 la isoterma se vuelve endotérmica, caso que no se muestra con el otro ligando, en el caso de la  $\beta\text{CD}$  no podemos incrementar la concentración del ligando en la celda, ya que esto ocasiona que la proteína precipite. Por el contrario, con la  $\alpha\text{CD}$  este efecto no ocurre.

Las isotermas fueron ajustadas a diversos modelos (Figura 6.17). Para el caso de Origin se ajustaron al modelo de sitios secuenciales, mientras que en AFFINImeter se ajustaron a los modelos de sitios secuenciales y sitios independientes bajo las siguientes condiciones: un sitio con capacidad de unir tres moléculas de ligando y de tres sitios con capacidad de unir una molécula de ligando cada uno.

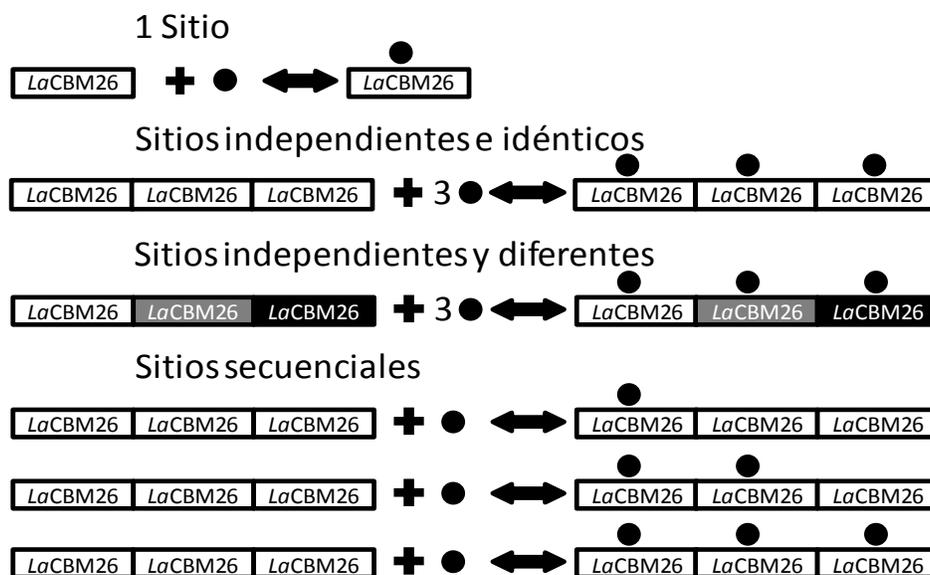


Figura 6.17. Modelos de ajuste en AFFINImeter

Por otro lado, observamos cambios en la huella termodinámica comparada con la huella de un sitio, el ajuste muestra que algunos sitios se rigen por las generalidades termodinámicas, entálpicamente favorecidas y entrópicamente desfavorecidas, y otros son dirigidos entrópicamente, pero siempre favorables, lo cual se observa en los gráficos de las Figuras 5.18 A y B, dónde la energía libre de Gibbs nos indica que la interacción es espontánea.

En el transcurso de una interacción proteína-ligando existen varios eventos asociados, tales como la modificación de la capa de solvatación y cambios de conformación. Para poder asociar este tipo de eventos se requiere conocer las estructuras 3D de la proteína libre y en presencia del ligando.

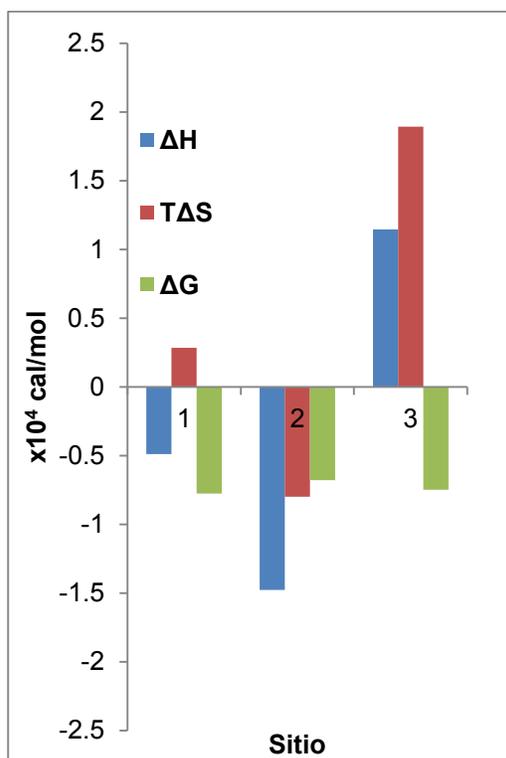
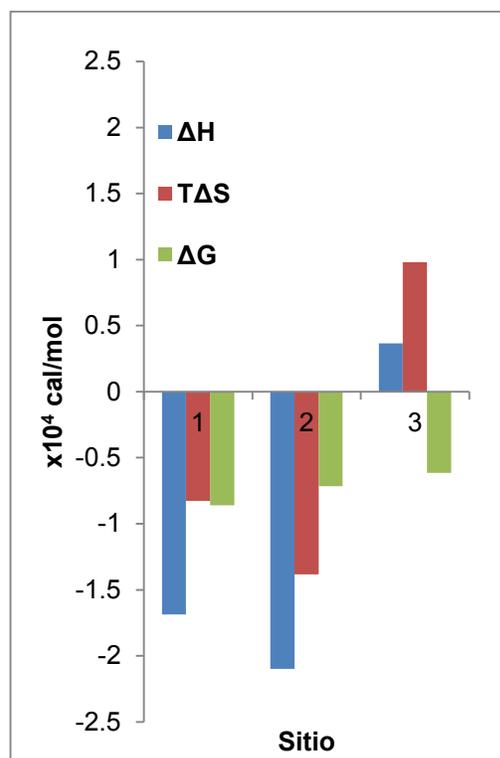
**A****B**

Figura 6.18. Huella termodinámica del 3xLaCBM26 titulada con (A)  $\alpha$ CD y (B)  $\beta$ CD. Cuando el número de sitios incrementa, el comportamiento cambia, algunos sitios están favorecidos entálpicamente y otros entrópicamente; sin embargo, las interacciones de todos los sitios son espontáneas, manteniendo una energía libre de Gibbs similar a la de un módulo para cada sitio.

## 5xLaCBM26

La figura 6.15 A se muestra la isoterma del 5xLaCBM26 a una concentración de 11  $\mu\text{M}$  titulada con  $\alpha\text{CD}$  a 440  $\mu\text{M}$  y en la figura 6.19 B se muestra la isoterma del 5xLaCBM26 a una concentración de 6.22  $\mu\text{M}$  titulada con  $\beta\text{CD}$  a 234  $\mu\text{M}$  [García., 2014. Tesis no publicada]. Las isotermas del 5xLaCBM26 muestran un comportamiento más marcado que las de 3xLaCBM26 en las primeras inyecciones, figura 6.15 A y B, como se mencionó arriba, este comportamiento puede indicar que existe un efecto cooperativo en la unión con el ligando.

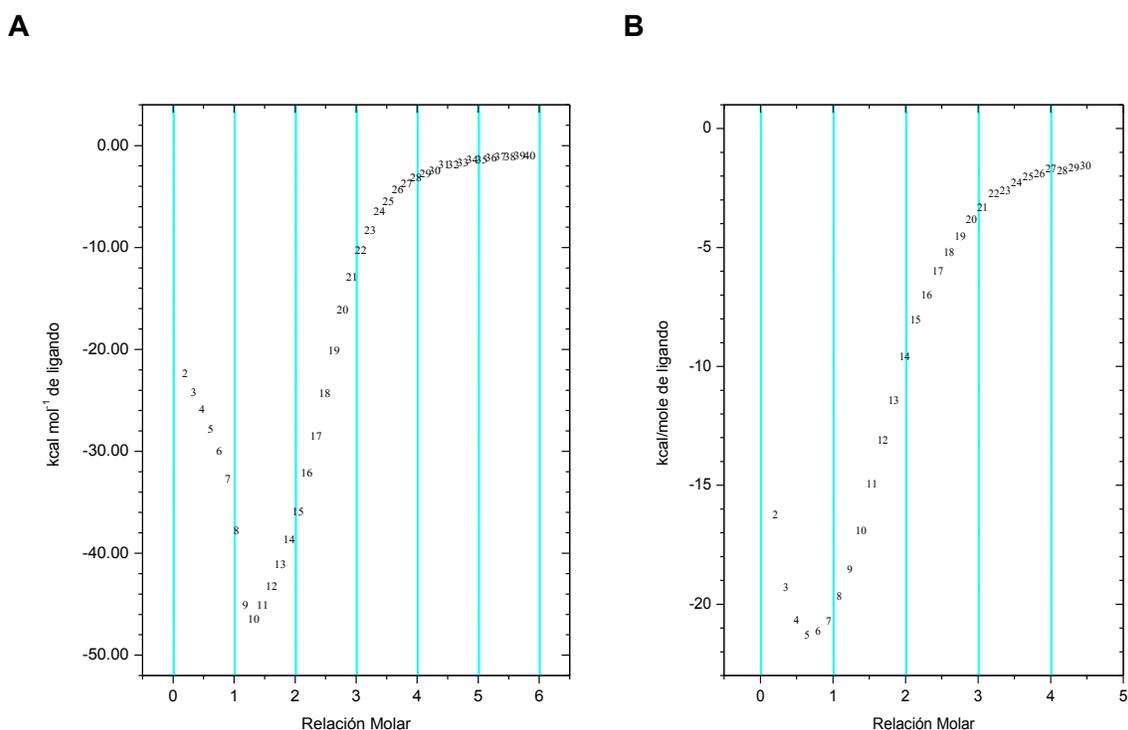


Figura 6.19. Isotermas promedio del 5xLaCBM26 titulada con **(A)**  $\alpha\text{CD}$  y **(B)**  $\beta\text{CD}$  [García., 2014 Tesis no publicada]

En la huella termodinámica, Figura 6.20 A y B, del 5xLaCBM26 observamos un comportamiento semejante al tándem de 3 módulos, es decir, que no todos los sitios se rigen por las generalidades termodinámicas. Sin embargo, todos los sitios interaccionan de forma espontánea.

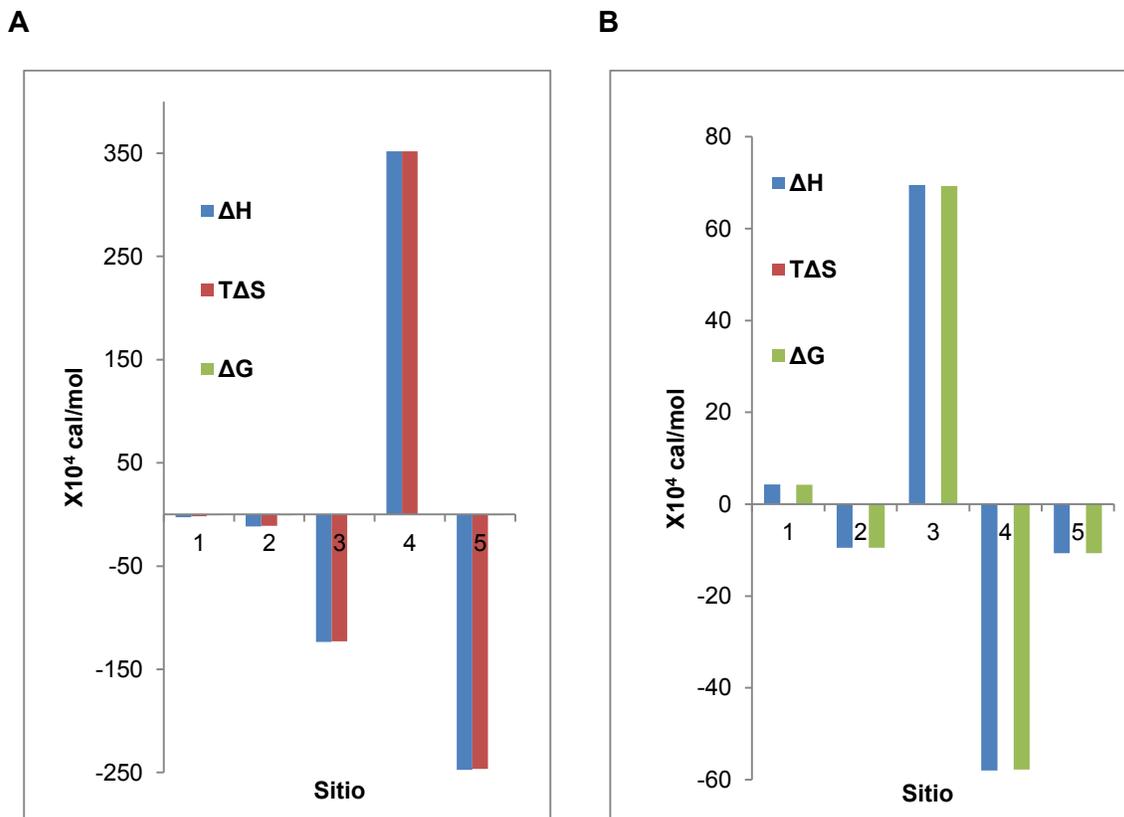


Figura 6.20. Huella termodinámica del 5xLaCBM26 titulada con **(A)**  $\alpha$ CD y **(B)**  $\beta$ CD. Cuando el número de sitios incrementa, el comportamiento cambia, algunos sitios están favorecidos entálpicamente y otros entrópicamente; sin embargo, las interacciones de todos los sitios son espontáneas, siendo la energía libre de Gibbs, para cada sitio, similar a la de un módulo.

Igual que para el tándem de tres sitios, aquí no podemos afirmar que el orden de cada sitio en el ajuste sea el orden espacial en la proteína. Cada sitio tiene la misma capacidad y probabilidad de unirse al carbohidrato, esto porque cada uno de los cinco sitios es idéntico; sin embargo, algunos pueden encontrarse impedidos estéricamente y ser la razón de la forma de las isothermas, es decir, a medida que se une el ligando se vuelven más accesibles los demás sitios. La unión del ligando puede favorecer que los sitios pierdan un posible impedimento estérico, dando como resultado el creciente calor en las primeras inyecciones de la isoterma.

En la tabla 6.3 se muestran comparativamente las constantes de asociación del LaCBM26 y sus respectivos tándems de éste. Se observa que a medida que se incrementa el número de sitios de unión en la cadena polipeptídica se incrementan las constantes de asociación. Cabe resaltar que para todos los módulos se observó

una mayor afinidad a la  $\beta$ -CD que a la  $\alpha$ -CD. Esto último se podría explicar dada la flexibilidad de la  $\beta$ -CD que es mayor que la de la  $\alpha$ -CD (Mixcoha *et al.*, 2014) y que la  $\beta$ -CD presenta una unidad de glucosa más que la  $\alpha$ -CD estableciendo mayor cantidad de contactos. Se ha descrito que algunos residuos tienen la capacidad de interaccionar con las ciclodextrinas en el interior hidrófobo de las ciclodextrinas.

Las entalpías de cada ajuste se muestran en la tabla 6.4, observamos que a medida que se incrementa el número de sitios la magnitud y el comportamiento cambia ya que algunos sitios se muestran dirigidos entálpicamente y otros entrópicamente.

Tabla 6.3 Constantes de asociación de los dominios de unión al almidón del LaCBM26, 3xLaCBM26 y 5xLaCBM26. También se muestran los ajustes realizados y su respectivo valor de  $\chi^2$ .

	Microcal, Origin				Affinimeter			
	$\alpha$ CD Ka M <sup>-1</sup>	$\chi^2$	$\beta$ CD Ka M <sup>-1</sup>	$\chi^2$	$\alpha$ CD Ka M <sup>-1</sup>	$\chi^2$	$\beta$ CD Ka M <sup>-1</sup>	$\chi^2$
LaCBM26 1 sitio	2.71x10 <sup>4</sup>	1.57 x10 <sup>3</sup>	7.70x10 <sup>4</sup>	2.76x10 <sup>3</sup>	2.31x10 <sup>4</sup>	2.68 x10 <sup>3</sup>	8.54x10 <sup>4</sup>	2.56 x10 <sup>3</sup>
3xLaCBM26 Sitios secuenciales	4.83x10 <sup>5</sup> 9.39x10 <sup>4</sup> 3.13x10 <sup>5</sup>	4.72 x10 <sup>3</sup>	2.00x10 <sup>6</sup> 1.79x10 <sup>5</sup> 3.20x10 <sup>4</sup>	7.59 x10 <sup>3</sup>	1.27x10 <sup>5</sup> 1.77x10 <sup>4</sup> 1.54x10 <sup>5</sup>	1.87 x10 <sup>3</sup>	2.00x10 <sup>6</sup> 1.32x10 <sup>5</sup> 1.11x10 <sup>5</sup>	3.36 x10 <sup>4</sup>
3xLaCBM26 Sitios independientes y diferentes 3 sitios n=1	--	--	--	--	4.90x10 <sup>5</sup> 1.75x10 <sup>4</sup> 8.98x10 <sup>4</sup>	3.02 x10 <sup>3</sup>	4.83x10 <sup>4</sup> 4.27x10 <sup>4</sup> 3.00x10 <sup>7</sup>	3.54 x10 <sup>4</sup>
3xLaCBM26 Sitios independientes e idénticos 1 sitio n=3	--	--	--	--	3.83x10 <sup>5</sup>	1.48 x10 <sup>5</sup>	2.94x10 <sup>5</sup>	3.94 x10 <sup>6</sup>
3xLaCBM26 Sitios independientes 1 sitio n=RND	--	--	--	--	3.03x10 <sup>5</sup> n=2.45	3.02 x10 <sup>3</sup>	5.09x10 <sup>5</sup> n=1.99	1.03 x10 <sup>5</sup>
5xLaCBM26 Sitios secuenciales	7.26x10 <sup>5</sup> 3.29x10 <sup>4</sup> 2.63x10 <sup>4</sup> 4.18x10 <sup>4</sup> 1.94x10 <sup>5</sup>	7.26 x10 <sup>5</sup>	1.28x10 <sup>6</sup> 1.16x10 <sup>6</sup> 9.85x10 <sup>5</sup> 9.17x10 <sup>5</sup> 8.50x10 <sup>5</sup>	3.29 x10 <sup>4</sup>	4.40x10 <sup>7</sup> 9.72x10 <sup>7</sup> 7.98x10 <sup>6</sup> 1.22x10 <sup>6</sup> 1.00x10 <sup>8</sup>	3.91 x10 <sup>6</sup>	5.39x10 <sup>7</sup> 4.99x10 <sup>7</sup> 9.22x10 <sup>6</sup> 4.35x10 <sup>7</sup> 3.28x10 <sup>7</sup>	5.75 x10 <sup>6</sup>
5xLaCBM26 Sitios independientes y diferentes 5 sitios n=1	--	--	--	--	7.19x10 <sup>7</sup> 7.61x10 <sup>5</sup> 1.50x10 <sup>6</sup> 1.62x10 <sup>7</sup> 1.37x10 <sup>6</sup>	3.47 x10 <sup>5</sup>	2.75x10 <sup>4</sup> 1.50x10 <sup>4</sup> 4.31x10 <sup>7</sup> 6.59x10 <sup>4</sup> 2.04x10 <sup>5</sup>	9.25 x10 <sup>6</sup>
5xLaCBM26 Sitios independientes e idénticos 1 sitio n=5	--	--	--	--	5.62x10 <sup>6</sup>	6.67 x10 <sup>6</sup>	1.89x10 <sup>5</sup>	3.00 x10 <sup>6</sup>
5xLaCBM26 Sitios independientes 1 sitio n=RND	--	--	--	--	5.63x10 <sup>3</sup> n=2.68	6.67 x10 <sup>6</sup>	6.31x10 <sup>3</sup> n=100	6.23 x10 <sup>6</sup>

Tabla 6.4. $\Delta H$ de los dominios de unión al almidón del <i>LaCBM26</i> , <i>3xLaCBM26</i> y <i>5xLaCBM26</i> . Solamente se muestran los resultados de los mejores ajustes.				
	Microcal, Origin		Affinimeter	
	$\alpha$ CD (cal/mol)	$\beta$ CD(cal/mol)	$\alpha$ CD (cal/mol)	$\beta$ CD (cal/mol)
<i>LaCBM26</i> Sitios independientes	$-1.14 \times 10^4$	$-1.18 \times 10^4$	$-1.00 \times 10^4$	$-1.04 \times 10^4$
<i>3xLaCBM26</i> Sitios secuenciales	$-4.90 \times 10^3$ $-1.48 \times 10^4$ $1.15 \times 10^4$	$-1.69 \times 10^4$ $-2.10 \times 10^4$ $3.66 \times 10^3$	$-7.78 \times 10^3$ $-4.27 \times 10^4$ $4.54 \times 10^4$	$-1.47 \times 10^4$ $-2.65 \times 10^4$ $1.62 \times 10^4$
<i>3xLaCBM26</i> Sitios independientes 3 sets n=1	--	--	$-1.00 \times 10^5$ $9.82 \times 10^4$ $2.46 \times 10^4$	$-1.10 \times 10^4$ $-1.73 \times 10^4$ $-1.62 \times 10^4$
<i>3xLaCBM26</i> Sitios independientes 1 sets n=3	--	--	$-5.13 \times 10^3$	$-1.57 \times 10^4$
<i>3xLaCBM26</i> Sitios independientes 1 sets n=RND	--	--	$-6.05 \times 10^3$	$-1.70 \times 10^4$
<i>5xLaCBM26</i> Sitios secuenciales	$-2.53 \times 10^4$ $-1.17 \times 10^4$ $-1.23 \times 10^4$ $3.52 \times 10^4$ $-2.47 \times 10^5$	$4.26 \times 10^4$ $-9.52 \times 10^4$ $6.95 \times 10^6$ $-5.80 \times 10^6$ $-1.07 \times 10^6$	$1.61 \times 10^4$ $-5.83 \times 10^4$ $-6.6 \times 10^3$ $6.11 \times 10^4$ $-5.36 \times 10^4$	$-1.75 \times 10^4$ $-2.53 \times 10^4$ $-1.19 \times 10^4$ $-1.76 \times 10^3$ $-2.58 \times 10^4$
<i>5xLaCBM26</i> Sitios independientes 5 sets n=1	--	--	$1.02 \times 10^3$ $-2.79 \times 10^3$ $9.23 \times 10^4$ $-6.48 \times 10^4$ $-8.22 \times 10^4$	$-2.21 \times 10^4$ $6.03 \times 10^4$ $-8.34 \times 10^4$ $-8.91 \times 10^4$ $-1.00 \times 10^6$
<i>5xLaCBM26</i> Sitios independientes 1 sets n=5	--	--	$-1.68 \times 10^4$	$-3.01 \times 10^4$
<i>5xLaCBM26</i> Sitios independientes 1 sets n=RND	--	--	$5.63 \times 10^6$	$-2.25 \times 10^4$

## Dicroísmo Circular de los Dominios de Unión al Almidón

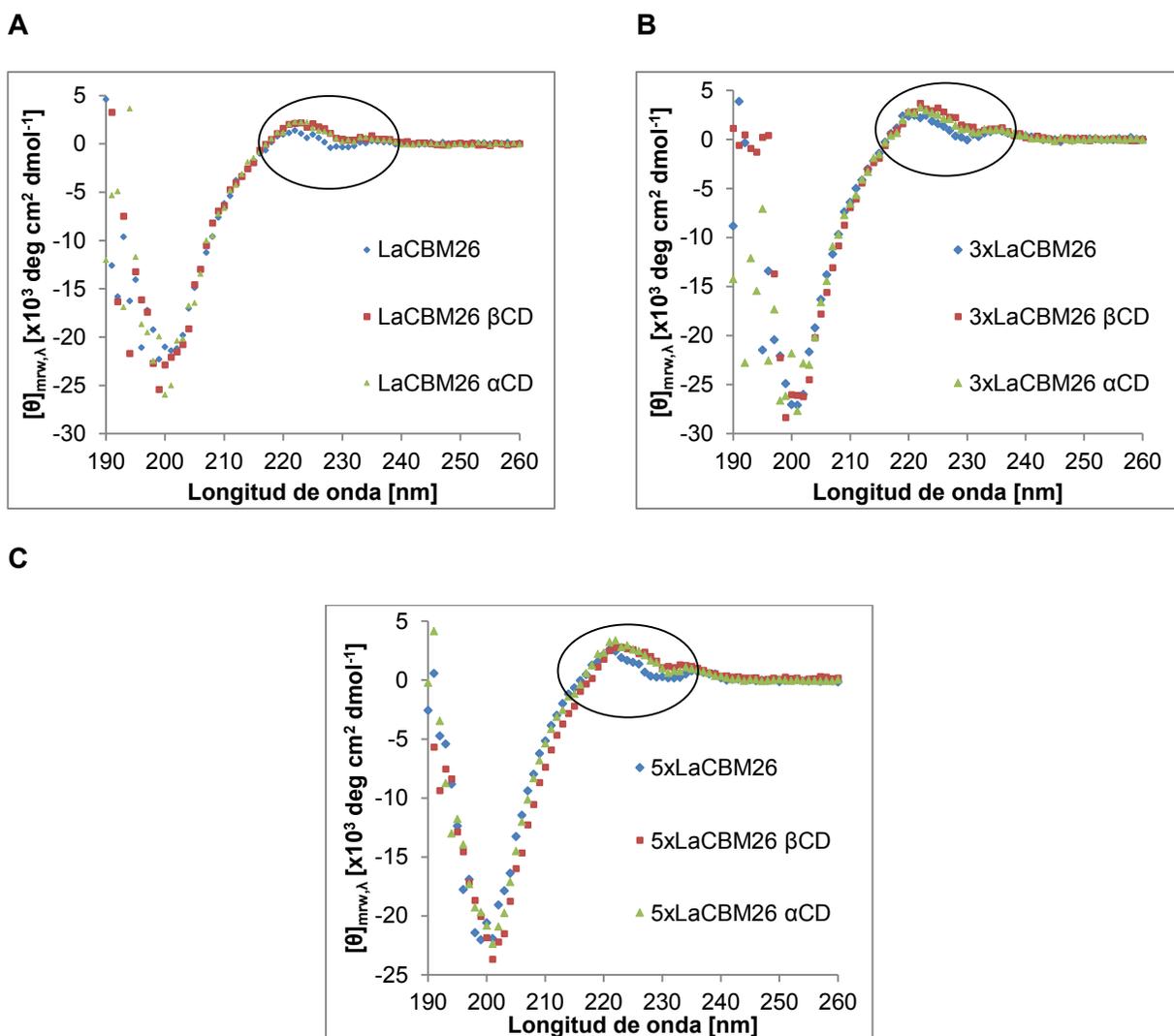


Figura 6.21. Espectros de Dicroísmo Circular en la región del UV lejano sin ligando, con  $\beta$ CD y  $\alpha$ CD de **A.** *LaCBM26*; **B.** *3xLaCBM26*; **C.** *5xLaCBM26*.

Los espectros de dicroísmo circular para los 3 módulos de unión al almidón (Figura 6.20) analizados en la región del UV lejano a concentración de 130.4  $\mu\text{g/mL}$  para *LaCBM26*, 131.4  $\mu\text{g/mL}$  para *3xLaCBM26* y 180.4  $\mu\text{g/mL}$  para *5xLaCBM26*, sin ligando, presentan una banda negativa cercana a los 200 nm, una banda positiva centrada en 220 nm con un hombro alrededor de los 235 nm. Se puede observar que los espectros de *LaCBM26* después de unir  $\beta$ -CD y  $\alpha$ CD sufren un pequeño desplazamiento en la región que comprende de los 220 a los 240 nm.

El cambio que se observa en los espectros obtenidos en este trabajo indica que la unión del ligando con los *LaCBM26* ocasiona un cambio en el ambiente de los

residuos aromáticos inducido por la interacción con los anillos de piranosa del ligando.

El espectro de dicroísmo circular del CBM21 de la glucoamilasa de *Rhizopus oryzae* (RoCBM21) es semejante a los mostrados en el presente trabajo respecto a que presentan una elipticidad positiva alrededor entre los 220 y los 240 nm, no obstante se muestra diferente en la elipticidad negativa el RoCBM21 tiene una elipticidad característica de una conformación de hebras  $\beta$ , mientras que la elipticidad negativa en los espectros mostrados está centrada en longitudes de onda menores que pertenece más a una conformación de giros aleatorios [Jiang *et al.*, 2012]. En la figura 6.22 se muestra que la mutación sobre los residuos aromáticos de la proteína modifica el espectro de dicroísmo del RoCBM21, en la región, que como se mencionó antes, se debe a los residuos de Tyr y Trp.

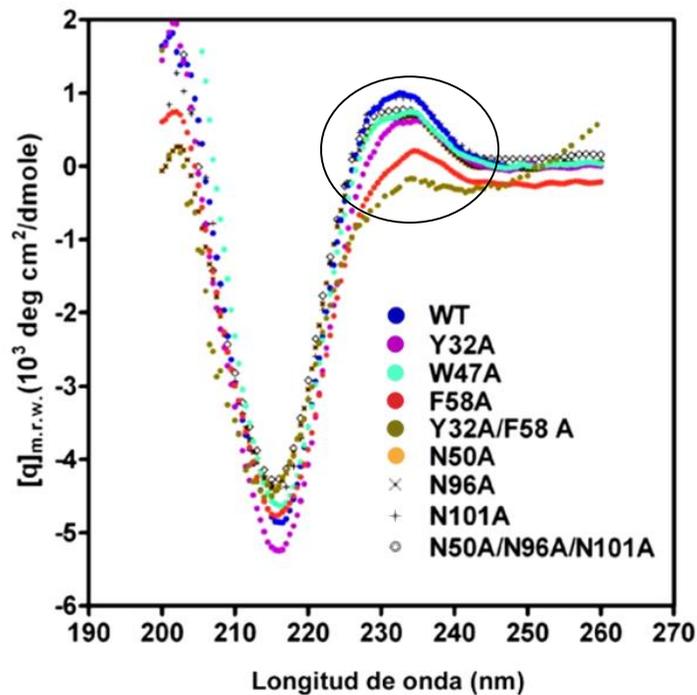


Figura 6.22. Espectro de DC del DFA la WT-glucoamilasa de *Rhizopus oryzae* (azul) y sus mutantes, [Jiang *et al.*, 2012]. Se encuentra señalada la región que se modifica al mutar los residuos.

La estructura resuelta del RoCBM21 por cristalografía de rayos x mostró que está constituido por ocho hebras  $\beta$  antiparalelas forman dos hojas  $\beta$ , formando un barril distorsionado.

## VII. Conclusiones

El acoplamiento molecular sugiere la presencia de otro sitio de unión en *HbCBM18-R5W*, lo que indica que utilizar ligandos con más unidades de N-acetil-glucosamina debería incrementar las constantes de asociación.

La constante de asociación del *HbCBM18-R5W* con N-acetil-quitotriosa es dos y cuatro órdenes de magnitud menor que la constante de la heveína y el *HbCBM18*, respectivamente con el mismo ligando. Lo que indica que la delección de la Met -1 en el *HbCBM18-R5W* afecta la interacción con el ligando.

Los *LaCBM26* presentan más afinidad con  $\beta$ -CD que con  $\alpha$ -CD. Los tándems de 3 y 5 módulos contribuyen en el incremento de la afinidad y modifican la huella termodinámica de la unión, siendo más marcado este efecto en el tándem de 5 módulos.

Los modelos de ajuste probados en las isotermas nos indican que los tándems de 3 y 5 módulos muestran un mecanismo de unión secuencial del ligando. La forma de las isotermas obtenidas nos sugiere que existe un cambio en la proteína durante la unión del ligando el cual puede ser un efecto cooperativo o sinérgico.

Los experimentos de DC realizados en este trabajo con dos tipos de módulos de unión a carbohidratos sugieren que las interacciones proteína-carbohidrato que se establecen son del tipo CH- $\pi$ ,  $\pi$ - $\pi$  principalmente.

Estas interacciones dependen de una combinación de orientación, distancia y exposición al disolvente de los aminoácidos aromáticos que brindan especificidad a cada uno de los módulos.

Los espectros de dicroísmo circular de los *LaCBM26* no corresponden a los espectros de una estructura de  $\beta$ -sandwich, reportadas para módulos similares, sino que se asemejan a los espectros de los dominios de unión a quitina *HbCBM18*.

Los espectros de DC del *LaCBM26* con  $\alpha$ -CD y  $\beta$ -CD muestran un desplazamiento en la banda positiva centrada en 220 nm hacia una longitud de onda mayor,

respecto al espectro sin ligando. Esto indica que la unión del ligando afecta a las interacciones  $\pi$ - $\pi$  entre los residuos aromáticos presentes en el sitio de unión, llevándolas hacia una emisión de menor energía.

## VIII. Perspectivas

Cristalizar y resolver la estructura de los dominios *HbCBM18* y los *LaCBM26*, así como de los complejos proteína-ligando

Realizar los ITC de los *HbCBM18* con N-acetil-quitohexosa y los del *LaCBM26* con maltoheptaosa.

Determinar si existe cooperatividad en los dominios *LaCBM26*

## IX. Referencias

Anslyn EV, Dougherty DA, Modern Physical Organic Chemistry, University Science Books, Sausalito, CA, USA, 2006, pp. 162–168.

Asensio JL, Canada FJ, Bruix M, Rodriguez-Romero A, Jimenez-Barbero J (1995). The interaction of hevein with N-acetylglucosamine-containing oligosaccharides. Solution structure of hevein complexed to chitiobiose. *European Journal of Biochemistry*, 230:621-633.

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

Belitz D, Grosch W (1997). *Química de los alimentos*. Segunda edición. Zaragoza: Acribia. 337-348.

Belshaw N, Williamson G (1993). Specificity of the binding domain of glucoamylase 1. *European Journal of Biochemistry*. 211:717-724.

Boraston A, Bolam D, Gilbert H, Davies G (2004). Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition, *Biochemical Journal*, 15; 382:769–781.

Boraston A, Ghaffari M, Warren RA, Kilburn DG (2002). Identification and glucan-binding properties of a new carbohydrate-binding module family. *Biochemical Journal*, 361:35-40.

Boraston A, Healey M, Klassen J, Ficko-Blean E, Lammerts A, Law V (2006). A structural and functional analysis of  $\alpha$ -glucan recognition by family 25 y 26 carbohydrate-binding modules reveals a conserved mode of starch recognition. *Journal of Biological Chemistry*, 281:587-598.

Boraston AB, Lammerts van Bueren A, Ficko-Blean E, Abbott DW (2007). Carbohydrate–Protein Interactions: Carbohydrate-Binding Modules. Kamerling JP, Boons GJ, Lee YC, Suzuki A, Taniguchi N, Voragen AGJ. *Comprehensive Glycoscience*. Elsevier, 661-689.

Buist G, Steen A, Kok J, P. Kuipers OP (2008). LysM, a widely distributed protein motif for binding to (peptido) glycans. *Molecular Biology*. 68: 838–847.

Burnouf D, Ennifar E, Guedich S, Puffer B, Hoffmann G, Bec G, Disdier F, Baltzinger M, Dumas P (2012). KinITC: A New Method for Obtaining Joint Thermodynamic and Kinetic Data by Isothermal Titration Calorimetry. *Journal of American Chemistry Society*, 134(1), 559-565.

CAZY (Carbohydrate Active enZYmes). Last update: 2016-02-25. Copyright 1998-2012. AFM-CNRS- Universités Aix-Marseille I & II.

Charnock SJ, Bolam D, Nurizzo d, Szabo L, Mckie V, Gilbert H, Davies GJ (2002). Promiscuity in Ligand-Binding Module, CBM29-2, in complex with Cello- and MannoHexaose. *Proceedings of the National Academics of Sciences*, 99:14077.

Creagh AL, Ong E, Jervis E, Kilburn DG, Haynes CA (1996). Binding of the cellulose-binding domain of exoglucanase Cex from *Cellulomonas fimi* to insoluble microcrystalline cellulose is entropically driven. *Proceedings of the National Academics of Sciences*, 93:12229–12234.

Diamond, R (1974). Real-space refinement of the structure of hen egg-white lysozyme. *Journal of molecular biology*, 82:371-391.

Galicia C, Mendoza-Hernández G, Rodríguez-Romero A (2015). Impact of the vulcanization process on the structural characteristics and IgE recognition of two allergens, Hev b 2 and Hev b 6.02, extracted from latex surgical gloves. *Molecular Immunology*. 65:250-258.

García, B (2014). Estudio termodinámico de la interacción carbohidrato-proteína de la  $\alpha$ -amilasa de *Lactobacillus amylovorus*. Tesis de licenciatura no publicada. Universidad Nacional Autónoma de México, Distrito Federal, México.

García-Hernández E, Zubillaga R, Rojo-Domínguez A, Rodríguez-Romero A, Hernández-Arana A (1997). New Insights Into the Molecular Basis of Lectin-Carbohydrate Interactions: A Calorimetric and Structural Study of the Association of Hevein to Oligomers of N-Acetylglucosamine. *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics* 29, 467–477.

Garfin DE (1990). One dimensional gel electrophoresis. *Methods in enzymology*. 182:425-41

Giraud E, Cuny G (1997). Molecular characterization of the  $\alpha$ -amylase genes of *Lactobacillus plantarum* A6 and *Lactobacillus amylovorus* reveals an unusual 3' end structure with direct tandem repeats and suggests a common evolutionary origin. *Gene*, 198:149-157.

Guillén D, Santiago M, Linares L, Pérez R, Morlon J, Sánchez S, Rodríguez-Sanoja R (2007). Alpha-amylase starch binding domains: cooperative effects of binding to starch granules of multiple tandemly arranged domains. *Applied and Environmental Microbiology*, 73:3833–3837.

Hashimoto M, Ikegami T, Seino S, Ohuchi N, Fukada H, Sugiyama J, Shirakawa M, Watanabe T (2000). Expression and characterization of the chitin-binding domain of chitinase A1 from *Bacillus circulans* WL-12. *Journal of Bacteriology*, 182, 3045–3054.

Henrissat, B (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochemical Journal*, 280:309-316.

Hiramatsu S, Fujie M, Usami S, Sakai K, Yamada T (2000). Two catalytic domains of *Chlorella virus* CVK2 chitinase. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 89(3), 252-257.

Ikegami T, Okada T, Hashimoto M, Seino S, Watanabe T, Shirakawa M (2000). Solution structure of the chitin-binding domain of *Bacillus circulans* WL-12 chitinase A1. *The Journal of biological chemistry*. 275(18), 13654-13661.

Jane JL (2009). Starch, ed. BeMiller J, Wistler R, Starch. Chemistry and Technology. Tercera edición. USA: Elsevier, 193-236.

Jeffery GA (1997). *An Introduction to Hydrogen Bonding*, Oxford University Press, Oxford, UK.

Jiang TY, Ci YP, Chow W, Lee YC, Sun YJ, Chou WY, Li KM, Chang MDT (2012). Two Unique Ligand-Binding Clamps of *Rhizopus oryzae* Starch Binding Domain for Helical Structure Disruption of Amylose. *PLoS ONE*, 7:0041131.

Kamitori S, Abe A, Ohtaki A, Kaji A, Tonozukat & Sakano Y (2002) Crystal structures and structural comparison of *Thermoactinomyces vulgaris* R-47 alpha-amylase 1 (TVAI) at 1.6 Å resolution and alpha-amylase 2 (TVAII) at 2.3 Å resolution. *Journal of Molecular Biology* 318:443-453.

Lammerts van Bueren A, Ficko-Blean E, Pluvinage B, Hehemann JH, Higgins MA, Deng L, Ogunniyi AD, Stroehler UH, El Warry N, Burke RD, Czjzek M, Paton JC, Vocadlo DJ, Boraston AB (2011). The conformation and function of a multimodular glycogen-degrading pneumococcal virulence factor. *Structure*, 19:640-651.

Linder M, Salovuori I, Ruohonen L, Teeri TT (1996). Characterization of a double cellulose-binding domain. Synergistic high affinity binding to crystalline cellulose. *J The Journal of Biological Chemistry*. 271(35), 21268-21272.

Liu YN, Lai YT, Chou WI, Chang MDT, Lyu PC (2007). Solution structure of family 21 carbohydrate-binding module from *Rhizopus oryzae* glucoamylase. *Biochemical Journal*, 403:21-30.

Lombard V, Golaconda Ramulu H, Drula E, Coutinho PM, Henrissat B (2014) The Carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Research* 42:D490–D495.

Machovic M, Janecek S (2006). The evolution of putative starch-binding domains. *Federation of European Biochemical Society Letters*, 580(27), 6349-6356.

Martínez Caballero S, Cano-Sánchez P, Díaz-Sánchez AG, Macías-Rubalcava ML, Hermoso JA, Rodríguez-Romero A. (2014). Comparative study of two GH19 chitinase-like proteins from *Hevea brasiliensis*, one exhibiting a novel carbohydrate-binding domain, *Federation of European Biochemical Societies Journal*, 281, 4535–4554.

Mesnager S, Dellarole M, Baxter NJ, Rouget JB, Dimitrov, JD, Wang Ning, Fujimoto Y, Hounslow AM, Lacroix-Desmazes S, Fukase K, Foster SJ, Williamson MP (2014) Molecular basis for bacterial peptidoglycan recognition by LysM Domains. *Nature Communications*. 5:4269.

Mixcoha E, Campos-Teherán J, Piñeiro Á (2014). Surface adsorption and bulk aggregation of cyclodextrins by computational molecular dynamics simulations as a function of temperature:  $\alpha$ -CD vs  $\beta$ -CD. *Journal of Physical Chemistry B*. 118, 6999-7011.

O'Brien R, Ladbury JE, Chowdry BZ (2000). Protein-Ligand interactions: hydrodynamics and calorimetry. Harding SE, Chowdry BZ, Isothermal titration calorimetry of biomolecules. Oxford University Press. 263-286.

Obembe OO, Jacobsen E, Timmers J, Gilbert H, Blake AW, Knox JP, Visser RG, Vincken JP. (2007). Promiscuous, non-catalytic, tandem carbohydrate-binding modules modulate the cell-wall structure and development of transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants. *Journal of Plant Research*. 120(5):605-617.

Raghothama S, Simpson PJ, Szabo L, Nagy T, Gilbert HJ, Williamson MP (2000). Solution Structure of the CBM10 Cellulose Binding Module from *Pseudomonas Xylanase A*. *Biochemistry*. 39:978-984.

Rahman AY, Usharraj AO, Misra BB, Thottathil GP, Jayasekaran K, Feng Y, Hou S, Ong SY, Ng FL, Lee LS, Tan HS, Sakaff MK, Teh BS, Khoo BF, Badai SS, Aziz NA, Yuryev A, Knudsen B, Dionne-Laporte A, Mchunu NP, Yu Q, Langston BJ, Freitas

TA, Young AG, Chen R, Wang L, Najimudin N, Saito JA, Alam M. (2013) Draft genome sequence of the rubber tree *Hevea brasiliensis*. *BioMed Central Genomics*. 14:75.

Reyes-López CA, Hernández-Santoyo A, Pedraza-Escalona M, Mendoza G, Hernández-Arana A, Rodríguez-Romero A. (2004) Insights into a conformational epitope of Hev b 6.02 (hevein). *Biochemical and Biophysical Research communication*. 314:123-130.

Rodríguez- Sanoja R, Morlon-Guyot J, Jore J, Pintado J, Juge N, Guyot JP (2000). Comparative characterization of complete and truncated forms of *Lactobacillus amylovorus*  $\alpha$ -amylase and role of the C-terminal direct repeats in raw starch binding. *Applied and Environmental Microbiology*, 66:3350-3356.

Rodríguez-Romero A, Arreguín B, Hernandez-Arana A. (1989). Unusual far-ultraviolet circular dichroism of wheat germ agglutinin and hevein originated from cystine residues. *Biochimica et Biophysica Acta*. 998: 21-24.

Rodríguez-Romero A, Ravichandran KG, Soriano-García M (1991). Crystal structure of hevein at 2.8 Å resolution. *Federation of European Biochemical Societies*. 291(2):307-309.

Rodríguez-Sanoja R, Oviedo N, Escalante L, Ruiz B, Sánchez S (2009). A single residue mutation abolishes attachment of the CBM26 starch-binding domain from *Lactobacillus amylovorus*  $\alpha$ -amylase. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 36:341–346.

Sigurskjold W, Svensson B, Williamson G, Driguez H (1994). Thermodynamics of ligand binding to the starch-binding domain of glucoamylase from *Aspergillus niger*. *European Journal of Biochemistry*. 225:133-141.

Simpson PJ, Xie H, Bolam DN, Gilbert HJ, Williamson MP (2000). The structural basis for the ligand specificity of family 2 carbohydrate-binding modules. *Journal of Biological Chemistry*. 275(52):41137-41142.

Sorimachi K, Jacks AJ, Le Gal-Coeffet MF, Williamson G, Archer DB & Williamson MP (1996). Solution structure of the granular starch binding domain of glucoamylase from *Aspergillus niger* by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of Molecular Biology*. 259, 970–987.

Steed JW, Turner DR, Wallace K (2007). Supramolecular interactions Core Concepts in Supramolecular Chemistry and Nanochemistry. 17-27.

Tomme P, Creagh AL, Kilburn DG, Haynes CA (1996). Interaction of polysaccharides with the N-terminal cellulose-binding domain of *Cellulomonas fimi* CenC. 1. Binding specificity and calorimetric analysis. *Biochemistry*. 35(44), 13885-13894.

Vaaje-Kolstad G, Houston DR, Riemen AH, Eijsink VG, van Aalten DM (2005). Crystal Structure and Binding Properties of the *Serratia marcescens* Chitin-binding Protein CBP21. *Journal of Biological Chemistry*. 280, 11313–11319.

van Aalten DMF, Synstad B, Brurberg MB, Hough E, Riise BW, Eijsink VGH, Wierenga RK (2000). Structure of a two-domain chitotriosidase from *Serratia marcescens* at 1.9-Å resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97(11): 5842–5847.

Williams MA (2013). Chapter 1 in *Protein–Ligand Interactions: Fundamentals*. Williams MA, Daviter T. *Protein-Ligand Interactions, Methods and Applications*. Humana Press. 3-34.

Wohlkönig A, Huet J, Looze Y, Wintjens R (2010). Structural relationships in the lysozyme superfamily: significant evidence for glycoside hydrolase signature motifs. *PLoS One*. 5:e15388.

Woody R (1994). *Circular Dichroism of peptides and proteins*. Ed Nakanishi K, Berova N, Woody R. *Circular Dichroism Principles and applications*. VCH, 173-196.