

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL
I. P. N.
UNIDAD IRAPUATO
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA GENÉTICA**

**Expresión heteróloga de una quitina sintasa (Chs1)
del hongo Zygomycota *Rhizopus oryzae* y
evaluación de la quitina sintetizada.**

Tesis que presenta
MC. Holjes Salgado Lugo

Para obtener el grado de
Doctor en Ciencias

En la especialidad de
Biología de plantas

Bajo la dirección del Profesor Emérito
Dr. José Ruiz Herrera

Irapuato, Guanajuato

febrero 2017

El presente trabajo titulado “Expresión heteróloga de una quitina sintasa (Chs1) del hongo Zygomycota *Rhizopus oryzae* y evaluación de la quitina sintetizada” se realizó en el Laboratorio de Desarrollo y Diferenciación de Hongos del Departamento de Ingeniería Genética en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Irapuato, bajo la dirección del Profesor Emérito, Dr. José Ruiz Herrera con el soporte de una beca de CONACyT con número 234841.

Agradecimientos

CINVESTAV

Agradezco el apoyo facilitado por CONACyT referente a la beca otorgada con No. #234841, pues sin este apoyo económico, la manutención fuera de mi ciudad natal no hubieran sido posibles.

Mi agradecimiento al CINVESTAV, la institución que me facilito las herramientas y medios para entrenarme y crecer como profesional, y aun más a CINVESTAV Unidad Irapuato, complejo científico que siempre buscan un bien común, el crecimiento de sus estudiantes y su entorno.

Al personal administrativo del CINVESTAV: Dora Anguiano, Mayra, a la Directora Dra. Gabriela Olmedo y el personal del sindicato, pues en un momento de enfermedad, ellos facilitaron acciones en el hospital. A Leticia Chong y Laura Camacho.

Quiero externar un profundo agradecimiento y un enorme respeto que tengo por mi mentor, un guía que nunca me dejo abatirme ante las dificultades personales y profesionales. Una persona con un gran corazón, del mismo tamaño que su conocimiento. Un doctor que además de se profesor emérito, es un personaje con un increíble sentido del humor. Un Investigador ejemplar y ante todo, como una vez escuche decir “un árbol que da mucha sombra”. A mi director de tesis, el Prof. José Ruiz Herrera, mi mayor agradecimiento y mi mas entrañable respeto.

Un respetuoso agradecimiento a los miembros del mi comité tutorial:

A la Dra. Doralinda Asunción Guzmán Ortiz, investigadora que aprecio, respeto y agradezco su apoyo en momentos difíciles, así como en las recomendaciones siempre acertadas para llevar a este proyecto lo mas profesional posible.

Al Dr. Miguel Ángel Gómez Lim, mi agradecimiento profesional y personal durante este entrenamiento en el rumbo de ser un investigador con alto nivel de exigencia. Siempre sus consejos con un alto valor científico y recomendaciones sobre el rumbo de este proyecto de tesis, mis mas sinceras gracias.

Al Dr. Luis Eugenio Gonzales de la Vara, quiero externar un agradecimiento especial, pues para mi es un ejemplo muy claro del investigador analítico y

profesional que me gustaría ser. Gracias por todos los consejos y ayudas en el campo de la bioquímica de proteínas de membrana, mil gracias.

Al Dr. Eduardo Campos Góngora de la Universidad Autónoma de Nuevo León, agradezco su interés y profundo apoyo en el seguimiento de esta tesis así como sus valiosos consejos profesionales. Muchas gracias por el entrenamiento y consideraciones.

Al Dr. Lorenzo Guevara Olvera del Instituto Tecnológico de Celaya, un respetuoso agradecimientos por aceptar pertenecer a mi comité tutorial y sencillamente es un honor tenerlo, pues sé que además de ser un respetado investigador, fue estudiante del Dr. Ruiz Herrera como lo soy yo, y de alguna manera entiende como me siento. Muchas gracias.

También quiero agradecer a la gente profesional y que nos volvimos compañeros y amigos en este trayecto:

A la QFB Claudia G. León, auxiliar de investigación del Laboratorio Desarrollo y Diferenciación de Hongos del Dr. José Ruiz Herrera quien siempre mantenía pendiente de los experimentos que se realizaban, además de siempre mantener el *stock* de reactivos para no parar de trabajar. Un agradecimiento lleno de alegría pues además la considero una amiga entrañable.

A mis compañeros del laboratorio, quien están y los que ya volaron del nido: la Dra. Lucila Ortiz y San Juana (Doña Juana), al Dr. Alejandro Sánchez A., al Dr. Domingo Martínez, a la Dra. Cintia Valentina S., Biol. Mayela, al MC Jonh, al MC Orlando.

A los compañeros de laboratorios donde fui adoptado: Alejandra, Lina María del Mar, Yardená, Rafa, Víctor, Laura, Chava, Dianita, Humberto, Anni, Mayte, Damaris, Crystabel, Eliana, Marco, Itzel, Priscila, Maru, Cesar, Guillermo (paisano), Paco, Luis Miguel, Ana Sarahí

A mis compañeros de Generación que empezamos desde 2009 y los que empezamos en 2011: Ivette, Javier, Gabriela, Edgardo, Julio, Eli, Rosario, Toño, Ana Lilia, Hugo, Sheyla, Alicia.

Agradecimientos

FAMILIA & AMIGOS

Quizá el mas importante, pero también el mas difícil de expresar. Una eterna gratitud a una mujer. Un increíble ser humano. El mas grande ejemplo a imitar. La mujer que me dejo crecer dentro de ella para luego abrazarme, y si por ambos fuera, a la persona que jamás hubiera querido dejar de abrazar. A mi madre, que estaría orgullosa de verme continuar y formarme en lo que me gusta. A una madre, amiga, maestra de vida, una mujer que siempre apoyó todo lo que buscaba proponerme. Gracias Holda Alicia Lugo Angón, mi madre. Es un honor ser tu hijo.

Al respecto, al hombre que me ayuda en todo, que respeta mi opinión, pero él sabe en el fondo que yo respeto mas su consideración sobre las cosas. Un padre que es mas que eso, que todos los días puede ser el mejor escuchando y el único que sabe que estas haciendo las cosas por pasión. A mi papá José Jesús Salgado Cervantes, un amigo, un cuate, un padre y un guía de vida. Es un privilegio ser tu hijo.

A mi hermano, quien además de la conexión existente que hay entre nuestros nombres, hay un increíble ser humano en esa persona. Alguien allá arriba está orgulloso de el. Yo lo estoy, y por ello mi eterno agradecimiento.

A toda mi familia materna y paterna que me educaron, fortalecieron y apoyaron en todo lo que buscaba hacer. Por levantarme en las derrotas y por mostrarme el siguiente escalón durante los éxitos. Por su unidad y sencillez. A todos y cada uno que se apellide Salgado, Lugo, Cervantes, Angón, Martínez, García, Mesa, Burington, a todos.

A Gabriel Jiménez, paisano Acapulqueño que siempre esta ahí en las buenas y que se puede contar con el más en las malas. Muchas Gracias!

A mis amigos de la preparatoria que me apoyaron frente a las locuras: Lisset Velez, Lilibeth Bornios, Marvic Mendoza, José Ángel Bello y Tania Leyva. Gracias.

A mis amigos del Tecnológico: Marisol López, Jorge Ruiz, Roberto Toscano, Cyntia Zabala, Kenia Sánchez. Gracias Bioquímicos.

Agradecimientos

NUEVA FAMILIA

A María del Pilar Valencia Morales. Mi colombianita. Ofrezco mi mayor reconocimiento, mi eterna gratitud y lealtad. Todo su apoyo no se puede resumir en una cuartilla. Todo su respaldo que me ofreció en uno de mis momentos mas débiles, de detrimento y desorientación, Pilar era la persona que permaneció ahí para tomarme la mano, levantarme el mentón y mirarme a los ojos. Despertar después de un día gris, parecen solo el pasado con ella.

A Pilar agradezco también la paciencia que me tiene, pues suelo ser terco y necio. Agradezco su tesitura en mi formación como persona y profesionista, pues ella merece toda mi admiración. Un enorme GRACIAS por sus consejos en todo y cualquier momento, pues es como la vocécita que esta ahí para aconsejar o detenerte.

Pilar, muchas gracias por estar conmigo y gracias por ser mi amiga y esposa. Ser mi compañera de ruta en este tramo tan importante de nuestras vidas, merece toda mi atención y respeto. Gracias por acompañarme también en mis debilidades y mis fortalezas, por compartirme tus éxitos y siempre sabrás que estaré ahí, con mis manos y espalda para apoyarte ante cualquier dificultad.

Y por último, y no por ello la menos importante, a Maya la perra. La cocker spaniel marrón que nos ha acompañado a Pilar y a mí durante la etapa de entrenamiento doctoral... quien también seguro tiene gastritis. Gracias Mayita.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
ÍNDICE DE TABLAS.....	X
ABREVIATURAS.....	XI
RESUMEN	XII
ABSTRACT.....	XIII
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Funciones y composición de la pared celular.....	1
1.2. Quitina sintasas y la biosíntesis de quitina.....	4
1.3. Infecciones fúngicas e inhibidores de la síntesis de quitina.....	6
II. HIPÓTESIS.....	9
III. OBJETIVOS.....	10
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
4.1. Material biológico y medios de cultivo.....	11
4.2. Análisis <i>in silico</i> de la estructura de la Chs candidata.....	11
4.3. Aislamiento de RNA y síntesis de cDNA.....	12
4.4. Clonación del transcrito de la quitina sintasa RO3G_00942 de <i>R. oryzae</i> en plásmidos de expresión.....	12
4.5. Expresión heteróloga del gen RoChs1 en <i>E. coli</i>	13
4.6. Determinación de la actividad enzimática.....	14
4.7. Detección de RoChs1 por medio de Western blot.....	15
4.8. Cromatografía en gel por exclusión molecular.....	16
4.9. IMAC (Cromatografía por afinidad metálica inmovilizante).....	16
4.10. Microscopía de fluorescencia.....	16
4.11. Microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	17
4.12. Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR).....	17
4.14. Microscopía de fuerza atómica (AFM).....	18
V. RESULTADOS.....	19
5.1. Análisis <i>in silico</i> para determinar la Chs candidata a ser clonada y expresada en bacteria.....	19
5.2. Clonación de RoChs1 y construcción de vectores de expresión.....	29
5.3. Expresión heteróloga de RoChs1 en <i>E. coli</i>	31

5.4.	Purificación de RoChs1 Δ TD	35
5.5.	Determinación de la actividad de RoChs1 Δ TD	42
5.6.	Determinación de quitina por transformada de Fourier del espectro infrarrojo acoplado a un atenuador de reflexión total (ATR-FTIR).....	46
5.7.	Patrón de difracción de rayos-X de la quitina sintetizada por la enzima RoChs1 Δ TD.	47
5.8.	Análisis de la quitina sintetizada <i>in vitro</i> por Microscopia de Fuerza Atómica (AFM).....	49
5.9.	Análisis de la quitina sintetizada <i>in vitro</i> por microscopía de fluorescencia (MF).....	49
5.10.	Análisis de la quitina sintetizada <i>in vitro</i> por Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM).....	50
VI.	DISCUSIÓN.....	54
VII.	CONCLUSIONES.....	61
VIII.	PERSPECTIVAS	63
IX.	BIBLIOGRAFÍA.....	64
	ANEXO	75
A.	Representación esquemática del plásmido pColdI:RoChs1DTD.....	75
B.	Artículo Salgado-Lugo <i>et al.</i> 2016.....	76

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Esquema general de la pared celular en dos tipos de hongos.....	2
Fig. 2 Esquema y ecuación de la síntesis de quitina por la enzima quitina sintasa.....	5
Fig. 3 Dendrograma de las secuencias de quitina sintasa del hongo <i>Zigomycota Rhizopus oryzae</i>	21
Fig. 4 Estructura construida in silico para la RoChs.....	27
Fig. 5 Alineamiento de los dominios conservados de la enzima RoChs1.....	30
Fig. 6 Electroforesis en gel desnaturizante (SDS-PAGE) de extractos de células de <i>E. coli</i> transformadas con los plásmidos que poseen los cDNAs de RoChs1.....	32
Fig. 7 SDS-PAGE de extractos de células de tres cepas <i>E. coli</i> transformadas con los plásmidos que poseen los cDNAs de RoChs1.....	33
Figura 8. SDS-PAGE comparativo de extractos de la cepa de <i>E. coli</i> transformada bajo tres diferentes protocolos.....	34
Fig. 9 Análisis por SDS-PAGE de la purificación de RoChs1 Δ TD por IMAC de níquel.....	38
Fig. 10 Secuencia de la RoChs1 donde se señalan los péptidos identificados con el análisis por espectrometría de masas.....	39
Fig. 11 SDS-PAGE del sobrenadante y sedimento de un extracto crudo de <i>E. coli</i> transformado con el vector que expresa la proteína RoChs1 Δ TD.....	40
Fig. 12 Estructura <i>in silico</i> de la proteína RoChs, señalando el epítipo utilizado para obtener anticuerpos.....	41
Fig. 13 Efecto de los iones metálicos sobre la actividad de la enzima RoChs1 Δ TD.....	44
Fig. 14 Demostración que la banda de proteína de 55 kDa es la enzima RoChs1 Δ TD responsable de la actividad enzimática.....	45
Fig. 15 Inferograma de quitina sintetizada por la enzima RoChs1 Δ TD (A) y quitina comercial (B, control positivo).....	46
Fig. 16 Espectro de difracción de Rayos X de la quitina sintetizada in vitro por RoChs1 Δ TD y una muestra de quitina de camarón como control (quitina comercial).....	48
Fig. 17 Imágenes topográficas de obtenidas con un microscopio de fuerza atómica.....	51
Fig. 18 Imágenes de fluorescencia la quitina sintetizada por la enzima RoChs1 Δ TD.....	52
Fig. 19 Microscopia electrónica de transmisión de muestras de quitina sintetizada por la enzima RoChs1 Δ TD.....	53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Organismos utilizados para localizar Chs's en la base de Datos en línea.....	20
Tabla 2. Sitios en línea para la evaluación de residuos hidrofóbicos & Dominios transmembranales.....	22
Tabla 3. Evaluación de dominios transmembranales para Chs clase II de Rhizopus oryzae.....	25
Tabla 4. Ocho firmas conservadas en quitina sintasa (adaptado de Choquer et al., 2004).....	28
Tabla 5. Oligonucleótidos para la amplificación por PCR de los genes RO3G_00942, gen completo (RoChs1) y gen deletado (RoChs1ΔDT).....	31
Tabla 6. Reguladores utilizados para el lisado de células de expresión con proteína inducida.....	36
Tabla 7. Soluciones utilizadas para renaturalizar la fase purificada de RoChs1ΔTD utilizando el método IMAC con níquel.....	37
Tabla 8. Actividad de RoChs1ΔTD y control (plásmido vacío).....	43
Tabla 9. Propiedades generales de la enzima quitina sintasa del hongo Rhizopus oryzae (RoChs1ΔTD).....	44
Tabla 10. Bandas características por ATR-FTIR de quitina.....	47

ABREVIATURAS

aa	aminoácidos
mM	milimolar
M	Molar
µg	microgramos
mg	miligramos
gr	gramos
nm	nanómetros
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>g</i>	fuerza centrífuga
kDa	Kilo Dalton
v/v	volumen/volumen
h	hora(s)
Nm ⁻¹	Newton/metro
DT	dominio transmembranal
IPTG	isopropil-β-tiogalactopiranosido
P.M.	peso molecular
Chs	quitina sintasa
rpm	revoluciones por minuto
O.D.	densidad óptica
G.T.	glicosiltransferasa
RNA	ácido ribonucleico
DNA	ácido desoxirribonucleico
°C	grados Celsius
seg	segundos
Ci	Curio
UV	ultra violeta
µL	microlitros
mL	mililitros
kv	kilovoltios
mA	miliampers
rpm	revoluciones por minuto

RESUMEN

Las quitina sintasas (Chs) son enzimas de gran importancia en la naturaleza debido a que sintetizan los componentes estructurales de especies de diferentes reinos eucariota, incluyendo al de los hongos. Desafortunadamente, su estructura y el mecanismo molecular de la síntesis de su producto microfibrilar siguen siendo en gran medida, desconocidos. Probablemente, esto se debe a que hasta el momento no se han purificado quitina sintasas fúngicas activas, posiblemente debido a su extrema hidrofobicidad. En este estudio, hemos recurrido a la expresión heteróloga de una quitina sintasa de tamaño pequeño del hongo Zygomycota *Rhizopus oryzae* (RO3G_00942, Chs1) en *Escherichia coli*, que aunque se acumulaba principalmente en cuerpos de inclusión, altas concentraciones de arginina o urea permitieron su solubilización. Sin embargo, durante la dilución de la enzima, así solubilizada, ocurrió su desnaturalización y precipitación. Pese a ello, el uso de urea permitió la purificación de pequeñas cantidades de la enzima. Las propiedades cinéticas de la enzima RoChs1 (Km del sustrato, temperatura y pH óptimos efecto de *N*-acetilglucosamina (GlcNAc)) fueron anormales comparadas con las determinadas en preparaciones crudas de enzimas Chs de diferentes hongos, probablemente debido a que carece de las regiones transmembranales, zonas hidrofóbicas que son características de las quitina sintasas. La proteína RoChs1 es capaz de sintetizar quitina *in vitro*, producto que en contraste con quitina sintetizada por preparaciones de quitosomas, ocurría sólo parcialmente en forma de microfibrillas cortas de baja cristalinidad. Este trabajo es el primero que describe una Chs activa expresada de manera heteróloga, y en el que se ha podido medir la actividad de una sola Chs, ya que en trabajos anteriores se han empleado mezclas crudas de varias enzimas o quitosomas. Este enfoque puede conducir a futuros trabajos en el afán de obtener quitina sintasas activas que permitan la comprensión de su mecanismo de actividad molecular, y el proceso de síntesis de microfibrillas de quitina.

ABSTRACT

Chitin synthases are highly important enzymes in nature, where they synthesize structural components in species of different eukaryotic kingdoms, including the kingdom Fungi. Unfortunately, their structure and the molecular mechanism of synthesis of their microfibrillar product remain largely unknown, probably because no fungal active chitin synthases have been isolated, possibly due to their extreme hydrophobicity. In this study we have turned to the heterologous expression of the transcript from a small chitin synthase of *Rhizopus oryzae* (RO3G_00942, Chs1) in *Escherichia coli*. The enzyme was active, but accumulated mostly in inclusion bodies. High concentrations of arginine or urea solubilized the enzyme, but their dilution led to its denaturation and precipitation. Nevertheless, use of urea permitted the purification of small amounts of the enzyme. The properties of Chs1 (Km, optimum temperature and pH, effect of GlcNAc) were abnormal different to others previously reported, probably because it RoChs1 lacks the hydrophobic transmembrane regions characteristic of chitin synthases. The product of the enzyme showed that, contrasting with chitin made by membrane-bound Chs's and chitosomes, was only partially in the form of short microfibrils of low crystallinity.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Funciones y composición de la pared celular

Un gran número de organismos como las plantas, los hongos y los procariontes, poseen una estructura externa llamada pared celular que los protege de los cambios en el medio ambiente. Dicha estructura se localiza fuera de la membrana celular y además de brindarles resistencia, soporte y plasticidad, les confiere su forma, y también permite que la célula pueda interactuar con su entorno (Ruiz-Herrera, 2012).

En el caso de los hongos, la pared celular provee funciones de protección y de interacción con superficies sólidas, incluyendo a otros organismos que pueden ser sus huéspedes. En primer lugar, al proveer funciones de protección pues actúa como una barrera en contacto con el ambiente donde se desarrollan los hongos. Si la pared celular se remueve o debilita, el hongo muere, debido a que la membrana plasmática es incapaz de resistir los cambios en la presión osmótica existentes entre la célula y el medio ambiente. Por otro lado, la interacción con superficies sólidas es debido a que puede poseer moléculas hidrolíticas como también tóxicas, y éstas pueden estar siendo involucradas por el hongo en la invasión de diversos nichos ecológicos, incluyendo sus huéspedes, en el caso de hongos patógenos (Latge, 2007). En las levaduras, la cubierta externa es una estructura rígida que mide cerca de 100-200nm de espesor y constituye alrededor del 25% del total de la masa seca de la célula (Rast *et al.*, 2003).

La pared celular está compuesta de cuatro clases de macromoléculas: proteínas altamente glicosiladas (“manoproteínas”), dos tipos de β -glucanas y quitina (**Fig. 1**). La composición de la pared celular está sujeta a considerables variaciones de acuerdo a las condiciones del medio externo, o de los estadios de desarrollo, alteraciones que pueden ser altamente controladas en el espacio y el tiempo (Erwig y Gow, 2016).

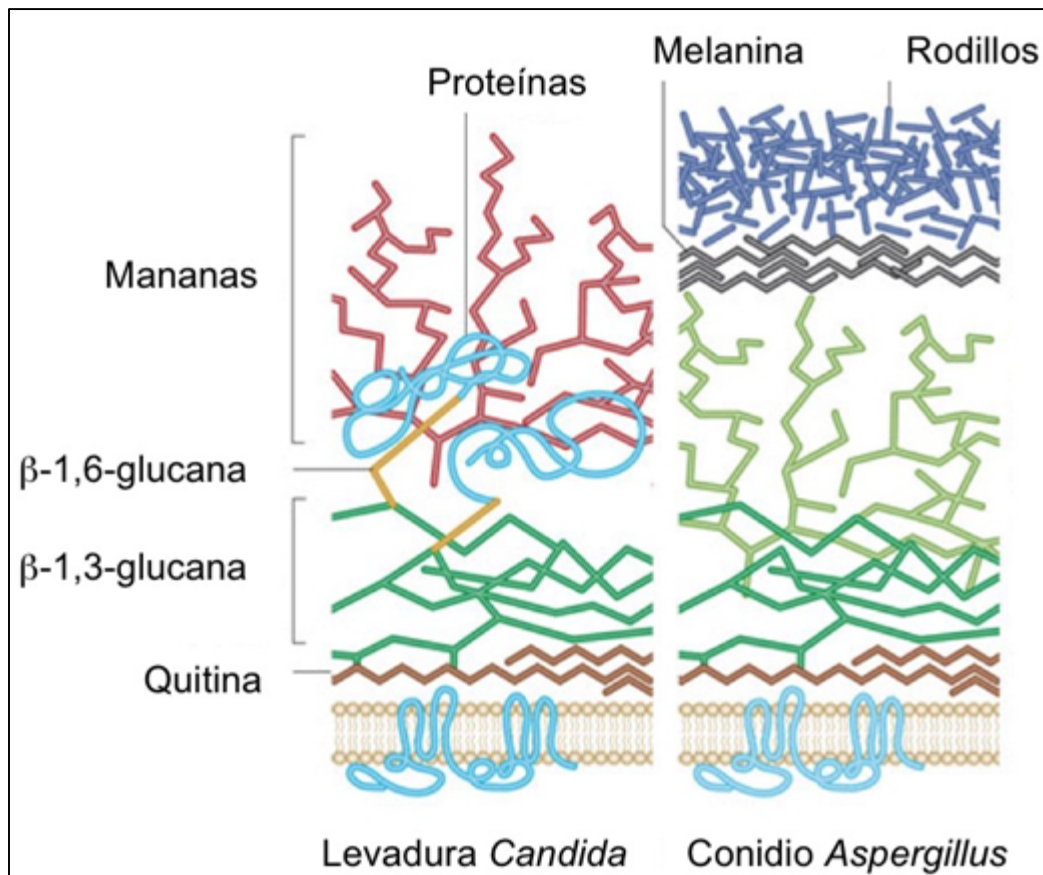


Fig. 1 Esquema general de la pared celular en dos tipos de hongos

La pared celular de hongos (levadura o micelio) está generalmente compuesta de cuatro clases de macromoléculas: glicoproteínas altamente glicosiladas (“manoproteínas”), dos tipos de β -glucanas y quitina. (figura modificada de Erwig y Gow, 2016).

La estructura y biogénesis de la pared celular de hongos es única, e involucra un número de procesos celulares que a menudo resultan ser excelentes blancos para el desarrollo de drogas antifúngicas. Estos procesos han sido caracterizados a nivel molecular, por medio del análisis de la función de muchos genes y proteínas.

La riqueza de la información genética involucrada en la biogénesis de la pared celular debe ser una salvaguarda para la protección de la célula, de modo que la falla de algún proceso puede ser compensada por la activación de otro mecanismo que restaure la barrera para su estabilidad.

Por medio de tratamiento con enzimas líticas en presencia de un estabilizante osmótico, la pared celular de los hongos puede removerse sin perjudicar la viabilidad, aunque sí otras funciones de la célula. Estas células “desnudas” son llamadas protoplastos, los cuales pueden regenerar la pared celular, y este proceso ha sido usado para estudiar los mecanismos involucrados en su biosíntesis.

En 1811, Henry Braconnot aisló por primera vez de un hongo (*Agaricus volvaceus*) un polisacárido que llamó fungina, y que conocemos actualmente como quitina (Braconnot, 1811). A mediados del siglo XX, se aislaron por primera vez paredes celulares de hongos que mostraron poseer este polisacárido altamente resistente, así como una composición compleja formada por diversos polisacáridos no-nitrogenados, además de lípidos, proteínas y sustancias inorgánicas (ejemplos de estos estudios, se pueden ver en Horikoshi and lida, 1964; Ruiz-Herrera, 1967; véase una revisión global en Ruiz-Herrera, 1992). Estos componentes pueden entrecruzarse por medio de uniones covalentes dentro de la matriz de la pared celular (Ruiz-Herrera, 2012, 1992) para constituir una estructura coherente.

De manera interesante, cabe señalarse, que la quitina, que constituye el componente estructural más importante en la pared celular de los hongos, se ha determinado posteriormente que está ampliamente distribuida en otros grupos de organismos eucariotas. Es así que desde que Odir (1823) la identificó en los élitros de los escarabajos, se ha demostrado su existencia en Protistas (Mulisch, 1993), incluyendo quistes de amoeba (Arroyo-Begovich y Ruiz-Herrera, 1979; Campos-Gongora *et al.*, 2004), algunas algas tales como cromofitos y diatomeas (Blackwell *et al.*, 1967; Round *et al.*, 1990; Smucker y Dawson, 1986); prymnesiophytes (Chretiennot-Dinet *et al.*, 1997), algunos Cromistas (Stramenopiles) (Dietrich, 1975), e incluso en Cordados (Tang *et al.*, 2015; Wagner *et al.*, 1993).

1.2. Quitina sintasas y la biosíntesis de quitina

Glaser y Brown (1957), describieron por primera vez la síntesis de quitina *in vitro* usando extractos crudos de *Neurospora crassa*, y las propiedades de la enzima involucrada en el proceso (quitina sintetasa, llamada ahora quitina sintasa, aunque ambas denominaciones son comunes) (Glaser and Brown, 1957). Posteriormente un gran número de estudios ha sido descrito en la literatura sobre las propiedades de estas enzimas, aunque en todos ellos se emplearon extractos crudos que contenían un número variable de enzimas. Dentro de estos estudios se puede citar que Ruiz-Herrera y Bartnicki-García (1974) demostraron la síntesis de microfibrillas de quitina *in vitro* por una forma “soluble” de quitina sintasa del hongo *Mucor rouxii*. Esta forma de la enzima estaba dentro de microvesículas especializadas en el transporte de la quitina sintasa hacia la membrana plasmática, denominadas quitosomas (Ruiz-Herrera and Bartnicki-Garcia, 1974). Cabe señalar que posteriormente se demostró que *M. rouxii* posee más de 20 quitina sintasas (Flores-Martinez *et al.*, 1990; Lending *et al.*, 1991), por lo que el número de quitina sintasas presente en los quitosomas debe ser grande.

Algunos de los componentes de la pared celular de los hongos son polimerizados en el exterior de la célula, mientras que otros son sintetizados intracelularmente y transportados al exterior por una vía secretora que se inicia en el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi, la cual forma un sistema de vesículas, microvesículas, microtúbulos y microfilamentos de actina, localizado en el ápice de hifas conocido como corpúsculo apical o Spitzenkörper, en el caso de hongos filamentosos (Martín-Udíroz *et al.*, 2004a; Riquelme, 2013; Riquelme y Sánchez-León, 2014; Ruiz-Herrera y Martínez-Espinoza, 1999).

Como ya se señaló, la síntesis de quitina es llevada a cabo por enzimas conocidas como quitina sintasas (Chs) que se localizan intracelularmente dentro de vesículas especializadas conocidas como quitosomas (Bracker *et al.*, 1976; Ruiz-Herrera y Bartnicki-Garcia, 1974). Las Chs no han podido ser purificadas aún, sin embargo, mediante el uso de extractos crudos de membranas y quitosomas, que

poseen mezclas de diferentes Chs, se ha podido estudiar la síntesis de quitina *in vitro* (Ruiz-Herrera, 2012). Se ha demostrado que las Chs son enzimas alostéricas que se activan por *N*-acetilglucosamina que se une a su sitio alostérico. Utilizan como sustrato la uridina-difosfato *N*-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc), mediante una reacción de transglucosilación (**Fig. 2**) la GlcNAc se une a una cadena creciente de quitina. Esta reacción requiere como cofactor un metal divalente que usualmente es el Mg^{++} (Horsch *et al.*, 1996). Las Chs se han clasificado en dos divisiones y cinco clases, aunque algunos autores manejan siete clases. De acuerdo a su clasificación, la División 1 comprende las Chs de tipo I, II y III, mientras que en la División 2 se

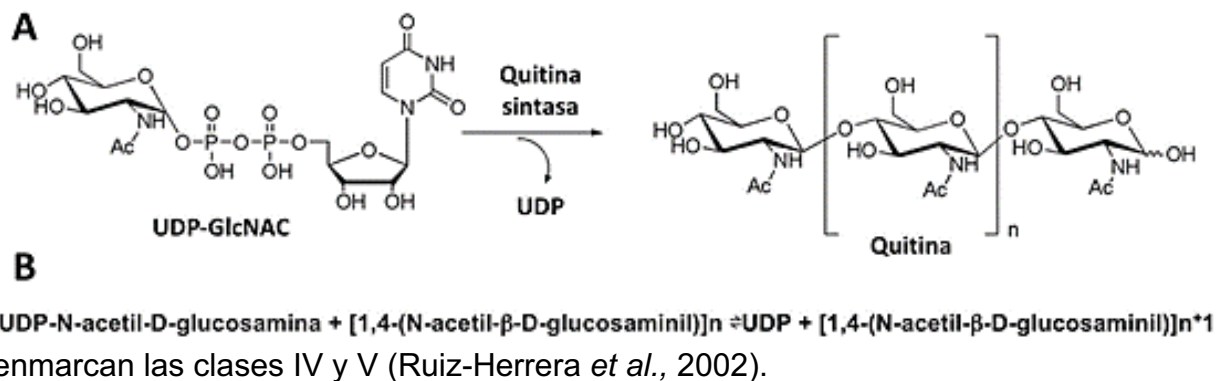


Fig. 2 Esquema y ecuación de la síntesis de quitina por la enzima quitina sintasa

A, Esquema de la síntesis de quitina por la enzima quitina sintasa que añade a partir del azúcar donador (UDP-GlcNAc) unidades de GlcNAc al extremo no-reductor de la cadena de quitina en crecimiento. B, ecuación de la síntesis de quitina. (Figura modificada de Wattenberg *et al.*, 2010).

Los genes que codifican Chs se conocen como *CHS*, y se sabe que los hongos poseen más de una clase de estos genes (Ruiz-Herrera y Ortiz-Castellanos, 2010). Esto podría explicarse como un mecanismo de protección de la célula a la pérdida de una quitina sintasa, o como enzimas con una regulación, localización o función distintas. *Saccharomyces cerevisiae* tiene en su genoma tres genes *CHS*. La disrupción de los primeros genes conocidos como *CHS1* y *CHS2* no causó grandes

alteraciones fenotípicas (Bulawa, 1992; Bulawa *et al.*, 1986; Bulawa y Osmond, 1990). Por el contrario, la mutante en el tercer gen, *CHS3*, mostró una reducción notable en el contenido de quitina (Valdivieso *et al.*, 1991). La función de cada uno de los productos que codifican estos genes ha sido sugerida con escasas bases en este organismo. Así, se ha señalado que *Chs1* está involucrada en la reparación después de la gemación, *Chs2* participa en la formación del septo y *Chs3* sintetiza la mayoría de la quitina; el anillo de quitina del septo que separa la célula madre y la célula hija durante la gemación y la quitina para la síntesis de quitosana en las ascosporas (Cabib y Arroyo, 2013; Shaw *et al.*, 1991; Silverman *et al.*, 1988; Valdivieso *et al.*, 1991).

1.3. Infecciones fúngicas e inhibidores de la síntesis de quitina

Las infecciones fúngicas han llegado a ser recientemente un tema de alarma junto con la alta tasa de morbilidad y mortalidad en pacientes que han sido aquejados por estas infecciones (micosis) al recibir trasplantes de órganos, quimioterapia antineoplásica, o que sufren de síndrome de inmunodeficiencia humana (HIV, por sus siglas en inglés) (Pfaller and Diekema, 2007). Muchas de estas infecciones son causadas por patógenos oportunistas como *Candida*, *Cryptococcus* y *Aspergillus* (Seyedmousavi *et al.*, 2015). En este sentido cabe señalar que existen escasos antifúngicos seguros y efectivos. Algunos de los más comunes usados en la terapia clínica incluyen a triazoles (por ej. fluconazol, voriconazol, itraconazol y pisaconazol), polienos (por ej. anfotericina B, nistatina), inhibidores de síntesis de glucanas (por. ej. equinocandinas, caspofungina, micofungina, anidulafungina), inhibidores de la síntesis de quitina (por ej. nikomicina, polioxinas) y flucitosina, pero cada uno de ellos tiene limitantes (Kathiravan *et al.*, 2012; Perlin, 2007; Verweij *et al.*, 2009; Louise A. Walker *et al.*, 2010).

Además, como existe un incremento emergente de cepas resistentes a varias de estas drogas y surgen nuevos patógenos (Scheffler *et al.*, 2013), hay una continua

demanda hacia el descubrimiento de novedosos agentes antifúngicos para tratar enfermedades infecciosas causadas por hongos.

En hongos, las células están protegidas por una pared celular, como antes se mencionó, que posee mayormente dos tipos de polisacáridos estructurales, los cuales no existen en los humanos, por lo que son blancos específicos contra las micosis: β -1,3-glucanas y quitina. La biosíntesis de estos polisacáridos es llevada a cabo por dos glicosiltransferasas, 1,3- β -glucana sintasa y quitina sintasa respectivamente (Munro, 2013). Las nuevas clases de drogas antifúngicas que inhiben la síntesis de 1,3- β -glucanas de la pared celular fúngica son equinocandinas (por ej. caspofungina, micofungina, y anidulafungina) (Cappelletty y Eiselstein-McKitrick, 2007; Denning, 2003). Estas equinocandinas son caracterizadas por su efectiva y relativa seguridad en las terapias, sin embargo, existe preocupación al respecto por la aparición de mutantes resistentes. En algunos estudios, donde se utilizaron equinocandinas, se observó un reforzamiento en la ruta de síntesis de quitina, y con ello alteraciones en la eficacia de las drogas, pues la pared celular contenía cantidades adicionales de quitina (Lenardon *et al.*, 2010; Walker *et al.*, 2010; Wiederhold, 2007). Este es un proceso de compensación o salvamento. Por ello la quitina sintasa se vuelve el blanco ideal para el desarrollo de agentes antifúngicos, y en algunos casos, los inhibidores ya existentes para quitina sintasa son el complemento cuando son usados con equinocandinas.

En la naturaleza existe una gran cantidad de antibióticos de tipo nucleósidos que han mostrado tener una actividad contra una variedad de microbios. Entre ellos, polioxinas y nikomicina, las cuales fueron descritas por primera vez como inhibidores competitivos de las quitina sintasas *in vitro*, mostrando actividad antifúngica, insecticida y acaricida (Liu y Balasubramanian, 2001). A pesar de su favorable actividad *in vitro*, estos inhibidores no han sido aceptados como antifúngicos alternativos, pues no son transportados fácilmente a través de la membrana celular, y tampoco alcanzan concentraciones efectivas en el suero. Sin embargo, estructuras análogas a estos antibióticos podrían ser utilizadas para diseñar y desarrollar

inhibidores más potentes de la quitina sintasa (Liu y Balasubramanian, 2001; Ruiz-Herrera y San-Blas, 2003).

Perfeccionar las propiedades farmacocinéticas de las polioxinas y la nikomicina implica la síntesis de derivados que contengan modificaciones en diferentes sitios de la estructura (por ej. cambios estructurales en una parte del péptido, modificaciones a la posición C-5' del nucleósido, o modificación de una base). Estos análogos pueden ser compuestos que poseen mayor actividad inhibitoria comparable que la de la nikomicina. Varias derivados de uridina fueron sintetizados y probados contra quitina sintasa. Compuestos con mejor eficacia fueron 1,2,3-triaolin unido a derivados de uridina (Behr, 2011). Otros inhibidores fuertes incluyen análogos de la nikomicina Z (nikkomycin Z), que fueron sintetizados por condensación de aldehído de uridina con varios ácidos carboxílicos e isocianuros en enfoques combinatorios de síntesis, o síntesis por inducción de grupos aromáticos al aminoácido terminal a partir de polioxina C (Liao *et al.*, 2009; Merzendorfer, 2013). Sin embargo estos estudios son aún preliminares y requieren mucho trabajo a futuro.

II. HIPÓTESIS

Existen en la actualidad metodologías que permiten el estudio de proteínas recombinantes que pertenecen a un ambiente hidrofóbico, como es el caso de las proteínas transmembranales. Las quitina sintasas (Chs) de los hongos son proteínas transmembranales que no han podido ser aisladas por sus características hidrofóbicas, lo que ha impedido su estudio a nivel molecular. Por ello se ha propuesto buscar en la literatura la descripción de una Chs con menores características hidrofóbicas, para intentar expresarla en forma de una proteína recombinante activa en *Escherichia coli* y proceder a su purificación parcial para determinar sus propiedades y las características fisicoquímicas de su producto, la quitina. Ello permitirá obtener un acercamiento al conocimiento molecular de las quitina sintasas,

III. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Obtener en un sistema de expresión heteróloga (*E. coli*) la síntesis de una proteína quitina sintasa recombinante y evaluar su capacidad de síntesis de quitina, y determinar la naturaleza del producto sintetizado.

3.2. Objetivos Específicos

- Seleccionar a partir del análisis de la literatura una quitina sintasa (Chs), con un bajo nivel de hidrofobicidad, cuyo gen codificante sea expresada *in vivo*.
- Elaborar una estrategia basada en su expresión heteróloga en *E. coli* para obtener la enzima recombinante.
- Aislar la quitina sintasa recombinante mediante diferentes estrategias de purificación.
- Evaluar las características bioquímicas y cinéticas de la quitina sintasa recombinante
- Obtener producto de la síntesis (quitina), y determinar sus características fisicoquímicas

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Material biológico y medios de cultivo

La cepa de *Rhizopus oryzae* 2672 utilizada para la obtención del gen RO3G_00942 fue adquirida del centro de Colección Española de cultivos Tipo (CECT). Ésta fue mantenida y propagada en medio sólido YPD, el cual contiene peptona al 2% (Difco), extracto de levadura al 1% (Difco), glucosa al 2% (Sigma) y agar bacteriológico al 2% (Difco). Para obtener el micelio, se recuperaron 5×10^{-5} esporas por mL en agua destilada estéril, se inocularon en medio YPD líquido y se incubaron por 24 h en condiciones de agitación (180 rpm). El micelio fue colectado por centrifugación y lavado dos veces con agua destilada estéril.

La cepa de *Escherichia coli* BL21 (DE3) (Hussain y Ward 2003), así como las cepas modificadas para la expresión de genes fueron mantenidas en medio sólido Luria-Bertani (LB) que contiene NaCl 1%, extracto de levadura 5%, peptona de caseína 1% (Difco), agar bacteriológico 2%, suplementado con 100 µg por ml de ampicilina y 34 µg por ml de cloranfenicol]. Las células fueron crecidas a 37 °C hasta que alcanzaron una densidad óptica (OD 600 nm) de 0.6 (entre 12 y 16 h).

4.2. Análisis *in silico* de la estructura de la Chs candidata

Para obtener estructuras tridimensionales confiables, se empleó el programa en línea llamado Phyre² (Protein Homology/analogy Recognition Engine v 2.0, por sus siglas en Inglés, Kelley *et al.* 2015). Este nos permite construir de manera automática estructuras tridimensionales con extensión “pdb”, y que se pueden utilizar y trabajar en “software” libres como PyMol (The PyMOL Molecular Graphics System, Versión 1.2r3pre, Schrödinger, LLC) y UCSF Chimera (Pettersen *et al.*, 2004). Como antes se mencionó, Phyre² implementa cuatro estadios al momento de construir los modelos : 1, alineamiento de secuencias; 2, búsqueda en librerías estructurales; 3, modelado y 4, remplazo. Para estos fines, es decir, la obtención de una estructura 3D de la

quitina sintasa *in silico*, fue una tarea laboriosa, pues a la fecha no se conocen estructuras para esta clase de proteínas, pero si para las glicosiltransferasa tipo 2, GT-2 y β -GT (Vrieling *et al.* 1994; Tarbouriech *et al.* 2001; Ciocchini *et al.* 2002; Gurien *et al.* 2007; Vetting *et al.* 2008; Sheng *et al.* 2009; Sethaphong *et al.* 2013), estructuras templado utilizadas en Phyre² pues son de la familia a la que pertenece la quitina sintasa.

4.3. Aislamiento de RNA y síntesis de cDNA

Para el aislamiento de RNA se utilizó micelio de la cepa de *Rhizopus oryzae* 2672 previamente congelado en nitrógeno líquido y almacenado a -80 °C. Las muestras de micelio congelado fueron maceradas en un mortero con pistilo con nitrógeno líquido y el RNA fue extraído usando el reactivo TRIzol siguiendo las recomendaciones del fabricante (USB Biochemical, Affymetrix). Posteriormente, la síntesis de cDNA de primera cadena se realizó usando oligonucleótido dT₍₂₀₎ y la enzima transcriptasa reversa Superscript II (Invitrogen).

4.4. Clonación del transcrito de la quitina sintasa RO3G_00942 de *R. oryzae* en plásmidos de expresión.

Dado que el gen seleccionado RO3G_00942 contiene dos intrones, se sintetizó y clonó su correspondiente cDNA para su expresión en *E. coli* en lugar del gen completo. Para la amplificación del transcrito del gen RO3G_00942 (de aquí en adelante nombrado *CHS1*) se usaron tres oligonucleótidos: el sentido (CSF1, 5'-CTCGAGATGTCTGAAGAATCAGGAAGC-3', el sitio *Xho*I está subrayado), el antisentido 1 (CSR1, 5'-TCTAGATTAAGTACAAAGGAAGGATGAG-3) y el antisentido 2 (CSR2, 5'-TCTAGATTATTCAATCAACAGCAAGAACG-3', el sitio *Xba*I está subrayado).

Los oligonucleótidos CSF1 y CSR1 se usaron para sintetizar el transcrito completo, mientras que CSF1 y CSR2 fueron utilizados para sintetizar un transcrito

incompleto. Dicha versión, carece del dominio transmembranal ubicado al 3' del gen, en donde se removió el fragmento que codifica los 30 aminoácidos más hidrofóbicos, pero se preservaron los motivos importantes de las quitina sintasas (Ruiz-Herrera *et al.* 2002).

La mezcla de PCR (50 μ L) contenía el cDNA de *R. oryzae*, oligonucleótidos 0.25 μ M, dNTP 200 μ M y 1.25 U de Taq DNA Polymerase Platinum de alta fidelidad (Invitrogen). Las condiciones de reacción en el termociclador fueron 30 ciclos a 94 °C por 30s, 57 °C por 30s y 68 °C por 90s. Los fragmentos de DNA amplificados de 1.5 kb fueron clonados en el vector de clonación TOPO (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los vectores TOPO que contenían los fragmentos de DNA fueron digeridos con *Xho*I y *Xba*I y posteriormente purificados en geles de electroforesis de agarosa.

Para la construcción de los vectores de expresión, se usó el plásmido pCold I el cual contiene un residuo de seis histidinas hacia el amino terminal (Takara Bio, Kyoto, Japón). Tanto los fragmentos de DNA purificados así como el pCold I fueron mezclados y ligados con la Ligasa T4 (Sigma) para generar así los vectores de expresión pCold-chs942 (transcrito completo que codifica un péptido de 530 aa) y el pCold-chs942TD (transcrito truncado que codifica un péptido de 500 aa).

4.5. Expresión heteróloga del gen RoChs1 en *E. coli*

Células competentes *E. coli* BL21 Star (DE3) pRARE (Hussain y Ward, 2003) se transformaron con los vectores de expresión pCold-chs942 ó pCold-chs942TD. Los cultivos fueron establecidos en medio LB a una temperatura de 37 °C hasta que alcanzaron una DO 600 nm de 0.6. Posteriormente, fueron transferidos a un baño de hielo por 30 min, se adicionó IPTG (isopropil- β -D tiogalactopiranosido) 1 mM y se continuó la incubación por 16 h a 18 °C. Las células fueron cosechadas por centrifugación y almacenadas a -80 °C hasta su uso. En algunos casos se requirió resuspender las células de *E. coli* en una solución de lisis (Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 50 mM de pH 6.5, 0.05%) con diferentes adiciones y PMSF 1 mM.

Las células fueron fragmentadas mecánicamente por vibración ultrasónica usando una secuencia de pulsos de 10 seg y fueron centrifugadas a 750 g por 30 min. Los extractos celulares fueron resuspendidos en dodecil sulfato de sodio (SDS) caliente y sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE, Leammli 1970) al 12 %. La tinción se realizó con azul de Coomassie. La banda correspondiente a la quitina sintasa se identificó por su movilidad correspondiente a una proteína de 55 kDa.

4.6. Determinación de la actividad enzimática

De manera habitual se usó el método de filtración descrito por Ruiz-Herrera y Bartnicki-García (1976). La mezcla de incubación normal usada contenía lo siguiente: extracto enzimático, UDP-[¹⁴C]GlcNAc 0.4 mM (0.2 Ci mol⁻¹ GlcNAc 20 mM, MgCl₂ 1 mM, Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 50 mM pH 6.5 en un volumen final de 0.05 mL. Después de 30 o 60 min de incubación, se detuvo la reacción al adicionar ya fuese 20 µL de ácido acético glacial o 50 µL de NaOH 2 N. Las muestras fueron filtradas a través de discos de fibra de vidrio de un diámetro de 2.5 cm (Whatman GF/C) y subsecuentemente fueron lavadas con 50 mL de una mezcla de ácido acético 1 M y etanol al 95%. Los discos fueron secados a 70 °C al menos por 1 h y se midió su radioactividad en un contador de centelleo. La actividad fue expresada como nmoles de GlcNAc incorporada en quitina por h. La actividad específica fue calculada por mg de proteína. En algunos experimentos, al final de la incubación enzimática, las muestras fueron hidrolizadas con quitinasa (Sigma, 1 U por ml en regulador de Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 50 mM pH 6.0 a 25 °C por 2 h) y se filtraron en discos de fibra de vidrio como anteriormente se mencionó o fueron sometidas a cromatografía en papel ascendente en tiras de papel Whatman No. 3 usando como solvente etanol/ácido acético glacial 7:3 v/v. Los cromatogramas (10 cm de longitud) fueron cortados en fragmentos de 1 cm y su radioactividad fue medida como se mencionó antes.

Para determinar la actividad enzimática de la quitina sintasa separada por electroforesis en gel de poliacrilamida (12 %) en condición desnaturalizante (SDS-

PAGE) o nativa (PAGE), los geles se incubaron con una mezcla de sustrato no radioactivo usando el doble de las concentraciones ya mencionadas. El gel fue lavado con una solución de fosfato de sodio 50 mM de pH 5.6 toda la noche, se incubó con 0.1% de Calcofluor por 3 h en la oscuridad, y finalmente después de un lavado con agua destilada toda la noche, se observó bajo una fuente de UV y se tomaron fotografías.

Para sintetizar quitina no radioactiva con muestras enzimáticas, y así evaluar sus características fisicoquímicas y morfológicas, las condiciones de incubación se modificaron ligeramente. Usamos el doble de las concentraciones de sustrato no radioactivo y GlcNAc, pero la misma concentración de $MgCl_2$, y la incubación se llevó a cabo toda la noche a 28°C. La reacción fue detenida como ya se describió y el producto de ésta fue colectado por centrifugación a 12,000 rpm en tubos Eppendorf. Posteriormente se hicieron dos lavados con NaOH 2N, seguidos de tres lavados con etanol al 20% y agua. Por último, las muestras se secaron a 65 °C por 1 h y se resuspendieron en 10-15 μ L de agua. Este producto se caracterizó por medio de IFTR (transformación de Fourier de espectroscopía de infrarojo), XRD (Difracción de rayos X), TEM (Microscopía electrónica de transmisión) y AFM (Microscopía de fuerza atómica).

4.7. Detección de RoChs1 por medio de Western blot

Se sintetizó un péptido con la secuencia GKLVRTDTESYLDAPKTQ, la cual se encuentra en la zona externa de Chs1, el cual fue usado como antígeno para obtener anticuerpos en conejos (GeneScript, USA). Las muestras que fueron analizadas fueron sometidas a electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida y posteriormente se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa y se detectaron como lo describen Harlow y Lane (1988) con el anticuerpo descrito anteriormente. El anticuerpo secundario fue anti-conejo de cabra acoplado a peroxidasa de rábano (Invitrogen). El sustrato usado para realizar el revelado de la RoChs1 Δ TD fue una solución de Lumi-Light Western Blotting Substrate (Roche).

4.8. Cromatografía en gel por exclusión molecular

Se usó una columna de de Bio-Gel P-100 de Bio-Rad de 45 cm x 1 cm. Las muestras enzimáticas de 0.5 mL obtenidas del sobrenadante del extracto de la cepa de *E. coli* que expresaba la Chs1 (RoChs1 Δ TD), fueron aplicadas y eluidas con la solución de lisis empleada. A continuación, se recuperaron alícuotas de 0.5 mL de las respectivas fracciones en donde se analizó la presencia de la proteína recombinante por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida y por Western blot.

4.9. IMAC (Cromatografía por afinidad metálica inmovilizante)

Se utilizó una columna de Sepharose HiTrap IMAC FF (GE Healthcare Life Sciences) equilibrada con una solución de lisis que contenía 0.05 % de LMNG (2,2-didecilpropano-1,3-bis- β -D-maltopiranosido, lauril maltosa neopentil glicol; Chan *et al.*, 2010) y urea 8 M. Después de adicionar 5 mL del sobrenadante del extracto celular, se realizó un lavado con 5 volúmenes de la misma solución de lisis. La Chs1 fue eluida con 10 mL de soluciones de lisis que contenían cada una 20 mM, 40 mM o 500 mM de imidazol. Las muestras eluidas fueron dializadas contra soluciones de lisis carentes de imidazol que contenían sucesivamente urea 6M, 4M, 2M o solución libre de urea. Finalmente se determinó en cada fracción la actividad enzimática y el patrón electroforético (SDS-PAGE) de las proteínas eluidas.

4.10. Microscopía de fluorescencia

Los análisis de microscopía de fluorescencia fueron realizados con muestras de quitina previamente suspendidas en 10 μ L de agua destilada y teñidas con calcofluor 0.02%, seguido de 2 lavados con agua destilada estéril y decantados por centrifugación. Posteriormente se fijaron y observaron en un microscopio de fluorescencia Olympus BX50 (Japan). Se utilizaron filtros de excitación de 350/400 nm y de emisión de 400-421 nm. Las imágenes fueron tomadas con una cámara

Infinity3 de alta sensibilidad (Lumenera). Para la observación de la autofluorescencia de la quitina, las muestras fueron observadas en un microscopio confocal con laser de barrido (LSM 800; Carl Zeiss, Oberkochen). Se usó un filtro 2-methylbenzaxozole (MBenz) en un rango de excitación de una longitud de onda de 300 nm y emisión de 490 nm.

4.11. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

La quitina no radioactiva sintetizada fue colocada en una rejilla para microscopía electrónica de 300 mallas cubierta con Formvar con un revestimiento de carbono (Electron Microscopy Science, USA) y se sometió a tinción negativa con ácido fosfotúngstico al 2% a un pH 5.5 durante 1 min. Después de retirar el exceso de líquido en las rejillas con un papel filtro, se realizaron tres lavados con agua destilada estéril y se dejaron secar al aire. Una vez secadas las muestras, éstas fueron observadas en un microscopio electrónico Morgagni M-268, Phillips/FEI (Netherlands).

4.12. Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR)

La FTIR fue llevada a cabo usando un FTIR Cary 660 Agilent con refulgencia total atenuada (ATR, PIKE Diamond MIRacle) bajo los siguientes parámetros: resolución espectral: 2 cm^{-1} ; escaneo: 64 scans; espectro 4000–500 cm^{-1} ; apertura: 4 cm^{-1} ; usando un testigo de sulfato de triglicina dopado de L-alanina deuterada; frecuencia del espejo: 5 kHz. El programa para la recopilación y análisis de datos fue Agilent Resolutions Pro versión 5.2.

4.13. Difracción de rayos X

Cada muestra fue secada y puesta sobre placas de cristal y analizadas en un difractómetro PANalytical XPERT-PRO (XRD, Netherlands) operado a 45 kv, 20 mA,

entre $2\theta = 4^\circ$ y $2\theta = 100^\circ$. Los difractogramas fueron medidos por el método de reflexión con filtrado de $\text{CuK}\alpha$ como fuente de radiación.

4.14. Microscopía de fuerza atómica (AFM)

Se obtuvieron imágenes topográficas de las superficies de las muestras con un AFM (Veeco Digital Instruments) en el modo de "tapping". Se utilizó un tamaño de exploración de $3\ \mu\text{m}$ para dar una ampliación de aproximadamente 51.600x. Las imágenes obtenidas con el sensor ("cantiliver") para grabar con punta de silicona de una longitud de $125\ \mu\text{m}$, un ancho de $30\text{-}40\ \mu\text{m}$, una altura de la punta de $10\text{-}15\ \mu\text{m}$, a una fuerza constante de $20\text{-}100\ \text{Nm}^{-1}$ y una frecuencia de resonancia de $200\text{-}400\ \text{Hz}$. El software SPMLab de la compañía Veeco (USA) se utilizó para recopilar los datos topográficos.

V. RESULTADOS

5.1. Análisis *in silico* para determinar la Chs candidata a ser clonada y expresada en bacteria

Se practicó una búsqueda de genes que codifican quitina sintasas de diferentes organismos con genomas conocidos hasta la fecha (**Tabla 1**) en la base de datos del NCBI y los resultados fueron evaluados con diferentes programas en línea. Los primeros estudios que se realizaron a cada secuencia primaria de proteínas Chs versaron en las características de secuencia secundaria y los dominios transmembranales simultáneamente. Con ello se pudo establecer la viabilidad de la expresión, pues fue importante reconocer las zonas hidrofílicas/hidrofóbicas en la secuencia primaria de las proteínas analizadas. De aproximadamente 60 genes de diferentes organismos del reino de los hongos, solo uno cumplió con los requisitos para ser evaluado experimentalmente, el cual fue la Chs del hongo *Rhizopus oryzae* con número de identificación RO3G_00942. En términos generales, *Rhizopus oryzae* contiene 24 genes que codifican quitina sintasas (**Fig. 3**) y entre ellas, la diversidad en extensión y cantidad de los dominios transmembranales es muy clara.

El dendrograma (**Fig. 3**) construido a partir de las 24 secuencias de quitina sintasa existentes en *R. oryzae* nos permitió conocer su clasificación, así como establecer comparaciones entre ellas. Las evidencias sugieren que los dominios transmembranales no favorecen la solubilidad de la quitina sintasa, y que aunque estos dominios pueden ser indispensables para la completa funcionalidad de la enzima, es decir de su actividad como se menciona por Magellan *et al.* (2010), aquellas proteínas que los contengan en exceso probablemente no serían expresados adecuadamente en *E. coli*.

Tabla 1. Organismos utilizados para localizar Chs's en la base de Datos en línea.

Hongo	Número de secuencias Chs	Grupo taxonómico	Referencia
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3	Ascomycota	Bulawa Y Osmond, 1990
<i>Cryptococcus neoformans</i>	8	Ascomycota	Banks <i>et al.</i> , 2005
<i>Aspergillus fumigatus</i>	7	Ascomycota	Choquer <i>et al.</i> , 2004; Mellado <i>et al.</i> , 2003
<i>Neurospora crassa</i>	7	Ascomycota	Fajardo-Somera <i>et al.</i> , 2015
<i>Botrytis cinerea</i>	8	Ascomycota	Morcx <i>et al.</i> , 2013
<i>Fusarium oxysporum</i>	8-12	Ascomycota	Martín-Udíroz <i>et al.</i> , 2004b
<i>Yarrowia lipolytica</i>	7	Ascomycota	Sheng <i>et al.</i> , 2013
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	2	Ascomycota	Matsuo <i>et al.</i> , 2004
<i>Candida albicans</i>	4	Ascomycota	Munro Y Gow, 2001
<i>Candida glabrata</i>	4	Ascomycota	Ueno <i>et al.</i> , 2011
<i>Aspergillus nidulans</i>	8	Ascomycota	Choquer <i>et al.</i> , 2004; Specht <i>et al.</i> , 1996
<i>Ustilago maydis</i>	8	Basidiomycota	Xoconostle-Cazares <i>et al.</i> , 1996
<i>Saprolegnia parasitica</i>	2	Oomycete	Mort-Bontemps <i>et al.</i> , 1997
<i>Rhizopus oryzae</i>	24	Zygomycota	Ma <i>et al.</i> , 2009

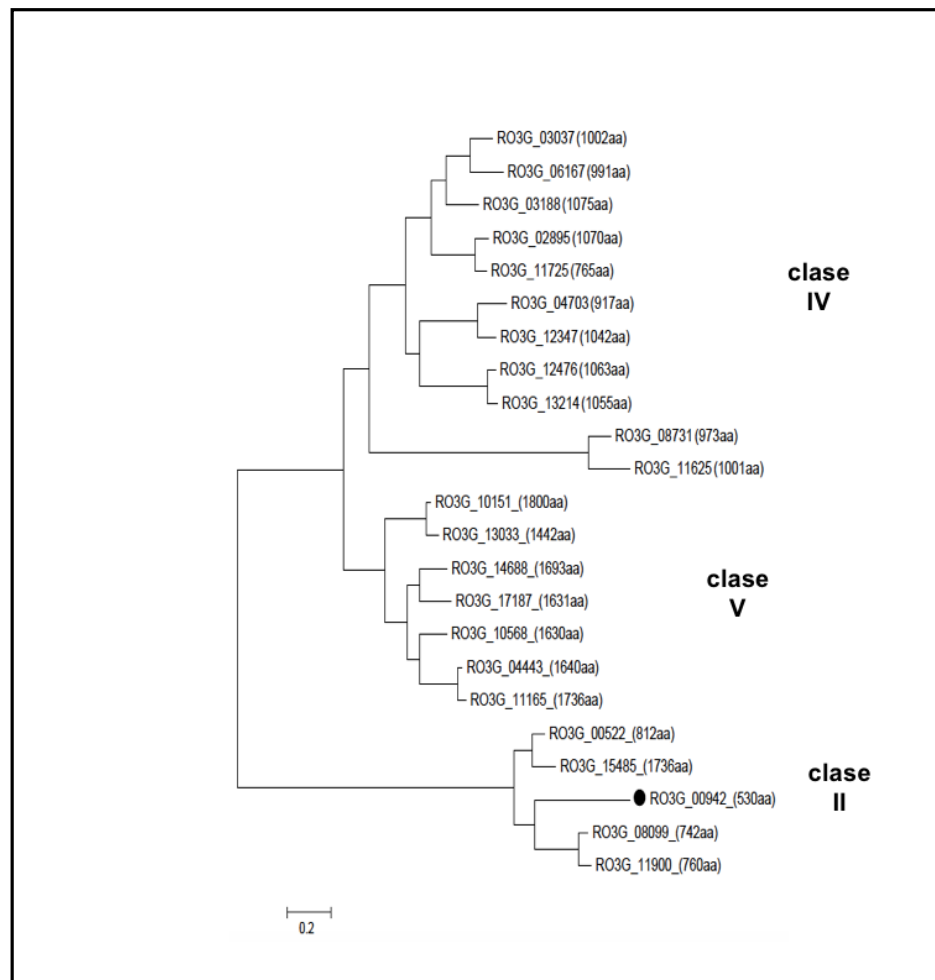


Fig. 3 Dendrograma de las secuencias de quitina sintasa del hongo *Zigomycota Rhizopus oryzae*

Se muestra la organización de las quitina sintasas (24 secuencias) clasificadas en tres grupos: Clase II de la División 1, y Clases IV y V de la División 2. Dendrograma construido por el método de *Neighbor joining* y un *bootstrap* de 1000 repeticiones.

En la **Tabla 2** se muestran los programas en línea utilizados para determinar los dominios transmembranales, así como la estructura secundaria de las proteínas. Por ejemplo, podemos observar que de la División 1 de *Rhizopus oryzae* solo posee Chs Clase II, pues los hongos *Zygomycota* solo contienen Chs de la División 1, y no presentan ninguna Chs de las Clases I y III.

Tabla 2. Sitios en línea para la evaluación de residuos hidrofóbicos & Dominios transmembranales

Sitio en línea	Referencia
TMHMM Server v. 2.0 http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/	Center for Biological Sequence Analysis, The Technical University of Denmark
DAS http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/	Stockholm University, Sweden
Phobius http://phobius.binf.ku.dk	L. Käll <i>et al.</i> , 2004. J. Mol. Biol. 338: 1027-1036
MINNOUS http://minnou.cchmc.org	Cao <i>et al.</i> , 2006. Bioinformatics 22: 303-309
TMDDET http://tmdet.enzim.hu/?go=form	P.W. Hildebrand <i>et al.</i> , 2009. Nucl. Acids Res. 37
PROTTER http://wlab.ethz.ch/protter/start/	U. Omasits <i>et al.</i> , 2014. Bioinformatics. 30:884-886

Esas enzimas de la Clase II de *R. oryzae* son 5: RO3G_00522 (812 aa), RO3G_15485 (1736 aa), RO3G_00942 (530 aa), RO3G_08099 (742 aa) y RO3G_11900 (760 aa).

Es notorio que las características de una excelente candidata para ser una proteína recombinante eran las de la quitina sintasa con numero ID RO3G_00942 con 530 aminoácidos, pues solo contiene 1 dominio transmembranal (DT, de ahora en adelante) muy pequeño hacia el carboxilo terminal, de las también quitina sintasas de la clase II del hongo, éstas poseen un número mayor de DT's de mayor tamaño: RO3G_00522, con 7 DT, RO3G_15485, con 8 DT, RO3G_08099 y RO3G_11900 con 5 DT cada una. Adicionalmente la RO3G_00942, en lo sucesivo RoChs1, es una quitina sintasa, si no la más pequeña de *Rhizopus oryzae*, sí una de las más pequeñas en todo el Reino de los hongos, pero que conserva todos los motivos característicos de las quitina sintasas. RoChs1 contiene una secuencia, como se mencionó anteriormente, hacia el carboxilo terminal con altas probabilidades de ser un dominio transmembranal, que va desde el aminoácido 502 al 526 (LLLIEGIYNVISLIFSWFSVVIVLS), secuencia que forma una α -hélice, que según un análisis *in silico* es de inclusión membranal, resultado que se ampliara más adelante, y probablemente está anclada a la membrana plasmática de la célula (**Tabla 3**).

Además, nos pareció interesante evaluar, desde el punto de vista estructural, la reconstrucción *in silico* de muchas de las secuencias candidatas a clonar para obtener la proteína recombinante. Lo anterior para sustentar la evaluación de los dominios transmembranales que se analizaron mediante el programa "DAS", facilitado en línea y elaborado en la Universidad de Estocolmo, Suecia (**Tabla 2**).

Como se muestra en la **Fig. 4**, la estructura construida *in silico* de RoChs1 se obtuvo utilizando como plantados principalmente tres proteínas que ya se encontraban en la base de datos del Banco de Datos de Proteínas (PDB, por sus siglas en inglés) de estructuras tridimensionales de proteínas.

La primera estructura plantado que el sitio en línea Phyre² emplea es la subunidad A de la celulosa sintasa (4HG6.pdb) de *Rhodobacter sphaeroides*

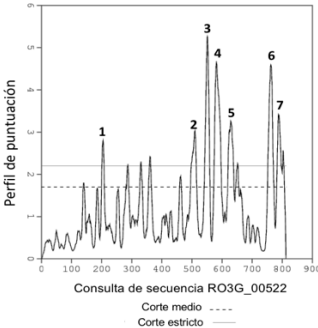
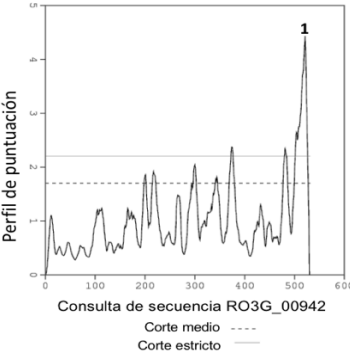
(Morgan et al., 2013), con una confianza del 99.9% de reconstrucción y un 19% de identidad con RoChs1.

Lo que quiere decir que a pesar de que la celulosa sintasa, siendo una glicosiltransferasa y no una *N*-acetilglucosaminiltransferasa, a nivel de secuencia primaria es 19% idéntica, inclusive son altas las probabilidades de que este plegado sea el que forme la quitina sintasa (RoChs1). Las dos segundas enzimas con las que se construyó la estructura son UDP- galactofuranosiltransferasa (4FIY.pdb) de *Mycobacterium tuberculosis* (Wheatley et al., 2012), y la polipéptido *N*-acetilglucosaminiltransferasa (1XHB) de *Mus musculus* (Fritz et al., 2004), ambas con un 98.2 de confianza y con un 15-18% de identidad de secuencia. Por último, la polipeptido *N*-acetilgalactosaminiltransferase (2FFU.pdb) de *Homo sapiens* (Fritz et al., 2006) con una confianza de 98 y un 19% de identidad.

La proteína RoChs1 contiene todos los motivos importantes característicos de las quitina sintasa en hongos (Ruiz-Herrera et al. 2002). En la **Tabla 4** se muestran los residuos conservados en las quitina sintasa de la División 1.

RoChs1 contiene 6 dominios conservados en identidad de aminoácidos de los 8 aquí descritos, incluso aquellos que RoChs1 no contiene, "TMYNE" y "SWGTK", aun son descritos como con función desconocida. Los sitios firma más representativos entre las quitina sintasas son "QXXEY", "LAEDRXL" y "QRRRW" (Ruiz-Herrera et al., 2002), y ellos se encuentran totalmente conservados en RoChs1. En la **Fig. 5** se muestra la ubicación de los motivos conservados a lo largo de la secuencia primaria de la proteína RoChs1.

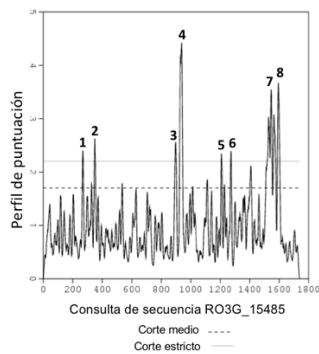
Tabla 3. Evaluación de dominios transmembranales para Chs clase II de *Rhizopus oryzae*.

ID	Aminoácidos	Diagrama de hidrofobicidad	Numero de dominios transmembranales			
			inicio	final	longitud	Corte estricto
RO3G_00522	812		201	207	7	2.2
			498	514	17	2.2
			543	558	16	2.2
			574	596	23	2.2
			621	638	18	2.2
			753	770	18	2.2
			783	796	14	2.2
RO3G_00942	530		502	526	25	2.2

RESULTADOS

RO3G_15485

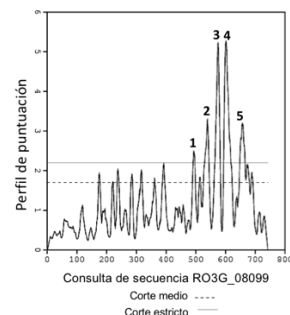
1736



266	270	5	2.2
347	353	7	2.2
894	901	8	2.2
924	945	22	2.2
1207	1210	4	2.2
1518	1551	34	2.2
1560	1576	17	2.2
1589	1603	15	2.2

RO3G_08099

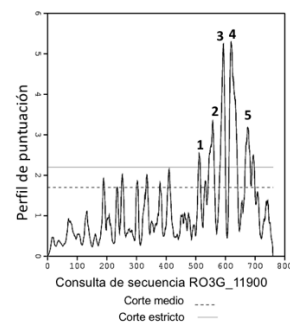
742



491	496	6	2.2
530	544	15	2.2
564	582	19	2.2
594	618	25	2.2
648	665	18	2.2

RO3G_11900

760



544	562	19	2.2
582	599	18	2.2
612	639	28	2.2
666	683	18	2.2
690	697	8	2.2

Características de los dominios transmembranales para las Chs clase II de *Rhizopus oryzae*. El Hongo *R. oryzae* contiene 5 genes que codifican para quitinas sintasa de la clase II, que prácticamente parecen funcionales, según lo demuestra la presencia de transcrito por RT-PCR (Ma *et al.*, 2009)

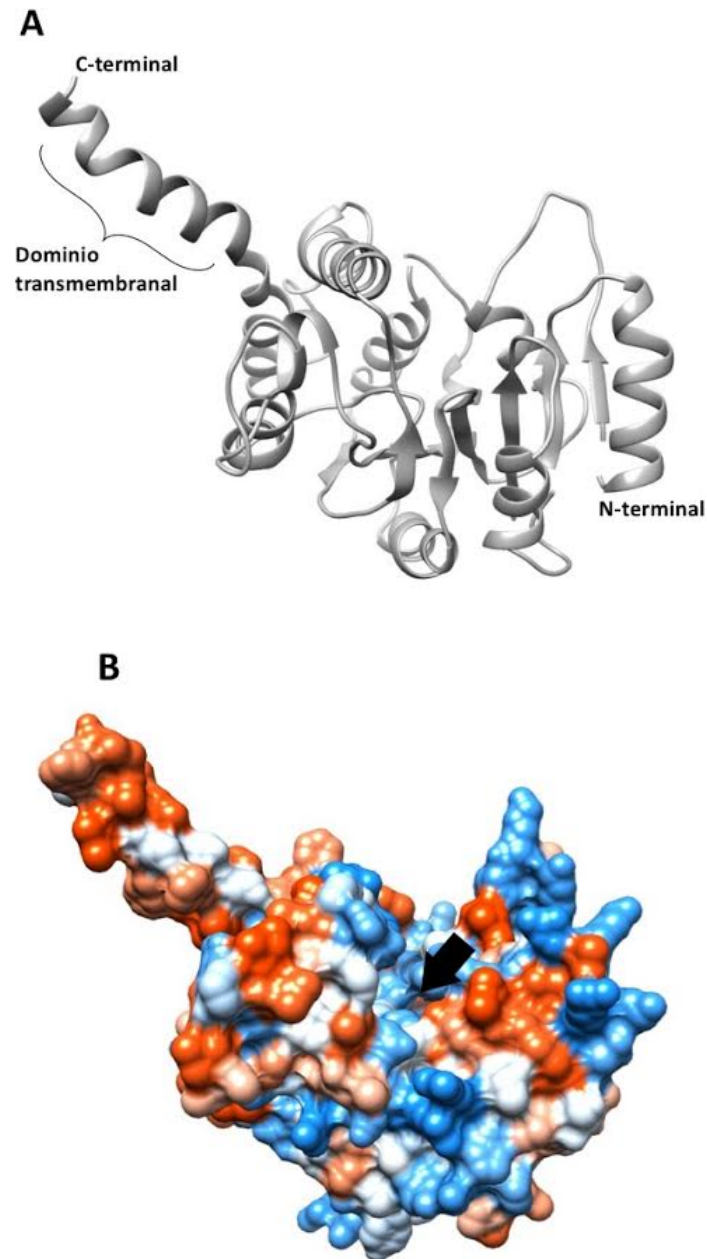


Fig. 4 Estructura construida in silico para la RoChs

A, esquema de la estructura mostrando el “bucle” del dominio transmembranal; B, estructura con la superficie electrostática de acuerdo con los residuos expuestos y en contacto con el solvente. Marcado con una flecha negra se muestra el “bolsillo” catalítico sugerido de acuerdo a la estructura de la proteína.

Tabla 4. Ocho firmas conservadas en quitina sintasa (adaptado de Choquer *et al.*, 2004).

Los motivos de la “a” la “h” tienen una posición central en las quitina sintasa y generalmente están rodeando a los dominios transmembranales, pues se especula que antes de llegar a la pared celular, la síntesis ocurre previo a atravesar la membrana, canal formado por los dominios transmembranales.

Motivo	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>b'</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>e</i>	<i>f</i>	<i>g</i>	<i>h</i>
Función supuesta	Unión de sustrato				desconocida	Unión a quitina	Núcleo catalítico	Unión a quitina	desconocido
División 1	TMYNE	DG	KINSH	DVGT	QNFY	LPG	LAEDRIL	QRRRW	SWGTK
RoChs1	NA	DG	KINSH	DVGT	QNFY	LPG	LAEDRIL	QRRRW	NA
Ubicación	NA	191	278	302	351	375	425	467	NA

5.2. Clonación de RoChs1 y construcción de vectores de expresión

Considerando el gran número de secuencias de quitina sintasa (Chs's) presentes en los hongos Zygomycota, como se describió anteriormente, seleccionamos la secuencia RO3G_00942 (RoChs1) la cual contenía todos los aspectos positivos para expresarla en un sistema de expresión heterólogo, ya que era una enzima pequeña, y cuya estructura primaria demostraba en su mayoría una constitución hidrofílica, excepto el carboxilo terminal (**Tabla 3**). El gen que la codifica está constituido por 1789 pares de bases, y en él se localizan dos intrones: uno en la región 480-560, y un segundo del nucleótido 809 al 875.

Mediante la extracción de RNA por el método de TRIzol se sintetizó el cDNA usando los oligonucleótidos dt20 y la enzima Superscript II (Invitrogen) y clonamos los correspondientes cDNAs, en lugar del gen completo, en *Escherichia coli*. Se diseñaron dos estrategias para llegar a obtener dos escenarios de expresión, esto por la presencia de la zona hidrofóbica identificada hacia el carboxilo terminal. Esta zona nos obligó a diseñar un oligonucleótido extra para deletar la zona que expresa los últimos 30 aminoácidos hacia el carboxilo terminal. Tres oligonucleótidos fueron entonces diseñados (**Tabla 5**) para amplificar el cDNA, una forma completa, y la otra que carecía del C-terminal. Estos se ligaron a un vector de expresión especial para obtener un mejor plegado de proteínas de origen eucariótico y que además permitía la inducción del gen a baja temperatura, llamado pCold I. Los oligonucleótidos CSF1 y CSR1 fueron utilizados para sintetizar el transcrito completo, mientras que nuevamente el CSF1 y además el CSR2 se utilizaron para sintetizar una versión incompleta del transcrito (ver metodología) que carece del dominio transmembranal localizado hacia el 3' terminal del gen, fueron removidos lo cual dio lugar a que fueran eliminados de la proteína codificada 30 aminoácidos altamente hidrofóbicos, mientras se preservaron los motivos importantes de las quitina sintasas (Ruiz-Herrera et al., 2002).

```

RoChs1      MSEESGSFGGWFSSWFNTSKDQESSNLIQQQPPTNYARNQOTLSSLRS
-----

RoChs1      QKQQAESSKEDTRNSPGKLVRTDTESYLDAPKTQQANNRNVTRRLPLTN
-----

RoChs1     >NNLVIDCPIPDRLLGALNCTERDEFSQLRYTAATCEPDDFELEGYTLRPK
-----

RoChs1      IYNRETELFIEDEILFTRTMHGVMKNIAHLCSLKNSVWGPDGWKKVVVC
motivo b    -----DG-----
                                     **

RoChs1      IVADGRKVVNKRVLNVLASMGIIYQAGIAKNIVDNKPKAHYIYETTQISI
-----

RoChs1      DSDMNIKGSCKGIVPVQTIFFCLKEKNAKKINSHRWFNFAFGPILQPNVCI
motivo b'   -----KINSH-----
                                     *****

RoChs1      LLDVGTRPGNSSIYQLWKVFHRNPLIGGACGEIRAMLGTACCQLINPLVA
motivo c    --DVGT-----
                                     ****

RoChs1      AQNFYKMSNILDKPLESVFGYISVLPGAFSAYRYAALKNDVSGQGPLEK
motivo d,e  -QNFY-----LPG-----
                                     *****          ***

RoChs1      YFLGEDLHKDQHTGKKAGLFANMYLAEDRILCFELVAKKDERWLLQYVD
motivo f    -----LAEDRIL-----
                                     *****

RoChs1      SAFGETDVPSQLPEFISQRRRWLNLSFFAGVYGLIHFSKIWNNSGHGFSRT
motivo g    -----QRRRW-----
                                     *****

RoChs1      FLLLIIEGIYNVISLIFSWFSVVIVLSFLCT
-----

```

Fig. 5 Alineamiento de los dominios conservados de la enzima RoChs1

La secuencia RO3G_00942 (RoChs1) de *Rhizopus oryzae* contiene los motivos firma (marcados con estrellas) que se sugiere que están involucrados en la síntesis de la quitina. Se han clasificado los motivos de la *b* a la *g* para su mejor descripción según Gonçalves I.R. *et al.* 2016. Las secuencias conservadas *a* y la *h* son secuencias que no están presentes en RoChs1.

Tabla 5. Oligonucleótidos para la amplificación por PCR de los genes RO3G_00942, gen completo (RoChs1) y gen deletado (RoChs1ΔDT)

Nombre	Orientación	Oligonucleótido	# nt	Restricción
CSF1	Sentido	5'- <u>CTCGAGATGTCTGAAGAATCAGGAAGC</u> -3'	27	<i>XhoI</i>
CSR1	Anti-sentido	5'- <u>TCTAGATTAAGTACAAAGGAAGGATGAG</u> -3'	28	<i>XbaI</i>
CSR2	Anti-sentido	5'- <u>TCTAGATTATTCAATCAACAGCAAGAACG</u> -3'	28	<i>XbaI</i>

Los fragmentos de DNA resultantes de ~1.5-kb fueron clonados en el vector de clonación TOPO (Invitrogen) de acuerdo al protocolo del proveedor y fueron secuenciados para asegurar su integridad y que no tuviesen ninguna mutación. Posteriormente los vectores fueron tratados con las enzimas de restricción *XhoI* y *XbaI*, y los fragmentos fueron purificados por electroforesis en agarosa. Por último, los fragmentos y el vector pCold I (el cual tienen una etiqueta de seis histidinas hacia el amino terminal, operon *lac I* (región operada por el Inductor: IPTG) y es inducible a bajas temperaturas) fueron ligados utilizando la ligasa T4 DNA (Sigma-Aldrich). El plásmido que conducía a la expresión de la variedad completa se le llamo pColdI-chs942 (530 aa), mientras que a la variedad con la deleción hacia el carboxilo terminal (30 aa) se le llamo pColdI-chs942TD (500 aa).

5.3. Expresión heteróloga de RoChs1 en *E. coli*

Los vectores pColdI-chs942 (530 aa) y pColdI-chs942TD (500 aa) fueron introducidos a *E. coli* mediante la transformación de células electrocompetentes (ver Metodología) usando la cepa BL21 Star (DE3) pRARE (Hussain and Ward, 2003). Los primeros experimentos de las inducciones con 1mM de IPTG demostraron que la variante deletada (500 aa) tenía una alta expresión muy por encima de la variante completa, que al parecer casi no se expresaba. Este resultado se muestra en la **Fig. 6**, donde se aprecia la expresión después de la inducción con IPTG, posterior a las 16h, para las dos variantes. En la misma **Fig. 6**, se muestra la electroforesis desnaturalizante que es evidencia de que la banda de ~55kDa (variante 500 aa) está presente, mientras que hay ausencia de la variante completa (~59 kDa).

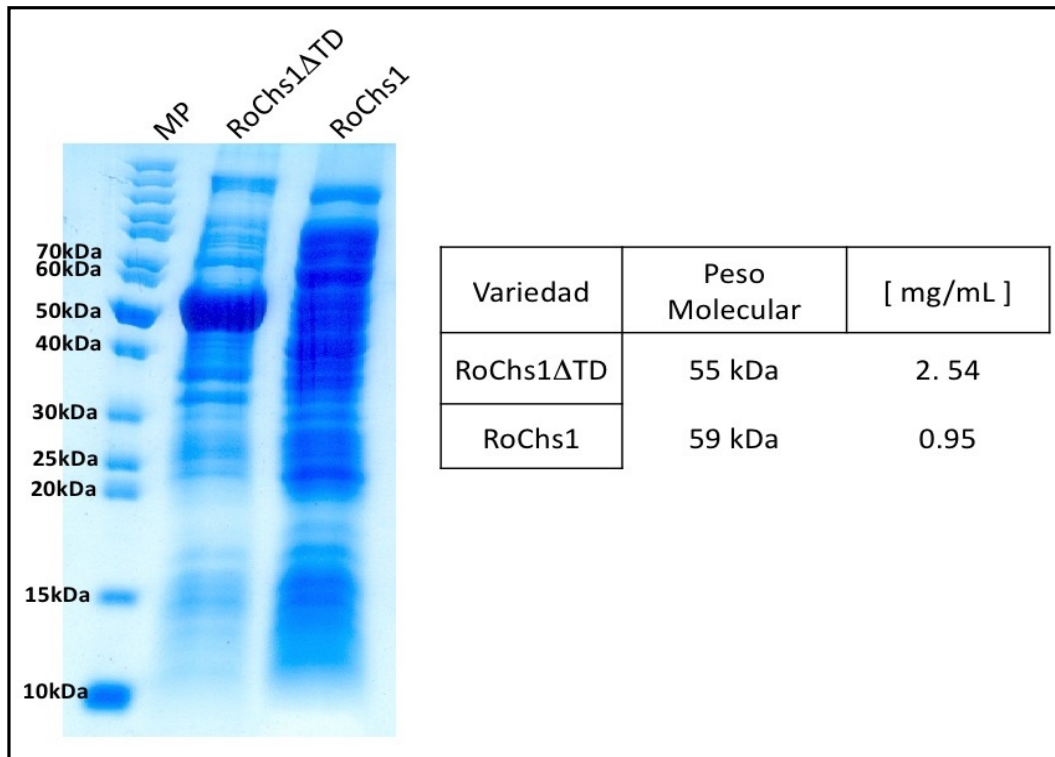


Fig. 6 Electroforesis en gel desnaturizante (SDS-PAGE) de extractos de células de *E. coli* transformadas con los plásmidos que poseen los cDNAs de RoChs1

Se analizaron extractos de células transformadas con los plásmidos que expresan la forma deletada (RoChs1ΔTD; carril 2) o la completa (RoChs1; carril 3). El carril uno corresponde a los patrones de PM. La Tabla anexa muestra la concentración de proteína total y el P.M. de las bandas esperadas.

Debido a este resultado negativo, la expresión de la variante completa (530 aa) fue probada en otras dos cepas de expresión de *E. coli*: *E. coli* BL21 (DE3) y *E. coli* RosettaTM 2. Sin embargo, no se tuvo un resultado diferente, pues aun así, la variante completa tampoco fue expresada (**Fig. 7**) en estas cepas bajo ninguna condición diferente de tiempos de expresión, concentración del inductor IPTG y temperaturas probadas.

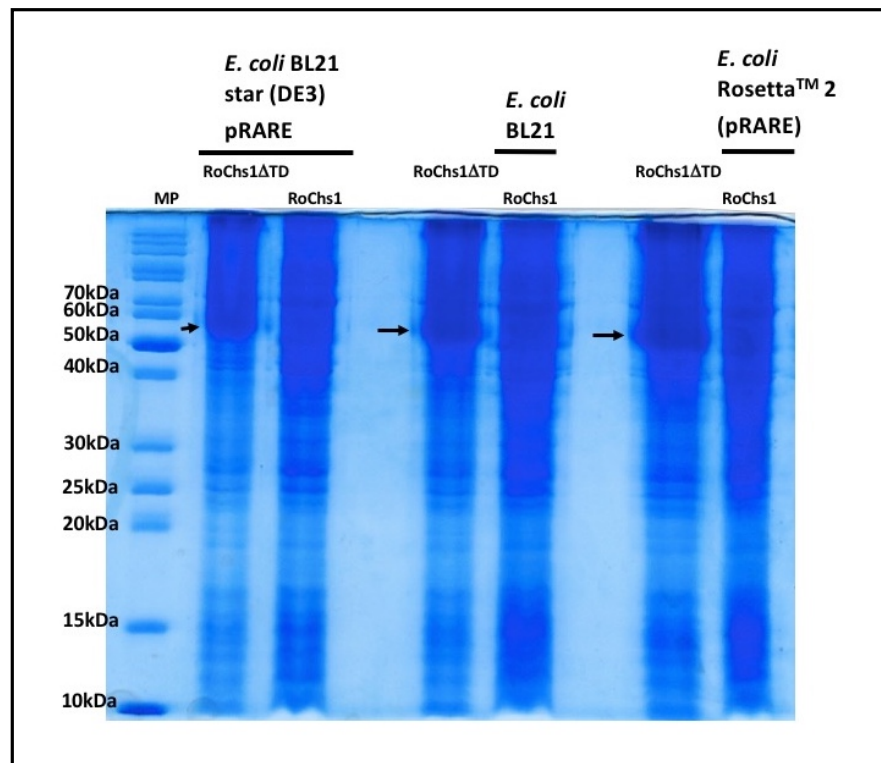


Fig. 7 SDS-PAGE de extractos de células de tres cepas *E. coli* transformadas con los plásmidos que poseen los cDNAs de RoChs1.

Las 3 cepas de *E. coli* fueron transformadas con el plásmido que codifica el péptido completo de 530 aminoácidos (carriles 3, 5, y 7, respectivamente), o con el que expresa la forma deletada (carriles 2, 4, y 6). Nótese que la Chs solo fue expresada en su forma deletada (RoChs1 Δ TD) en las tres cepas. Nota: Los carriles vacíos no están enumerados.

La variante deletada, RoChs1 Δ TD, mostró expresión óptima con inducción por IPTG 1mM a 18 °C por 16h, considerando esta variedad óptima para los subsecuentes ensayos. Como variedad de control negativo, se transformó la cepa *E. coli* BL21 (DE3) star pRARE con el vector vacío de pCold I (**Fig. 7**). Usando este control se obtuvieron resultados negativos al analizar la expresión de la quitina sintasa de *R. oryzae* (RoChs1 Δ TD) (ver **Fig. 8**).

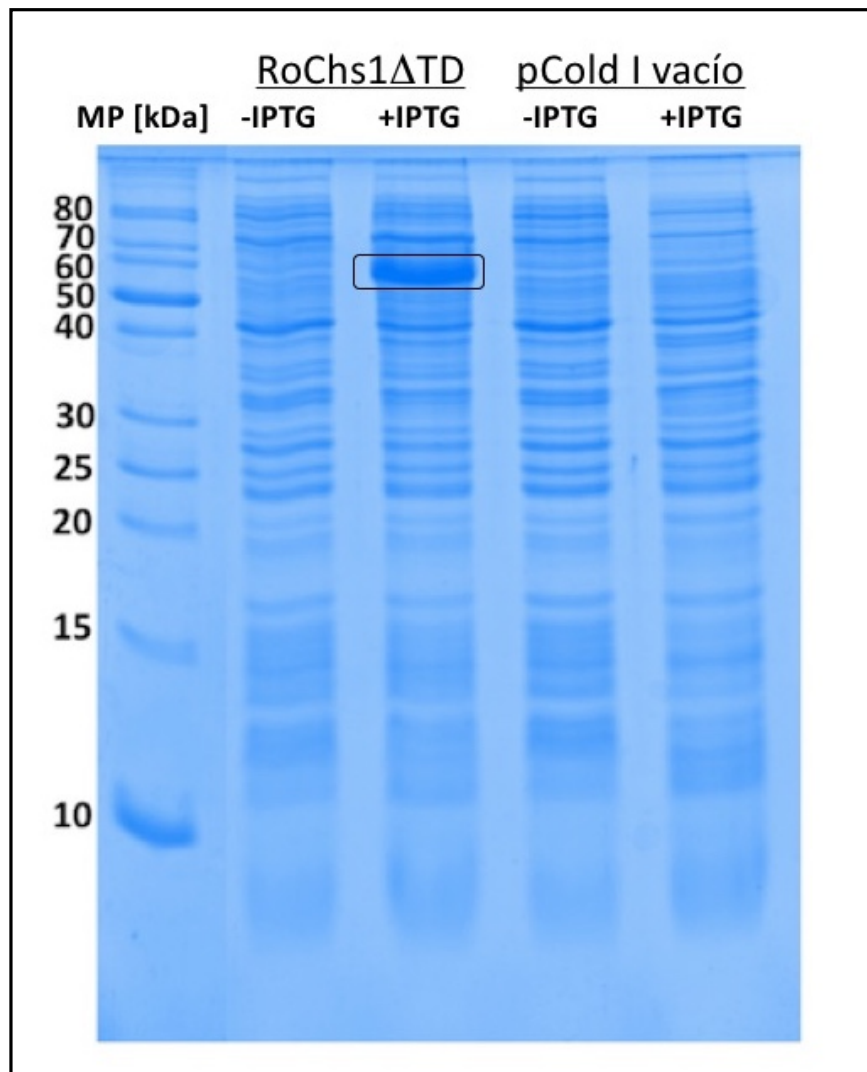


Figura 8. SDS-PAGE comparativo de extractos de la cepa de *E. coli* transformada bajo tres diferentes protocolos

La bacteria fue transformada con el plásmido que expresa RoChs1 Δ TD (carriles 2 y 3), o con el vector pCold carente del mismo (vacío), siendo las cepas inducidas (carriles 3 y 5) o no (carriles 2 y 4) con IPTG. Se observa que el péptido de 55 kDa (RoChs1 Δ TD) fue sintetizado solo por la cepa transformada con el plásmido que posee la construcción e inducida con IPTG (carril 3).

5.4. Purificación de RoChs1 Δ TD

Para los ensayos de purificación posteriores a la inducción, se empleó un regulador de lisis ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 50 mM a pH 6.5), sumado a la lisis mecánica por ultrasonido (ver Metodología). Este regulador al cual llamamos regulador de lisis 1 no dio resultados positivos para obtener la proteína soluble, y por ello se buscó modificarlo y los resultados se muestran en la **Tabla 6**. El regulador de lisis que dio mejor resultado mostrando a la proteína RoChs1 Δ TD casi soluble fue el que contenía $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 50 mM de pH 6.5 y 0.05% de LMNG (lauril maltosa neopentil glicol), además de lisis mecánica por ultrasonido (regulador de lisis 9; ver **Tabla 6**). Sin embargo, la separación de la fase soluble por centrifugación a baja velocidad (750 g), demostró que la proteína RoChs1 Δ TD se localizaba dentro de cuerpos de inclusión. Esta forma fue posteriormente empleada para los ensayos de actividad. Por otro lado, el empleo del regulador de lisis 6 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 50 mM a pH 6.5 + urea 8 M) a altas velocidades de centrifugación (12,000 g) separaba la Chs en la parte soluble, mostrando la banda esperada de 55 kDa (RoChs1 Δ TD), pero dado que la urea desnatura cualquier proteína, la Chs era inactiva. Con el empleo del regulador de lisis 6 se implementó el uso del sistema IMAC (ver Métodos), sistema fallido con los reguladores 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10 y 11, mediante el cual (**Fig. 9**) se logró obtener una fracción de RoChs1 Δ TD sin bandas contaminantes. Sin embargo al eliminar la urea por medio de diálisis, las muestras se agregaban, y la enzima se inactivaba (**Tabla 7**). Pero la utilidad de la técnica se demostró al cortar la fracción del gel que contenía la banda de 55kDa y proceder a su secuenciación, revelando su identidad con la RoChs1 de *Rhizopus* (**Fig. 10**).

Incluso varios protocolos de dializado (**Tabla 7**) fueron implementados posteriores a la purificación de RoChs1 Δ TD por el sistema IMAC con níquel (**Fig. 8**) con el objeto de evitar la desnaturación de la quitina sintasa. Sin embargo, empleando ninguna de ellas se obtuvieron mejores resultados. Por ello aún se continuó prefiriendo la muestra en cuerpos de inclusión para ensayos posteriores (**Fig. 11**).

Tabla 6. Reguladores utilizados para el lisado de células de expresión con proteína inducida

Los reguladores fueron utilizados a temperatura de 4°C (baño de hielo) para resuspender paquete celular y lisis mecánica (ultrasonido)

Regulador	Componentes	RoChs1ΔTD soluble***
Regulador lisis 1†	50mM de Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ a pH 6.5	No
Regulador lisis 2†	50mM de Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ a pH 6.5 + 100mM NaCl	No
Regulador lisis 3†	50mM de Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ a pH 7.5	No
Regulador lisis 4†	50mM de Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ a pH 7.5 + 100mM NaCl	No
Regulador lisis 5φ**	50mM de Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ a pH 6.5 + 0.5 % Sarkosyl	Si (50%)
Regulador lisis 6φ**	50mM de Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ a pH 6.5 + 8M Urea	Si (~100%)
Regulador lisis 7φ**	50mM de Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ a pH 6.5 + 400mM Arginina	Si (~50%)
Regulador lisis 8†	50mM de Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ a pH 6.5 + 0.02% LMNG	No
Regulador lisis 9*	50mM de Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ a pH 6.5 + 0.05% LMNG	Si (~70-80%)
Regulador lisis 10†	50mM de Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ a pH 6.5 + 500mM Sacarosa	Si (~20%)
Regulador lisis 11†	50mM de Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ a pH 6.5 + 0.1% Digitonina	No

† Separación por centrifugación a 12,000 *g* y 750 *g*


φ Separación por centrifugación a 12,000 *g*

* Separación por centrifugación a 750 *g*

** Se dializo y precipito.

*** dentro del paréntesis es el porcentaje aproximada de RoChs1ΔTD en la fase soluble

Tabla 7. Soluciones utilizadas para renaturalizar la fase purificada de RoChs1ΔTD utilizando el método IMAC con níquel

Regulador de Diálisis	Componentes	Decremento de urea* 	Proteína fase soluble	Proteína agregada
Regulador D1	50mM de Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ a pH 6.5	8 M → 4 M	No	Si
Regulador D2	50mM de Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ a pH 6.5 + 150mM NaCl	8 M → 4 M	No	Si
Regulador D3	50mM de Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ a pH 6.5 + 150mM NaCl + 0.05% LMNG	8 M → 3 M	No	Si
Regulador D4	50mM de Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ a pH 6.5 + 150mM NaCl + 400 mM Arginina	8 M → 2 M	No	Si
Regulador D5	50mM de Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ a pH 6.5 + 150mM NaCl + 0.1% Digitonina	8 M → 4 M	No	Si
Regulador D5	50mM de Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ a pH 6.5 + 150mM NaCl + Triton X-100	8 M → 2 M	No	Si

*En los decrementos de urea, los cuales siguieron una velocidad de reducción de la [1M urea] son la concentración final a la que se observó precipitados, aunque siempre se llegó a una etapa de ~0M de urea en las diálisis

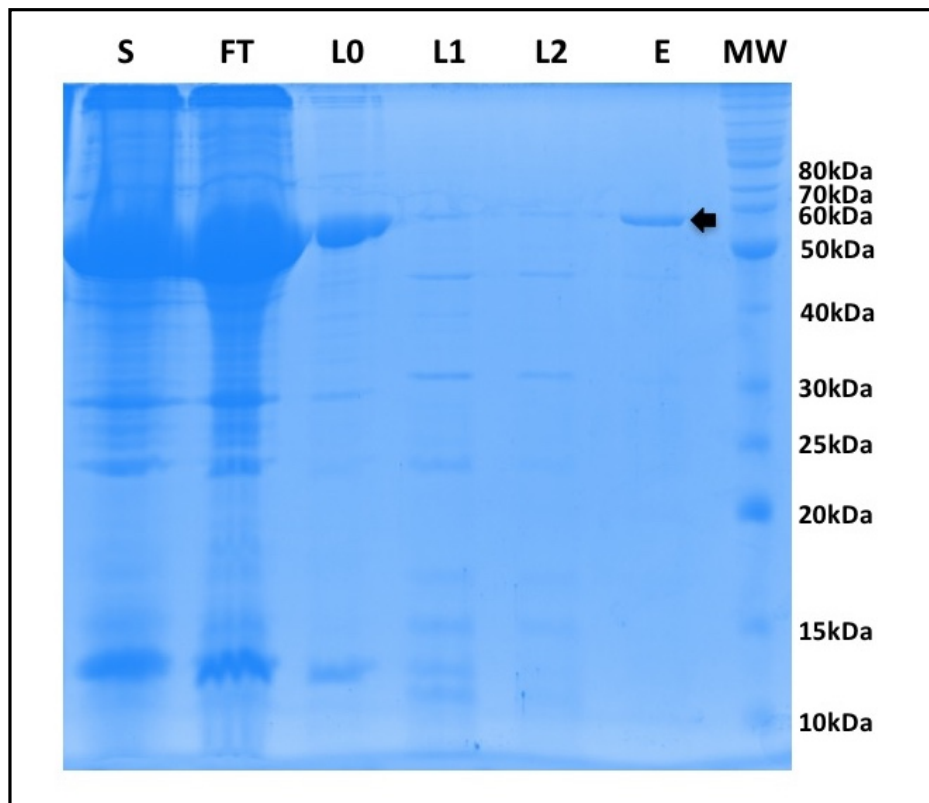


Fig. 9 Análisis por SDS-PAGE de la purificación de RoChs1 Δ TD por IMAC de níquel

Muestras tomadas a diferentes estadios de la purificación de la quitina sintasa RoChs1 Δ TD por el sistema IMAC con níquel se sometieron a SDS-PAGE. S, sobrenadante de un extracto crudo soluble en urea 8M; FT, material no adsorbido por la columna (*flow through*); L0, eluído con una solución de Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 50 mM de pH 6.5 y urea 8 M; L1, eluído con la misma solución conteniendo imidazol 20 mM; L2, eluído con la misma solución conteniendo imidazol 40 mM; E, eluído con la misma solución conteniendo imidazol 500mM; MW, marcadores de peso molecular. La flecha indica la banda de RoChs1 Δ TD (55 kDa).

Cabe señalar que ensayos por cromatografía de exclusión en una columna tipo Superdex 200 para FPLS (ÄKTA) confirmaron la existencia de los cuerpos de inclusión, pues toda la RoChs1 Δ TD se eluía en el volumen vacío (datos no mostrados).

Mediante el uso de la estructura reconstruida *in silico* (Fig. 12) con el programa Phyre², se diseñó un anticuerpo policlonal solicitado a la empresa GenScript (Piscataway, NJ).

RO3G_00942 MS	DTRNSPGKLVRTDTESYLDAPKTQQANNRQVTRRLPLTNNNLVIDCPIPDRLLGALNCT 120 -----TDTESYLDAPK----- *****
RO3G_00942 MS	ERDEFSQLRYTAATCEPDDFELEGYTLRPKIYNRETELFIEDIILFTRTMHGVMKNIAHL 180 -----YTAATCEPDEFESRGFTLRPK----EETELFIEDIILFTR----- *****.*.*.*.*****
RO3G_00942 MS	CSLKKNVWGPDPGWKKVVVCIVADGRKVVNKRVLNVLASMGYQAGIAKNIVDNKPVKAH 240 -----VVVCIVADGR-----VLDVLASMGVYQAGIA-----AH ***** **.******.***** **
RO3G_00942 MS	IYEYTTQISIDSDMNIKSGDKGIVPVQTIIFCLKEKNAKKINSHRWFNAPFPILQPNVCI 300 IYEYTTQISIDSDMNIK----- *****
RO3G_00942 MS	LLDVGTRPGNSSIYQLWKVFRNPLIGGACGEIRAMLTACCQLINPLVAAQNFYKMSN 360 -----NPLIGGACGEIRAMLTACCQLLNPLVAAQNFYKMSN 15 *****.******
RO3G_00942 MS	ILDKPLESVFGYISVLPGAFSAYRYAALKNDVSGQPLEKYFLGEDLHKDQHTGKKAGLF 420 ILDKPLESVFGYISVLPGAFSAYR-----GLF 39 ***** **
RO3G_00942 MS	EANMYLAEDRILCFELVAKKDERWLLQYVDSAFGETDVPSQLPEFISQRRRWLNGSFFAG 480 EANMYLAEDRILCFELVAK----- *****
RO3G_00942 MS	VYGLIHFSKIWNHSGHGFSRTFLLIEGIYNVISLIPSWFSVVIVLSFLCT 530 -----

Fig. 10 Secuencia de la RoChs1 donde se señalan los péptidos identificados con el análisis por espectrometría de masas

A lo largo de la secuencia primaria completa de RoChs1 se señalan los péptidos de la proteína RoChs1 purificada por SDS-PAGE identificados por espectrometría de masas.

La idea básica fue identificar una secuencia peptídica (GKLVRTDTESYLDAPKTQ) en la superficie de la proteína RoChs1 que funcionara como epítipo (18 aa) y que además, esta secuencia no la tuvieran otras Chs's de *Rhizopus oryzae*, e incluso que no coincidieran con alguna secuencia de proteínas dentro de la cepa de expresión *E. coli* BL21 (DE3) star pRARE, para evitar falsos positivos en los ensayos de Western blot.

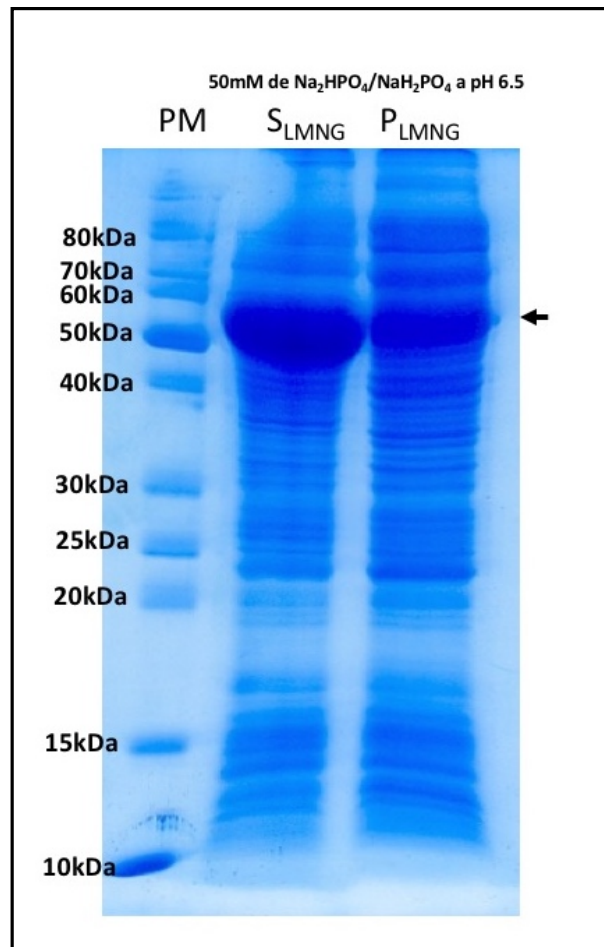


Fig. 11 SDS-PAGE del sobrenadante y sedimento de un extracto crudo de *E. coli* transformado con el vector que expresa la proteína RoChs1ΔTD.

El sobrenadante (S_{LMNG}), y el sedimento (P_{LMNG}) de un extracto de *E. coli* obtenido en presencia del detergente LMNG (Lauril maltosa neopentil glicol) obtenidos por centrifugación a 750 g, fueron sometidos a SDS-PAGE. La proteína RoChs1ΔTD se señala por una flecha negra.

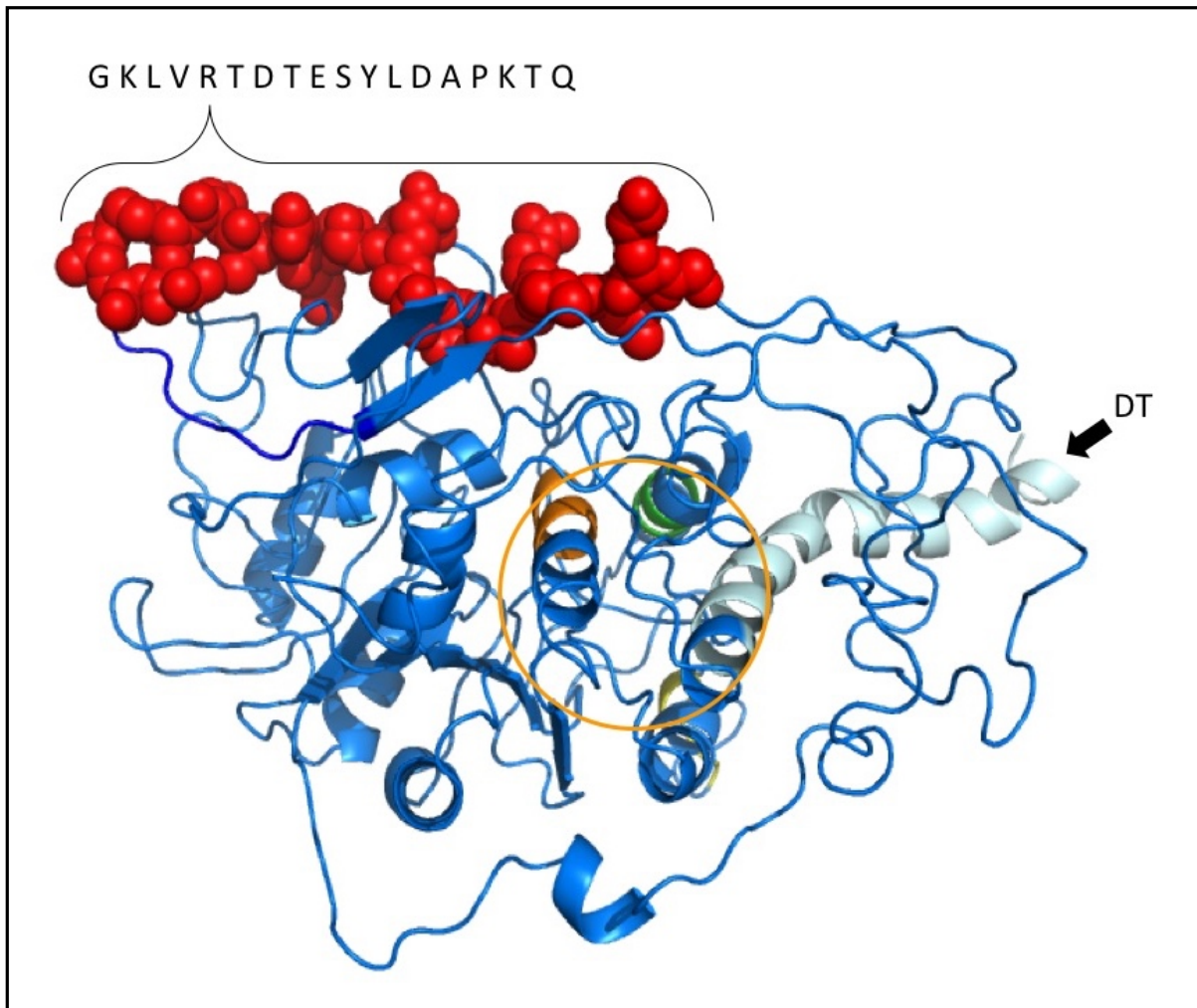


Fig. 12 Estructura *in silico* de la proteína RoChs, señalando el epítipo utilizado para obtener anticuerpos

La estructura *in silico* de RoChs1 se construyó con el programa en línea Phyre². Como esferas rojas se muestra la zona que corresponde al epítipo empleado para obtener anticuerpos contra la Chs, previamente evaluada para no dar reacciones cruzadas con otras proteínas de *E. coli*, u otras Chs's de *R. oryzae*. En las hélices naranja, rojo y amarillo (circulo naranja), se encuentra el posible núcleo de actividad enzimática, donde se localizan el triple aspártico (D) y el motivo QRRRW, mientras que el trazo en azul claro (flecha negra) corresponde al dominio transmembranal.

5.5. Determinación de la actividad de RoChs1 Δ TD

El sobrenadante obtenido a baja velocidad de centrifugación (750 g) en donde ubicamos los cuerpos de inclusión que albergaban la proteína RoChs1 Δ TD, nos permitió medir la actividad enzimática. Normalmente, el método de filtración radiactivo descrito por Ruiz-Herrera and Bartnicki-Garcia (1976) ha sido empleado para la determinación de la actividad de la enzima quitina sintasa. El sobrenadante con los cuerpos de inclusión obtenido por lisis celular con el regulador 9 (Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 50 mM pH 6.5 + 0.05% LMNG), mostró la incorporación de [¹⁴C]-GlcNAc en un compuesto insoluble retenido por los discos de fibra de vidrio con una actividad específica de $1.58 \pm 2.6 \times 10^{-2}$ nmoles GlcNAc/mg proteína (**Tabla 8**). Incluso, se adicionó una enzima proteolítica, tripsina, para medir la actividad al requerimiento de corte de alguna zona dentro de la enzima RoChs1 Δ TD con un ligero aumento en la actividad de 0.2 veces ($1.77 \pm 9.6 \times 10^{-2}$ nmoles GlcNAc/mg proteína (**Tabla 8**). Cabe señalar que un número de quitina sintasas son activadas por proteasas (Bulawa y Osmond, 1990; Ruiz-Herrera *et al.*, 1977). Un control positivo para evaluar que el producto de la actividad enzimática era quitina, consistió en la adición de quitinasa a las mezcla de incubación, la cual es capaz de hidrolizar dicho polisacárido. Dicha adición resultó en una reducción en la incorporación de GlcNAc al producto insoluble, a un nivel mínimo: $0.15 \pm 2 \times 10^{-2}$ nmoles GlcNAc/mg proteína (**Tabla 8**).

La **Tabla 9** resume las características generales que tuvo la quitina sintasa recombinante. En primer lugar se determinó la Km (constante de Michaelis-Menten), que nos permite evaluar la afinidad de la enzima por su substrato, en este caso la UDP-GlcNAc. Mediante experimentos donde se evaluó la dependencia de la enzima a la concentración de UDP-GlcNAc, se logró obtener una Km de 32.1mM (**Tabla 9**). Esta es una muy baja afinidad a la UDP-GlcNAc si se compara con lo descrito en la literatura, en donde se han evaluado diferentes fracciones membranales y quitosomas de diferentes especies de hongos, encontrándose valores de la Km de

0.5 – 3.5 mM en promedio (Barreto *et al.*, 2010; Bulawa y Osmond, 1990; Guerriero *et al.*, 2010; Ruiz-Herrera *et al.*, 1977; Silverman *et al.*, 1988).

Tabla 8. Actividad de RoChs1ΔTD y control (plásmido vacío)

Extracto	GlcNAc Incorporado*	GlcNAc Incorporado* + Quitinasa ^a	GlcNAc Incorporado* + Tripsina ^b
Control (plásmido vacío)	0.09 ± 1.2e ⁻²	n.a.	0.07 ± 1e ⁻³
RoChs1ΔTD	1.58 ± 2.6e ⁻²	0.15 ± 2e ⁻²	1.77 ± 9.6e ⁻²

*nmoles GlcNAc mg⁻¹ proteína

*n=2, 3 diferentes experimentos

n.a. = no aplica

^a [1 U ml⁻¹]

^b [1 μg ml⁻¹]

La RoChs1ΔTD además mostró una actividad máxima a temperaturas en un rango muy amplio de 15 a 40°C (**Tabla 9**), al igual que ocurrió al medir la dependencia de la actividad al pH, que fue óptima en el rango de pH entre 5-8 (**Tabla 9**), mientras que a pH de 2 o de 12 la actividad fue prácticamente nula (datos no mostrados). Estos datos son muy diferentes de lo que ocurre en general con la actividad de las quitina sintasas medidas en extractos crudos o quitosomas que muestran un máximo de actividad a valores de temperatura o de pH muy definidos (Ruiz-Herrera *et al.*, 1977; Ruiz-Herrera y Bartnicki-Garcia, 1976). Las determinaciones del cofactor metálico que requiere la enzima evidenció un resultado también contrastante con lo descrito en la literatura, aunque el Mg⁺⁺ fue el metal más activo, su concentración óptima fue muy baja en comparación con el promedio utilizado en los ensayos de actividad de quitina sintasas presentes en extractos crudos o quitosomas (5-10 mM) (**Tabla 9 y Fig. 13**; (Ruiz-Herrera *et al.*, 1977; Ruiz-Herrera y Bartnicki-Garcia, 1976). En este

mismo sentido, tres iones metálicos utilizados comúnmente como cofactores fueron, Co^{++} , Ca^{++} y Mn^{++} , cuya activación fue muy baja en comparación a las concentraciones comúnmente empleadas del ion Mg^{++} (Tabla 9 y Fig. 13) (Ruiz-Herrera *et al.*, 1977; Ruiz-Herrera y Bartnicki-Garcia, 1976; Van Dellen *et al.*, 2006)

Tabla 9. Propiedades generales de la enzima quitina sintasa del hongo *Rhizopus oryzae* (RoChs1 Δ TD)

Parámetros	Valores o características
Km aparente	32.1 mM
Temperatura optima	15 - 40 °C
Catión divalente	0.1 mM Mg^{++}
Otros cationes divalentes	$\text{Co}^{++} > \text{Ca}^{++} > \text{Mn}^{++}$
pH óptimo	5 - 8
Estimulador Alostérico	GlcNAc: 1.28 ± 0.06 veces

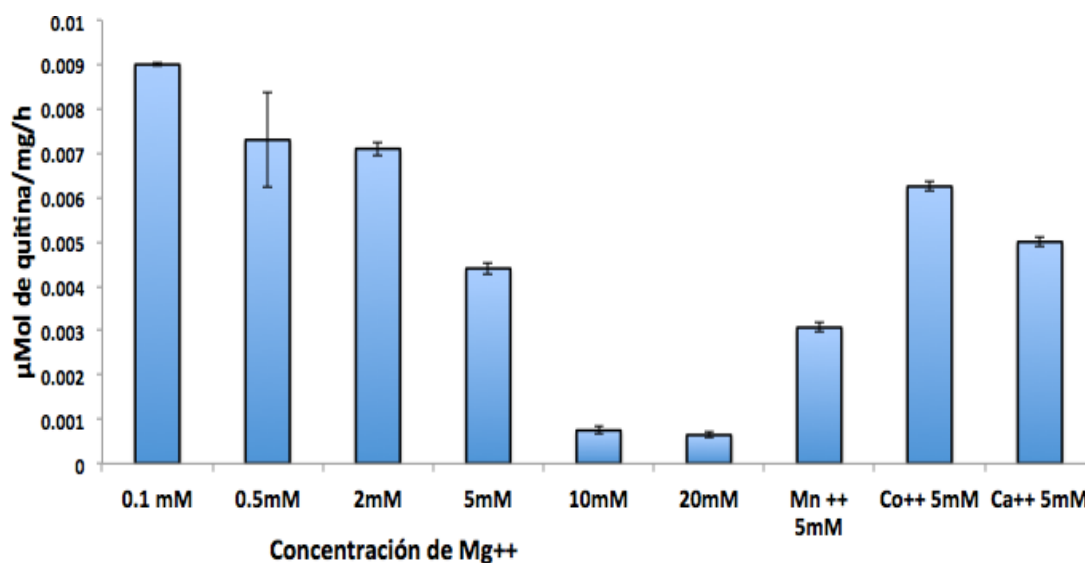


Fig. 13 Efecto de los iones metálicos sobre la actividad de la enzima RoChs1 Δ TD

Los extractos de la quitina sintasa soluble se incubaron en presencia de diferentes concentraciones de iones divalentes usando la técnica descrita en la sección de métodos.

La determinación de actividad *in gel*, junto con ensayos de inmunodetección (“Western blot”) (**Fig. 14**), sirvió para demostrar que la proteína de 55k Da (según su *Mr*), era la responsable de la actividad enzimática de quitina sintasa

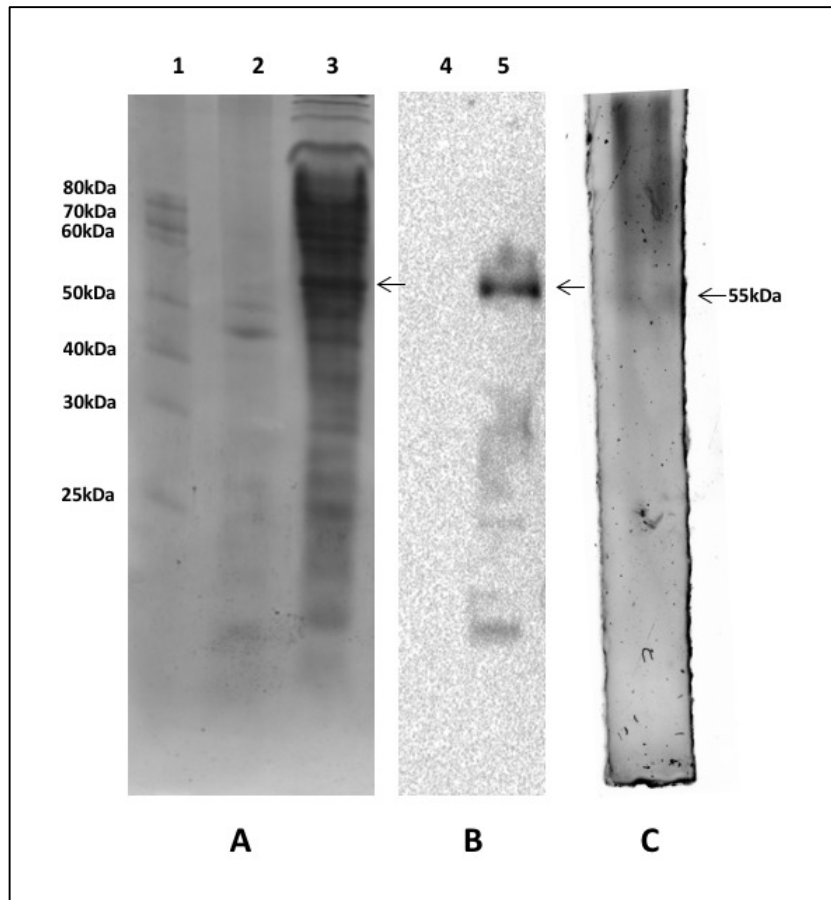


Fig. 14 Demostración que la banda de proteína de 55 kDa es la enzima RoChs1ΔTD responsable de la actividad enzimática

A. SDS-PAGE (tinción por Coomassie). Carril 1, marcador de peso molecular; carril 2, patrón electroforético del extracto crudo de *E. coli* transformado con el vector vacío; carril 3, patrón electroforético del extracto crudo de *E. coli* transformado con el vector que expresa la proteína RoChs1ΔTD (55kDa). **B.** “Western blot”. Carril 4, extracto crudo de *E. coli* transformado con el vector vacío; carril 5, extracto crudo de *E. coli* transformado con el vector que expresa la proteína RoChs1ΔTD. **C.** Determinación de actividad *in gel* del extracto crudo de *E. coli* transformado con el vector que expresa la proteína RoChs1ΔTD (tinción con Calcofluor). La flecha señala a la proteína RoChs1ΔTD

5.6. Determinación de quitina por transformada de Fourier del espectro infrarrojo acoplado a un atenuador de reflexión total (ATR-FTIR).

Como anteriormente se describió, la quitina obtenida a partir de la síntesis *in vitro* fue purificada por medio de una extracción con una solución alcalina con el fin de eliminar a la Chs y las proteínas contaminantes. Los datos observados por ATR-FTIR mostraron un patrón de composición química respecto a la señal de infrarrojo que absorben los diferentes grupos indistinguible del control positivo de quitina coloidal comercial purificada (Sigma). El inferograma mostrado en la **Fig. 15** destaca principalmente las bandas características para cada grupo químico (resumidas en la **Tabla 11**)

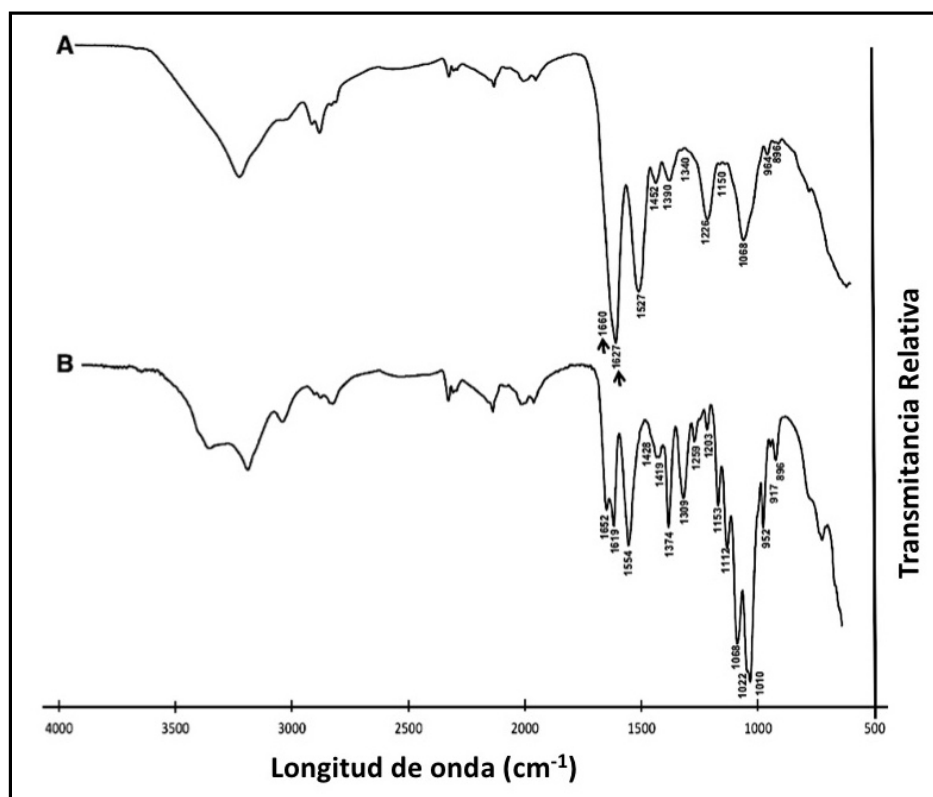


Fig. 15 Inferograma de quitina sintetizada por la enzima RoChs1ΔTD (A) y quitina comercial (B, control positivo)

Tabla 10. Bandas características por ATR-FTIR de quitina

α -Quitina* longitud de onda/cm ⁻¹	Quitina control longitud de onda/cm ⁻¹	Quitina sintetizada por RoChs1 Δ TD longitud de onda/cm ⁻¹	Asignación
895	896	896	CH deformación
919	917	916	CHx deformación
953	952	964	CH ₃ movimiento cadena
1012	1010		C-O-C / C-O extensión
1028	1022		C-O-C / C-O extensión
1073	1068	1068	C-O-C / C-O extensión
1115	1112		
1157	1153	1150	
1205	1203		Amida III
1235	1228	1226	
1261	1259		
1312	1309	1309	
		1340	
1378	1374		CHx deformación
		1390	
1415	1419		
1429	1428		
		1452	
		1527	
1558	1554		Amida II
1630	1619	1627	Amida I
1660	1652	1660	

*datos tomados de Wijesena *et al.*, 2014

5.7. Patrón de difracción de rayos-X de la quitina sintetizada por la enzima RoChs1 Δ TD.

El análisis de quitina sintetizada por éste método resultó complicado y muy difícil de aplicar, debido a que el equipo accesible para ello requiere una gran cantidad de muestra en estado sólido cristalino. Considerando las pequeñas cantidades de

quitina sintetizada en nuestros estudios, desafortunadamente no se pudieron obtener las bandas de difracción similares entre la muestra de quitina sintetizada *in vitro* por la RoChs1 Δ TD y la implementada como control, misma utilizada en las pruebas de ATR-FTIR. Sin embargo, y dadas las circunstancias, las señales que se obtuvieron están mostradas en un difractograma comparativo entre el control y la quitina sintetizada *in vitro*, sugieren que la primera tiene una muy baja cristalinidad (**Fig. 16**).

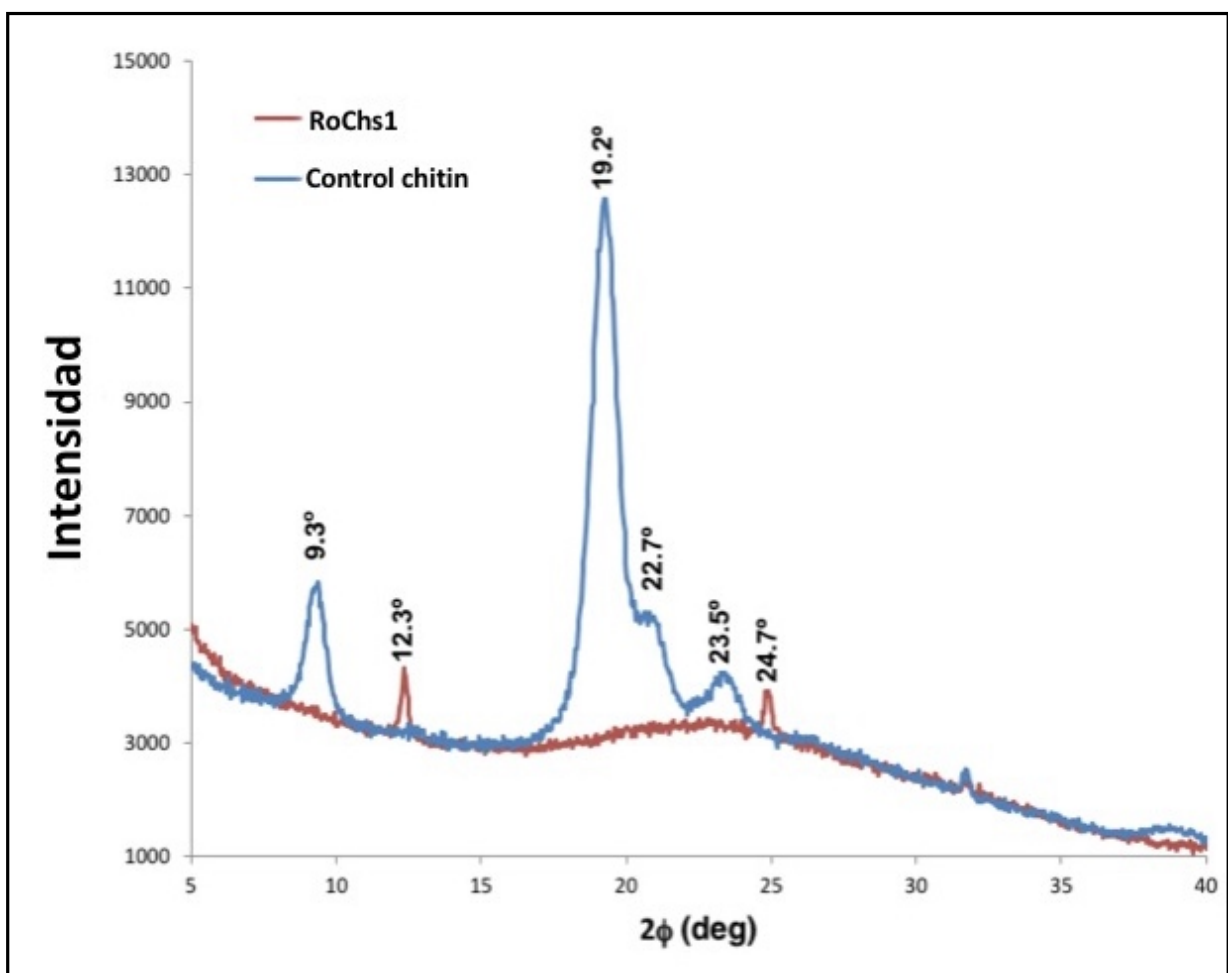


Fig. 16 Espectro de difracción de Rayos X de la quitina sintetizada *in vitro* por RoChs1 Δ TD y una muestra de quitina de camarón como control (quitina comercial)

5.8. Análisis de la quitina sintetizada *in vitro* por Microscopia de Fuerza Atómica (AFM).

Una evaluación morfológica por AFM nos permitió determinar la forma de la quitina sintetizada *in vitro* por la enzima RoChs1 Δ TD (**Fig. 17**) Estas estructuras son similares a las observadas en muestras de quitina de cangrejo (Wijesena et al., 2014), aunque dado que en la literatura no se ha aplicado a la fecha a muestras de quitina de hongos esta técnica, AFM, no fue posible compararla con quitinas fúngicas. Como control se utilizó el extracto total de *E. coli* transformado con el vector vacío (pCold I) sometido a los mismos criterios de obtención e incubación de síntesis de quitina. Se pudo observar que la quitina sintetizada *in vitro*, aparecía en forma de fibrillas de tamaño y grosor variables, y con diferentes grados de asociación.

5.9. Análisis de la quitina sintetizada *in vitro* por microscopía de fluorescencia (MF)

La tinción de la quitina sintetizada con Calcofluor nos ayudó a revelar la organización del producto, quitina, pues este colorante tiñe las estructuras fibrilares de los polisacáridos y usando los filtros de microscopía adecuados (350/400nm excitación, 400/425nm emisión) se tiene la capacidad de revelarlos por medio de fluorescencia, tal y como se observa en la **Fig. 18 A**, donde se observan pequeñas fibrillas de tamaño variable en una masa fluorescente, lo que revela que la quitina sintetizada en nuestras muestras es parcialmente microfibrilar. Por otro lado se sabe que la quitina muestra auto-fluorescencia en un rango de excitación λ de 300nm y λ de emisión de 490nm (Pöhlker et al., 2012). El uso de ésta técnica también reveló la estructura de la quitina sintetizada *in vitro* (**Fig. 18 B**).

5.10. Análisis de la quitina sintetizada *in vitro* por Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

La quitina sintetizada *in vitro* por la enzima RoChs1 Δ TD fue sometida a tinción negativa con ácido fosfotúngstico revelando en microscopía electrónica de transmisión estructuras microfibrilares solo en algunas regiones (**Fig. 19 A-C**), aunque no tan bien definidas como las características y bien estudiadas microfibrillas sintetizadas por quitosomas (Bartnicki-Garcia et al., 1978; Ruiz-Herrera y Bartnicki-Garcia, 1974). En observaciones como controles negativos de muestras de extracto total de *E. coli* transformada con el vector vacío tratado por los mismos protocolos, estas estructuras microfibrilares estaban ausentes (**Fig. 19 D**).

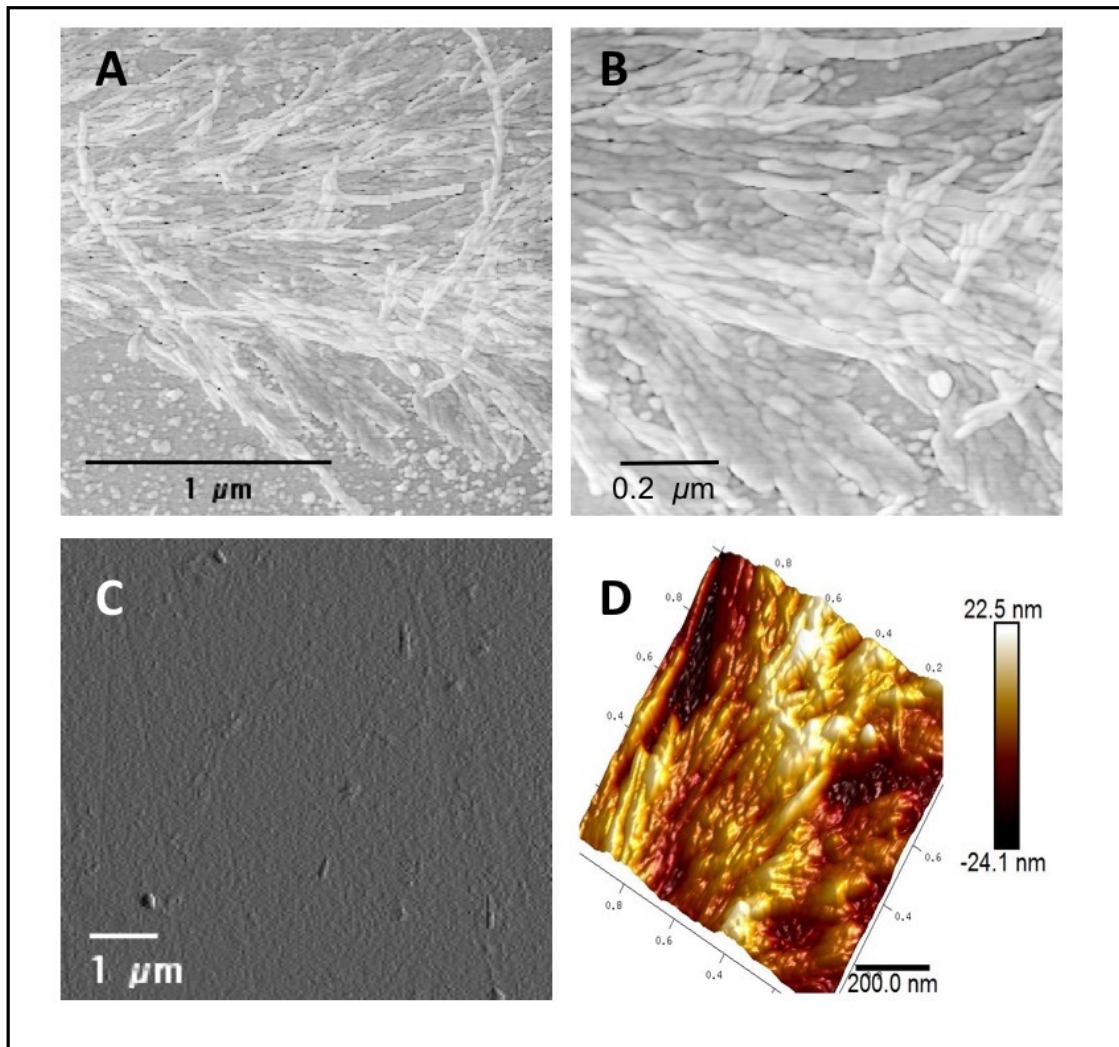


Fig. 17 Imágenes topográficas de obtenidas con un microscopio de fuerza atómica

A y B, muestras de quitina sintetizada *in vitro* por la enzima RoChs1ΔTD. C, muestra control negativa de un extracto total de *E. coli* transformada con el plásmido pCold I vacío. D. Imagen en 3D de la muestra de quitina sintetizada *in vitro* por la enzima RoChs1ΔTD.

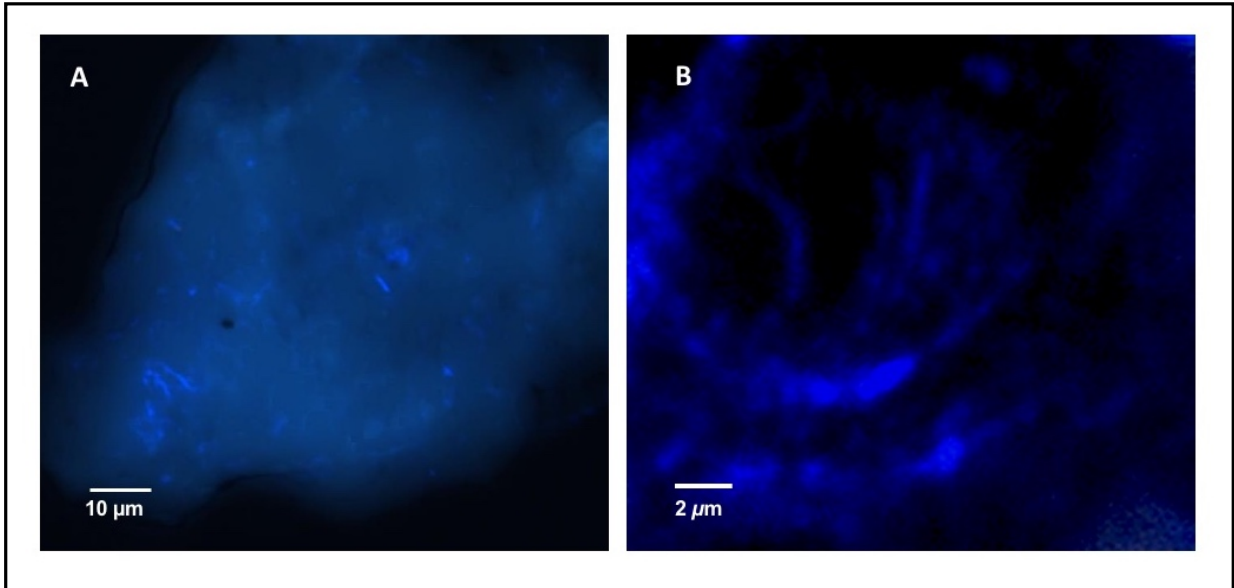


Fig. 18 Imágenes de fluorescencia la quitina sintetizada por la enzima **RoChs1 Δ TD**

A, imagen de microscopía de fluorescencia de la quitina teñida con Calcofluor. B, imagen de la auto-fluorescencia de la quitina.

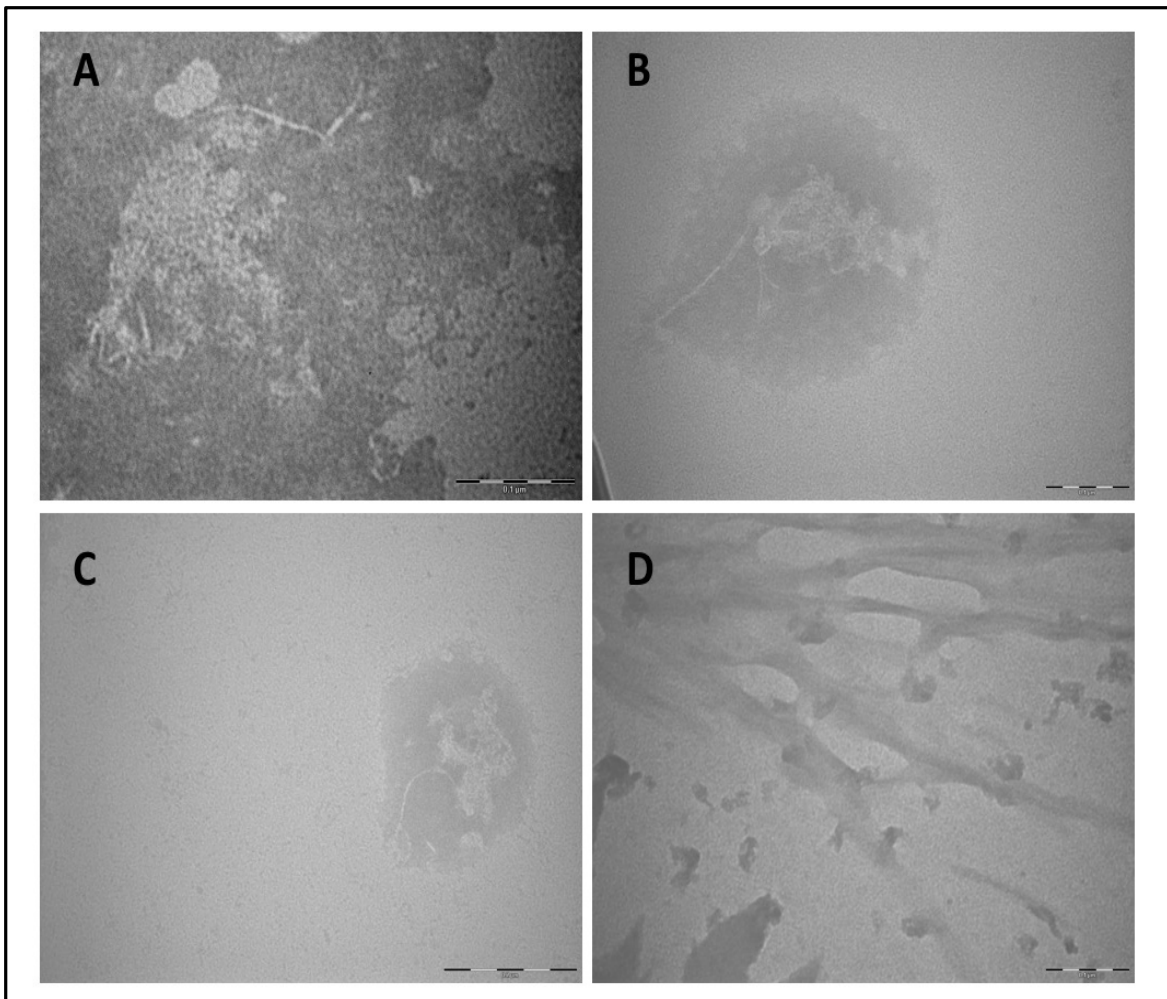


Fig. 19 Microscopia electrónica de transmisión de muestras de quitina sintetizada por la enzima RoChs1 Δ TD

A, B y C, muestras de quitina teñidas negativamente con ácido fosfotúngstico, D, muestra de un control negativo utilizando extracto de la variante con vector vacío. En todos los casos la barra es de 0.1 μ m.

VI. DISCUSIÓN

La quitina es el segundo compuesto orgánico más abundante en la naturaleza, y el compuesto nitrogenado más abundante. Por ello resulta contrastante que no existan datos sobre la estructura de las enzimas involucradas en su síntesis, principalmente debido a que no ha sido posible aislarlas en forma pura, considerando su naturaleza altamente hidrofóbica. En realidad conocemos más de los genes que las codifican, ya que los datos sobre sus propiedades cinéticas, mecanismos de activación y regulación se han obtenido utilizando extractos crudos, y quitosomas, ambos conteniendo mezclas diversas de quitina sintasas (Ruiz-Herrera, 2012). En realidad, los resultados de estas publicaciones previas (Braun and Calderone, 1979; Duran and Cabib, 1978; Kang *et al.*, 1984; Lending *et al.*, 1991; Machida and Saito, 1993; Montgomery *et al.*, 1984; Uchida *et al.*, 1996), donde se ha descrito la purificación de quitina sintasas, se ha demostrado posteriormente que son erróneos.

Posteriormente, en el Ascomycota *Wangiella dermatitidis* se obtuvieron extractos crudos de composición desconocida de varias quitina sintasa (Abramczyk and Szaniszlo, 2009). En *Botrytis cinerea*, se utilizó un sistema de expresión heteróloga para obtener una proteína recombinante de Chs, sin embargo los esfuerzos se concentraron en datos de unión de sustrato dejando de lado ensayos cinéticos debido a que la fracción enzimática no presentaba actividad en las dos variantes obtenidas (Magellan *et al.*, 2010).

Todos estos resultados muestran que hasta el inicio del presente estudio, no se contaba con una quitina sintasa aislada, por lo que, por un lado todos los análisis de las propiedades cinéticas de las quitina sintasas obtenidos previamente correspondían a mezclas de diferentes enzimas presentes en extractos crudos de membranas fúngicas, o a lo más de quitosomas. Por otro lado a que la estructura, y el mecanismo molecular de las quitina sintasas es desconocido.

La única aproximación para entender la estructura y el mecanismo de acción de la quitina sintasa, es un estudio en el cual se utilizó a la proteína NodC de

Sinorhizobium meliloti, que en realidad no es una quitina sintasa, empleando como “plantilla” a la celulosa sintasa BcsA de *Rhodobacter sphaeroides*. En este caso, se observó la conservación de algunos elementos entre NodC, BcsA y la ScCHS2 de *Saccharomyces cerevisiae*, sugiriendo que se forman los mismos elementos estructurales, con la finalidad de proponer un modelo de estudio a nivel molecular y estructural para explicar el mecanismo de reacción (Dorfmueller et al., 2014). Este estudio sin embargo, siendo una aproximación demasiado teórica y sin ninguna base experimental, deja muchas dudas al respecto.

Debido a ello, lo que seguía en pie, era la necesidad de obtener una quitina sintasa aislada y evaluar las características estructura-función, ya que éste es el camino para entender cómo funciona una enzima. En este sentido, el primer acercamiento es obtener una proteína, generalmente recombinante, para estudiar sus características bioquímicas, fisicoquímicas, termodinámicas y por supuesto, estructurales. Sin embargo, en muchos casos, el primer reto es la obtención de una proteína recombinante soluble para los ensayos que así lo requieran. En el caso de la purificación de una quitina sintasa, la cual sintetiza el segundo polímero más abundante sobre el planeta Tierra, es de gran importancia para conocer la relación estructura-función, que a la fecha no se ha podido establecer, limitándose al conocimiento de la estructura de sus genes y la biología celular de la quitina sintasa.

Por ello, en el presente trabajo de tesis, seguimos esa alternativa, intentando expresar una quitina sintasa que poseyese todos los motivos firma de estas enzimas, y los cuales son importantes para su actividad (Ruiz-Herrera et al., 2002; Salgado-Lugo et al., 2016) usando un sistema de expresión heterólogo en la bacteria de expresión por excelencia, *Escherichia coli*. Tomando en consideración que, en general las quitina sintasa contienen muchos dominios transmembranales, se buscó que la enzima quitina sintasa candidato tuviese un mínimo de residuos hidrofóbicos, ya que el excesivo número de dominios transmembranales es posiblemente la razón por lo que no se han podido purificar las quitina sintasas. Este análisis nos llevó a seleccionar a una quitina sintasa de *Rhizopus oryzae* que denominamos RoChs1, la cual solo posee un residuo hidrofóbico, probablemente transmembranal, hacia el

carboxilo terminal. Sin embargo observamos que esta proteína no se expresaba en el sistema de expresión heterólogo, por lo cual se desarrolló una variante que tuviera éste fragmento deletado, la cual sí fue expresada correctamente por la cepa de *E. coli*. Desafortunadamente la mayoría de la enzima sintetizada estaba presente en cuerpos de inclusión (IB), y en los intentos por tratar de extraerla de los mismos, el uso de diferentes compuestos y condiciones de extracción fue un objetivo importante. Por ello se recurrió al uso de agentes solubilizantes que fueron removidos por diálisis, sin embargo en todos los casos la enzima se agregó y desnaturizó en estas condiciones.

Es importante, sin embargo, hacer notar que el uso del detergente LMNG (lauril maltosa neopentil glicol ; Chae *et al.*, 2010) ayudó favorablemente a obtener una fracción de la enzima que permaneció en el sobrenadante de la centrifugación a baja velocidad, y que se usó en la mayoría de los experimentos de análisis de las propiedades de la enzima. Es factible que, como se ha señalado, este detergente haya evitado el desplegamiento de la proteína, mimetizando las fuerzas laterales y la curvatura de una membrana celular, importantes para el mantenimiento estructural de las proteínas (Botelho *et al.*, 2006).

Algunas propiedades bioquímicas sobresalen por el contraste que hay con algunos datos que se han obtenido con extractos crudos de diferentes hongos que contienen una mezcla de quitina sintasas (Ruiz-Herrera, 1992;1982). La K_m aparente medida para Rochs1 Δ TD fue de 10 a 60 veces más alta que las descritas para las fracciones crudas de membranas y de los quitosomas, lo cual revela una afinidad extremadamente baja para el substrato, probablemente porque no contiene el resto de la proteína (30 aa del dominio transmembranal eliminado), o por la falta de residuos que contienen las quitina sintasas de la misma Clase II.

Respecto a la concentración baja del ion Mg^{++} requerido para la actividad de la Rochs1 Δ TD, y cuyas concentraciones, normalmente óptimas para las preparaciones crudas de quitina sintasas fueron tóxicas para la enzima Rochs1 Δ TD, esto puede ser debido al diferente plegamiento de la quitina sintasa en el detergente LMNG, que aquel que mantienen las quitina sintasas en la membrana. Por otro lado es

conveniente señalar que en algunas preparaciones crudas, el requerimiento metálico solo se puso de manifiesto cuando éstas se dializaron contra EDTA (que como se sabe es un quelante de iones metálicos divalentes), lo que sugiere que restos del ion pueden estar fuertemente asociados a la enzima (Ruiz-Herrera, 1992). La misma posible explicación que en el caso del Mg^{++} , puede aplicarse al efecto de la temperatura, ya que normalmente las quitina sintasas tienen valores óptimos más o menos restringidos, en contraste con el amplio rango mostrado por la enzima en estudio. Se puede indicar que el comportamiento diferente puede deberse a la pérdida del dominio transmembranal, y sugerir que los residuos de la superficie juegan un papel importante en esta diferencia de comportamiento. Las quitina sintasa de los hongos tienen numerosos dominios transmembranales que les proporcionan una estructura más rígida, mientras que la pequeña RoChs1 de *R. oryzae* debe tener una estructura muy flexible en su sitio activo que se adapta a un rango mayor de temperaturas. Además, se sabe que la actividad a pH lejanos a los pH óptimos es producto de los residuos laterales de la superficie de las proteínas (sumamente reducidos en la proteína Rochs1 Δ TD (Segel, 1993).

Otra notable diferencia fue el efecto causado por proteólisis con tripsina sobre la actividad de la enzima, el cual fue prácticamente despreciable. Sin embargo esto no es inusual, pues el efecto por proteólisis es variable, y esto depende de la quitina sintasa y de la concentración de la proteasa (Ruiz-Herrera *et al.*, 1977), mientras unas son activadas, otras no lo son, e incluso pueden ser destruidas totalmente por efecto de la proteólisis (Ruiz-Herrera, 1992).

Un resultado importante fue la demostración que la proteína Rochs1 Δ TD identificada con un anticuerpo específico y que es la responsable de la actividad enzimática, como lo demostró la tinción de la quitina sintetizada en geles teñidos con calcofluor.

En lo que se refiere a la estructura y morfología del producto sintetizado por la enzima Rochs1 Δ TD, los resultados obtenidos fueron notables. Primeramente, cabe hacer notar que éste fue demostrado ser quitina, por su susceptibilidad al efecto hidrolítico de la quitinasa, y por los análisis de ATR-FTIR, en la cual sometimos el

producto a un barrido sobre el espectro del infrarrojo de 4000 cm^{-1} – 500 cm^{-1} que demostró que éste era realmente quitina, con toda seguridad α -quitina, ya que las bandas a 1527 cm^{-1} y 1627 cm^{-1} son las indicativas de ello, además de la banda 898 cm^{-1} característica del enlace β -glicosídico (Brunner *et al.*, 2009). Esta identificación se comprobó por comparación con el interferograma de quitina comercial, utilizada como control positivo.

Adicionalmente, la evaluación de la auto-fluorescencia natural del compuesto sintetizado por la quitina sintasa estudiada, determinada a una longitud de onda de excitación de 300 nm y de emisión de 490 nm, confirmó que se trataba de quitina de acuerdo con lo que se ha señalado en la literatura (Pöhlker *et al.*, 2012). Más interesante quizás, fue el alto peso molecular del producto revelado porque permanecía en el origen al ser sometido a cromatografía en papel y era retenido en filtros de fibra de vidrio. Estos resultados, primeramente van en contra de la sugerencia de que la fracción hidrofóbica de las Chs en la región carboxilo se requiere para el alargamiento y extrusión del polisacárido, como lo señalaron Dorfmueller *et al.* (2014), y en segundo lugar muestran que la enzima soluble se comporta como una quitina sintasa verdadera, muy lejos de la función de las enzimas que sintetizan oligosacáridos de GlcNAc formados por 2 o 3 unidades, como el factor de nodulación NodC, que dichos autores propusieron como modelo de la función de las quitinas sintasas.

Como se describió en el capítulo de Resultados, la estructura y morfología del producto mostró semejanzas y diferencias con el sintetizado por los quitosomas que poseen un número grande de moléculas de quitina sintasas iguales o diferentes (Bracker *et al.*, 1976), y la quitina que se deposita en la pared celular de los hongos por la actividad de las diferentes quitina sintasas que poseen asociadas al plasmalema (por ej. Aronson y Preston, 1960).

La observación por medio de microscopía electrónica de transmisión (TEM por sus siglas en inglés) de muestras del producto, demostró que éste estaba constituido por microfibrillas muy cortas inmersas en un material fundamentalmente amorfo. Esta

misma morfología se observó por tinción con calcofluor (el cual tiñe polisacáridos cristalinos) o por auto-fluorescencia.

Las observaciones por medio de microscopia de fuerza atómica (AFM) dieron resultados incluso más concluyentes sobre la morfología de la quitina sintetizada *in vitro* por la enzima Rochs1 Δ TD. Estos análisis revelaron, al igual que se señaló arriba, de la presencia de una mezcla de microfibrillas y algunas regiones amorfas menores en el producto. Cabe señalar que la estructura microfibrilar revela la existencia de una estructura cristalina, en tanto que la fracción amorfa implica que muchas cadenas de quitina se asocian de manera desorganizada. Esto contrasta con las microfibrillas de quitina presentes en la pared celular de los hongos y las sintetizadas por los quitosomas.

Igualmente el análisis de la quitina sintetizada *in vitro* por medio de difracción de rayos X, mostró que el material era de muy baja cristalinidad, aunque cabe señalar que el instrumento usado imponía severos problemas sobre la cantidad de muestra, ya que requería cantidades 10 o más veces mayores que las que podíamos acumular de múltiples incubaciones de nuestra enzima.

Estas diferencias en morfología y cristalinidad entre el producto sintetizado *in vitro* por la enzima en estudio y la quitina sintetizada *in vivo* o por los quitosomas, son posiblemente debidas a que en los quitosomas y el plasmalema, múltiples moléculas de Chs están asociadas unas con otras, permitiendo que las cadenas de quitina sintetizadas se asocien de inmediato formando las microfibrillas, en tanto que en el caso aquí estudiado, las moléculas de la enzima están en forma soluble, sin ningún arreglo espacial, lo que impone restricciones en la asociación de las moléculas de quitina sintetizadas.

Las observaciones estudiadas por medio de microscopía de fuerza atómica (AFM) dieron resultados más concluyentes sobre la morfología de la quitina sintetizada *in vitro* por la enzima Rochs1 Δ TD. Estos análisis revelaron la presencia de una mezcla de microfibrillas y algunas regiones amorfas menores en el producto.

En lo que se refiere al papel que desempeña *in vivo* la quitina sintasa seleccionada (RO3G_00942, RoChs1) en el hongo *Rhizopus oryzae*, esto es un

problema complejo dado que éste posee 24 genes que codifican quitina sintasas (Ma *et al.*, 2009). La evidencia sugiere que la *CHS1* no es un pseudogen, dada la información que se obtiene de expresión de su transcrito determinada por RT-PCR semi-cuantitativo (Ma *et al.*, 2009), así como por los datos obtenidos en el presente trabajo. De acuerdo a los resultados obtenidos *in vitro*, podemos insinuar que podría estar involucrada en mecanismos de reparación de la pared celular dada su naturaleza. Sin embargo es necesario insistir en que los datos de su actividad y la naturaleza del producto, muestran que la fracción hidrofóbica localizada en las quitina sintasas en la región carboxilo-terminal no es necesaria ni para la actividad, ni es requerida para formar un túnel donde se empuja la quitina al exterior como lo proponen Dorfmueller *et al.* (2014), ya que basta el corto fragmento hidrofóbico de la RoChs1, para cumplir con estas funciones.

En suma, es importante señalar que el presente estudio en donde por primera ocasión ha sido posible obtener una proteína recombinante parcialmente purificada de quitina sintasa en un sistema de expresión heterólogo y que además es activa, marca el camino a seguir para la posterior obtención y purificación de Chs de alto peso molecular que puedan ser usadas para determinar sus mecanismos de actividad y de formación de las microfibrillas de quitina.

VII. CONCLUSIONES

El presente trabajo proporcionó información valiosa sobre la posibilidad de expresar una quitina sintasa fúngica en un sistema bacteriano heterólogo. Para ello se seleccionó una quitina sintasa del hongo Zygomycota *Rhizopus oryzae*, cuyo uso fue de utilidad por diferentes aspectos:

1. La quitina sintasa seleccionada fue RoChs1 (RO3G_00942) de *Rhizopus oryzae*, la cual es una proteína de bajo peso molecular que contiene solo un dominio transmembranal hacia el C-terminal, pero posee intactas las zonas de los dominios conservados, sugeridos como catalíticos. Estas características facilitaron su expresión en el sistema heterólogo, ya que las quitina sintasas tienen un gran número de residuos transmembranales hidrofóbicos, lo que ha impedido su purificación y expresión heteróloga.
2. Para lograr la clonación y expresión recombinante de la quitina sintasa fue necesario eliminar el dominio transmembranal, obteniendo una mutante que se denominó RoChs1 Δ TD, y emplear el cDNA correspondiente, ya que el gen posee dos intrones.
3. Los aspectos clave para la obtención de la proteína RoChs1 Δ TD, recombinante incluyeron la utilización de un vector de expresión inducible en frío (pCold I) y una cepa bacteriana híbrida de expresión (*E. coli* BL21Star/Rosetta2).
4. La proteína recombinante se acumuló en cuerpos de inclusión lo que dificultó su purificación, pero ésta se logró por cromatografía de afinidad con bajos rendimientos, disolviéndolos en urea.
5. Independientemente del método de solubilización de los cuerpos de inclusión por diferentes procedimientos, la diálisis del agente solubilizante condujo a la precipitación e inactivación de la enzima.

6. El empleo de un detergente de última generación, lauril maltosa neoptentil glicol (LMNG), capaz de mimetizar las condiciones membranales, permitió obtener una fracción soluble con actividad enzimática.
7. Se observó que la enzima solubilizada tenía baja afinidad por la UDP-GlcNAc que es el el substrato donador de las unidades de GlcNAc.
8. La quitina sintasa recombinante fue activa en un amplio rango de temperatura y pH, y requería solo una baja concentración del ion Mg^{++} como cofactor. Estas propiedades difieren de lo que está descrito para las fracciones membranales crudas y los quitosomas, lo cual se supone que es debido a la ausencia de los componentes transmembranales hidrofóbicos existentes normalmente en éstas enzimas.
9. Por medio de la determinación de la actividad en *in gel* y experimentos de “Western blot” se demostró que la proteína de 55kDa era la RoChs1 Δ TD, responsable de la actividad enzimática.
10. Se logró caracterizar el producto sintetizado por la enzima RoChs1 Δ TD recombinante, como quitina de un alto PM, y con una morfología parcialmente microfibrilar, pero el cual es diferente estructuralmente de las microfibrillas sintetizadas por las fracciones membranales crudas y los quitosomas. Posiblemente el hecho de que las moléculas de las preparaciones de la enzima RoChs1 Δ TD sean solubles y no asociadas, como ocurre con aquellas, impida la correcta asociación del producto para dar lugar a las típicas microfibrillas de quitina.
11. El hecho de que la quitina sintetizada por la enzima RoChs1 Δ TD recombinante sea de un alto PM, demuestra que la fracción C-terminal hidrofóbica transmembranal, de la cual carece, no es requerida para la formación de la cadena de quitina como fue propuesta en un modelo “*in silico*”.

VIII. PERSPECTIVAS

Con un enfoque hacia la determinación de la relación que existe entre estructura y función de la quitina sintasa, se deben obtener condiciones que favorezcan la purificación y homogeneidad de esta proteína recombinante, u otra con similares características. En otras palabras, es de suma importancia poder realizar ensayos de cristalografía y/o crio-microscopía electrónica, pues hasta la fecha la estructura molecular y el mecanismo de fibrilogénesis de las quitina sintasas, no se han podido determinar experimentalmente.

Considerando la baja actividad de esta proteína recombinante, es importante lograr condiciones que impidan la formación de cuerpos de inclusión en las bacterias que sinteticen la enzima. Alternativamente será necesario determinar condiciones de solubilización de la enzima activa a partir de los cuerpos de inclusión. Y finalmente sería aconsejable hacer una búsqueda de quitina sintasas de hongos o de miembros de otros Reinos de organismos vivos, para obtener otros candidatos a evaluar, para ser expresados en sistemas recombinantes.

Es también importante determinar cual es la función de la RoChs1 en el hongo *Rhizopus oryzae*. Para ello se podría recurrir a su mutación y análisis de las mutantes nulas obtenidas. Otro aspecto sería la determinación de su localización celular en el hongo, por medio de técnicas de microscopía.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Abramczyk, D., Szaniszlo, P.J., 2009. Immunoaffinity purification of the class V chitin synthase of *Wangiella (Exophiala) dermatitidis*. *Prep. Biochem. {&} Biotechnol.* 39, 277–288. doi:10.1080/10826060902953244
- Aronson, J.M., Preston, R.D., 1960. The microfibrillar structure of the cell walls of the filamentous fungus, *Allomyces*. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 8, 247–56.
- Arroyo-Begovich, A., Ruiz-Herrera, J., 1979. Proteolytic Activation and Inactivation of Chitin Synthase from *Neurospora crassa*. *J. Gen. Microbiol.* 113, 339–345. doi:10.1099/00221287-113-2-339
- Banks, I.R., Specht, C.A., Donlin, M.J., Gerik, K.J., Levitz, S.M., Lodge, J.K., Banks, I.R., Specht, C.A., Donlin, M.J., Gerik, K.J., Levitz, S.M., Lodge, J.K., 2005. A Chitin Synthase and Its Regulator Protein Are Critical for Chitosan Production and Growth of the Fungal Pathogen *Cryptococcus neoformans* A Chitin Synthase and Its Regulator Protein Are Critical for Chitosan Production and Growth of the Fungal Pathogen C. doi:10.1128/EC.4.11.1902
- Barreto, L., Sorais, F., Salazar, V., San-Blas, G., Niño-Vega, G.A., 2010. Expression of *Paracoccidioides brasiliensis* CHS3 in a *Saccharomyces cerevisiae* chs3 null mutant demonstrates its functionality as a chitin synthase gene. *Yeast* 27, 293–300. doi:10.1002/yea.1748
- Bartnicki-Garcia, S., Bracker, C.E., Reyes, E., Ruiz-Herrera, J., 1978. Isolation of chitosomes from taxonomically diverse fungi and synthesis of chitin microfibrils in Vitro. *Exp. Mycol.* 2, 173–192. doi:10.1016/S0147-5975(78)80031-0
- Behr, J.-B., 2011. Chitin Synthase, a Fungal Glycosyltransferase that Is a Valuable Antifungal Target. *Chim. Int. J. Chem.* 65, 49–53. doi:10.2533/chimia.2011.49
- Blackwell, J., Parker, K.D., Rudall, K.M., 1967. Chitin fibres of the diatoms *Thalassiosira fluviatilis* and *Cyclotella cryptica*. *J. Mol. Biol.* 28, 383–5.
- Botelho, A.V., Huber, T., Sakmar, T.P., Brown, M.F., 2006. Curvature and Hydrophobic Forces Drive Oligomerization and Modulate Activity of Rhodopsin in

- Membranes. *Biophys. J.* 91, 4464–4477. doi:10.1529/biophysj.106.082776
- Bracker, C.E., Ruiz-Herrera, J., Bartnicki-Garcia, S., 1976. Structure and transformation of chitin synthetase particles (chitosomes) during microfibril synthesis in vitro 73, 4570–4574.
- Braconnot, H., 1811. Sur la nature des Champignons. *Ann. Chim.* 79, 265–304.
- Braun, P.C., Calderone, R.A., 1979. Regulation and solubilization of *Candida albicans* chitin synthetase. *J. Bacteriol.* 140, 666–670.
- Brunner, E., Ehrlich, H., Schupp, P., Hedrich, R., Hunoldt, S., Kammer, M., Machill, S., Paasch, S., Bazhenov, V. V, Kurek, D. V, Arnold, T., Brockmann, S., Ruhnow, M., Born, R., 2009. Chitin-based scaffolds are an integral part of the skeleton of the marine demosponge *Ianthella basta*. *J. Struct. Biol.* 168, 539–547. doi:10.1016/j.jsb.2009.06.018
- Bulawa, C.E., 1992. CSD2, CSD3, and CSD4, genes required for chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the CSD2 gene product is related to chitin synthases and to developmentally regulated proteins in *Rhizobium* species and *Xenopus laevis*. *Mol. Cell. Biol.* 12, 1764–76.
- Bulawa, C.E., Osmond, B.C., 1990. Chitin synthase I and chitin synthase II are not required for chitin synthesis in vivo in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 7424–7428. doi:10.1073/pnas.87.19.7424
- Bulawa, C.E., Slater, M., Cabib, E., Au-Young, J., Sburlati, A., Adair, W.L., Robbins, P.W., 1986. The *S. cerevisiae* structural gene for chitin synthase is not required for chitin synthesis in vivo. *Cell* 46, 213–25.
- Cabib, E., Arroyo, J., 2013. How carbohydrates sculpt cells: chemical control of morphogenesis in the yeast cell wall. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 648–655. doi:10.1038/nrmicro3090
- Campos-Gongora, E., Ebert, F., Willhoeft, U., Said-Fernández, S., Tannich, E., 2004. Characterization of Chitin Synthases from *Entamoeba* 155, 323–330.
- Cappelletty, D., Eiselstein-McKittrick, K., 2007. The echinocandins. *Pharmacotherapy* 27, 369–88. doi:10.1592/phco.27.3.369
- Chae, P.S., Rasmussen, S.G.F., Rana, R.R., Gotfryd, K., Chandra, R., Goren, M.A.,

- Kruse, A.C., Nurva, S., Loland, C.J., Pierre, Y., Drew, D., Popot, J.-L., Picot, D., Fox, B.G., Guan, L., Gether, U., Byrne, B., Kobilka, B., Gellman, S.H., 2010. Maltose-neopentyl glycol (MNG) amphiphiles for solubilization, stabilization and crystallization of membrane proteins. *Nat. Methods* 7, 1003–8. doi:10.1038/nmeth.1526
- Choquer, M., Boccara, M., Gonçalves, I.R., Soulié, M.-C., Vidal-Cros, A., 2004. Survey of the *Botrytis cinerea* chitin synthase multigenic family through the analysis of six euascomycetes genomes. *Eur. J. Biochem.* 271, 2153–64. doi:10.1111/j.1432-1033.2004.04135.x
- Chretiennot-Dinet, M.J., GiraudGuille, M.M., Vaultot, D., Putaux, J.L., Saito, Y., Chanzy, H., 1997. The chitinous nature of filaments ejected by *Phaeocystis* (Prymnesiophyceae). *J. Phycol.* doi:10.1111/j.1529-8817.1997.tb03962.x
- Denning, D.W., 2003. Echinocandin antifungal drugs. *Lancet* (London, England) 362, 1142–51. doi:10.1016/S0140-6736(03)14472-8
- Dietrich, S.M., 1975. Comparative studies of hyphal wall components of Oomycetes: Saprolegniae and Pythiaceae. *An. Acad. Bras. Cienc.* 47, 155–162.
- Dorfmueller, H.C., Ferenbach, A.T., Borodkin, V.S., van Aalten, D.M.F., 2014. A structural and biochemical model of processive chitin synthesis. *J. Biol. Chem.* 289, 23020–23028. doi:10.1074/jbc.M114.563353
- Duran, A., Cabib, E., 1978. Solubilization and partial purification of yeast chitin synthetase. Confirmation of the zymogenic nature of the enzyme. *J. Biol. Chem.* 253, 4419–4425.
- Erwig, L.P., Gow, N. a. R., 2016. Interactions of fungal pathogens with phagocytes. *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 163–176. doi:10.1038/nrmicro.2015.21
- Fajardo-Somera, R. a, Jöhnk, B., Bayram, Ö., Valerius, O., Braus, G.H., Riquelme, M., 2015. Dissecting the function of the different chitin synthases in vegetative growth and sexual development in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet. Biol.* FG {&} B 75, 30–45. doi:10.1016/j.fgb.2015.01.002
- Flores-Martinez, A., Lopez-Romero, E., Martinez, J.P., Bracker, C.E., Ruiz-Herrera, J., Bartnicki-Garcia, S., 1990. Protein composition of purified chitosomes of *Mucor*

- rouxii. *Exp. Mycol.* 14, 160–168. doi:10.1016/0147-5975(90)90074-4
- Fritz, T.A., Hurley, J.H., Trinh, L.-B., Shiloach, J., Tabak, L.A., 2004. The beginnings of mucin biosynthesis: the crystal structure of UDP-GalNAc:polypeptide alpha-N-acetylgalactosaminyltransferase-T1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 15307–12. doi:10.1073/pnas.0405657101
- Fritz, T.A., Raman, J., Tabak, L.A., 2006. Dynamic association between the catalytic and lectin domains of human UDP-GalNAc:polypeptide alpha-N-acetylgalactosaminyltransferase-2. *J. Biol. Chem.* 281, 8613–9. doi:10.1074/jbc.M513590200
- Glaser, L., Brown, D.H., 1957. The synthesis of chitin in cell-free extracts of *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* 228, 729–42.
- Guerriero, G., Avino, M., Zhou, Q., Fugelstad, J., Clergeot, P.-H., Bulone, V., 2010. Chitin Synthases from *Saprolegnia* Are Involved in Tip Growth and Represent a Potential Target for Anti-Oomycete Drugs. *PLoS Pathog.* 6, e1001070. doi:10.1371/journal.ppat.1001070
- Horikoshi, K., Iida, S., 1964. Studies of the spore coats of fungi. i. isolation and composition of the spore coats of *Aspergillus oryzae*. *Biochim. Biophys. Acta* 83, 197–203.
- Horsch, M., Mayer, C., Rast, D.M., 1996. Stereochemical requirements of chitin synthase for ligand binding at the allosteric site for N-acetylglucosamine 482, 476–482.
- Hussain, H.A., Ward, J.M., 2003. Enhanced Heterologous Expression of Two *Streptomyces griseolus* Cytochrome P450s and *Streptomyces coelicolor* Ferredoxin Reductase as Potentially Efficient Hydroxylation Catalysts 69, 373–382. doi:10.1128/AEM.69.1.373
- Kang, M.S., Elango, N., Mattia, E., Au-Young, J., Robbins, P.W., Cabib, E., 1984. Isolation of chitin synthetase from *Saccharomyces cerevisiae*. Purification of an enzyme by entrapment in the reaction product. *J. Biol. Chem.* 259, 14966–14972.
- Kathiravan, M.K., Salake, A.B., Chothe, A.S., Dudhe, P.B., Watode, R.P., Mukta,

- M.S., Gadhwe, S., 2012. The biology and chemistry of antifungal agents: A review. *Bioorg. Med. Chem.* 20, 5678–5698. doi:10.1016/j.bmc.2012.04.045
- Latge, J.P., 2007. The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Mol. Microbiol.* 66, 279–290.
- Lenardon, M.D., Munro, C. a, Gow, N. a R., 2010. Chitin synthesis and fungal pathogenesis. *Curr. Opin. Microbiol.* 13, 416–423. doi:10.1016/j.mib.2010.05.002
- Lending, C.R., Leal-Morales, C.A., Flores-Martinez, A., Bracker, C.E., Bartnicki_Garcia, S., 1991. Purification and characterization of 16 S chitin synthetase particles from cell walls of *Mucor rouxii*. *Exp. Mycol.* 15, 11–25. doi:10.1016/0147-5975(91)90003-V
- Liao, G., Li, J., Li, L., Yang, H., Tian, Y., Tan, H., 2009. Selectively improving nikkomycin Z production by blocking the imidazolone biosynthetic pathway of nikkomycin X and uracil feeding in *Streptomyces ansochromogenes*. *Microb. Cell Fact.* 8, 61. doi:10.1186/1475-2859-8-61
- Liu, J., Balasubramanian, M.K., 2001. 1,3-beta-Glucan synthase: a useful target for antifungal drugs. *Curr. Drug Targets. Infect. Disord.* 1, 159–69.
- Ma, L.-J., Ibrahim, A.S., Skory, C., Grabherr, M.G., Burger, G., Butler, M., Elias, M., Idnurm, A., Lang, B.F., Sone, T., Abe, A., Calvo, S.E., Corrochano, L.M., Engels, R., Fu, J., Hansberg, W., Kim, J.-M., Kodira, C.D., Koehrsen, M.J., Liu, B., Miranda-Saavedra, D., O’Leary, S., Ortiz-Castellanos, L., Poulter, R., Rodriguez-Romero, J., Ruiz-Herrera, J., Shen, Y.-Q., Zeng, Q., Galagan, J., Birren, B.W., Cuomo, C. a, Wickes, B.L., 2009b. Genomic analysis of the basal lineage fungus *Rhizopus oryzae* reveals a whole-genome duplication. *PLoS Genet.* 5, e1000549. doi:10.1371/journal.pgen.1000549
- Machida, S., Saito, M., 1993. Purification and characterization of membrane-bound chitin synthase. *J. Biol. Chem.* 268, 1702–1707.
- Magellan, H., Drujon, T., Thellend, A., Piffeteau, A., Becker, H.F., 2010. Expression in *E. coli* and characterization of the catalytic domain of *Botrytis cinerea* chitin synthase. *BMC Res. Notes* 3, 299. doi:10.1186/1756-0500-3-299
- Martín-Udíroz, M., Madrid, M.P., Roncero, M.I.G., 2004a. Role of chitin synthase

- genes in *Fusarium oxysporum*. *Microbiology* 150, 3175–3187.
doi:10.1099/mic.0.27236-0
- Martín-Udíroz, M., Madrid, M.P., Roncero, M.I.G., 2004b. Role of chitin synthase genes in *Fusarium oxysporum*. *Microbiology* 150, 3175–87.
doi:10.1099/mic.0.27236-0
- Matsuo, Y., Matsuura, Y., Tanaka, K., Matsuda, H., Kawamukai, M., 2004. Chr4, a *Schizosaccharomyces pombe* homologue of the *Saccharomyces cerevisiae* Chs4p/Skt5p protein, is related to septum formation and is required for the proper localization of Chs2. *Yeast* 21, 1005–19. doi:10.1002/yea.1145
- Mellado, E., Dubreucq, G., Mol, P., Sarfati, J., Paris, S., Diaquin, M., Holden, D.W., Latg, J.P., 2003. Cell wall biogenesis in a double chitin synthase mutant (*chsG* { Δ } / *chsE* { Δ }) of *Aspergillus fumigatus* 38, 98–109.
- Merzendorfer, H., 2013. Chitin synthesis inhibitors: old molecules and new developments. *Insect Sci.* 20, 121–138. doi:10.1111/j.1744-7917.2012.01535.x
- Montgomery, G.W.G., Adams, D.J., Gooday, G.W., 1984. Studies on the Purification of Chitin Synthase from *Coprinus-Cinereus*. *J. Gen. Microbiol.* 130, 291–297.
- Morcx, S., Kunz, C., Choquer, M., Assie, S., Blondet, E., Simond-Côte, E., Gajek, K., Chapeland-Leclerc, F., Expert, D., Soulie, M.-C., 2013. Disruption of *Bcchs4*, *Bcchs6* or *Bcchs7* chitin synthase genes in *Botrytis cinerea* and the essential role of class VI chitin synthase (*Bcchs6*). *Fungal Genet. Biol.* 52, 1–8.
doi:10.1016/j.fgb.2012.11.011
- Morgan, J.L.W., Strumillo, J., Zimmer, J., 2013. Crystallographic snapshot of cellulose synthesis and membrane translocation. *Nature* 493, 181–186.
doi:10.1038/nature11744
- Mort-Bontemps, M., Gay, L., Fèvre, M., 1997. *CHS2*, a chitin synthase gene from the oomycete *Saprolegnia monoica*. *Microbiology* 143 (Pt 6, 2009–20.
doi:10.1099/00221287-143-6-2009
- Mulisch, M., 1993. Chitin in protistan organisms: Distribution, synthesis and deposition. *Eur. J. Protistol.* 29, 1–18. doi:10.1016/S0932-4739(11)80291-9
- Munro, C.A., Gow, N.A., 2001. Chitin synthesis in human pathogenic fungi. *Med.*

- Mycol. 39 Suppl 1, 41–53.
- Munro, C. a, 2013. Chitin and glucan, the yin and yang of the fungal cell wall, implications for antifungal drug discovery and therapy., *Advances in applied microbiology*. Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-407678-5.00004-0
- Odier, A., 1823. Mémoire sur la composition chimique des parties cornées des insectes, 1st ed. Mémoires de la Société d'Histoire naturelle de Paris.
- Perlin, D.S., 2007. Resistance to echinocandin-class antifungal drugs. *Drug Resist. Updat.* 10, 121–130. doi:10.1016/j.drug.2007.04.002
- Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C., Ferrin, T.E., 2004. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* 25, 1605–12. doi:10.1002/jcc.20084
- Pfaller, M.A., Diekema, D.J., 2007. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin. Microbiol. Rev.* 20, 133–63. doi:10.1128/CMR.00029-06
- Pöhlker, C., Huffman, J.A., Pöschl, U., 2012. Autofluorescence of atmospheric bioaerosols - Fluorescent biomolecules and potential interferences. *Atmos. Meas. Tech.* 5, 37–71. doi:10.5194/amt-5-37-2012
- Rast, D.M., Baumgartner, D., Mayer, C., Hollenstein, G.O., 2003. Cell wall-associated enzymes in fungi. *Phytochemistry* 64, 339–366. doi:10.1016/S0031-9422(03)00350-9
- Riquelme, M., 2013. Tip growth in filamentous fungi: a road trip to the apex. *Annu. Rev. Microbiol.* 67, 587–609. doi:10.1146/annurev-micro-092412-155652
- Riquelme, M., Sánchez-León, E., 2014. The Spitzenkörper: A choreographer of fungal growth and morphogenesis. *Curr. Opin. Microbiol.* 20, 27–33. doi:10.1016/j.mib.2014.04.003
- Round, F., Crawford, M., Mann, D., 1990. *The Diatoms : biology & morphology of the genera*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Ruiz-Herrera, J., 2012. *Fungal cell wall : structure, synthesis, and assembly*, Mycology Series.
- Ruiz-Herrera, J., 1992. *Fungal Cell Wall: Structure, Synthesis, and Assembly*, 1 ed.

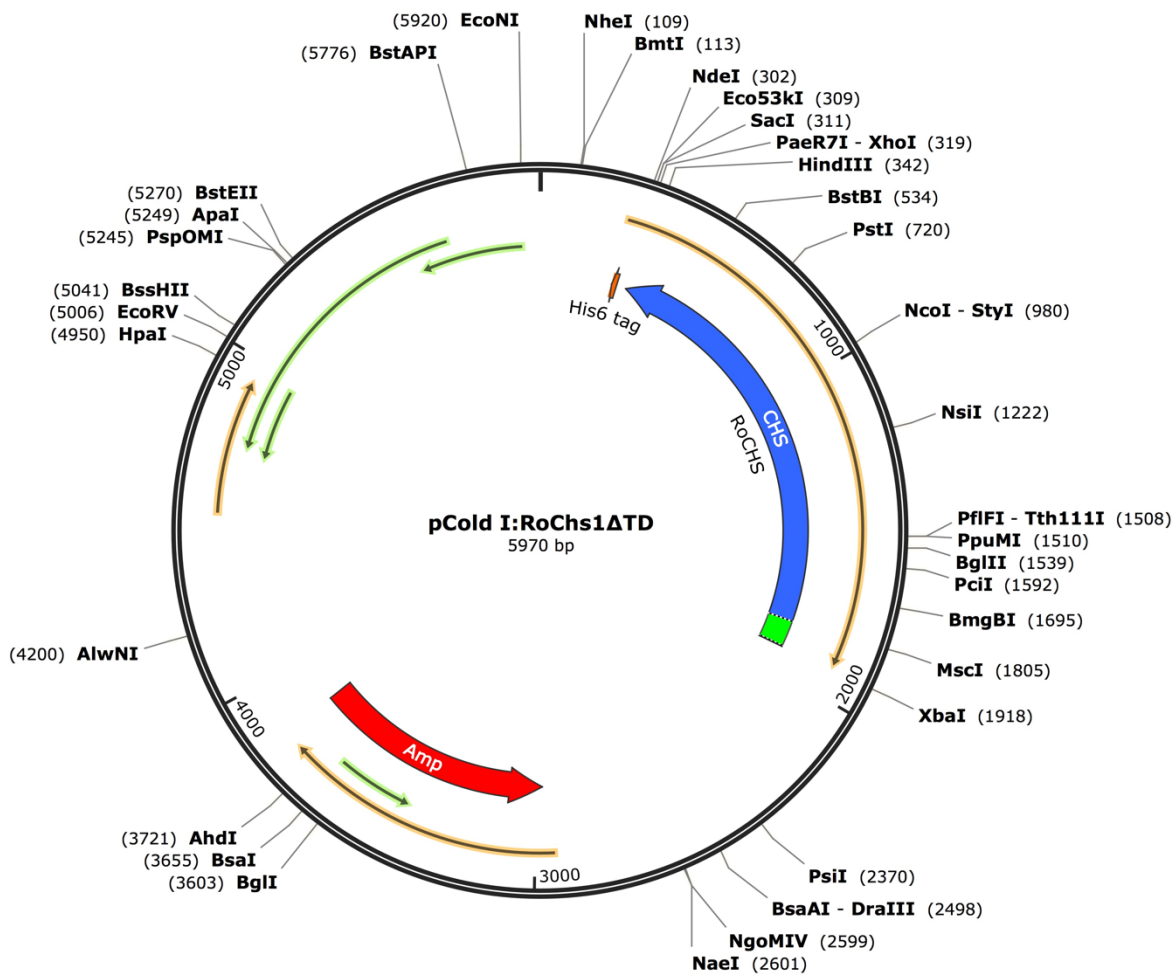
- ed. CRC Press.
- Ruiz-Herrera, J., 1967. Chemical components of the cell wall of *Aspergillus* species. *Arch. Biochem. Biophys.* 122, 118–25.
- Ruiz-Herrera, J., Bartnicki-Garcia, S., 1976. Proteolytic activation and inactivation of chitin synthetase from *Mucor rouxii*. *J. Gen. Microbiol.* 97, 241–9.
doi:10.1099/00221287-97-2-241
- Ruiz-Herrera, J., Bartnicki-Garcia, S., 1974. Synthesis of cell wall microfibrils in vitro by a “soluble” chitin synthetase from *Mucor rouxii*. *Science* 186, 357–9.
- Ruiz-Herrera, J., González-Prieto, J.M., Ruiz-Medrano, R., 2002. Evolution and phylogenetic relationships of chitin synthases from yeasts and fungi. *FEMS Yeast Res.* 1, 247–56.
- Ruiz-Herrera, J., Lopez-Romero, E., Bartnicki-Garcia, S., 1977. Properties of chitin synthetase in isolated chitosomes from yeast cells of *Mucor rouxii*. *J. Biol. Chem.* 252, 3338–43.
- Ruiz-Herrera, J., Martínez-Espinoza, A., 1999. Chitin biosynthesis and structural organization in vivo, in: *Chitin and Chitinases*. pp. 39–53.
- Ruiz-Herrera, J., Ortiz-Castellanos, L., 2010. Analysis of the phylogenetic relationships and evolution of the cell walls from yeasts and fungi. *FEMS Yeast Res.* doi:10.1111/j.1567-1364.2009.00589.x
- Ruiz-Herrera, J., San-Blas, G., 2003. Chitin synthesis as target for antifungal drugs. *Curr. Drug Targets. Infect. Disord.* 3, 77–91.
- Salgado-Lugo, H., Sánchez-Arreguín, A., Ruiz-Herrera, J., 2016. Heterologous expression of an active chitin synthase from *Rhizopus oryzae*. *Fungal Genet. Biol.* doi:10.1016/j.fgb.2016.10.005
- Scheffler, R.J., Colmer, S., Tynan, H., Demain, A.L., Gullo, V.P., 2013. Antimicrobials, drug discovery, and genome mining. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*
doi:10.1007/s00253-012-4609-8
- Segel, I.H., 1993. *Enzyme kinetics: behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems*. John Wiley Sons New York. doi:10.1016/0307-4412(76)90018-2

- Seyedmousavi, S., Verweij, P.E., Mouton, J.W., 2015. Isavuconazole, a broad-spectrum triazole for the treatment of systemic fungal diseases. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 13, 9–27. doi:10.1586/14787210.2015.990382
- Shaw, J.A., Mol, P.C., Bowers, B., Silverman, S.J., Valdivieso, M.H., Durán, A., Cabib, E., 1991. The function of chitin synthases 2 and 3 in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *J. Cell Biol.* 114, 111–23.
- Sheng, W., Yamashita, S., Ohta, A., Horiuchi, H., 2013. Functional differentiation of chitin synthases in *Yarrowia lipolytica*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 77, 1275–81. doi:10.1271/bbb.130111
- Silverman, S.J., Sburlati, A., Slatert, M.L., Cabib, E., 1988. Chitin synthase 2 is essential for septum formation and cell division in *Saccharomyces cerevisiae* 85, 4735–4739.
- Smucker, R.A., Dawson, R., 1986. Products of photosynthesis by marine phytoplankton: Chitin in TCA “protein” precipitates. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 104, 143–152. doi:10.1016/0022-0981(86)90101-2
- Specht, C.A., Liu, Y., Robbins, P.W., Bulawa, C.E., Iartchouk, N., Winter, K.R., Riggle, P.J., Rhodes, J.C., Dodge, C.L., Culp, D.W., Borgia, P.T., 1996. The *chsD* and *chsE* Genes of *Aspergillus nidulans* and Their Roles in Chitin Synthesis 167, 153–167.
- Tang, W.J., Fernandez, J.G., Sohn, J.J., Amemiya, C.T., 2015. Chitin is endogenously produced in vertebrates. *Curr. Biol.* 25, 897–900. doi:10.1016/j.cub.2015.01.058
- Uchida, Y., Shimmi, O., Sudoh, M., Arisawa, M., 1996. Characterization of Chitin Synthase 2 of *Saccharomyces cerevisiae* II : Both Full Size and Processed Enzymes Are Active for Chitin Synthesis 119, 659–666.
- Ueno, K., Namiki, Y., Mitani, H., Yamaguchi, M., Chibana, H., 2011. Differential cell wall remodeling of two chitin synthase deletants Δ *chs3A* and Δ *chs3B* in the pathogenic yeast *Candida glabrata*. *FEMS Yeast Res.* 11, 398–407. doi:10.1111/j.1567-1364.2011.00728.x
- Valdivieso, M.H., Mol, P.C., Shaw, J.A., Cabib, E., Durán, A., 1991. *CAL1*, a gene

- required for activity of chitin synthase 3 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 114, 101–9.
- Van Dellen, K.L., Chatterjee, A., Ratner, D.M., Magnelli, P.E., Cipollo, J.F., Steffen, M., Robbins, P.W., Samuelson, J., 2006. Unique posttranslational modifications of chitin-binding lectins of *Entamoeba invadens* cyst walls. *Eukaryot. Cell* 5, 836–48. doi:10.1128/EC.5.5.836-848.2006
- Verweij, P.E., Snelders, E., Kema, G.H., Mellado, E., Melchers, W.J., 2009. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a side-effect of environmental fungicide use? *Lancet Infect. Dis.* 9, 789–795. doi:10.1016/S1473-3099(09)70265-8
- Wagner, G.P., Lo, J., Laine, R., Almeder, M., 1993. Chitin in the epidermal cuticle of a vertebrate (*Paralipophrys trigloides*, Blenniidae, Teleostei). *Experientia* 49, 317–319. doi:10.1007/BF01923410
- Walker, L.A., Gow, N.A.R., Munro, C.A., 2010. Fungal echinocandin resistance. *Fungal Genet. Biol.* 47, 117–126. doi:10.1016/j.fgb.2009.09.003
- Walker, L.A., Gow, N.A.R., Munro, C.A., 2010. Fungal echinocandin resistance. *Fungal Genet. Biol.* 47, 117–26. doi:10.1016/j.fgb.2009.09.003
- Wattenberg, L.W., Patterson, S., Antonides, J.D., 2010. Chitin or chitin-like glycans as targets for late-term cancer chemoprevention. *Cancer Prev. Res. (Phila.)* 3, 1519–22. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-09-0230
- Wheatley, R.W., Zheng, R.B., Richards, M.R., Lowary, T.L., Ng, K.K.S., 2012. Tetrameric structure of the GlfT2 galactofuranosyltransferase reveals a scaffold for the assembly of mycobacterial Arabinogalactan. *J. Biol. Chem.* 287, 28132–43. doi:10.1074/jbc.M112.347484
- Wiederhold, N.P., 2007. Attenuation of echinocandin activity at elevated concentrations: a review of the paradoxical effect. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 20, 574–8. doi:10.1097/QCO.0b013e3282f1be7f
- Wijesena, R.N., Tissera, N., Perera, R., de Silva, K.M.N., 2014. Side selective surface modification of chitin nanofibers on anionically modified cotton fabrics. *Carbohydr. Polym.* 109, 56–63. doi:10.1016/j.carbpol.2014.03.035
- Xoconostle-Cazares, B., Leon-Ramirez, C., Ruiz-Herrera, J., 1996. Two chitin

synthase genes from *Ustilago maydis*. *Microbiology* 142 (Pt 2, 377–87.
doi:10.1099/13500872-142-2-377

ANEXO



A. Representación esquemática del plásmido pColdI:RoChs1DTD

El gen que codifica a la proteína RoChs1DTD está insertada entre los sitios *XhoI* y *XbaI* localizado en el sitio de clonación múltiple.

B. Artículo Salgado-Lugo *et al.* 2016.