



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**DILUCIDACIÓN Y ESTUDIO *IN SILICO* DE LA
ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE UNA VERSIÓN
TRUNCADA DE LA LEVANSACARASA LevS DE
Leuconostoc mesenteroides B512F**

Tesis presentada para obtener el título de

LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:
MIGUEL CASTAÑEDA VAQUERA

DIRECTORA DE TESIS:
D.C. CLARITA OLVERA CARRANZA

CODIRECTOR DE TESIS:
D.C EDUARDO TORRES RAMÍREZ

Mayo 2025



El presente trabajo se realizó en los Laboratorios de Investigación en Programas Institucionales del Departamento de ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), en el grupo de Investigación de Polímeros Biocompatibles y Nanobiotecnología de la Dra. Clarita Olvera Carranza.

La realización de este proyecto fue financiada por la UNAM en el marco del proyecto PAPIIT es IN227723 y por el Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT) dentro del proyecto CF-2023-I-1195 y la Beca de Apoyo a Estudiantes de Movilidad del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)

AGRADECIMIENTOS

A mi familia; Miguel Castañeda Lucio, Olga Vaquera Martínez y Paulina Castañeda Vaquera

Por todo. Sin su apoyo, paciencia, confianza y amor incondicional, nada de esto sería posible. Gracias por su comprensión en los momentos de mayor desafío, por sus palabras de aliento y por estar siempre presentes, incluso en la distancia. Su apoyo ha sido mi mayor fortaleza y su ejemplo, mi mayor inspiración.

A la Dra. Clarita Olvera Carranza

Por recibirme en su grupo de trabajo y brindarme su invaluable guía, paciencia y apoyo a lo largo de este proyecto. Su conocimiento, compromiso y orientación ayudaron a ofrecer nuevas perspectivas a los obstáculos que enfrente durante los análisis de este trabajo. Su dedicación y pasión por la investigación han sido una inspiración constante para mí y me han brindado la oportunidad de empezar a ver al mundo “fuera de la caja”.

Al Dr. Eduardo Torres Ramírez

Por haberme iniciado en el mundo de las enzimas y ofrecerme su apoyo técnico. Sus conocimientos teóricos brindados durante las clases de la Licenciatura fueron fundamentales para entender conceptos básicos de este trabajo.

Al Dr. Enrique Rudiño Piñera

Por la ayuda técnica en el apartado de difracción de rayos X, procesamiento de datos y refinamiento de la estructura de LevS N34Tn22, además de las asesorías proporcionadas que me ayudaron a comprender mejor el proceso de la obtención de una estructura cristalográfica de una enzima.

A la Dra. Marcela Ayala Aceves

Por compartir su conocimiento durante los seminarios, los cuales fueron de ayuda para la realización de este proyecto.

A la Dra. Paloma Columba Gil

Por el apoyo técnico brindado durante los experimentos de cristalización de LevS N70Tn38.

A la M.C. Maura Jennifer Martínez Morales

Por su apoyo técnico en la purificación de la enzima LevS N70Tn38 y optimización de este.

A la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA (USSDNA)

Por el apoyo en la síntesis de cebadores y los servicios de secuenciación de DNA que se emplearon en este trabajo.

A la Unidad de Cómputo del Instituto de Biotecnología

Por el mantenimiento actualización, expansión, monitoreo y demás funciones necesarias para el correcto funcionamiento de las redes locales de uso común.

A los miembros del Grupo de Polímeros Biocompatibles y Nanobiotecnología; Brandon, Ingrid, Gerardo, Memo, Maura, Lili, Hana y Ana

Por su tiempo en las reuniones de discusión de resultados e ideas que aportaron a este trabajo, así como los momentos que compartimos tanto fuera como dentro del laboratorio.

A mis amigos del laboratorio de Bioinorgánica Aplicada; Eren, Alexis, Luis, Adriana, y Ulises.

Por su apoyo incondicional, su compañía y las incontables muestras de ánimo que me ofrecieron para sobrellevar los momentos de mayor desafío de este proyecto. Gracias por haber formado parte de esta etapa y, sobre todo, por haberme dado su amistad.

INDICE

INDICE	5
RESUMEN	9
INTRODUCCIÓN	10
FRUCTANAS	10
IMPORTANCIA DE LAS FRUCTANAS	11
FRUCTANSACARASAS	12
REACCIONES QUE CATALIZAN LAS FRUCTANSACARASAS	12
ESTRUCTURA DE LAS FRUCTANSACARASAS.....	13
SUBSITIOS DE UNIÓN A CARBOHIDRATO	16
MECANISMOS MOLECULARES DE LAS FRUCTANSACARASAS	21
FRUCTANSACARASAS MULTIDOMINIO	22
LEVANSACARASA MULTIDOMINIO LevS.....	24
REGIÓN N-TERMINAL	26
DOMINIO CATALÍTICO	26
REGIÓN DE TRANSICIÓN	26
REGIÓN C-TERMINAL	27
CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y CINÉTICA	27
HIPÓTESIS DE LA ESTRUCTURA EN “U” DE LA LEVANSACARASA LEVS	28
ESTUDIOS DE RELACIÓN ESTRUCTURA FUNCIÓN.....	30
JUSTIFICACION	33
HIPÓTESIS	33
OBJETIVOS	33
OBJETIVO GENERAL	33
OBJETIVOS PARTICULARES	34
Identificar los residuos que pertenecen a los bucles dentro del dominio catalítico de LevS mediante alineamiento de secuencia.....	34
MATERIALES Y MÉTODOS	34
APARTADO DE ANÁLISIS COMPUTACIONALES	34
MODELAMIENTO DE LAS VERSIONES TRUNCADAS DE LevS.....	34
ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS PRIMARIAS DE PROTEÍNAS.....	34
ALINEAMIENTO DE LAS ESTRUCTURAS TRIDIMENSIONALES DE LAS PROTEÍNAS.....	35
ACOPLAMIENTO MOLECULAR	35
MAPA DE SUPERFICIES DE POTENCIAL ELECTROSTÁTICO	35

APARTADO DE BIOLOGÍA MOLECULAR	35
DISEÑO DE CEBADORES.....	35
REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) MUTAGÉNICA.....	36
ELECTROFORESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS	38
DIGESTIÓN CON LA ENZIMA <i>Dpnl</i>	38
TRANSFORMACIÓN QUÍMICA.....	39
EXTRACCIÓN DE PLÁSMIDO	39
ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DE LAS MUTANTES.....	40
APARTADO DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS.....	40
EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE LA ENZIMA LevS N70Tn38	40
EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS POR LISIS CELULAR	40
PURIFICACIÓN DE LA ENZIMA LevS N70Tn38 EMPLEANDO CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO	41
CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	41
ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES.....	42
TINCIÓN CON AZUL DE COOMASSIE.....	42
ENSAYOS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	42
APARTADO DE CRISTALOGRAFÍA	43
ENSAYOS DE CRISTALIZACIÓN	43
ENSAYO DE DIFRACCIÓN DE RAYOS X	44
REDUCCIÓN, INDEXACIÓN E INTEGRACIÓN DE DATOS	44
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
DILUCIDACIÓN DE LA ESTRUCTURA CRISTALOGRÁFICA DE LA VERSIÓN TRUNCADA LevS N70Tn38 DE LA LEVANSACARASA LEVS DE <i>Leuconostoc mesenteroides</i> B512F.	44
MODELOS <i>IN SILICO</i> DE LAS VERSIONES TRUNCADAS Δ N85C Y N70Tn38 DE LA LEVANSACARASA LevS EMPLEANDO ALPHAFOLD.	45
PRODUCCIÓN, PURIFICACIÓN Y CRISTALIZACIÓN DE LA VERSIÓN TRUNCADA LevS N70Tn38.....	48
ANÁLISIS DE LOS DATOS DE DIFRACCIÓN DE RAYOS X.....	52
REEMPLAZO MOLECULAR.....	53
DIFRACCIÓN DEL CRISTAL QUE CONTIENE A LevS N70Tn38.....	53
REFINAMIENTO DE LA ESTRUCTRA TRIDIMENSIONAL DE LA VERSIÓN LevS N70Tn38.....	58
ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA LevS N34Tn22.....	61

IDENTIFICACIÓN <i>IN SILICO</i> DE LOS RESIDUOS CATALÍTICOS Y LOS PERTENECIENTES A LOS SUBSITIOS DE RECONOCIMIENTO A CARBOHIDRATO	67
.....	
COMPARACIÓN DE SECUENCIA Y ESTRUCTURA DE LA ENZIMA LevS N34Tn34.	67
.....	
COMPARACIÓN DE LevS CON FRUCTANSACARASAS DE LA SUBFAMILIA GH68_1	68
.....	
COMPARACIÓN ESTRUCTURAL DE LEVS CON LEVANSACARASAS DE LA SUBFAMILIA GH68_2	69
.....	
IDENTIFICACIÓN MEDIANTE ACOPLAMIENTO MOLECULAR DE RESIDUOS QUE PUDIERAN INTERACTUAR CON LOS OLIGOSACÁRIDOS PRODUCTO DE LA SÍNTESIS ENZIMÁTICA	74
ANÁLISIS MEDIANTE ACOPLAMIENTO MOLECULAR DE OTROS RESIDUOS QUE PUDIERAN INTERACTUAR CON EL CARBOHIDRATO	74
.....	
ACOPLAMIENTO MOLECULAR DE LevS N34Tn22 CON UNA MOLÉCULA DE 1-KESTOSA	75
.....	
ACOPLAMIENTO MOLECULAR DE LevS N34Tn22 CON UNA MOLÉCULA DE 1F-FRUCTOFURANOSILNISTOSA	77
.....	
ACOPLAMIENTO MOLECULAR DE LevS N34Tn22 CON UNA MOLÉCULA DE 6-LEVANOHEXAOSA FLEXIBLE	79
.....	
ACOPLAMIENTO MOLECULAR DE LevS N34Tn22 CON 6-LEVANOHEXAOSA RÍGIDA	82
.....	
IDENTIFICACIÓN DE BUCLES PRESENTES EN LevS Y CONSERVACIÓN DE RESIDUOS DEL DOMINIO CATALÍTICO	85
.....	
IDENTIFICACIÓN Y CONSERVACIÓN DE LOS RESIDUOS QUE FORMAN LOS BUCLES DEL DOMINIO CATALÍTICO EN DIVERSAS FRUCTANSACARASAS	85
.....	
CONCLUSIÓN	89
PROSPECTIVAS	90
REFERENCIAS	91
MATERIAL SUPLEMENTARIO O ANEXOS	101
OBTENCIÓN DE LAS MUTANTES AFECTADAS DE LOS RESIDUOS CATALÍTICOS.	101
.....	
GENERACIÓN DE LA MUTANTE LevS N70Tn38 D247A	101
PARÁMETROS DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	101
DIGESTIÓN CON LA ENZIMA DE RESTRICCIÓN <i>DpnI</i> Y TRANSFORMACIÓN	102
EXTRACCIÓN DE PLÁSMIDO Y CONFIRMACIÓN DE LA SECUENCIA	103
OBTENCIÓN DE LA MUTANTE LevS ΔN85C_HS (LevS ΔN85C E123L)	104
DISEÑO DE CEBADORES	104
GENERACIÓN DE LA MUTANTE LevS ΔN85C_HS	104

MEZCLA DE REACCIÓN	105
RESULTADOS PCR EXPLORATORIA	106
DIGESTIÓN CON LA ENZIMA <i>DPM</i> Y ELECTROPORACIÓN	107
CONFIRMACIÓN DE LA MUTACIÓN.....	108
ANÁLISIS COMPLETO DE LAS ESTRUCTURAS SECUNDARIAS DE LA ESTRUCTURA LevS N34TN22	109

RESUMEN

En la actualidad, el número de estructuras cristalográficas de fructansacarasas de origen bacteriano disponibles en la base de datos “Protein Data Bank” (PDB) es bastante limitado. Específicamente, se han reportado siete estructuras cristalográficas de levansacarasa y una única estructura de inulosacarasa, siendo esta última la única estructura de una fructansacarasa multidominio. En el presente trabajo, se dilucidó la estructura cristalográfica “LevS N34Tn22” de la enzima truncada LevS N70Tn38 de la levansacarasa LevS de *Leuconostoc mesenteroides* B512F, con una resolución de 2.5 Å, la cual es la primera estructura cristalográfica de una levansacarasa multidominio.

En la estructura LevS N34Tn22 se identificaron los posibles residuos de la triada catalítica, que son Asp247, que actúa como el nucleófilo, Asp399, que es el estabilizador del estado de transición y Glu497 que funge como el catalizador general ácido/base. Además, se describieron los posibles subsitios de reconocimiento a carbohidrato (-1 al +4) con base en comparaciones de secuencia primaria y estructuras tridimensionales de levansacarasas pertenecientes a las familias GH68_1 y GH68_2, anteriormente reportadas. Los residuos correspondientes para el subsitio -1 incluyen a los residuos Trp246, Ser568, Ser317, Arg398, Leu271, y Trp316. Para el subsitio +1, se sugieren los residuos Arg515 y Lys518, mientras que en el subsitio +2 se encuentran los residuos Asn394 y Arg398. Los residuos asociados a los subsitios +3 y +4 son Asn394 y Tyr389, respectivamente.

Por otro lado, mediante ensayos de acoplamiento molecular se encontraron 16 residuos (Gln281, Asp278, Trp311, Thr340, Gln337, Pro3385, Glu495, Ser517, Asn529, Phe256, Phe560, Tyr567, Asn589, Tyr586, Arg590, Asn591 y Lys593) que parecen jugar un papel importante en el reconocimiento de carbohidratos.

Finalmente, se identificaron las secuencias aminoacídicas y ubicaciones espaciales pertenecientes a los nueve bucles que forman parte de la estructura del dominio catalítico para este tipo de enzimas, destacando a los bucles I, IV, VII, VIII y IX, los

cuales pueden influir en la síntesis de productos al afectar la topología del dominio catalítico de la levansacarasa LevS.

INTRODUCCIÓN

FRUCTANAS

Las fructanas son polímeros de fructosa unidos por enlaces β -glicosídicos que constan de varias unidades, las cuales pueden ser producidos por plantas, hongos y bacterias (Stick y Williams, 2009). El término fructana se utiliza para referirse a los polímeros conformados por cadenas de más de 10 moléculas de fructosa, mientras que, en caso de contener entre 2 y 10 moléculas de fructosa, estaríamos hablando de un oligosacárido, también denominados fructooligosacárido (FOS) (Olvera *et al.*, 2007).

Dependiendo del tipo de enlace que une a las fructosas, las fructanas se pueden dividir en dos grupos: inulinas y levanas. Las inulinas son polímeros conformados por enlaces β -(2-1) en las fructosas de la cadena principal y enlaces β -(2-6) en sus ramificaciones, mientras que las levanas son polímeros que cuentan con enlaces β -(2-6) entre las fructosas de la cadena principal y enlaces β -(2-1) en sus ramificaciones (Figura 1) (Verma *et al.*, 2021)

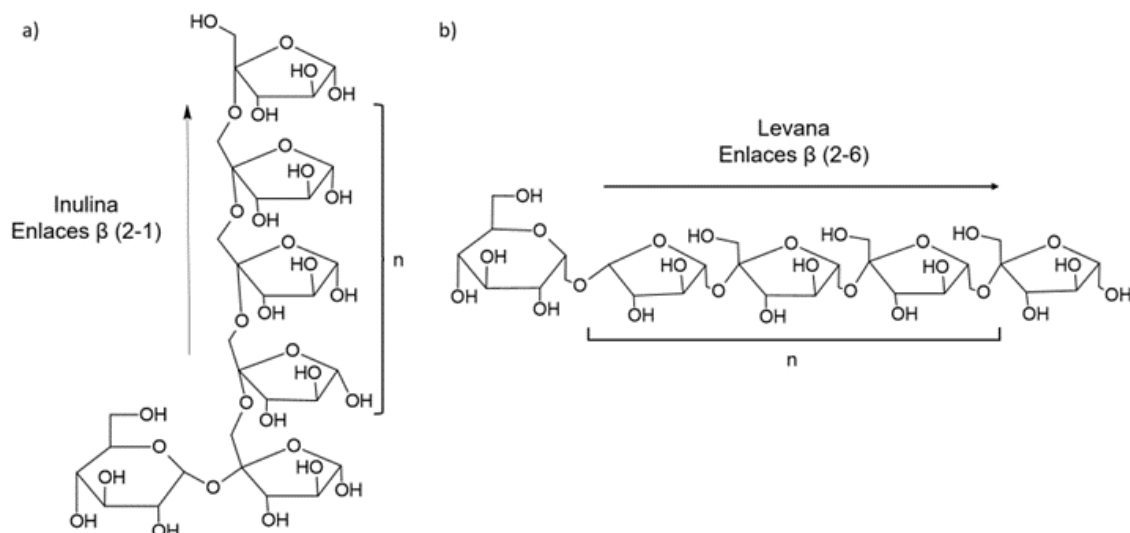


Figura 1. Estructuras de las fructanas a) Inulina y b) Levana no ramificadas (Elaboración propia).

IMPORTANCIA DE LAS FRUCTANAS

Las fructanas son moléculas que poseen importantes aplicaciones biotecnológicas, ya que tienen potencial como edulcorantes bajos en calorías, sustitutos de grasa, viscosificantes, emulsificantes y texturizador (Verma *et al.*, 2021), además de contar con propiedades prebióticas y la capacidad de nanoestructurarse. Gracias a estas propiedades pueden tener diversas aplicaciones en diferentes sectores de la industria como la alimentaria, médica, farmacéutica y cosmética.

En la industria alimentaria, las levanas pueden utilizarse como agentes emulsificantes, espesantes, estabilizantes, endulzantes y espumantes (Mummaleti *et al.*, 2021; Xu *et al.*, 2022). Sin embargo, la principal aplicación de las fructanas en el área alimentaria es como prebiótico, ya que su consumo promueve el crecimiento de bacterias intestinales beneficiosas, como las del género *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, lo cual puede ayudar en el control del crecimiento de bacterias potencialmente patógenas (Roberfroid *et al.*, 2010).

En el área médica y farmacéutica, tienen aplicaciones potenciales en la prevención y tratamiento de enfermedades como úlceras gástricas, cáncer y diabetes (Srikanth *et al.*, 2015; Ragab *et al.*, 2019; Díaz-Ramos *et al.*, 2023; Saleh *et al.*, 2023). Estas aplicaciones se deben a que las fructanas han mostrado propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, antimicrobianas y gastroprotectoras. Además, debido a la capacidad de las fructanas de nanoestructurarse, se ha probado a este tipo de moléculas como nuevos sistemas de administración de fármacos (Tabernerero *et al.*, 2016; Guillen-Tinoco, 2022; Martínez-Morales, 2024).

Tanto la levana como la inulina poseen efectos de proliferación celular, hidratación de la piel y alivian la irritación (Kim *et al.*, 2001). Por lo que, en el área cosmética, las inulinas son utilizadas como parte de la formulación de productos de la compañía Yves Rocher para el cuidado del cabello como shampoos, acondicionadores y mascarillas, aprovechando además su propiedad prebiótica para mantener en equilibrio a la microbiota que se encuentra en la piel (Bustamante *et al.*, 2019). Estos son solo algunos ejemplos que demuestran la amplia gama de aplicaciones biotecnológicas que tienen estos polisacáridos.

FRUCTANSACARASAS

Las fructansacararas (FNs) son un grupo de enzimas que catalizan la síntesis de fructanas mediante la reacción de transferencia del residuo fructosilo de una molécula de sacarosa, la cual es utilizada como sustrato, a una molécula aceptora usualmente otra sacarosa, liberando glucosa al medio de reacción (Olvera *et al.*, 2007). Dependiendo del tipo de fructana que se sintetice, las FNs se pueden clasificar como Inulosacararas (EC 2.4.1.9) las cuales sintetizan inulina; y Levansacararas (EC 2.4.1.10) que sintetizan levana (Phengnoi *et al.*, 2020).

Las FNs de origen procarionte forman parte de la familia de enzimas conocidas como glicosidohidrolasas 68 o GH68. En estudios recientes, se ha propuesto dividir a esta familia de enzimas en dos subfamilias (GH68_1 y GH68_2) en base a redes de similitud de secuencias (“sequence similarity networks”, SSN) y las actividades enzimáticas que estas enzimas presentan (Hornung y Terrapon, 2023). En el caso de las GH68_1, estas enzimas presentan actividades 2.4.1.9 y 2.4.1.10, teniendo como ejemplos a las levansacararas SacB de *Bacillus subtilis* (PDB ID: 1OYG) y LevS de *Leuconostoc mesenteroides* y a la inulosacarasa InuJ de *Lactobacillus johnsonii* (PDB ID: 2YFT), las cuales son enzimas que producen polímero de levana o inulina de alto peso molecular (Meng y Fütterer, 2003; Pijning *et al.*, 2011). Por otro lado, la subfamilia GH68_1 engloba enzimas que también presentan actividades 2.4.1.9 y 2.4.1.10, con la adición de 3.2.1.26 (β -fructofuranosidasa/invertasa), como ejemplos de esta familia de enzimas se encuentran las levansacararas Ea Lsc de *Erwinia amylovora* EtLsc de *Erwinia tasmaniensis* y LsdA de *Gluconoacetobacter diazotrophicus* (PDB ID: 1W18), las cuales se caracterizan por sintetizar **FOS** (Martínez-Fleites *et al.*, 2005; Wuerges *et al.*, 2015; Polsinelli *et al.*, 2019).

REACCIONES QUE CATALIZAN LAS FRUCTANSACARASAS

Las FNs son capaces de catalizar tres tipos de reacciones dependiendo de cuál sea la molécula aceptora: hidrólisis, transfructosilación y reacciones de aceptor (Figura 2). En la reacción de hidrólisis, una molécula de agua funciona como molécula aceptora de la fructosa, liberando tanto fructosa como glucosa al medio. En la reacción de transfructosilación, la enzima utiliza a una molécula de sacarosa o una

fructana en crecimiento como molécula aceptora para generar fructooligosacáridos y/o polímero de un mayor grado de polimerización (GP). En la reacción de aceptor, la molécula que actúa como aceptor es cualquier compuesto exógeno al medio de reacción (por ejemplo, alcoholes primarios, otros mono- o poli-sacáridos, compuestos fenólicos, etc), para generar un fructósido (Chambert *et al.*, 1974; Núñez-López *et al.*, 2018).

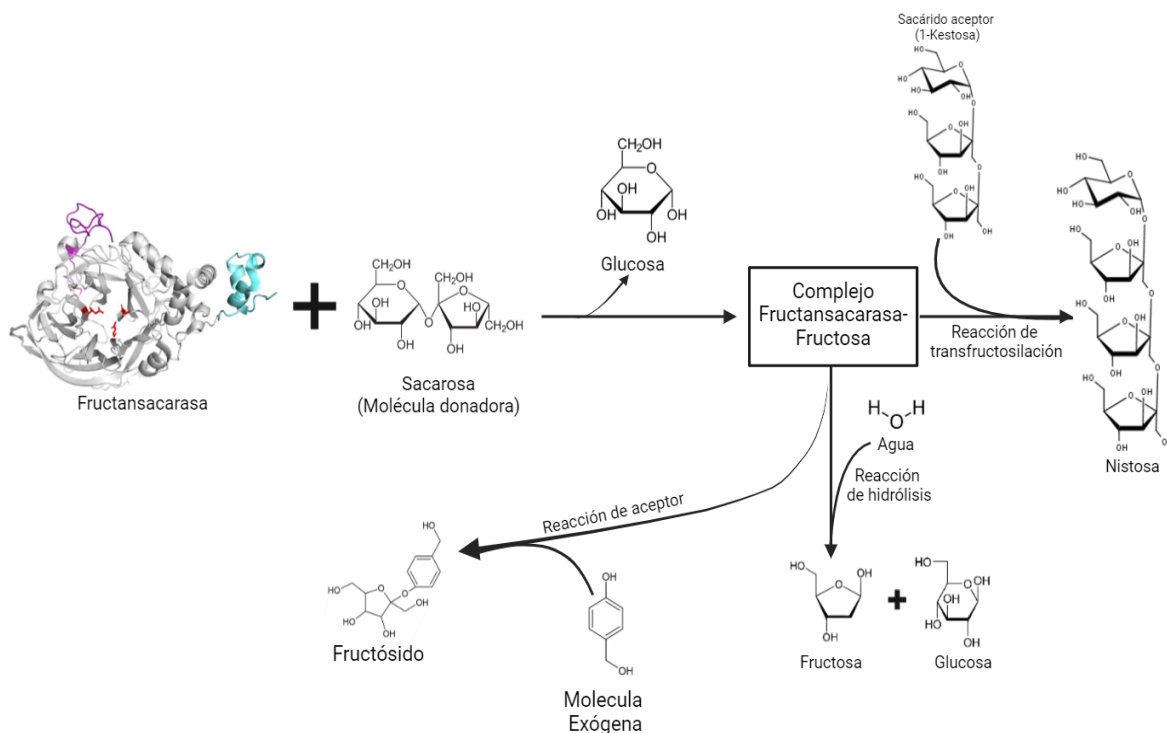


Figura 2: Reacciones catalizadas por las fructansacararas (Adaptado de Martínez-Bahena, 2024).

ESTRUCTURA DE LAS FRUCTANSACARASAS

El dominio catalítico de esta familia de enzimas (GH68) se caracteriza por tener un plegamiento de tipo β -propela de cinco palas β , las cuales cuentan con una topología en forma de "W" compuesta por cuatro hojas β antiparalelas. Estas hojas β generan una estructura tridimensional parecida a un embudo que se encuentra cargado negativamente (Figura 3A). En el fondo de este embudo se encuentran los tres residuos catalíticos, dos residuos de ácido aspártico y un residuo de ácido glutámico, los cuales actúan como nucleófilo, estabilizador del estado de transición y catalizador ácido/base, respectivamente. A estos tres residuos se les denomina como "la triada catalítica" (Figura 3B) (Ozimek *et al.*, 2006; Pijning *et al.*, 2011).

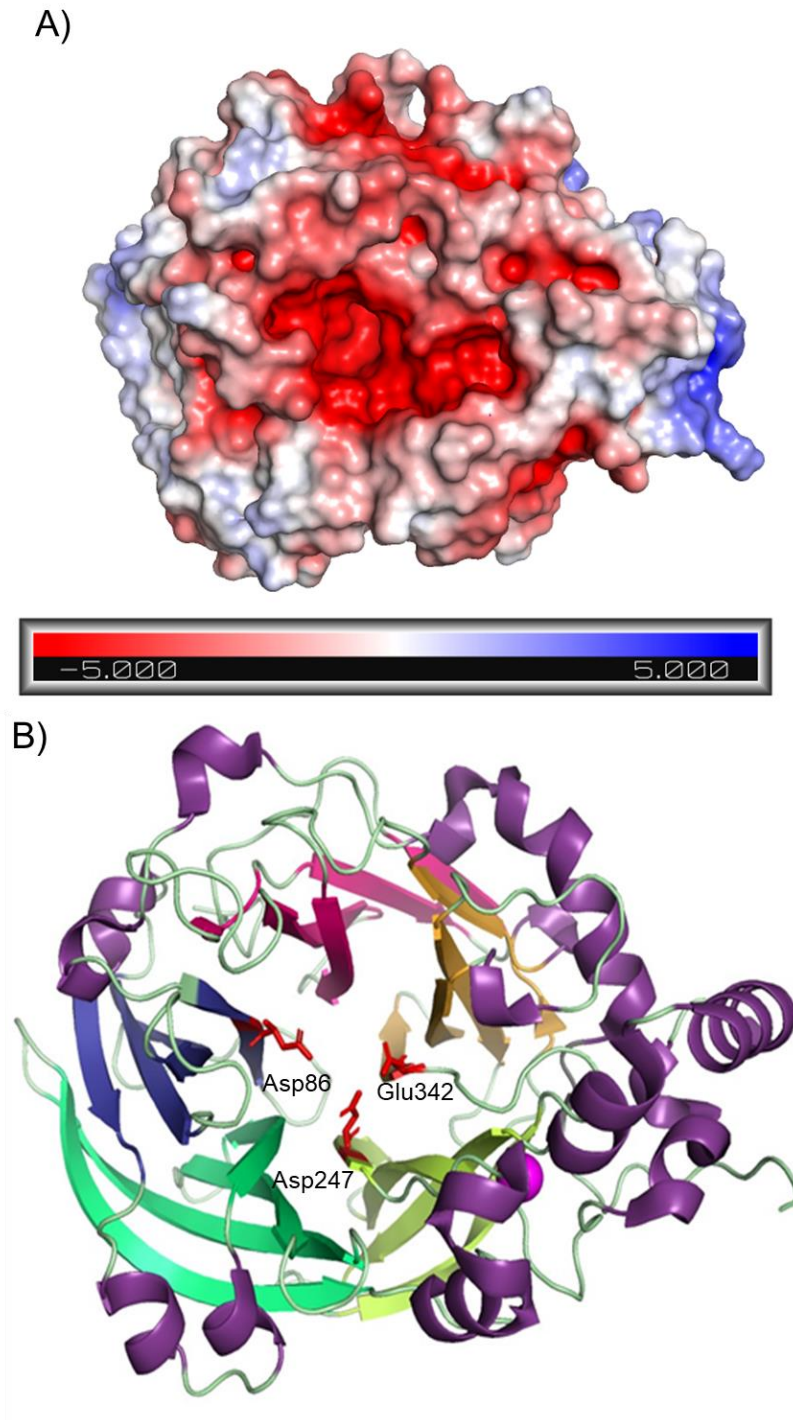


Figura 3. Estructura tridimensional de la levansacarasa SacB de *Bacillus subtilis* (PDB ID: 1OYG) A) Representación en superficie de cargas de la enzima (Rojo: cargado negativamente, Azul: cargado positivamente). B) Representación de las estructuras secundarias de la enzima, en rojo se resaltan los residuos pertenecientes a la triada catalítica. En morado: hélices α y hélices 3_{10} , en verde pálido: bucles de la estructura de β -propela de cinco palas, en verde: pala I, verde lima, pala II, en naranja pala III, en rosa: pala IV y en azul: pala V (Elaboración propia).

Meng y Fütterer (2003) obtuvieron la estructura cristalográfica de la levansacarasa unidominio (SacB) de *Bacillus subtilis* en su forma de apoenzima y unida a su sustrato (sacarosa); estas estructuras fueron resueltas del residuo 34 al 473, mediante el método de Reemplazo Isomorfo Múltiple con resoluciones de 1.5 y 2.1 Å, respectivamente. La enzima cuenta con una estructura de β-propela de cinco palas anteriormente descrita. Además, se puede observar una estructura en forma de “abrazadera” que rodea las palas IV y V que termina en la pala I (Figura 4). Esta estructura consta de una hoja-β que agrega una quinta hoja a la pala III, una hélice α1 y tres hélices 3₁₀. Además de esta estructura de abrazadera, se encontró una estructura helicoidal (conformada por dos hélices α y una hélice 3₁₀) que conecta a las hojas B y C en la pala III, permitiendo la formación de dos puentes de hidrógeno que estabilizan al extremo N-terminal. Cerca de esta estructura helicoidal, hay un sitio de unión a Ca²⁺, el cual fue asignado al residuo Thr265.

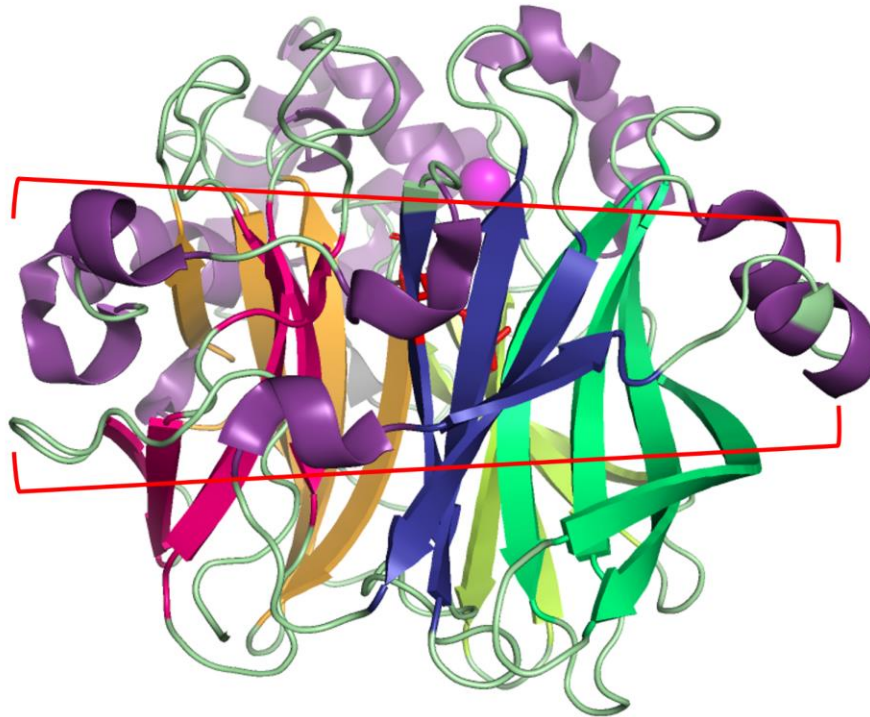


Figura 4. Vista lateral de la enzima SacB. En rojo: estructura de abrazadera formada por bucles y hélices (verde pálido y morado) que rodea las hojas IV (naranja) y V (azul) que termina en la pala I (Verde) (Elaboración propia).

SUBSITIOS DE UNIÓN A CARBOHIDRATO

En estudios posteriores, Meng y Fütterer (2008) cristalizaron a la levansacarasa SacB en complejo con dos sustratos: sacarosa y el trisacárido rafinosa (galactosa-glucosa-fructosa). En la estructura de la enzima con el trisacárido pudieron observar la aparición de subsitios de unión a carbohidratos, los cuales son divisiones del sitio catalítico. Estos subsitios fueron nombrados anteriormente en las enzimas glicósil hidrolasas y se enumeran de -n (extremo no reductor) a +n (extremo reductor), mientras que la escisión del enlace glicosídico se produce entre los subsitios -1 y +1 (Figura 5) (Davies *et al.*, 1997).

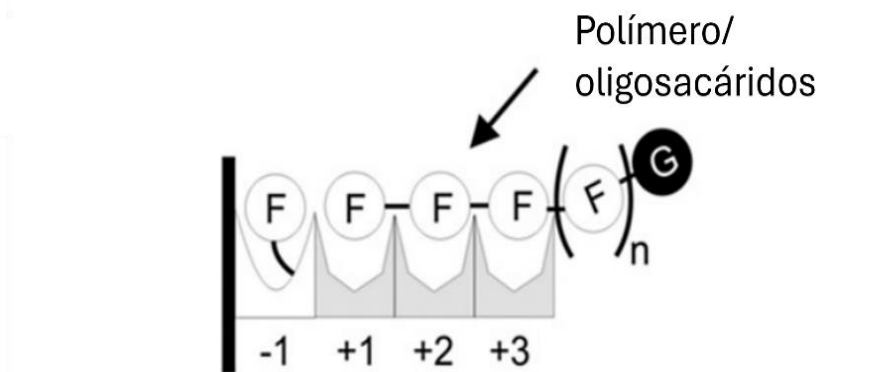


Figura 5. Representación esquemática de los subsitios de unión a carbohidrato de una fructansacarasa (Modificada de Pijning *et al.* 2011).

En esta estructura se definieron los subsitios -1, +1 y +2 en referencia a las posiciones de los residuos de rafinosa en la cavidad catalítica. Se nombró subsitio -1 a los residuos que interactúan con la fracción de fructosa, por su parte, se nombraron subsitio +1 y +2 a los residuos que interactúan con las fracciones de glucosa y galactosa respectivamente (Figura 6).

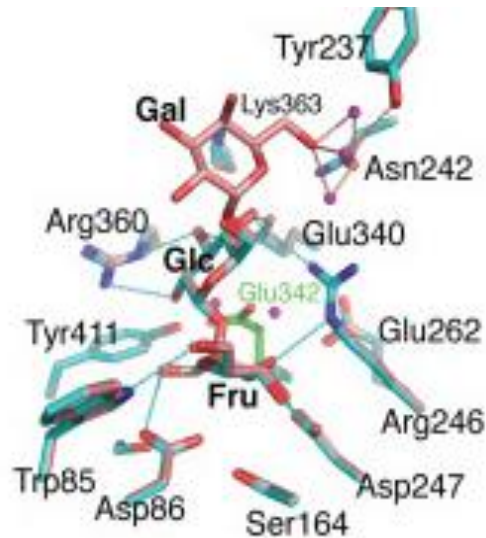


Figura 6: Subsitios de unión a carbohidratos -1, +1 y +2 identificados en el complejo de la levansacarasa SacB con Rafinosa (Tomada de Meng y Fütterer, 2008).

En el subsitio +1, los hidroxilos 2, 3 y 4 de la fracción glucosílica forman puentes de hidrógeno con los residuos Arg360 y Glu340 de la enzima SacB, provocando así, las orientaciones definidas de las fracciones fructosilo y glucosilo, posicionando a la unidad de fructosa a una distancia de 3.2 Å de distancia del nucleófilo Asp86 y al oxígeno glucosídico a aproximadamente 2.5 Å del carboxilato del catalizador ácido/base Glu342 (Figura 7). A diferencia de estos dos residuos, el hidroxilo 6 de la fracción glucosilo forma puentes de hidrógeno con los residuos Asn242 y Tyr237 mediante moléculas de agua.

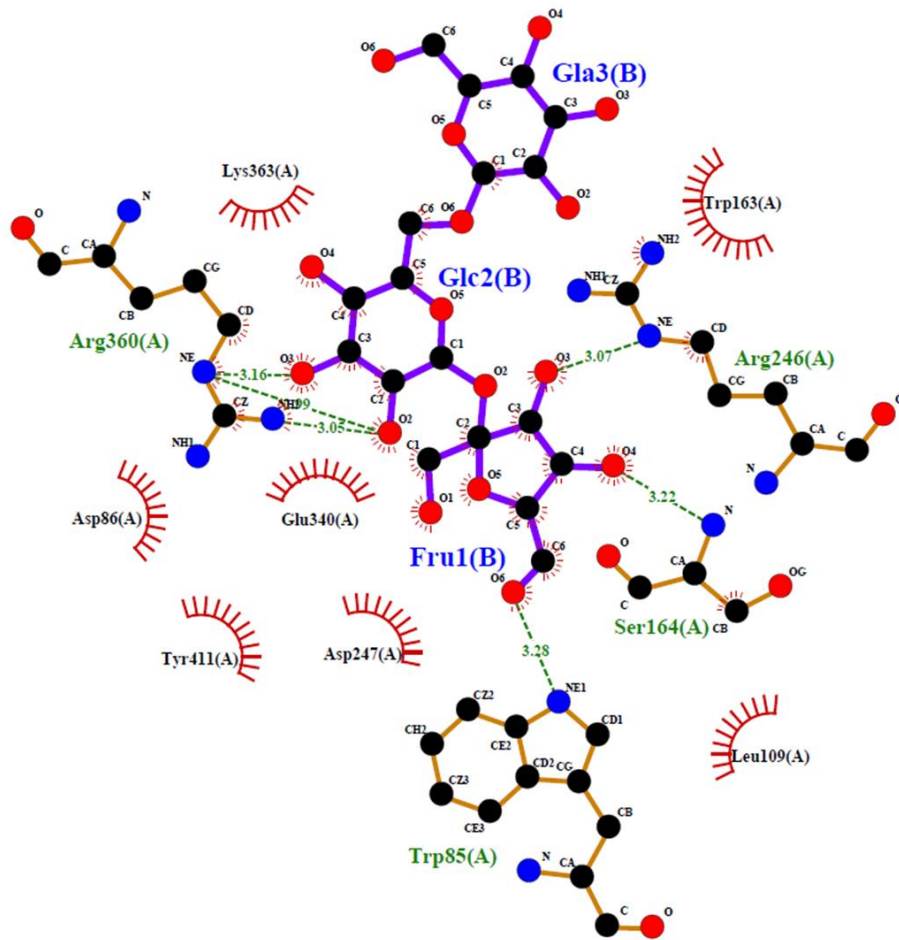


Figura 7. Representación esquemática de las interacciones de los subsitios (Elaboración propia).

Posteriormente, en el trabajo de Raga-Carbajal *et al.* (2021), se lograron definir los subsitios +3 y +4 (además de los subsitios anteriormente mencionados) junto a sitios de unión a oligosacárido (OB) al co-cristalizar un FOS de tipo levana denominado 6,6,6,6,6-kestooctaosa (DP 8) (Figura 8), la cual se encuentra orientada en el OB1 con el extremo reductor al interior de la cavidad catalítica y el extremo no reductor fuera de esta. Debido a esto, junto a la alta flexibilidad que presenta la molécula y la exposición al solvente, únicamente se pudo modelar una molécula de seis fructosas, denominada 6-levanohexaosa. El primer OB fue observable en el sitio activo de la enzima SacB y se encontró que la molécula de 6-levanohexaosa se encuentra unida a este sitio gracias a la formación de 32 puentes de hidrógeno formados por los residuos del bolsillo catalítico (12 interaccionando con las cadenas laterales, 1 en la cadena principal y el resto mediante moléculas de agua), además

de la presencia de interacciones de tipo “*stacking*” con los residuos Trp163 y Tyr237 y las interacciones hidrofóbicas de los residuos Leu109, Phe182, Gly184, Tyr187, Thr244, Arg343 y Tyr411 (Figura 9).

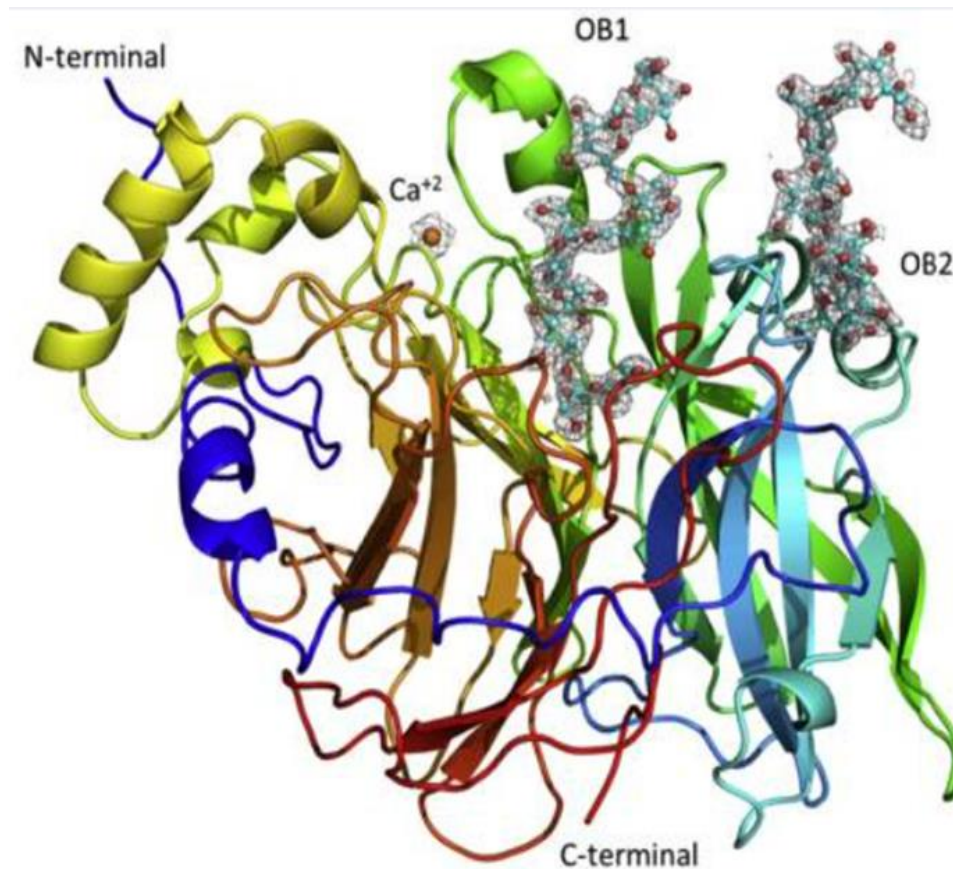


Figura 8. Estructura general de SacB con el sitio catalítico que contiene una molécula de 6-levanohexaosa (OB1) y (OB2) (Tomada de Raga-Carbajal et al., 2021).

Los subsitios superiores +3 y +4 presentan una menor cantidad de interacciones debido a que esta porción de la molécula de 6-levanohexaosa se encuentra más expuesta al solvente. Se identificaron a los residuos Asp117 y Phe182 como los residuos que conforman al subsitio +3, el primero mediante un puente de hidrogeno con el fructosilo 4 de la 6-levanohexaosa y el segundo a través de una interacción hidrofóbica; sin embargo, su posición permite una interacción de tipo “*stacking*” con Trp163, el cual es un residuo importante para la unión a ligando de los subsitios -1 y +1. Por su parte el subsitio +4, el residuo Tyr237 forma interacciones de tipo

“stacking” CH/ π con la quinta unidad de fructosa del ligando (de Raga-Carbajal *et al.*, 2021) (Figura 9).

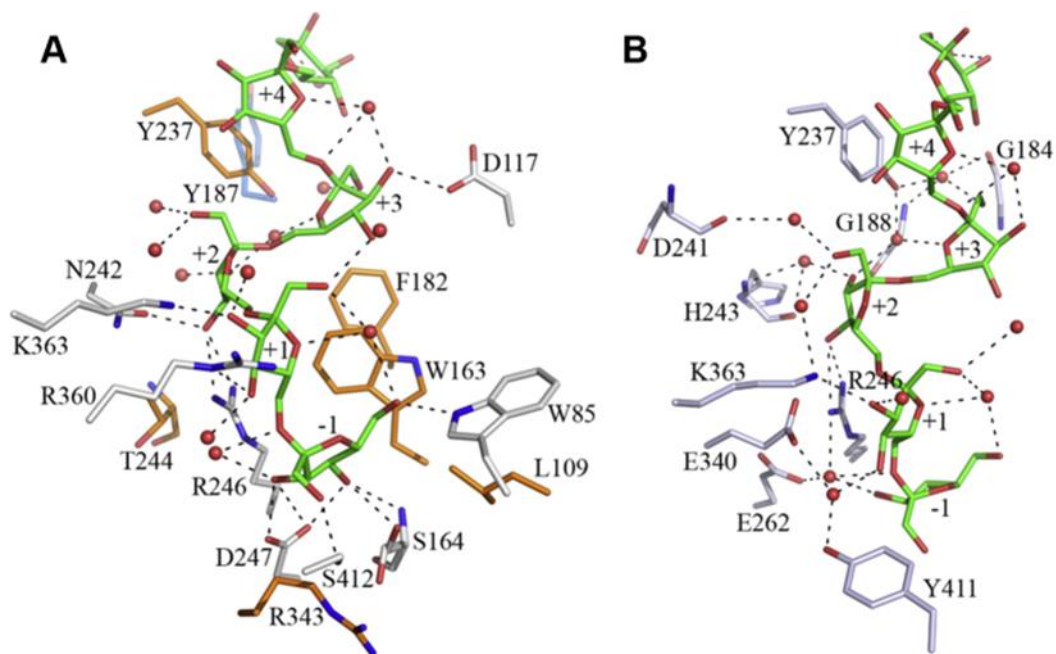


Figura 9. Sitio OB1 en complejo con la molécula de 6-levanohexaosa A) Residuos que interactúan directamente formando puentes de hidrógeno B) Residuos que interactúan mediante moléculas de agua (Modificada de Raga-Carbajal *et al.*, 2021).

Por otra parte, el segundo OB se observó a 20 Å del sitio catalítico. En este segundo OB, el oligosacárido está unido a la enzima por 23 puentes de hidrógeno de los cuales uno se encuentra en la cadena principal de Gln159, siete a las cadenas laterales de Asn115, Asp145, Lys148, Gln159 y Glu162 y 15 puentes de hidrógeno mediados por moléculas de agua (Figura 10).

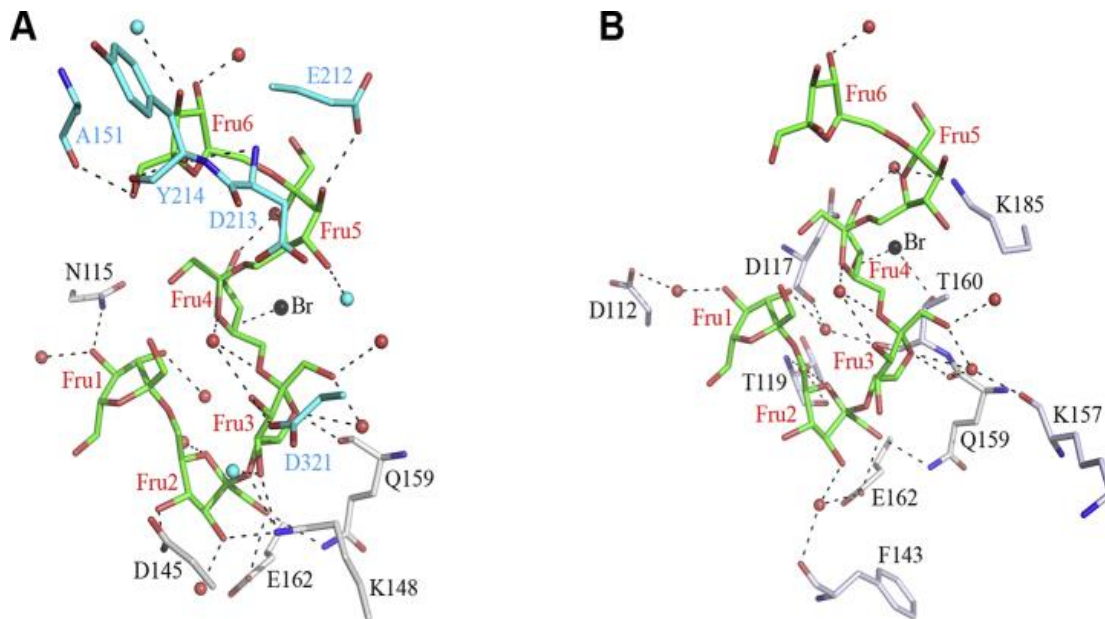


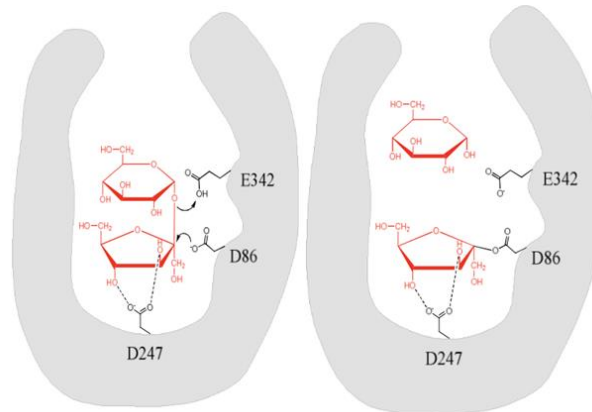
Figura 10. Residuos del OB2 que interactúan con la 6-levanohexaosa. A) Interacciones directas B) Interacciones mediadas por agua (Tomada de Raga-Carbajal et al. 2021).

MECANISMOS MOLECULARES DE LAS FRUCTANSACARASAS

El mecanismo molecular de las FNs se encuentra definido por un modelo de dos pasos: glicosilación y desglicosilación (Figura 11). En este modelo, el paso de glicosilación ocurre cuando el sustrato se acerca al sitio catalítico de la enzima, provocando que el ácido aspártico, que actúa como nucleófilo en la triada catalítica, realiza un ataque nucleofílico al carbono anomérico de la fracción fructosilo de la molécula de sacarosa. Después el residuo de ácido glutámico, que funge como catalizador general ácido/base, transfiere un protón al oxígeno del enlace glicosídico de la sacarosa, produciendo la liberación de la molécula de glucosa al medio de reacción, generando así el intermediario fructosil-enzima (estabilizado mediante un puente de hidrógeno por el segundo residuo de ácido aspártico de la triada catalítica).

En el paso de desglicosilación, el residuo de ácido glutámico actúa como base y remueve un hidrógeno de la molécula aceptora, formando un anión altamente reactivo que realiza un segundo ataque nucleofílico sobre el carbono anomérico del complejo fructosilo-enzima. Esto produce una desestabilización del intermediario que forma el complejo fructosil-aceptor que es liberado al medio de reacción (Raga-Carbajal, 2019).

1) Glicosilación



2) Deslicosilación

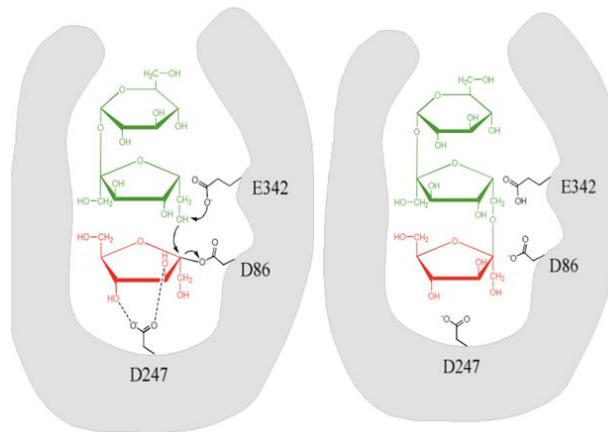


Figura 11. Representación del mecanismo general de reacción de las FNs. Triada catalítica: D86 (Nucleófilo), E342 (Catalizador general ácido/base) y D247 (Estabilizador del estado de transición). Numeración de SacB (Tomado de Martínez-Morales 2021; adaptado de Chuankhayan et al., 2010).

FRUCTANSACARASAS MULTIDOMINIO

Por su arquitectura, las FNs pueden dividirse en dos grupos: las FNs multidominio y las unidominio. Las FNs unidominio están constituidas únicamente por el dominio catalítico y tienen una masa que se encuentra entre los 45-65 kDa. Por otro lado, las FNs multidominio tienen una masa que oscila entre los 80-170 kDa y, como lo indica su nombre, cuentan con tres regiones: a) un dominio N-terminal, b) un dominio catalítico y c) un dominio C-terminal. Algunas de las FNs multidominio identificadas se pueden observar en la Figura 12.

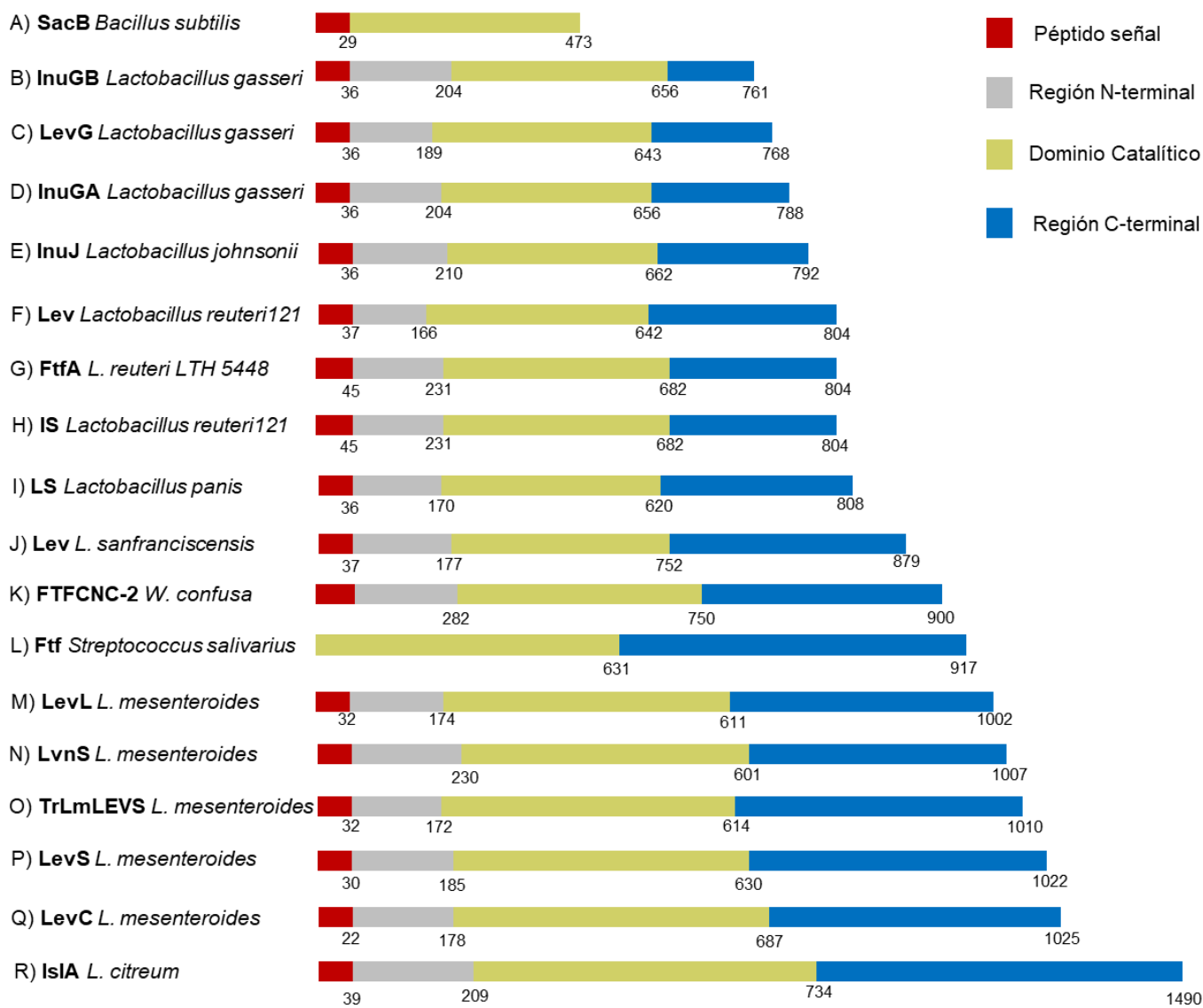


Figura 12. Representación esquemática de las fructansacararas identificadas hasta la fecha (Modificado de Martínez-Bahena 2024).

En la actualidad, la única estructura cristalográfica de una FN multidominio es una versión truncada de la inulosacarasa InuJ de *Lactobacillus johnsonii*, la cual está constituida por los residuos 145-708 de la enzima (Figura 13). Esta estructura cristalográfica comprende del residuo 176-708, ya que los primeros 31 aminoácidos no fueron visibles en los mapas de densidad electrónica, por lo que no pudieron ser dilucidados probablemente debido a su alta movilidad. La región N-terminal está formada por 33 residuos (176-209) formando dos α -hélices (α 1 y α 2) conectadas mediante un bucle. Estas hélices están empaquetadas en contra del dominio

catalítico, tienen una interacción con la hélice $\alpha 5$ y se encuentran conectadas por un bucle de 12 residuos al dominio catalítico. El dominio catalítico está conformado por 452 residuos (210-662), los cuales forman la estructura de tipo β -propela de cinco hojas β anteriormente descrita. Finalmente, la región C-terminal está constituido por 45 residuos (663-708), este carece de una estructura secundaria definida, a excepción de una pequeña hélice 310 y una corta horquilla β antiparalela de dos hebras, y parece empaquetarse cerca de las hojas 4 y 5 (Pijning *et al.*, 2011).

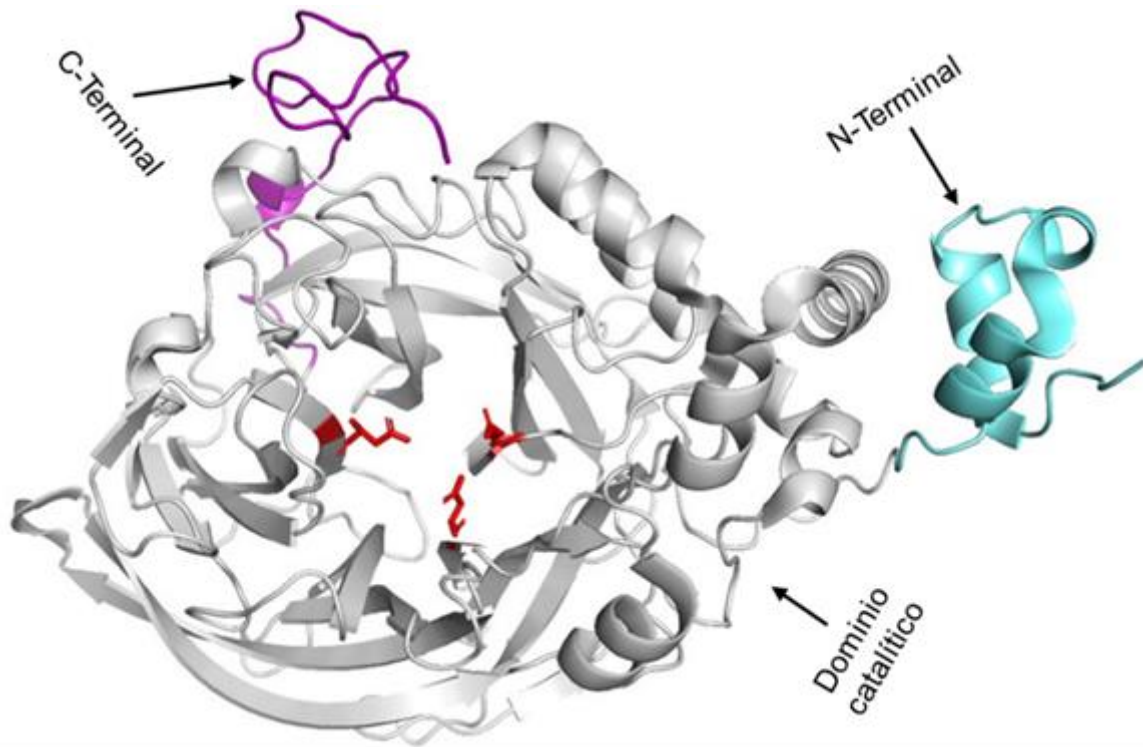


Figura 13. Estructura cristalográfica de la inulosacarasa de *Lactobacillus johnsonii*. Región N-Terminal: cian; Dominio catalítico: gris y región C-Terminal: morado. (Modificada de Pijning *et al.*, 2011; PDB ID: 2YFT) (Elaboración propia).

LEVANSACARASA MULTIDOMINIO LevS

En 2006, Morales-Arrieta *et. al.* identificaron tres proteínas producidas durante un proceso de fermentación de *L. mesenteroides* NRRL B512F mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes. La primera con un peso de 170 kDa, la segunda de 116 kDa y la tercera de 87 kDa. La proteína de 170 kDa se identificó como una dextransacarasa al presentar actividad glicosiltransferasa mediante una prueba de geles de actividad in situ incubados con

sacarosa, el cual se hidrolizó con dextranasa. Por otro lado, las proteínas de 116 y 87 kDa se identificaron como FNs utilizando geles de actividad in situ incubados con rafinosa. No obstante, se decidió aislar el gen que codifica para la proteína de 116 kDa, puesto que la proteína de 87 kDa podría ser el producto de una proteólisis que presentan las glicosiltransferasas del género *Leuconostoc*.

Se nombró *levS* al gen aislado el cual codifica para una levansacarasa nombrada LevS. Esta enzima consta de 1022 aminoácidos, cuenta con una masa molecular de 113 kDa y un punto isoelectrico de 4.74. Mediante el programa BLAST se encontró que esta enzima cuenta con cuatro regiones/dominios con características similares a las glicosiltransferasas y fructosiltransferasas. La primera región, conocida como la región N-terminal, está constituido por 184 residuos aminoacídicos e incluye un péptido-senial de 30 residuos. El segundo dominio es el dominio catalítico que consta de 445 residuos conservados entre las FNs de la familia GH68. La región de transición está formada por 138 residuos y se encuentra dentro de la cuarta región, también llamada región C-terminal, la cual cuenta con 254 residuos (Figura 14).

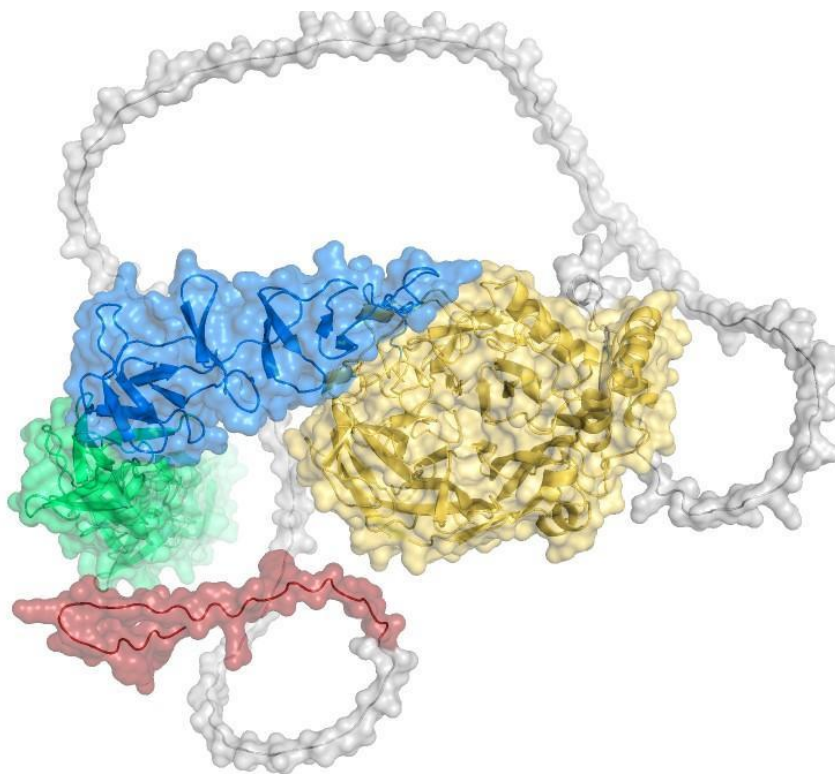


Figura 14. Modelo generado utilizando el software de inteligencia artificial AlphaFold de la enzima LevS. El péptido señal se muestra en rojo, la región N-terminal en gris, el dominio catalítico en amarillo, la región de transición en azul y la región C-terminal en verde.

REGIÓN N-TERMINAL

Los estudios sobre esta región han sugerido que los residuos que conforman esta sección corresponden a una región peptídica que se encuentra intrínsecamente desordenada debido a su gran contenido de residuos hidrofílicos. Adicionalmente, se han identificado cinco sitios de unión desordenados (SUD), los cuales podrían pasar de un estado “desordenado” a uno “ordenado” con la ayuda de una molécula “partner” (Martínez-Bahena, 2020). Se ha teorizado que esta región tiene una función de estabilización de la enzima, pues la eliminación de esta región reduce el tiempo de vida media de la enzima. Adicionalmente, Martínez-Bahena (2024) encontró que existe una región mínima de 20 residuos aminoacídicos que participan en la producción de polímero de alto peso molecular.

DOMINIO CATALÍTICO

Como su nombre lo indica, este dominio es el encargado de la actividad fructosiltransferasa de la enzima. Este dominio posee un bolsillo central, el cual cuenta con una carga negativa. Se ha propuesto que los residuos Asp247, Asp399 y Glu497 (numeración tomada desde el primer aminoácido de la secuencia primaria completa) son los residuos que conforman la triada catalítica, de los cuales funcionan como nucleófilo, como estabilizador del estado de transición y como catalizador general ácido/base, respectivamente (García-Paz, Datos no publicados).

REGIÓN DE TRANSICIÓN

Es una región que se encuentra entre el dominio catalítico y la región C-terminal, fue denominada de esta manera debido a que presentaba una baja similitud con las regiones C-terminal de las glucansacarasas. Aunado a esto, análisis realizados sobre esta región revelaron que presentan un 32% de identidad con dominios de unión a glucano, así como repetidas YG de un subgrupo de secuencias también asociadas con la unión a glucano. Además, se ha identificado que esta región posee cuatro posibles bolsillos hidrofóbicos (pCBMs), con cavidades que oscilan entre 7.5

y 11.5 Å, en las cuales se ha sugerido que pueden unirse carbohidratos. (Martínez-Morales, 2021; García-Paz, Datos no publicados).

Esta región parece tener un papel esencial en la reacción de polimerización y elongación de los polímeros, así como la estabilidad de la enzima. Martínez-Morales (2021) encontró que, al eliminar completamente esta región, la enzima aumenta su actividad hidrolasa y disminuye la producción de polímero de alto peso molecular, así como una disminución del pH y temperatura óptima.

REGIÓN C-TERMINAL

Se ha demostrado que esta región determina tanto al tamaño del polímero sintetizado como la especificidad de reacción de la enzima (Olvera *et al.* 2012). Adicionalmente, se ha sugerido que esta región cumple una función *in vivo*, pues esta sirve como región de anclaje de estas enzimas a la pared celular del organismo huésped (Del Moral *et al.*, 2008).

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y CINÉTICA

La caracterización bioquímica de LevS mostró que esta enzima tiene una temperatura óptima que oscila entre los 30-35°C (desactivándose completamente a 40°C) y un pH óptimo de 6. Además, en cuanto a sus propiedades cinéticas, esta enzima mostró tener una cinética de tipo Michaelis-Menten, donde los valores de K_m y V_{max} son de 36.7 ± 5.4 mM y $7.5 \pm$ U/mg respectivamente (Morales-Arrieta *et al.*, 2006). Aunado a esto, esta enzima muestra principalmente una actividad transferasa, pues cuenta con una relación de hidrólisis/transferencia (H/T) de 10/90%, del cual el 70% de la actividad transferasa es destinada a la producción de levana (masa molecular aproximada de 2 200 kDa), mientras que el 20% es asignado a la síntesis de FOS.

Entre los FOS que son sintetizados por LevS se encuentran el disacárido levanobiosa, los trisacáridos 1-kestosa, 6-kestosa, neokestosa y levanotriosa. Con grados de polimerización (DP) 8, se encuentran los de la serie 1-kestosa y 6-kestosa, siendo estos últimos los que presentan mayor acumulación (Figura 15).

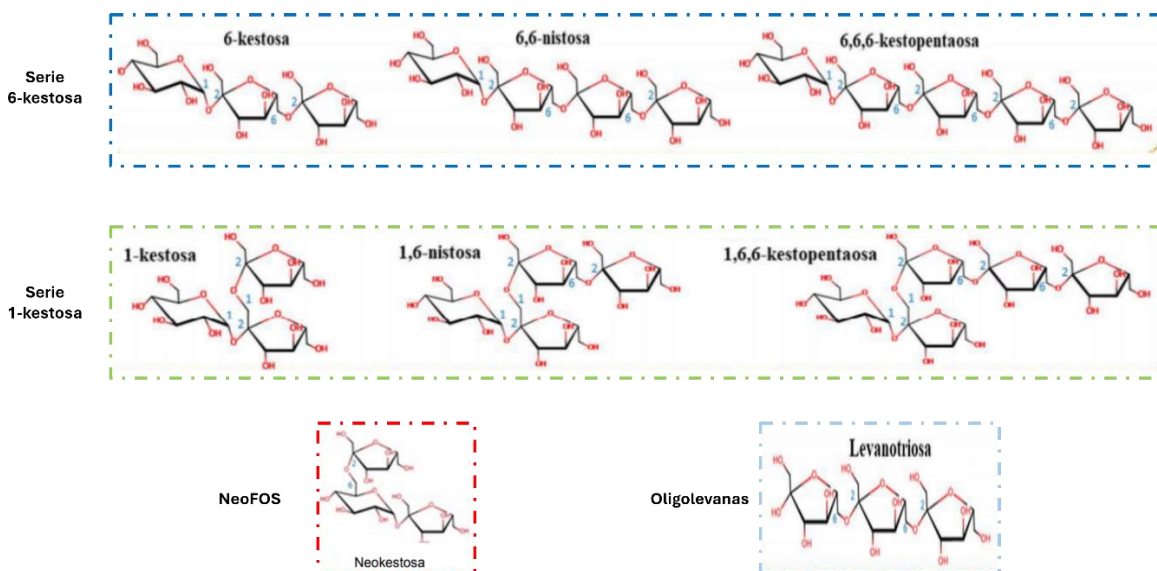


Figura 15. Fructooligosacáridos tipo levana sintetizados por la enzima LevS (Modificada de Alonso-Campos, 2019).

HIPÓTESIS DE LA ESTRUCTURA EN “U” DE LA LEVANSACARASA LEVS

Los resultados observados en el estudio de García-Paz (2022) sugieren que las regiones adicionales, N-terminal, región de transición y C-Terminal, se encuentran implicadas en la actividad enzimática de LevS, pues se observó que estos son importantes para la reacción de transfructosilación, así como en el alargamiento del polímero, lo cual permite a estas FNs multidominio sintetizar HMwL y FOS. Otro punto importante que se aborda en este estudio es la posible asociación e interacción de las regiones adicionales de LevS, especialmente la región N-terminal y de transición. Estas dos regiones parecen interactuar en conjunto con el sitio catalítico para llevar a cabo la reacción de transfructosilación del fructosil a la molécula aceptora, que es un papel parecido a los reportados con las regiones adicionales de las glucansacararas de la familia GH70.

En las glucansacararas de la familia GH70, que también son enzimas multidominio, se observa un plegamiento en forma de “U” donde las regiones N y C-terminal interactúan entre sí, formando cinco dominios estructurales. En este caso, el dominio A es el dominio catalítico, el dominio B tiene la función de aportar residuos a los sitios de unión de la molécula donadora y aceptora del sustrato, mientras que el dominio C sirve como base de la estructura en “U”. Por otra parte, el dominio IV

actúa como una especie de bisagra que ayuda a acercar al dominio V con el aceptor del sitio catalítico (Figura 16).

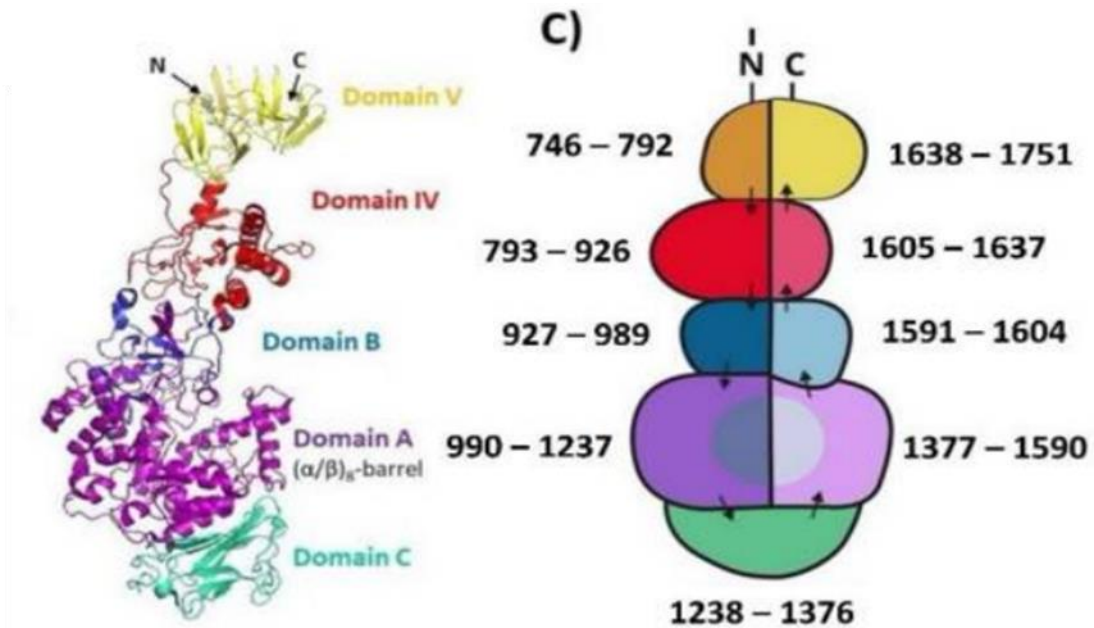


Figura 16. Representación esquemática del plegamiento en U de la Glucansacarasa GTF (Modificada de Vujičić-Žagar et al., 2010).

Con esta información se hipotetizó que, en el caso de la enzima LevS, el dominio catalítico comprende los dominios A y C de las glucansacarasa y el dominio B abarcaría la región de transición y la región N-terminal. Por otro lado, la región C-terminal tendría la función de bisagra del dominio IV, ayudando así al acercamiento del polímero en crecimiento al sitio catalítico (Figura 17).

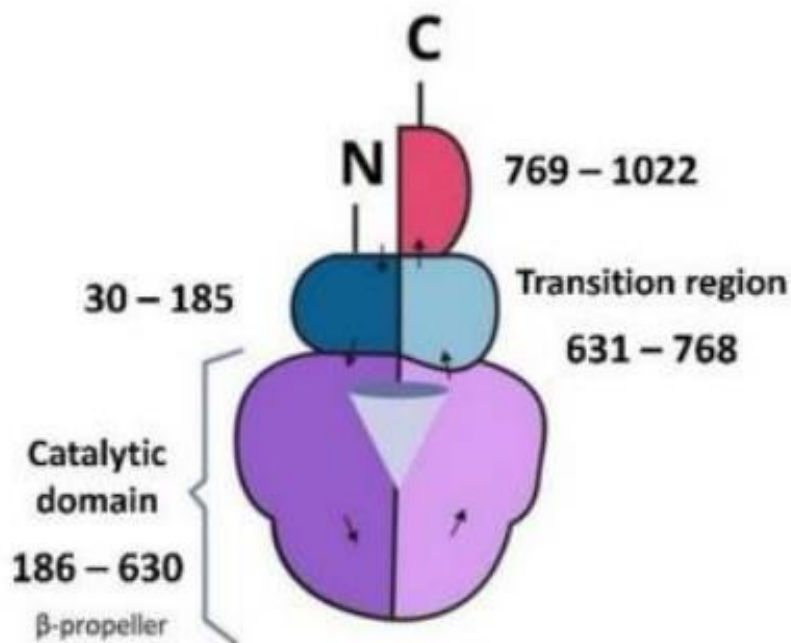


Figura 17. Representación esquemática del plegamiento en U de la Levansacarasa LevS de *Leuconostoc mesenteroides* (Modificada de García-Paz 2022).

ESTUDIOS DE RELACIÓN ESTRUCTURA FUNCIÓN

Además de toda la información recabada, con el objetivo de conocer la participación de los residuos adicionales de la enzima LevS, en el grupo de investigación de polímeros biocompatibles y nanobiotecnología se ha logrado obtener un catálogo de enzimas con diversas propiedades catalíticas, capaces de ser producidas y purificadas de una manera eficiente. Con el fin de comprender la relación estructura-función de las regiones adicionales de la levansacarasa LevS, se han producido y caracterizado diversas versiones truncadas de esta enzima eliminando parcial o totalmente las regiones adicionales (Figura 18).

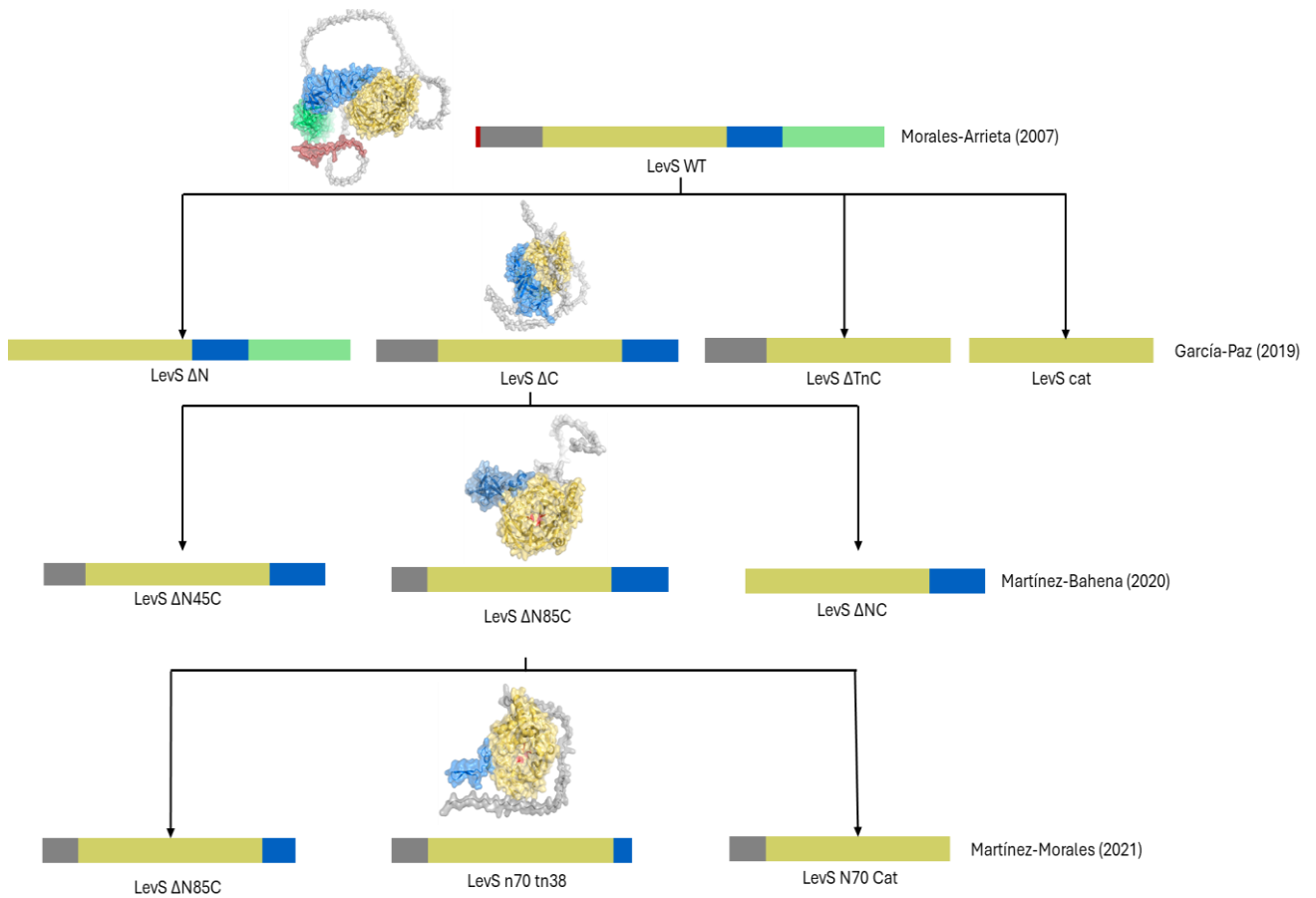


Figura 18. Representación esquemática y modelos tridimensionales generados con AlphaFold de las versiones truncadas de LevS generadas en los estudios de relación estructura-función (Elaboración propia).

De todas estas versiones truncadas de la enzima LevS, se puede destacar a la enzima LevS N70Tn38 (Martinez-Morales, 2021). Esta versión truncada es una enzima derivada de LevS ΔN85C y se caracteriza por tener una región N-terminal (constituido por 71 residuos aminoacídicos) un dominio catalítico (conformado por 445 residuos) y una región de transición (conformada por 38 residuos aminoacídicos, a diferencia de los 138 residuos que componen esta región en LevS ΔN85C), además cuenta con una masa aproximada de 60.66 kDa y tiene un punto isoeléctrico teórico de 4.37 (Figura 19).

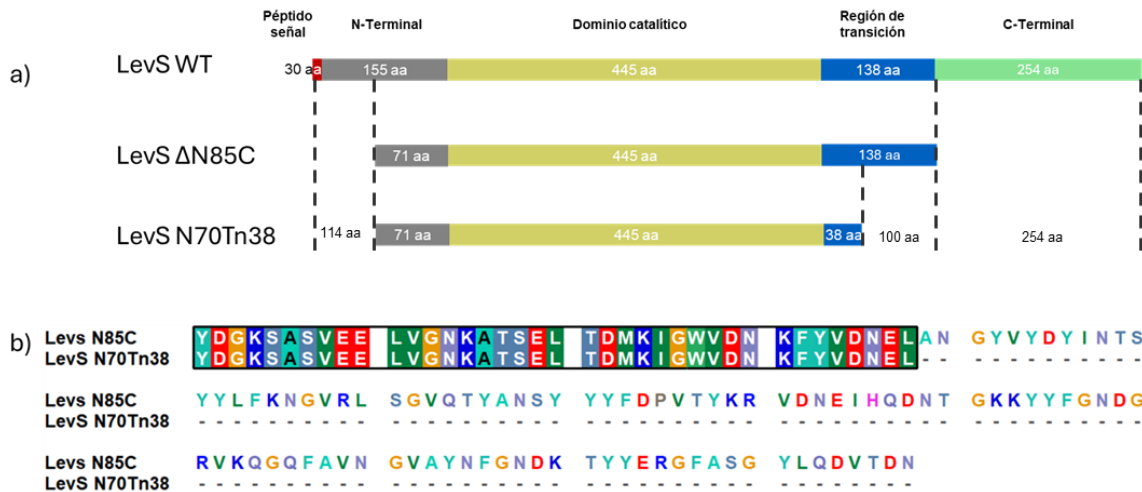


Figura 19. LevS y sus versiones truncadas. a) Esquema de la estructura primaria de las enzimas LevS, LevS Δ N85C, LevS N70Tn38 b) Alineamiento de la región de transición de LevS Δ N85C vs LevS N70Tn38 (Elaboración propia).

La caracterización bioquímica de LevS N70Tn38 mostró que esta versión truncada cuenta con una temperatura óptima de 40°C y un pH óptimo de 5. En cuanto a sus propiedades cinéticas, esta enzima cuenta con una Km de 10.0 ± 1.07 mM, una kcat 337.13 ± 12.98 s⁻¹ y una kcat/km 27.65 ± 2.65 . Al igual que LevS WT, esta versión truncada muestra principalmente una actividad transferasa, pues cuenta con una relación de hidrólisis/transferencia (H/T) de 22%/78%, del cual el 65% de la actividad transferasa es destinado a la producción de levana, mientras que el 12% es destinado a la síntesis de FOS. Además, esta enzima se ha logrado producir de manera heteróloga de forma exitosa y purificar de forma muy eficiente.

Estos estudios se han enfocado en entender la importancia de los dominios adicionales en la actividad y especificidad de la enzima; sin embargo, es importante conocer cómo está estructurado el dominio catalítico de esta enzima, que es el responsable de la catálisis enzimática. El presente trabajo se enfocó en la dilucidación y comparación de la estructura cristalográfica del dominio catalítico de la enzima LevS N70Tn38, responsable de la síntesis de polímero de levana, así como 34 y 22 residuos aminoacídicos de las regiones N-terminal y de transición, respectivamente.

JUSTIFICACION

En la actualidad, el número de estructuras cristalográficas de FNs de origen bacteriano disponibles en la base de datos “*Protein Data Bank*” (PDB) es bastante limitado. Específicamente, se han reportado siete estructuras cristalográficas de levansacarasa y una única estructura de inulosacarasa, siendo esta última la única estructura de una fructansacarasa multidominio. Entre las estructuras de levansacarasa disponibles, únicamente dos pertenecen a la subfamilia GH68_1 (SacB de *Bacillus subtilis* y SacB de *Priestia megaterium*). Por lo tanto, los análisis de los elementos estructurales del dominio catalítico, especialmente aquellos relacionados con el reconocimiento del sustrato y en la polimerización, de esta familia son escasos y se enfocan casi exclusivamente en la comparación de enzima SacB de *B. subtilis* con estructuras de la subfamilia GH68_2. El presente trabajo tiene como objetivo dilucidar y comparar la estructura cristalográfica del dominio catalítico de la levansacarasa multidominio LevS N70Tn38 con estructuras de FNs pertenecientes a las subfamilias GH68_1 y GH68_2. Estos análisis permitirán obtener un mejor panorama sobre los determinantes estructurales del dominio catalítico implicadas en la catálisis, contribuyendo al conocimiento de estructura-función de estas enzimas y a su potencial aplicación biotecnológica.

HIPÓTESIS

Al dilucidar y comparar la estructura tridimensional de una versión truncada de la LevS de *Leuconostoc mesenteroides* B512F se podrán identificar los residuos que participan en la catálisis y el reconocimiento a carbohidrato.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Dilucidar y analizar la estructura tridimensional de la versión truncada LevS N70Tn38 de levansacarasa LevS de *Leuconostoc mesenteroides* B512F.

OBJETIVOS PARTICULARES

Dilucidar la estructura cristalográfica de la versión truncada LevS N70Tn38 de la levansacarasa LevS de *Leuconostoc mesenteroides* B512F.

Identificar los residuos catalíticos y los pertenecientes a los subsitios de reconocimiento a carbohidrato con base en comparaciones de secuencia y estructura de levansacarasas previamente reportadas.

Identificar residuos que podrían interactuar con los oligosacáridos producto de la síntesis enzimática mediante acoplamiento molecular.

Identificar los residuos que pertenecen a los bucles dentro del dominio catalítico de LevS mediante alineamiento de secuencia.

MATERIALES Y MÉTODOS

APARTADO DE ANÁLISIS COMPUTACIONALES

MODELAMIENTO DE LAS VERSIONES TRUNCADAS DE LevS

Las secuencias aminoacídicas de las enzimas LevS Δ N85C y LevS N70Tn38 se analizaron mediante la herramienta de predicción de estructura “AlphaFold” y los servidores de Google Colab en el programa ChimeraX (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimerax/>) para obtener sus respectivos modelos tridimensionales. Los gráficos de Ramachandran fueron calculados utilizando el programa WinCoot (<https://bernhardcl.github.io/coot/>)

ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS PRIMARIAS DE PROTEÍNAS

Las secuencias primarias de las enzimas fueron descargadas en formato FASTA de la base de datos GenBank del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). El alineamiento se realizó utilizando el servidor T-COFFEE (<https://tcoffee.crg.eu/>) empleando el programa Structural alignments (Expresso) (<https://tcoffee.crg.eu/apps/tcoffee/do:expresso>). Los resultados fueron descargados en formato FASTA y visualizados con el programa BioEdit sequence alignment editor (<https://thalljiscience.github.io/>).

ALINEAMIENTO DE LAS ESTRUCTURAS TRIDIMENSIONALES DE LAS PROTEÍNAS

El alineamiento de las estructuras tridimensionales se realizó con la ayuda del programa Pymol (<https://pymol.org/>), en el cual se realizó la identificación de los residuos de interés en cada enzima para posteriormente juntar dos estructuras marcadas y utilizar el comando “align”.

ACOPLAMIENTO MOLECULAR

Los ensayos de acoplamiento molecular se realizaron utilizando el programa AutoDock Vina (<https://vina.scripps.edu/>). Los ligandos (1-Kestosa y 1F-fructofuranosilnistosa) se obtuvieron con los SMILES de la base de datos PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) y se generaron los archivos MOL con el programa ChemSketch (<https://www.acdlabs.com/resources/free-chemistry-software-apps/chemsketch-freeware/>). La molécula de 6-levanohexaosa se extrajo de la estructura cristalográfica de la levansacarasa SacB (PDB ID: 6VHQ) utilizando el programa PyMol. Las moléculas receptoras (LevS N70Tn38) y ligandos (6-levanohexaosa, 1-kestosa y 1F-Fructofuranosilnistosa) se prepararon agregando cargas utilizando el programa AutoDockTools 4 (<https://autodock.scripps.edu/download-autodock4/>), además, las conformaciones de los ligandos fueron optimizadas empleando el programa Avogadro (<https://avogadro.cc/>). Los resultados de los ensayos de acoplamiento molecular fueron visualizados tridimensionalmente con el programa PyMol, mientras que los resultados visualizados bidimensionalmente se obtuvieron mediante archivos PDB generados con Pymol y visualizados con el programa LigPlot+ (<https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/LigPlus/download.html>).

MAPA DE SUPERFICIES DE POTENCIAL ELECTROSTÁTICO

El mapa de cargas de la estructura cristalográfica preliminar de la enzima LevS N70Tn38 se obtuvo ejecutando las Herramientas APBS del programa PyMol.

APARTADO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

DISEÑO DE CEBADORES

Con el fin de construir la versión inactiva de la enzima LevS de *L. mesenteroides*, se diseñaron cebadores de tipo QuiKChange parcialmente superpuestos con base en el artículo de Xia & Xun (2016) utilizando la secuencia nucleotídica de LevS

(Tabla 1). Los cebadores diseñados fueron sintetizados en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología (UNAM) y fueron diluidos a una concentración final de 10 μ M para su posterior uso en las reacciones de PCR.

Tabla 1. Diseño de cebadores para la construcción de versiones truncadas.			
Nombre del cebador	Sentido	Secuencia nucleotídica (5'-3')	Tm (°C)
LevS D134A_Fw	Forward	GTTTGGGCTTCTTGGGCGTTACAAGATGCA AA	71.1
LevS D134A_Rv	Reverse	CAAGAAGCCCAAACATCCAAGTCTTGAATT TGACC	70.8

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) MUTAGÉNICA

Para generar los amplicones con la mutación puntual D247A (D134A) en el gen de la enzima LevS, se realizaron reacciones de PCR utilizando como ADN molde al plásmido pET-22(n70_tn38) que contiene el gen de la enzima LevS N70Tn38 (Figura 19). Este plásmido carece de péptido señal, cuenta con un gen de resistencia a ampicilina, un inductor por IPTG, análogo de la alolactosa, que induce la transcripción del operón lac.

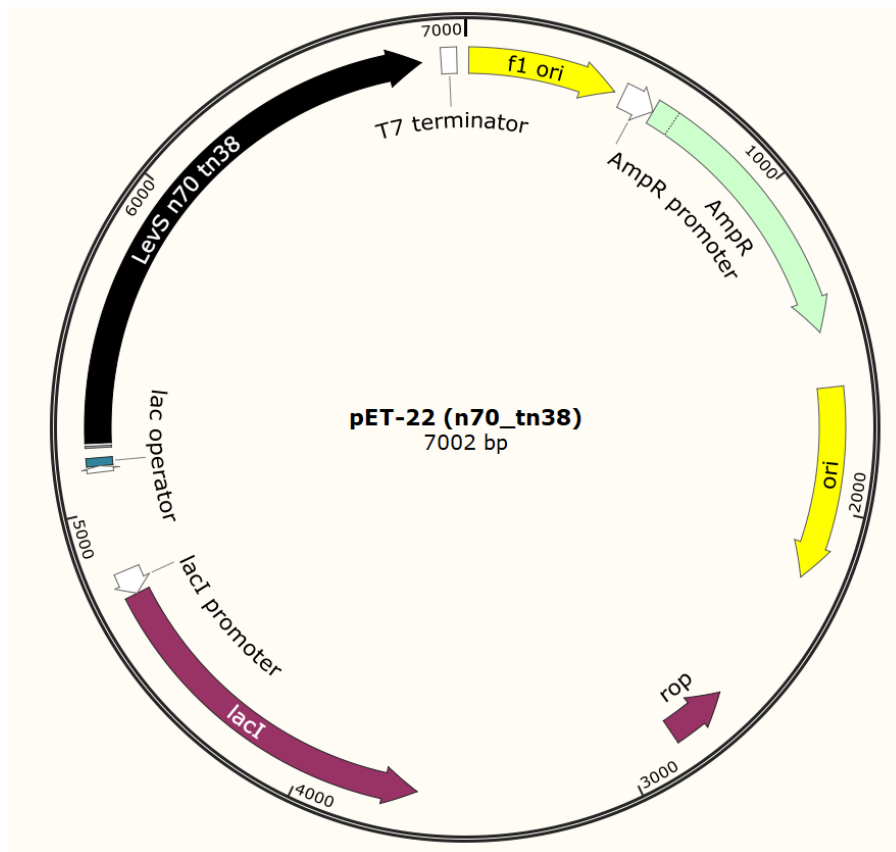


Figura 20: Plásmido pET-22 (n70_tn38) utilizado como DNA molde en la amplificación por PCR.

La reacción de PCR se ensayó utilizando un termociclador T100 thermal cycler de BioRad®. Para encontrar la temperatura óptima de reacción se hizo un gradiente de temperatura a 58°C, 60°C, 62°C, 64°C, 66°C y 68°C bajo las condiciones de reacción indicadas en la Tabla 2. Para llevar a cabo la reacción de PCR se utilizó la enzima Q5 de New England Biolabs, los componentes de la reacción de PCR se describen en la Tabla 3.

Tabla 2: Condiciones de la reacción de PCR para la mutagénesis			
Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	Ciclos
Desnaturalización Inicial	98	30	1
Desnaturalización	98	15	20

Alineamiento (Gradiente)	58, 60, 62°C, 64, 66 ó 68	30	
Extensión	72	210s	
Extensión Final	72	600s	1

Tabla 3: Componentes de la reacción de PCR (Q5) (20µL)

Componente	Volumen (µL)	Concentración Final
Agua tetradestilada	13.05	
Q5 Reaction Buffer (5x)	4.0	1X
dNTPs [10 mM]	0.4	200 µM
Primer Fw [20 µM]	1.0	0.5 µM
Primer Rv [20 µM]	1.0	0.5 µM
N70Tn38 [57.1 ng/µL] (20 ng)	0.35	20 ng (1 ng/µL)
Polimerasa Q5 [2 U/µL]	0.2	0.02 U/µl

ELECTROFORESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Los amplicones se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% p/v (agarosa/buffer TAE 1X), cargando 2 µL de cada reacción de PCR y 2 µL plásmido en relación 1:1 con el buffer de carga y un marcador de peso molecular Estándar de ADN 1 Kb Plus (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific) para determinar el peso molecular de los amplicones. La electroforesis se llevó a cabo aplicando una corriente eléctrica de 100 V con amperaje constante por aproximadamente 40 minutos. Los geles se tiñeron con una solución de bromuro de etidio [0.5 mg/mL] para visualizar las bandas correspondientes a los amplicones en un fotodocumentador Gel Doc™ EZ.

DIGESTIÓN CON LA ENZIMA *DpnI*

Para eliminar el ADN parental (ADN molde) presente en la mezcla de reacción de PCR, se realizó una reacción de digestión con la enzima *DpnI* la cual degrada el DNA metilado. Las condiciones de reacción se muestran en la Tabla 4.

Componente	Volumen (µL)	Concentración final	Notas
DNA	40	N/D	Incubar a 37°C durante 2 horas
Buffer 10x	5	1x	
<i>DpnI</i>	1	10U	
H ₂ O	4		

TRANSFORMACIÓN QUÍMICA

Los amplicones se transformaron en células químicamente competentes de *E. coli* DH5α mediante un choque térmico a 42°C después de ser incubadas con los amplicones en hielo durante 30 minutos. Después de la transformación química, las células se recuperaron en medio LB a 37°C y 350 rpm durante una hora. Enseguida, las células se plaquearon en medio LB sólido con ampicilina a una concentración de 200 µg/mL como marcador de selección y las placas se incubaron a 37°C durante 12-16 horas.

EXTRACCIÓN DE PLÁSMIDO

Para extraer el plásmido recombinante, se seleccionaron colonias que crecieron en el medio de selección con ampicilina, cada colonia se inóculo en un tubo de ensaye estéril con tapa con 5 mL de medio LB líquido adicionado con ampicilina [200 µg/mL] y los cultivos se incubaron a 37°C con agitación constante de 250 rpm durante 12-16 horas. Para cosechar las células, los cultivos se centrifugaron a 12,000 rpm, se retiró el sobrenadante y los paquetes celulares se concentraron en un volumen de 600µL de agua destilada. Posteriormente, se realizó la extracción y la purificación del plásmido utilizando el kit Zyppy™ Plasmid Miniprep de Zymo Research siguiendo las instrucciones del proveedor, que en términos generales consiste en un proceso de lisis celular para liberar el ADN, una precipitación para eliminar contaminantes y una purificación del DNA plasmídico mediante columnas de filtración rápida a través de una serie de lavados. Una vez realizada la purificación del plásmido se cuantificó su concentración a una longitud de onda de 260 nm

mediante espectrofotometría UV y se verificó su integridad y pureza mediante electroforesis de ácidos nucleicos en un gel de agarosa al 1% (p/v).

ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DE LAS MUTANTES

Para verificar la mutación puntual en el gen de la enzima LevS, se secuenció la región de clonación del plásmido purificado utilizando el oligo T7. El servicio de secuenciación fue realizado por la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología (UNAM).

APARTADO DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS

EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE LA ENZIMA LevS N70Tn38

Para llevar a cabo la expresión heteróloga de la enzima LevS N70Tn38, se transformaron células químicamente competentes de *E. coli* BL21 con el plásmido que contiene el gen que codifica para dicha enzima siguiendo el mismo protocolo de transformación química previamente descrito. Se tomó una de las colonias posibles transformantes y se realizó un preinóculo de 5 mL de medio LB líquido incubando a 37°C con agitación a 200 rpm durante 12-16 horas. Después, se realizó una fermentación con 100 mL de medio LB líquido adicionado con ampicilina [200 µg/mL] en un matraz Erlen-Meyer agregando el preinóculo e incubando a 37°C hasta alcanzar una DO de 0.5-0.6 a 600 nm. Una vez alcanzada la DO deseada, se agregó IPTG (Isopropil- β-D-1-tiogalactopiranosido) a una concentración final de 1.5 mM y se incubaron a 18°C durante 8 horas a 120 rpm. Posteriormente, se cosecharon las células mediante centrifugación a 8000 rpm a 4°C y se lavaron dos veces con buffer de fosfatos 1 mM pH 6.

EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS POR LISIS CELULAR

Para obtener las proteínas de interés a partir del cultivo del apartado anterior, se resuspendió el paquete celular en 10 mL de buffer de fosfatos 10 mM pH 6, añadiendo 10 mg de lisozima e incubando en hielo durante 30 minutos. A continuación, se realizaron 3 ciclos de congelación/descongelación utilizando hielo seco y acetona para posteriormente someter al extracto celular a sonicación durante 2 minutos con 10 segundos “on” y 30 segundos “off” y amplitud al 70%. Finalmente,

el sobrenadante se recuperó por centrifugación a 9, 000 rpm a 4°C durante 40 minutos.

PURIFICACIÓN DE LA ENZIMA LevS N70Tn38 EMPLEANDO CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO

Para purificar la enzima LevS N70Tn38 a partir del extracto obtenido anteriormente, se realizó una cromatografía de intercambio iónico utilizando una columna con resina DEAE+ previamente equilibrada con buffer de fosfatos 10mM pH 6. Primero, se cargó el extracto en esta columna y se conectó al FPLC AKTA, pasando buffer de fosfatos 10 mM pH 6, para posteriormente realizar un gradiente escalonado con un primer aumento a 150 mM y un segundo aumento a 250 mM del buffer de fosfatos pH 6, eluyendo así las proteínas inespecíficas. Una vez estabilizada la señal, se subió la concentración a 350 mM de buffer de fosfatos pH 6 para eluir a la proteína de interés. Se colectaron las fracciones eluidas y se realizaron ensayos de azúcares reductores por DNS para identificar las fracciones que presentaban la actividad enzimática esperada. Finalmente, se concentraron las fracciones seleccionadas por ultrafiltración con una membrana de corte de 30 kD, en este paso también se realizó un cambio de buffer usando buffer de acetatos 50 mM pH 6 1 mM de CaCl₂.

CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Para determinar la concentración de proteínas en las fracciones obtenidas previamente, se realizó una cuantificación de proteínas mediante el método de Bradford utilizando el reactivo Protein Assay (Bio-Rad), utilizando como referencia una curva estándar de albúmina sérica bovina con un rango de 5 – 25 µg/mL (BSA, Bio-Rad). Las lecturas se realizaron con las reacciones del reactivo de Bradford con las muestras de las fracciones purificadas, las cuales fueron incubadas durante 5 minutos a temperatura ambiente y se determinó la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro (Eppendorf BioSpectrometer Kinetic).

La concentración de proteína se determinó con la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración de proteína } \left(\frac{mg}{ml} \right) = \left(\frac{Abs_{595nm}}{PC_{BSA}} \right) \left(\frac{1 mg}{1000\mu g} \right) (FD)$$

Donde:

Ab_{585nm} : Absorbancia de muestra a 595nm (UA)

PC_{BSA} : Pendiente de la curva estándar de BSA (UA/ μ g/mL)

FD: Factor de dilución

ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES

Las proteínas se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), utilizando una cámara vertical Mighty Small II con amperaje constante de 20 mA para la migración por 40 minutos. Se utilizó un gel concentrador de acrilamida al 4% a pH 6.8 y un gel separador de acrilamida al 10% a pH 8.8. Se mezclaron 10 μ L de muestra de proteínas con buffer de carga que contenía 0.125 M tris-Cl pH 6.8; 4% SDS (p/v); 10% glicerol (v/v); 10% de β -mercaptoetanol (v/v) y azul de bromofenol 0.05% (p/v).

TINCIÓN CON AZUL DE COOMASSIE

Para observar las bandas correspondientes a las proteínas separadas por electroforesis, se realizó una tinción del gel de acrilamida con azul de coomassie. Esta tinción consistió en la adición de una solución teñidora (ácido acético 10%, metanol 30% y azul de coomassie 0.2%) al gel durante 30 minutos. Para remover el exceso de colorante, se utilizó una solución desteñidora (metanol 50% y ácido acético 10%) hasta que el gel se observó totalmente transparente logrando ver claramente las bandas y el marcador de peso molecular.

ENSAYOS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

La actividad enzimática fue determinada a partir de la cuantificación de azúcares reductores liberados durante la reacción enzimática mediante un análisis colorimétrico utilizando el método de ácido 3-5 dinitrosalicílico (DNS), con el cual se determina la actividad global que incluye tanto la hidrólisis como la transfructosilación. Esta reacción se realizó a 30°C a 300 rpm en buffer de acetatos 50 mM $CaCl_2$ 1 mM pH 6 utilizando sacarosa 100 g/L como sustrato. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 600 μ L, donde 500 μ L correspondieron a una mezcla del buffer con la cantidad de enzima necesaria, de acuerdo con los ensayos de Martínez-Morales (2021), para realizar la reacción y los 100 μ L restantes correspondieron a una solución de sacarosa a una concentración de 100 g/L.

Para determinar la actividad enzimática en las reacciones se tomaron 5 alícuotas de 50 µl cada una a diferentes tiempos de incubación (0, 2.5, 5, 7.5 y 10 minutos) y se neutralizaron con 50 µl de DNS. Posteriormente, las alícuotas se calentaron a 100 °C durante 5 minutos, lo cual provocó el cambio colorimétrico de amarillo a rojo correspondiente a una reducción de un grupo nitro a un grupo amino. Las muestras se incubaron en hielo durante 5 minutos y se les añadieron 500 µl de agua destilada. Finalmente, los azúcares reductores liberados se cuantificaron utilizando un espectrofotómetro Eppendorf BioSpectrometer Kinetic a 540 nm, empleando una solución equimolar de glucosa-fructosa como estándar. El promedio y la desviación estándar se obtuvieron de mediciones realizadas por triplicado.

La ecuación utilizada para determinar la actividad enzimática fue la siguiente:

$$\begin{aligned} \text{Act enzimática volumétrica} \left(\frac{U}{mL} \right) \\ = (PA_{Enz}) \left(\frac{mg/mL}{PC_{DNS}} \right) \left(\frac{1 \text{ mol}}{180\,000 \text{ mg}} \right) \left(\frac{1 \times 10^6 \text{ mol}}{1 \text{ mol}} \right) \left(\frac{0.6 \text{ mL}}{V_{enzima}} \right) \end{aligned}$$

Donde:

PA_{Enz} : Pendiente actividad enzimática (UA/min)

PC_{DNS} : Pendiente curva de estándar DNS (UA)

V_{enzima} : Volumen de enzima utilizada en la reacción (ml)

$$\text{Act. enzimática específica} \left(\frac{U}{mg} \right) = \frac{\text{Act. enzimática volumétrica} (U/mL)}{\text{Concentración de proteína} (mg/mL)}$$

La actividad enzimática específica se expresó en términos de U/mg, donde una unidad de actividad (U) se define como la cantidad de enzima capaz de liberar un µmol de azúcares reductores por minuto.

APARTADO DE CRISTALOGRAFÍA

ENSAYOS DE CRISTALIZACIÓN

La obtención de cristales se realizó mediante el kit Wizard Classic 3 Emerald Bio empleando las condiciones de 25% PEG 3350 con 200 mM de formato de magnesio a 18°C con la técnica de cristalización por Microbatch. Esta técnica consiste en

depositar una gota de muestra en una placa de micropozos con el resto de reactivos de reacción, se mezclan y se sellan con una capa de aceite (Barends & Dijkstra, 2003; Hampton Research, 2020).

ENSAYO DE DIFRACCIÓN DE RAYOS X

El cristal de la enzima LevS N70Tn38 fue difractado por el Dr. Enrique Rudiño Piñera en la línea FMX, ID-17-2 del National Synchrotron Light Source II (NSLS II, Upton, Nueva York) utilizando un detector Eiger 16M, y una longitud de onda de 0.97 Å

REDUCCIÓN, INDEXACIÓN E INTEGRACIÓN DE DATOS

La reducción, indexación e integración de datos se realizaron con el paquete XDS y las herramientas de la suite CCP4. El contenido de disolvente en la unidad asimétrica se estimó utilizando el coeficiente de Matthews, calculado mediante el servidor [Matthews Probability Calculator](https://www.ruppweb.org/mattprob/default.html) (<https://www.ruppweb.org/mattprob/default.html>).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

DILUCIDACIÓN DE LA ESTRUCTURA CRISTALOGRÁFICA DE LA VERSIÓN TRUNCADA LevS N70Tn38 DE LA LEVANSACARASA LEVS DE *Leuconostoc mesenteroides* B512F.

Para dilucidar la estructura cristalográfica de una proteína es necesario realizar diversos pasos. El primero de ellos es la producción y purificación altamente eficiente de la proteína a cristalizar, siendo necesaria una cantidad de 5-10 mg de la proteína en solución a una concentración de 5mg/mL de proteína con una pureza de al menos un 95%. Después de obtener la proteína pura, se realizan los ensayos de cristalización empleando diferentes buffers, sales utilizando distintas concentraciones de esta (McPherson y Gavira, 2013; Wlodawer *et al.*, 2013; Gorrec, 2021; Hampton Research, 2023). Una vez obtenidos los cristales en tamaños adecuados, entre 0.1 y 0.2 mm, estos son difractados en el sincrotrón, para obtener los datos cristalográficos, a partir de la difracción de rayos X, lo cuales son utilizados para resolver la estructura tridimensional de la proteína mediante el uso de la transformada de Fourier (Font-Bardia y Alcobé, 2012; Wlodawer *et al.*, 2013). Los datos obtenidos a partir de la difracción de rayos X se analizan mediante un

procedimiento de integración, indexado y escalamiento, los cuales nos permiten conocer la amplitud y posiciones relativas de las ondas difractadas, entre otros datos (Wlodawer *et al.*, 2013). No obstante, para completar el recíproco de la transformada de Fourier es necesario conocer las fases relativas de las ondas difractadas (lo cual es conocido como “el problema de fase”) (Wlodawer *et al.*, 2013; Gorrec, 2021).

Para resolver el problema de fase existen diversos métodos, entre los cuales destaca el reemplazo molecular, en el cual se utilizan las fases de una estructura resuelta relacionada a nuestra proteína de interés o un modelo computacional de esta (Evans y McCoy, 2007; Dodson, 2021). En la actualidad, el programa de inteligencia artificial AlphaFold es una herramienta de gran ayuda para generar modelos tridimensionales de proteínas con una gran precisión, lo cual facilita la técnica de reemplazo molecular. Una vez resuelto el problema de fases, se genera un mapa de densidad electrónica que se debe refinar de manera manual y/o automática para, finalmente, obtener la estructura cristalográfica.

MODELOS *IN SILICO* DE LAS VERSIONES TRUNCADAS Δ N85C Y N70Tn38 DE LA LEVANSACARASA LevS EMPLEANDO ALPHAFOLD.

Para explorar la estructura tridimensional de la enzima LevS y realizar posteriormente el reemplazo molecular con los datos de difracción de rayos X, se generaron modelos tridimensionales de las versiones truncadas de LevS N70Tn38 y Δ N85C. Los modelos de las versiones truncadas N70Tn38 y Δ N85C de la enzima LevS se generaron empleando el programa de inteligencia artificial AlphFold disponible como herramienta en el programa ChimeraX ejecutándose en los servidores de Google Collab (Figura 21). Adicionalmente, se validó la estructura predicha mediante la generación y análisis de gráficos de Ramachandran (Figura 22), los cuales fueron calculados empleando el programa WinCoot.

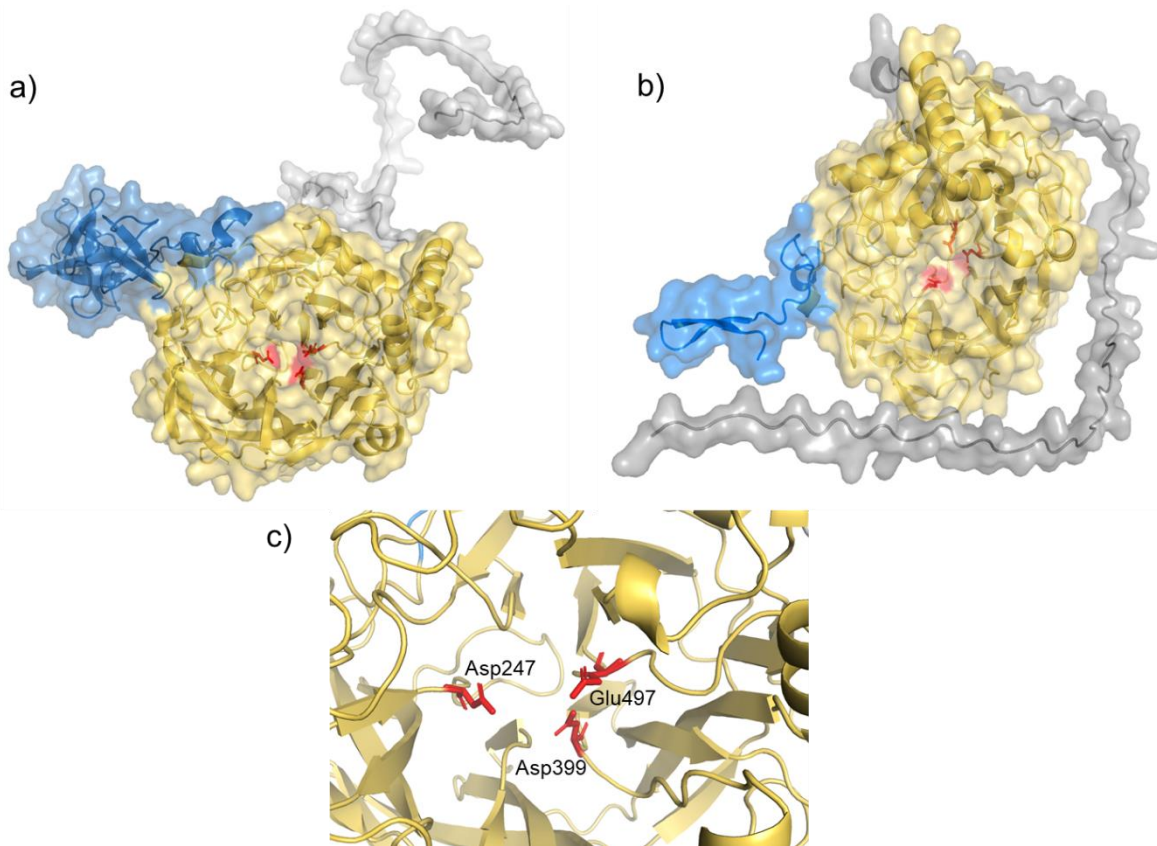


Figura 21. Modelo realizado por AlphaFold de las versiones truncadas LevS. a) enzima $\Delta N85C$ b) enzima $N70Tn38$ c) identificación de la triada catalítica de $\Delta N85C$. En amarillo se indica el sitio catalítico, en azul la región de transición y en gris el región N-terminal.

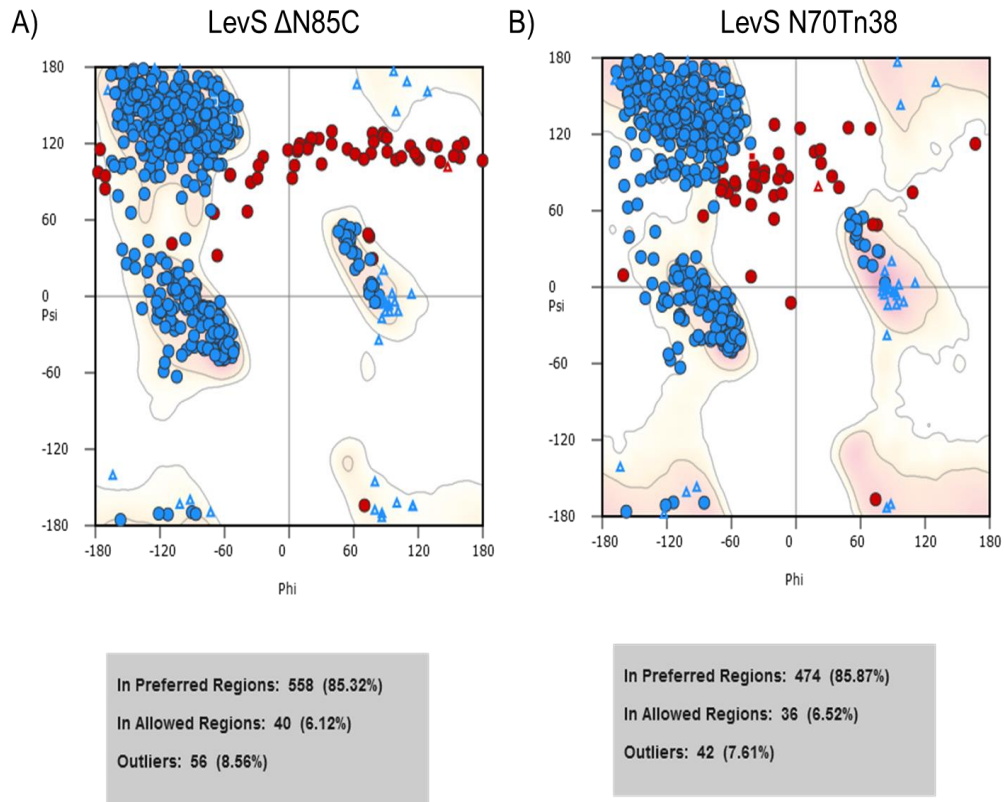


Figura 22. Gráficos de Ramachandran de las versiones truncadas de LevS: A) Δ N85C y B) N70Tn38.

Mediante el software AlphaFold se logró modelar correctamente el dominio catalítico y la región de transición, ya que los datos de regiones permitidas y preferidas, indicadas en el gráfico de Ramachandran, suman 92.39% para las versiones truncadas N70Tn38 y 91.44% para la versión Δ N85C. El dominio catalítico de ambos modelos muestra una estructura típica de la β -propela de 5 palas descrita anteriormente (Meng y Fütterer, 2003). Esta estructura cuenta con una cavidad central en donde comúnmente se aloja la triada catalítica: el residuo Asp247, que actúa como nucleófilo, el residuo Asp399, que tiene la función de estabilizador, y Glu497, que es el catalizador general ácido/base (numeración tomada desde el primer aminoácido de la secuencia primaria completa), estos residuos se resaltan en color rojo en la Figura 21c. Los dos modelos muestran que los residuos catalíticos se encuentran alojados en bucles pertenecientes a las palas de la β -propela; esta localización difiere de los residuos catalíticos presentes en las estructuras cristalográficas de otras levansacarosas (Meng y Fütterer, 2003; Martínez-Fleites *et al.*, 2005; Pijning *et al.*, 2011; Wuerges *et al.*, 2015; Polsinelli *et al.*, 2019), ya que,

por lo general estos residuos se encuentran asociados a hojas beta plegadas que conforman las palas de la β -propela. Por otra parte, la región de transición en estos dos modelos muestra un plegamiento de solenoide tipo β , caracterizado por la presencia de bucles y hojas β , lo cual fue propuesto por Martínez-Morales en 2021.

En ambos modelos, el programa AlphaFold no logró modelar correctamente la región N-terminal de 71 aminoácidos de estas enzimas. En esta región, el 78.87% y 59.15% de los residuos modelados de LevS N85C y N70Tn38, respectivamente, caen en regiones no permitidas en los gráficos de Ramachandran. Esta diferencia del 19.72% radica en que al final de esta región en el modelo de LevS N70Tn38 se observa un giro adicional en medio de dos hoja β antiparalela que interactúa con el dominio catalítico, formando una estructura en forma de “Z”, el cual no se observa en el modelo de LevS Δ N85C.

Martínez-Bahena (2020), basado en análisis *in silico* utilizando los servidores de AIUPred, DisMeta y Predict Protein, propuso que los aminoácidos que conforman la región N-terminal forman una región intrínsecamente desordenada. Esto concuerda con los resultados de Ruff y Pappu (2021), quienes describen que el programa AlphaFold modela estas regiones intrínsecamente desordenadas como una “cinta” que sólo sirve como representación visual del desorden de la región. Una de las propuestas que se han empleado en la actualidad para poder encontrar una “estructura” para este tipo de regiones o proteínas intrínsecamente desordenadas es el uso de dinámica molecular (Shrestha *et al.*, 2021, Li *et al.*, 2022) o la aplicación de nuevos métodos y análisis computacionales específicos para este tipo de proteínas (Yang *et al.*, 2023, Pang y Liu, 2024).

Los modelos generados de las versiones truncadas de LevS N85C y N70Tn38 a partir de la inteligencia artificial de AlphaFold se podrán utilizar para resolver el problema de fases al momento de realizar el método de reemplazo molecular.

PRODUCCIÓN, PURIFICACIÓN Y CRISTALIZACIÓN DE LA VERSIÓN TRUNCADA LevS N70Tn38

Para obtener los cristales de la enzima, es necesario obtener, al final de la producción y purificación, una proteína con una pureza mayor o igual a 95%. La

enzima LevS N70Tn38 es una enzima robusta, la cual se puede producir de manera heteróloga con amplios rendimientos y se puede purificar de forma eficiente, pudiendo alcanzar una pureza del 98% (Martinez-Morales, 2021). Además, esta versión truncada logra producir grandes cantidades de polímero con un mínimo de hidrólisis de sacarosa. Gracias a estas razones fue elegida para realizar la determinación de su estructura mediante cristalografía. Bajo la supervisión de Martínez-Morales se logró producir la enzima LevS N70Tn38 de forma heteróloga empleando a *Escherichia coli* BL21, siguiendo la metodología de descrita brevemente en la Figura 23.

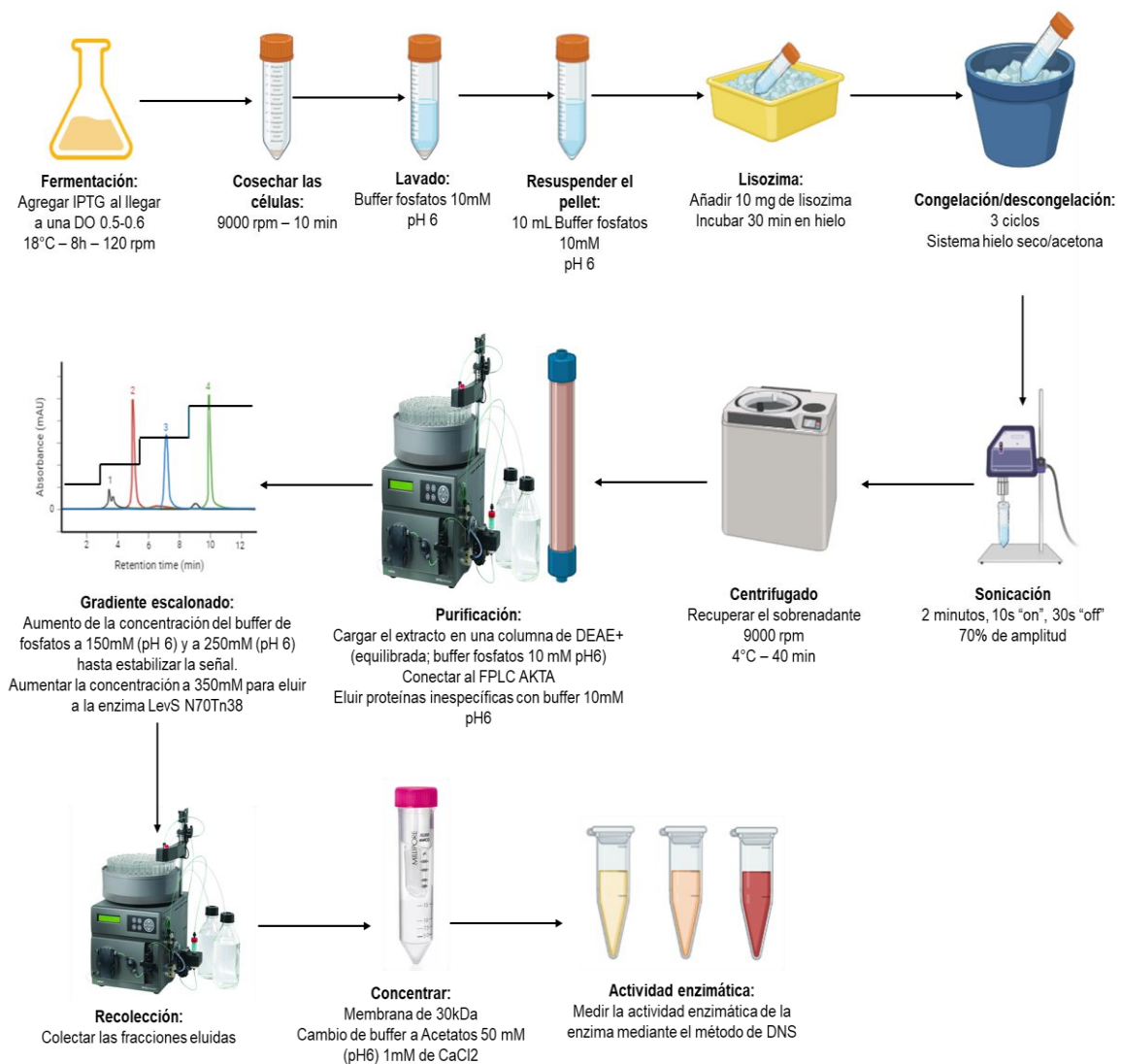


Figura 23. Esquema de producción de la enzima para su cristalización.

Además, las fracciones fueron recolectadas en base al cromatograma obtenido durante la purificación (Figura 24A) y se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE. En la Figura 24B, se muestra el gel de poliacrilamida SDS-PAGE cargado con diferentes muestras tomadas durante el proceso de purificación y concentración de la enzima. En el carril B se observan múltiples bandas de proteínas con diferentes pesos moleculares, incluida la proteína de interés que tiene un peso aproximado de 68 kDa. En los carriles C al F se colocaron muestras de fracciones recolectadas a lo largo de la purificación que corresponde a la elución de nuestra enzima. Finalmente, en el carril G se cargó la enzima después de concentrar todas las fracciones que contienen a la enzima LevS, logrando obtener una predominantemente una banda de 68 kDa, eliminando la mayoría de las impurezas presentes al inicio de la purificación.

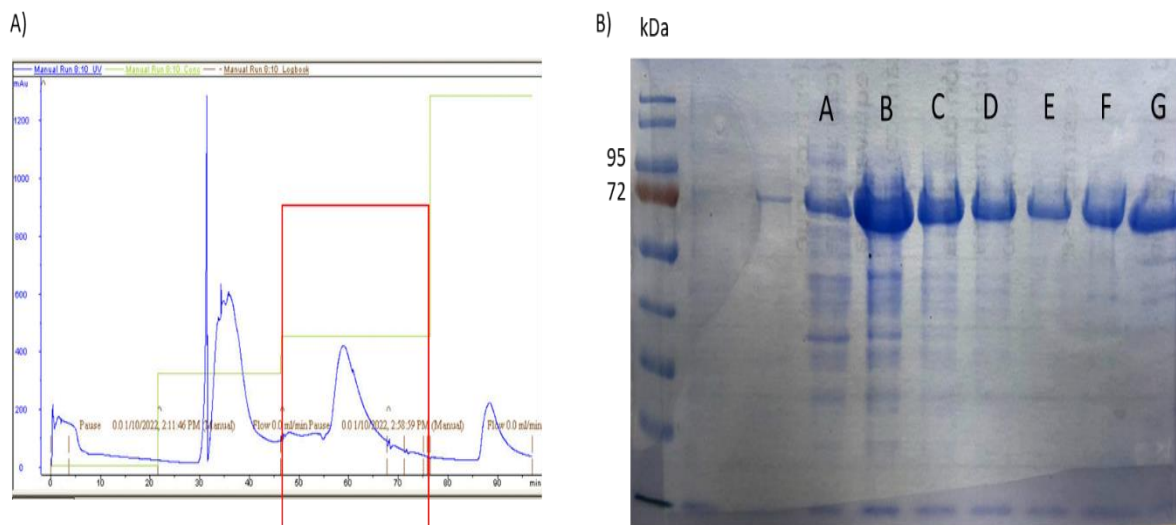
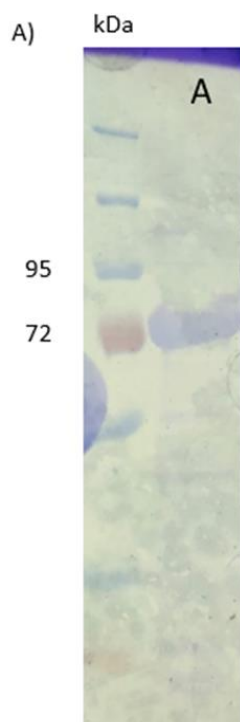


Figura 24. A) Cromatograma del método de purificación montado. Elución a 350 mM de buffer de fosfatos pH 6. B) Gel de poliacrilamida SDS-PAGE: Carril A: Después de cargar la columna B: Extracto sin purificar C: Fracción 1 D: Fracción 2 E: Fracción 3 F: Fracción 4 y G: Enzima pura y concentrada.

Para determinar el grado de pureza de la enzima se realizó un gel de poliacrilamida SDS-PAGE y se analizó mediante el programa Image J, en el cual se examinó la cantidad de píxeles por carril, cuantificando así el porcentaje total perteneciente a la banda de la enzima pura, determinándose un grado de pureza de 90% (Figura 25). En la Tabla 5. se muestra que al final de la purificación se obtuvieron 6,699 U,

correspondientes a aproximadamente 21.4 mg por litro de fermentación con una pureza del 90%.



B)

Tabla 5: Actividad enzimática de la versión truncada de LevS N70Tn38

Enzima	Unidades por litro de fermentación	mg de proteína pura por litro de fermentación	Actividad específica (U/mg)
<u>LevS N70 Tn38</u>	6699 ± 14.88	21.4 ± 1.9	307 ± 6.96

Figura 25. Gel de extracto con cuantificación de actividad volumétrica.

Las muestras de la enzima pura fueron entregadas a la Dra. Paloma Columba Gil Rodríguez, técnico académico del grupo de Cristalografía dirigido por el Dr. Enrique Rudiño Piñera, para la obtención de cristales de la proteína. Antes de los ensayos de cristalización, las muestras fueron purificadas con una mayor profundidad empleando la técnica de cromatografía de exclusión molecular. Finalmente, se obtuvo una muestra con una pureza del 98% que cumplió con los requisitos necesarios para realizar los ensayos de cristalización. El cristal obtenido se muestra en la Figura 26.

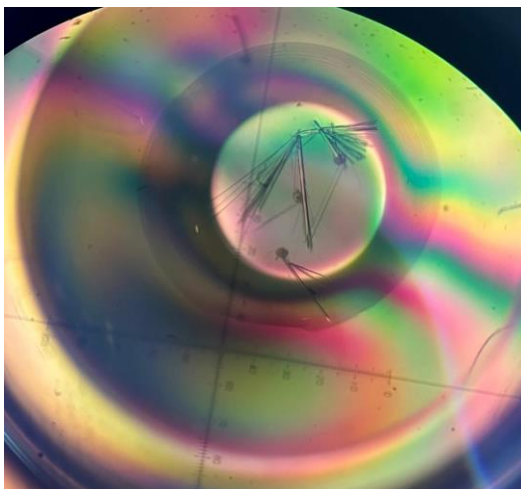


Figura 26. Visualización por microscopía del cristal obtenido mediante el kit Wizard Classic 3 Emerald Bio (Condiciones: 25% PEG 3350 con 200 mM de formato de magnesio a 18°C).

ANÁLISIS DE LOS DATOS DE DIFRACCIÓN DE RAYOS X

En la actualidad, las estructuras tridimensionales de las proteínas pueden obtenerse mediante diversas técnicas. No obstante, el método principal para estudiar la estructura tridimensional de las proteínas es el análisis de difracción de rayos X, ya que es el método con la mayor precisión y tiene como única limitante la calidad de los cristales durante la difracción de rayos X (Timofeev y Samygina, 2023).

En esta metodología, la difracción ocurre cuando la radiación electromagnética ($\lambda \approx 1\text{Å}$) interactúa con los electrones de las biomoléculas que se encuentran dentro del cristal, generando una curvatura de la onda (dispersión de onda). Esto provoca que cada electrón se convierta en una pequeña fuente de rayos X, las cuales interactúan entre sí (interferencia), provocando que todas las ondas dispersadas por los electrones se sumen entre sí generando ondas difractadas por cada átomo. Las ondas más fuertes generadas por el fenómeno de interferencia constructiva serán las percibidas por el detector de difracción de rayos (Gawaset *al.*, 2019). Cada exposición del cristal a la radiación de los rayos X genera un patrón de difracción, donde cada punto del patrón representa al haz de luz difractado por el cristal. Debido a esto, para poder resolver la estructura es necesario recolectar miles de puntos de difracción mientras se rota el cristal cada vez que se expone a la radiación. Los datos se procesan extrayendo las intensidades relativas de los rayos X mediante la ayuda de programas computacionales (Gawas *et al.*, 2019).

REEMPLAZO MOLECULAR

Para resolver el problema de fases, se decidió emplear el método de reemplazo molecular. En este método se toma una estructura que se teoriza que es similar a la estructura desconocida o un modelo tridimensional de la proteína de interés generado por un predictor de estructura terciaria, se prueban todas las orientaciones y posiciones posibles de la estructura conocida en el cristal hasta encontrar la que mejor se ajusta a la estructura problema. En otras palabras, las fases de la estructura conocida se utilizan como las fases de la estructura cristalizada calculando así un mapa de densidad electrónica inicial con estas fases “prestadas” y las amplitudes observadas de forma experimental (Evans y McCoy, 2007; Dodson, 2021).

Gracias a este método, el problema de fases pasa a ser un problema de refinamiento donde la solución parcial entra como la nueva “estructura conocida” de manera cíclica donde se realizan refinamientos (automáticos o manuales) hasta tener la solución correcta (Evans y McCoy, 2007; Dodson, 2021).

En este trabajo, se utilizó la predicción de la estructura tridimensional de la versión truncada de la enzima LevS N70Tn38 generada por AlphaFold como la estructura conocida. Se utilizó únicamente la estructura de la β -propela del dominio catalítico para poder iniciar el reemplazo molecular ya que esta zona se pudo modelar en su totalidad y el 100% de sus residuos se encuentran en zonas preferidas y permitidas.

DIFRACCIÓN DEL CRISTAL QUE CONTIENE A LevS N70Tn38

El cristal de la enzima LevS N70Tn38 fue difractado por el Dr. Enrique Rudiño Piñera. Los datos de difracción del cristal de LevS N70Tn38 se procesaron en el grupo espacial P12₁1. Los detalles de la colecta de datos y sus estadísticas de procesamiento se encuentran en la Tabla 6.

Tabla 6. Estadísticas de colecta y afinamiento de datos cristalográficos de LevS N70Tn38	
Recopilación de datos	
Longitud de onda (Å)	0.97
Intervalo de resolución (Å)	39.22 - 2.78 (2.879 - 2.78)

Grupo Espacial	P 1 2 ₁ 1
Celda Unitaria a, b, c (Å)	98.99, 104.14, 138.77
Celda Unitaria α , β , γ (°)	90.00, 96.251, 90.00
Estadísticas de colecta	
Reflexiones totales	409975 (35069)
Reflexiones únicas	70090 (6970)
Redundancia	5.80 (5.00)
Integridad (%)	99.13 (99.09)
Mean I/ σ (I)	7.57 (2.81)
Factor B de Wilson (Å ²)	27.56
R _{merge}	0.31 (0.92)
R _{meas}	0.35 (1.03)
R _{pim}	0.14 (0.44)
CC _{1/2}	0.94 (0.56)
CC*	0.98 (0.84)
Reflexiones usadas para el refinamiento R _{work}	70087 (6970)
Reflexiones usadas para calcular R _{free}	3470 (360)
R _{work}	0.38 (0.40)
R _{free}	0.40 (0.43)
CC (work)	0.64 (0.31)
CC (free)	0.59 (0.23)
Estadísticas del afinamiento	
Número de átomos que no son hidrógeno	19164
Número de átomos de macromoléculas (Proteína)	19164
Ligandos	0
Solvente (moléculas de agua)	0

Residuos aminoacídicos	2483
Calidad estereoquímica del modelo	
RMS (enlaces) (Å)	0.009
RMS (ángulos) (°)	1.86
Gráfico de Ramachandran	
Ramachandran regiones favorecidos (%)	92.32
Ramachandran regiones permitidas (%)	7.12
Ramachandran regiones no permitidas (%)	0.57
Rotámeros con mala geometría (%)	29.82
Factor B promedio (Å ²)	38.24

La estructura tridimensional de la versión truncada de LevS N70Tn38 fue determinada por difracción de rayos X a una resolución de 2.78 Å. Los cristales obtenidos pertenecen al sistema cristalino monoclinico P12₁1 con dimensiones de celda a= 98.99 Å, b= 104.14 Å y c=138.77 Å, con ángulos $\alpha= 90^\circ$ $\beta=96.251$ $\gamma= 90$. Se identificaron cinco copias de la enzima dentro de la unidad asimétrica del cristal (Figura 27).

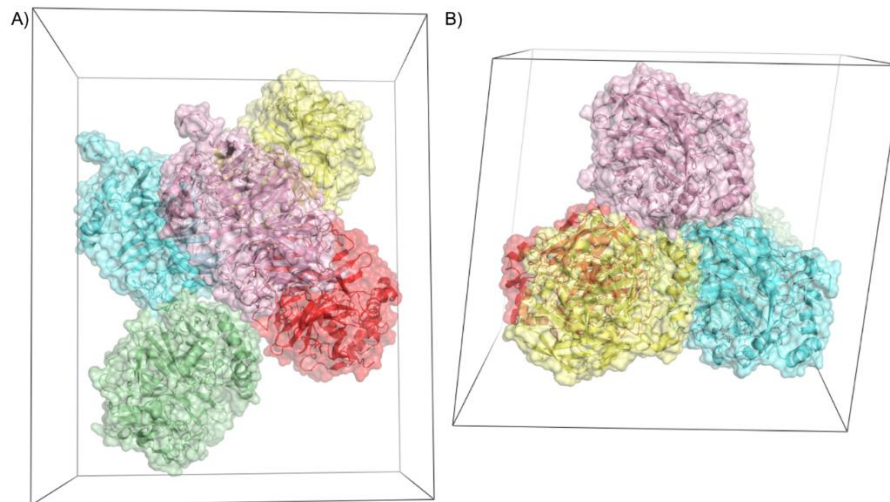


Figura 27. Celda unitaria obtenida del cristal de la enzima LevS N70Tn38: A) Vista vertical B) Vista horizontal con dimensiones de celda $a= 98.99$, $b= 104.14$ y $c=138.77$, $\alpha= 90^\circ$ $\beta=96.251$ $\gamma= 90^\circ$. Cadena A: rosa; Cadena B: Cian; Cadena C: Verde; Cadena D: Amarillo y Cadena E: Rojo.

Se recolectaron 409,975 reflexiones de las cuales 70,090 son reflexiones únicas, obteniendo así una redundancia de alrededor de 5. Sin embargo, al comparar el factor B de Wilson con el factor B promedio, se observa una discrepancia, lo que sugiere que el modelo obtenido está incompleto. Esta observación se confirma con los valores de R_{work} [0.38 (0.40)] y R_{free} [0.40 (0.43)], que superan el valor de referencia de 0.2 en ambos casos. Estos resultados indican que el modelo no representa en su totalidad a la estructura, debido fundamentalmente a la alta movilidad de los segmentos no construidos. Sin embargo, los estadísticos de afinamiento demuestran que los fragmentos construidos son confiables.

Por otro lado, los valores de los datos R_{merge} , R_{meas} duplican a los valores de referencia ideales, lo que sugiere una alta variabilidad en los datos recolectados. No obstante, los valores de R_{pim} cumplen con los valores de referencia ideales, lo que sugiere que al inicio de la colecta de datos su calidad era buena, pero al continuar con las mediciones, el ruido de los datos, debido probablemente a la falta de homogeneidad en el cristal, a la alta movilidad de segmentos de la proteína o al efecto de los propios rayos X, ésta disminuyó. Este fenómeno se observa en la figura 28, donde la calidad de los modelos construidos es mayor en la cadena A, pero disminuye progresivamente en las demás cadenas.

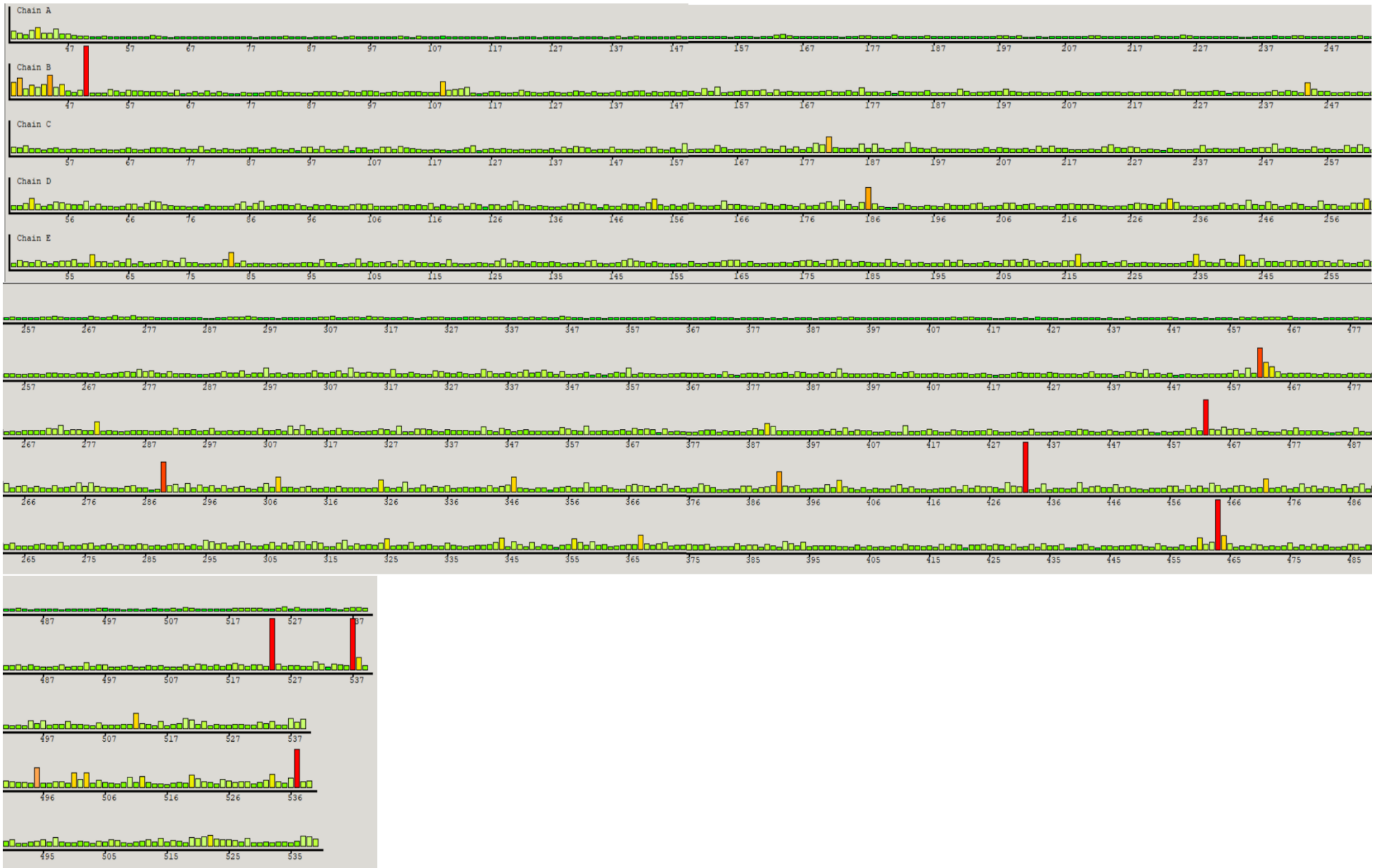


Figura 28. Grafica de ajuste de la densidad electrónica de las cinco cadenas de LevS N70tn38. En verde: aminoácidos que se ajustan bien a la densidad electrónica; En rojo: aminoácidos que no se ajustan bien a la densidad electrónica.

Otros parámetros clave para evaluar la calidad de los datos son CC y $CC_{1/2}$, ya que complementan la información proporcionada por R_{merge} . El parámetro CC mide la similitud entre los datos experimentales y el modelo teórico, mientras que $CC_{1/2}$ divide los datos recolectados en dos grupos distintos y los compara entre sí. Para estos datos se obtuvo un valor de $CC_{1/2}$ de 0.94 en la faja de datos generales y 0.56 en los datos en la faja de alta resolución. Esto indica los datos generales se encuentran en un umbral confiable, mientras que los datos de alta resolución se encuentran cerca del límite de confianza (0.50), lo cual nos sugiere que aun contiene información útil.

Por su parte, los valores de CC fueron de 0.98 para la faja de datos generales y 0.84 con para la faja de datos de alta resolución. Esto indica que, si bien los datos generales son confiables, los datos de la región de alta resolución presentan mayor ruido, lo que reduce la precisión con el modelo teórico.

En conclusión, los datos recolectados experimentalmente no son homogéneos, siendo la cadena A la que presenta la mejor calidad. Como resultado, no fue posible construir todos los aminoácidos del modelo tridimensional de LevS N70Tn38. Sin embargo, esta estructura es confiable en las regiones visibles en los mapas de densidad electrónica y sigue siendo válida si permite explicar fenómenos biológicos asociados a la enzima.

REFINAMIENTO DE LA ESTRUCTRA TRIDIMENSIONAL DE LA VERSIÓN LevS N70Tn38

En este trabajo, el refinamiento de la estructura tridimensional de la versión truncada de LevS N70Tn38 obtenida a partir de los datos cristalográficos, se llevó a cabo tomando como referencia la copia de la cadena A, ya que esta mostró el mejor ajuste con la densidad electrónica y presentó la mayor cantidad de aminoácidos visibles (Figura 28).

Para el refinamiento del modelo, se ajustaron manualmente los aminoácidos en las regiones adicionales N-terminal y de transición. Posteriormente, se empleó la técnica de reemplazo molecular, utilizando esta estructura como “estructura conocida” para validar el ajuste. Este proceso se realizó de manera individual con

cada uno de los aminoácidos de las regiones adicionales de la enzima, hasta donde fue posible realizar este proceso con los mapas de densidad electrónica.

En la figura 29, se puede observar una sección del mapa de densidad electrónica final del dominio catalítico de la estructura de la enzima LevS, donde observamos que los aminoácidos se ajustan perfectamente en las nubes de densidad electrónica. En rojo se resaltan los tres residuos pertenecientes a la triada catalítica: Asp247 (nucleófilo), Asp399 (estabilizador) y Glu497 (catalizador general ácido/base).

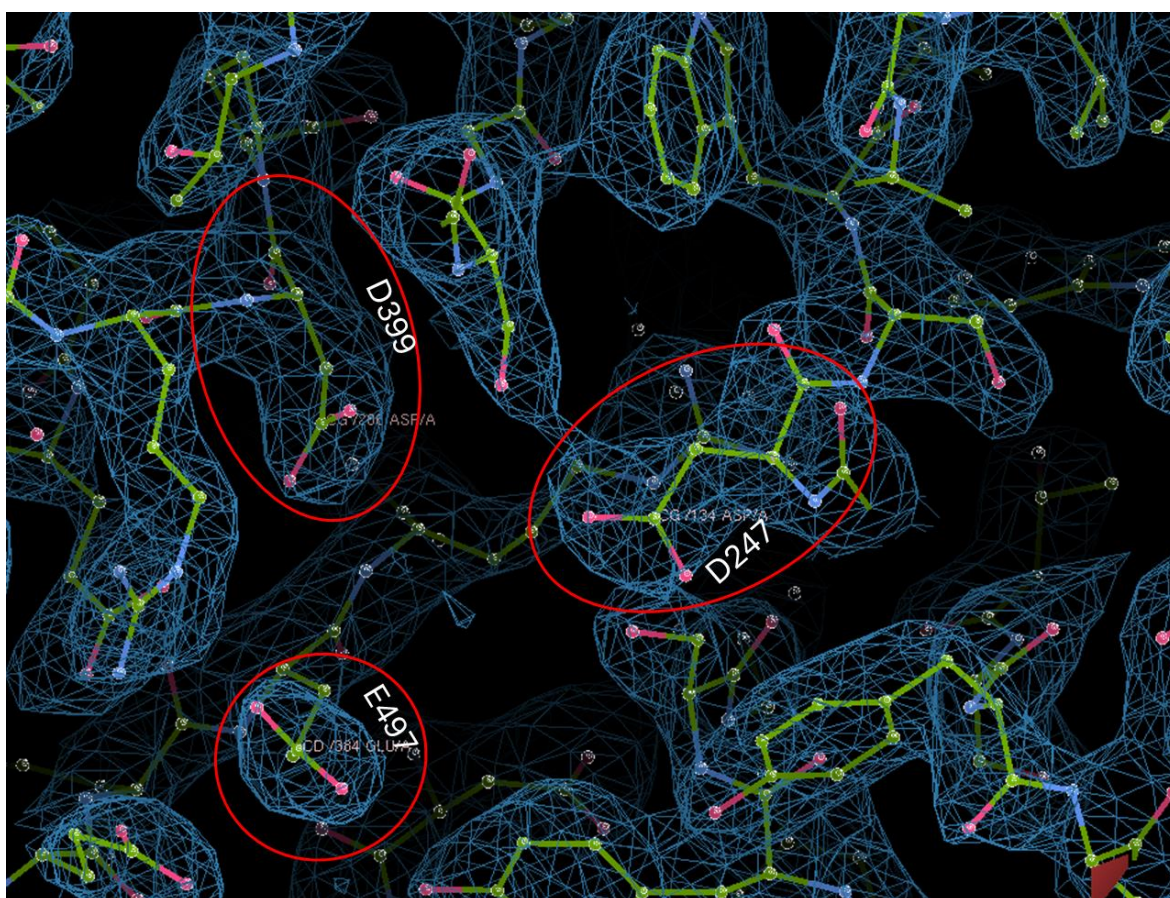


Figura 29. Mapa de densidad electrónica de la β -propela del dominio catalítico de la enzima LevS. En rojo, la triada catalítica: Asp247, Asp399 y E497.

A diferencia del dominio catalítico, las regiones adicionales de la enzima LevS N70Tn38 no pudieron resolverse en su totalidad. Se lograron resolver 34 de los 71 residuos que conforman a la región N-terminal, no obstante, los primeros tres residuos que conforman esta estructura fueron resueltos de manera parcial y

manual, debido a que el mapa de densidad electrónica únicamente mostraba pequeñas “nubes” de densidad donde suponemos que se colocan estos residuos (figura 30). Esto puede deberse principalmente a tres factores: la calidad de los datos obtenidos durante la difracción de rayos X, la autoproteólisis que sufre la enzima LevS después de cierto tiempo y la naturaleza intrínsecamente desordenada propuesta por Martínez-Bahena (2020).

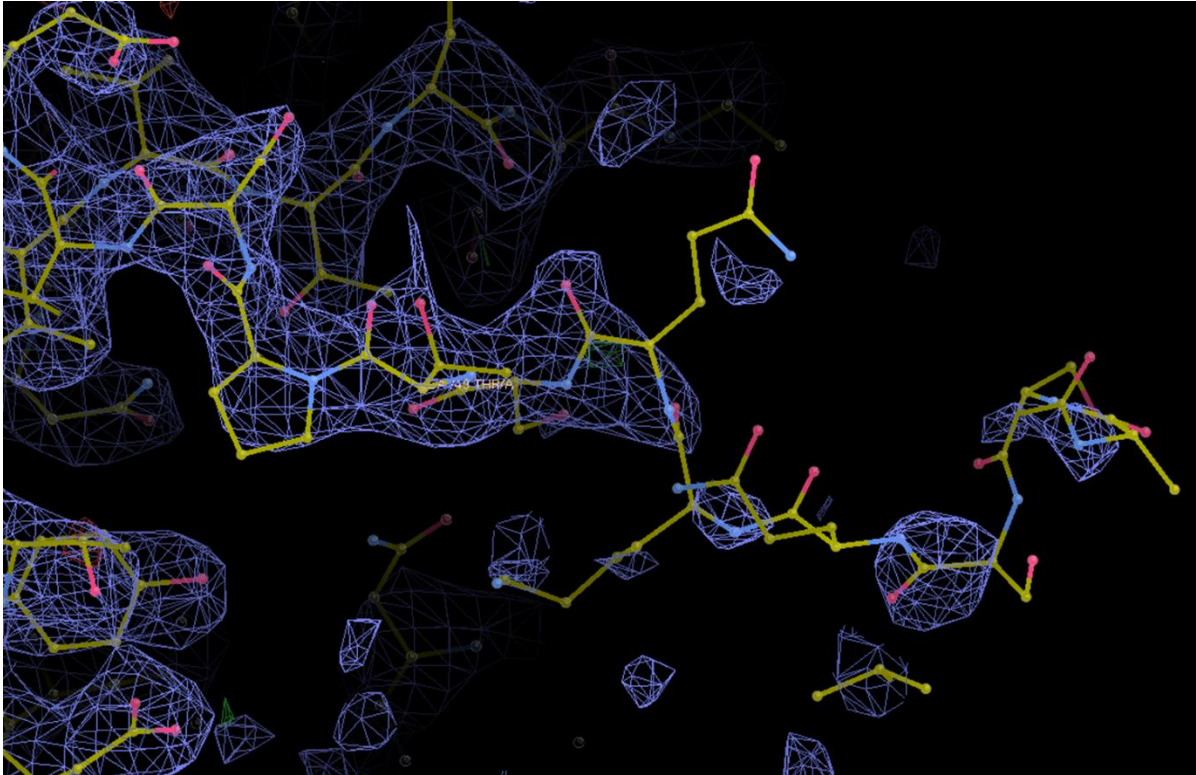


Figura 30. Mapa de densidad electrónica con el refinamiento de la región N-terminal

Por otra parte, solo se pudieron resolver 22 de los 38 residuos que componen a la región de transición truncada de LevS N70Tn38. A diferencia de la región N-terminal, el mapa de densidad electrónica termina en el residuo Asp625 (Figura 31). Esto puede deberse tanto a la autoproteólisis de la enzima, como a una posible movilidad de esta región.



Figura 31. Mapa de densidad electrónica de la región de transición

En conclusión, se logró obtener la estructura del dominio catalítico completa con 34 residuos resueltos de la región N-terminal y 22 residuos de la región de transición de la enzima LevS N70Tn38. A esta estructura parcial de la enzima LevS N70Tn38 se le denominó LevS N34Tn22.

ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA LevS N34Tn22

Los análisis cristalográficos nos permitieron obtener la estructura tridimensional LevS N34Tn21 que cuenta con 34 residuos resueltos (que comprenden del residuo Lys151 al residuo Lys185) de la región N-terminal, 445 residuos que constituyen el dominio catalítico (comprendidos del residuo Asn186 al residuo Thr630) y los 22 residuos resueltos que forman la región de transición (conformados desde el residuo Tyr631 al residuo Asp652) (Figura 32).

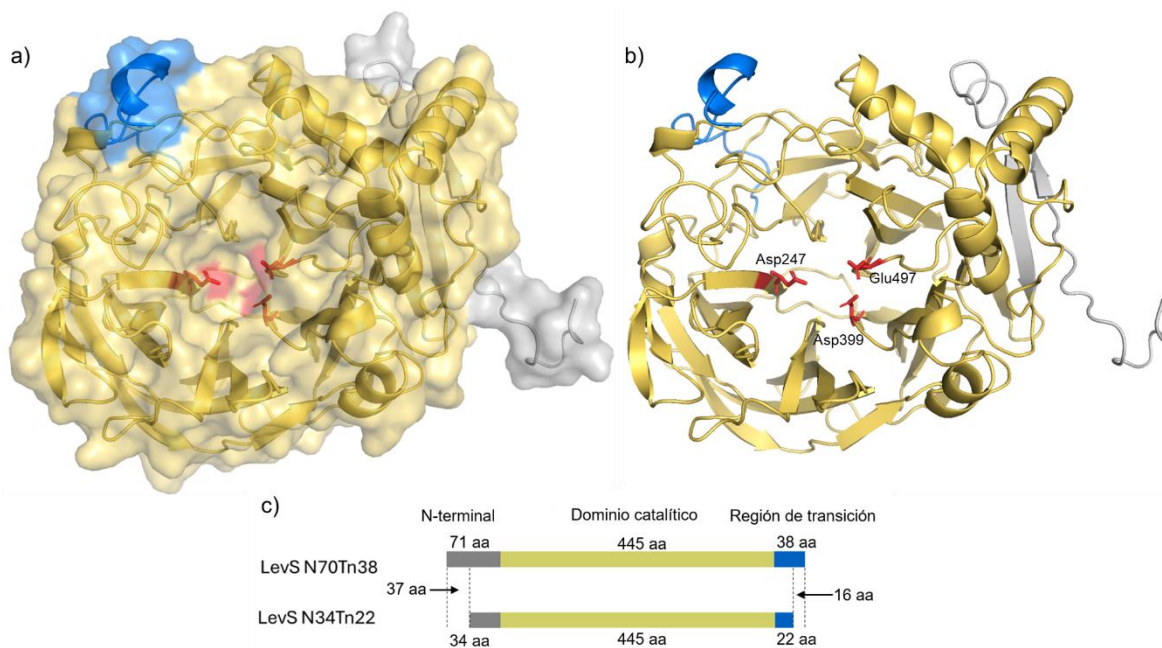


Figura 32. Estructura tridimensional LevS N34Tn22. a) Diseño combinado superficie y representación de las estructuras secundarias de la estructura LevS N34Tn22; b) Representación de las estructuras secundarias presentes en la enzima; c) Esquema comparativo de la secuencia primaria completa (LevS N70Tn38) y resuelta de la enzima (LevS N34Tn22). (En gris: la región N-terminal, en amarillo: el dominio catalítico, en azul: la región de transición y en rojo: los residuos catalíticos).

El dominio catalítico obtenido en la estructura cristalográfica LevS N34Tn22 es la conformación típica de una β -propela, descrita por Meng y Fütterer en 2003, la cual consta de 5 palas (numeradas del I-V) conformadas por 4 hojas β antiparalelas en forma de “W” (numeradas del I-IV), las cuales se muestran en la Figura 30. Además, se logra observar la presencia de la triada catalítica: Asp247, Asp399 y Glu497, los cuales están localizadas a las palas I, III y IV, respectivamente (Figura 33A y 34). Un punto que destacar es que la estructura de la β -propela parece estar “relajada”, pues se observa que varias de las hojas que conforman las palas del dominio catalítico son más cortas en comparación con la estructura cristalográfica de SacB, además de que carece de una estructura parecida a una “abrazadera” alrededor de la β -propela. Esto queda mejor ejemplificado al observar que los residuos catalíticos Glu497 y Asp399 no se encuentran sobre una hoja β como en SacB (Figura 33C) y otras estructuras cristalográficas reportados, sino sobre un bucle, lo cual también se encontró en el modelo *in silico* generado por AlphaFold (Figura 33B). Asimismo, el

dominio catalítico cuenta con cinco hélices que se encuentran cerca del dominio N-terminal, así como una hoja- β antiparalela seguida por Hélices/Turns cercanos a la región de transición.

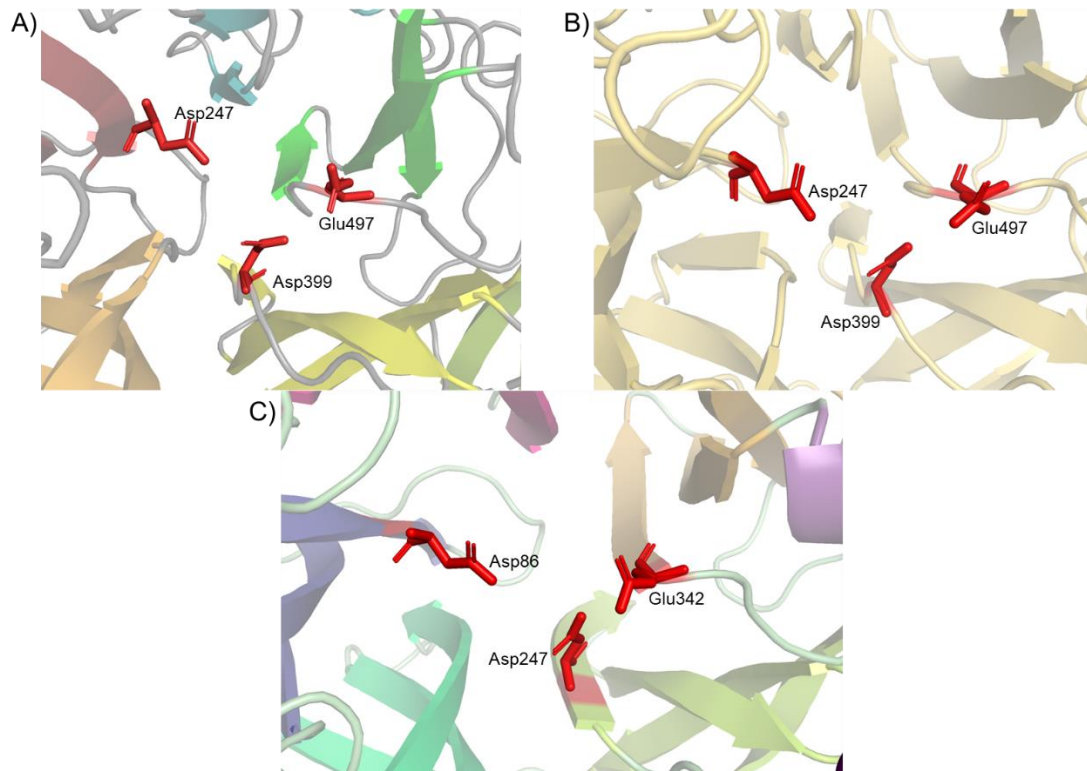


Figura 33. Comparación de los residuos catalíticos. A) Residuos catalíticos de la estructura cristalográfica “LevS N34Tn22”; B) Residuos catalíticos del modelo de LevS N70Tn38, y C) Residuos catalíticos de la estructura cristalográfica de SacB.

En esta estructura también se encontró que al final de la región N-terminal se forman dos hoja- β antiparalelas que forman una estructura en forma de “Z” (resaltada en color verde lima en la Figura 34) con una hoja- β del dominio catalítico ubicada entre las palas III y IV. Esta hoja- β del dominio catalítico no forma parte de la estructura en forma de “W” de ninguna de las palas que conforman a la estructura de la β -propela. Esta estructura en forma de “Z” también se encuentra presente en el modelo tridimensional generado por AlphaFold.

A pesar de esto, el resto de la región forma una estructura desordenada la cual fue descrita anteriormente. Sin embargo, en el mismo trabajo de Martínez-Bahena (2020) se sugirió la posibilidad de que esta zona pueda pasar de un estado

ordenado a uno desordenado al interactuar con alguna molécula de carbohidratos o proteica. Por su parte, la región de transición en esta estructura tridimensional parece carecer de estructuras secundarias, a excepción de una hélice a pesar de esto, no se logra apreciar la formación del plegamiento de solenoide tipo β , que sí se encuentra en el modelo de AlphaFold.

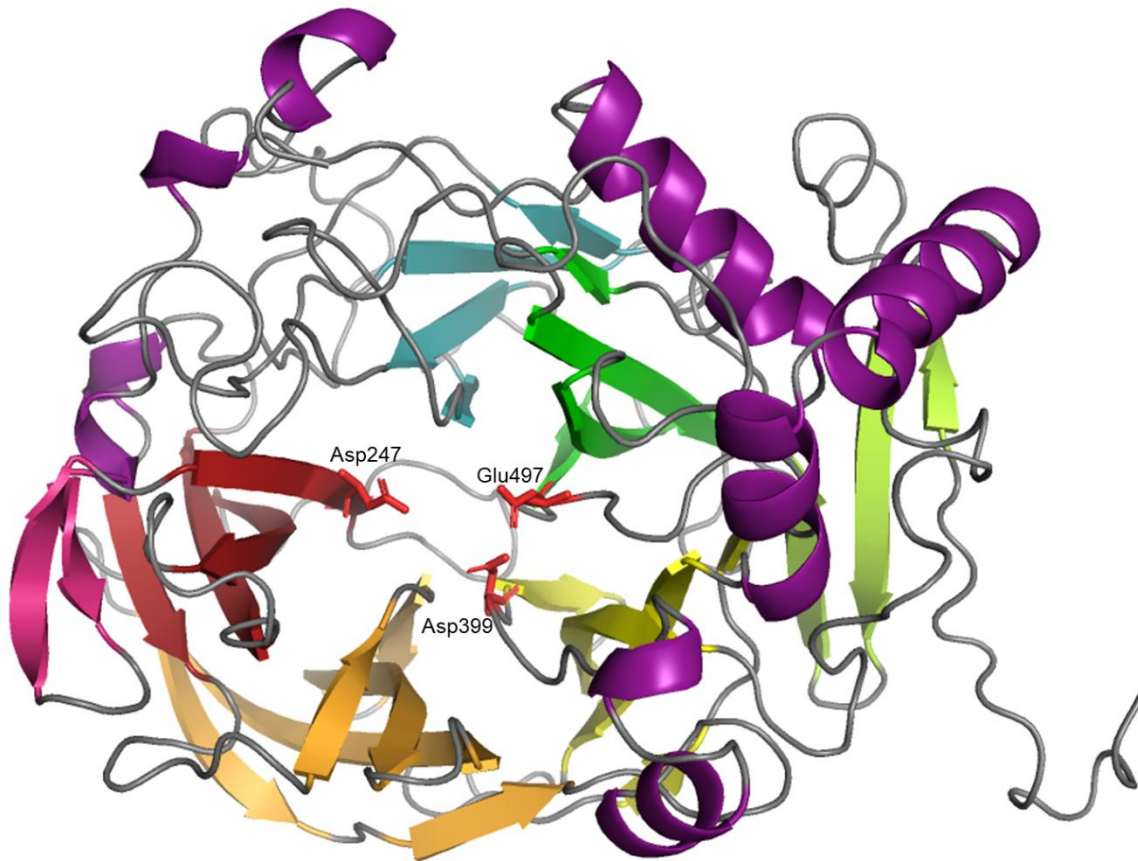
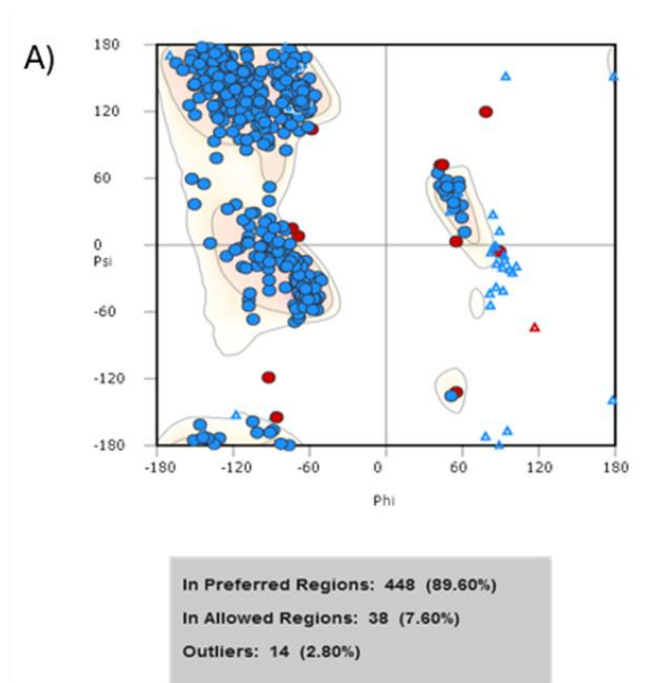


Figura 34. Estructuras secundarias de la estructura LevS N34Tn22. Se muestran las palas de la β -propela (pala I: rojo, pala II: naranja, pala III: amarillo, pala IV: verde y Pala V: azul), hélices (morado) bucles (gris) y estructura en "Z" (verde lima).

Al igual que con los modelos generados con el programa AlphaFold, se obtuvo un gráfico de Ramachandran utilizando el programa WinCoot (Figura 35). En este gráfico se puede observar que, de los 500 aminoácidos resueltos, 486 se encuentran en regiones permitidas mientras que, únicamente 14 caen en regiones no permitidas (2.80), estos resultados se muestran en la Tabla 7. Este fenómeno es común en estructuras tridimensionales de enzimas, especialmente en regiones cercanas al sitio catalítico, donde las interacciones de los aminoácidos, como

repulsiones de cargas o impedimentos estéricos, pueden generar cambios en la rotación de los ángulos ϕ y ψ . Es posible que estos aminoácidos adopten una conformación permitida al interactuar con su sustrato.



B)

Tabla 7: Aminoácidos en regiones no permitidas de la estructura LevS N34Tn22

Región	Resido	
N-terminal	Val152	Gln160
	Ser156	Ser173
Dominio catalítico	Asp188	Arg498
	Asp247	Ser552
	Val259	Ser588
	Asn279	Ala594
	Gly374	
De transición	Glu649	

Figura 36. Validación de la estructura de LevS N34Tn22. A) Diagrama de Ramachandran de la estructura cristalográfica de LevS N34Tn22; B) Aminoácidos en regiones no permitidas.

Con esta estructura cristalográfica se realizó un análisis de cargas utilizando el programa PyMol (Figura 37). Se observa que la cavidad catalítica que forma la β -

propela se encuentra altamente cargada de manera negativa, lo cual es típico de la familia GH68 (Meng y Fütterer, 2003). En la literatura se ha descrito que las interacciones electrostáticas son de gran importancia en la interacción carbohidrato-proteína de una enzima activa a carbohidrato, resaltando el papel de los residuos cargados en la cavidad catalítica (Zhang *et al.*, 2021). Además, se observó la presencia de un ion Ca^{2+} , este ion ya ha sido descrito en otras FNs, el cual es esencial para la estabilización y catálisis de estas enzimas, ayuda en la formación de “puentes positivos” entre los grupos hidroxilo de los carbohidratos con los residuos negativos de la cavidad catalítica (Ozimek *et al.*, 2005; Wimmerová *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2021 y García-Paz *et al.* 2022).

Igualmente, no solo la cavidad catalítica se encuentra cargada negativamente, sino que las zonas aledañas a esta cavidad, cercanas a los dos dominios adicionales, también cuentan con este tipo de carga.

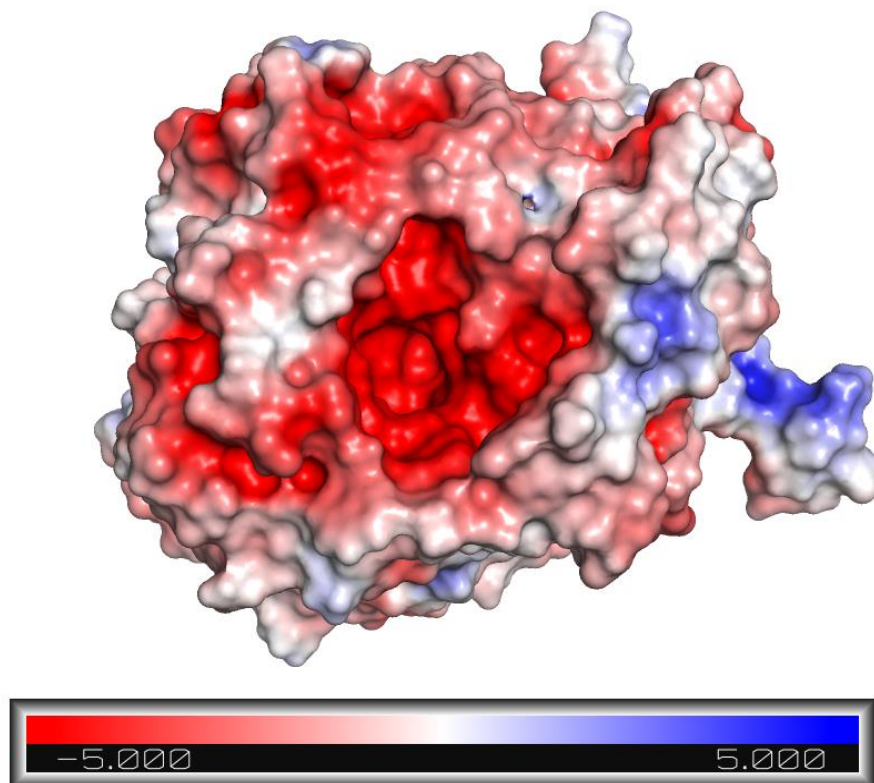


Figura 37. Representación de superficie de las cargas de la estructura de LevS N34Tn22.

Una vez analizada superficialmente la estructura de LevS N34Tn22, se pueden realizar análisis acerca de la ubicación de los subsitios de reconocimiento a carbohidratos.

IDENTIFICACIÓN *IN SILICO* DE LOS RESIDUOS CATALÍTICOS Y LOS PERTENECIENTES A LOS SUBSITIOS DE RECONOCIMIENTO A CARBOHIDRATO

COMPARACIÓN DE SECUENCIA Y ESTRUCTURA DE LA ENZIMA LevS N34Tn34.

Para conocer los posibles residuos que pertenecen a los subsitios de unión a carbohidrato, se realizó una comparación de secuencia primaria del dominio catalítico de la enzima LevS con la levansacarasa SacB de *Bacillus subtilis* (Raga *et al.* 2020, PDB ID: 6VHQ) empleando los programas T-COFFE (<https://tcoffee.crg.eu/>) y protein BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Figura 38).

```

LevS  - - - - - N - - ADGTSTTNM T YANLKDVADN IASLNPD T - - S V P Y F N A D A I K N L P A M T T A D A Q T G Q I Q D L
SacB  A S M K E T N Q K P Y K E T Y G I S H I T R H D M L Q I P E Q Q K - - - - N E K Y Q V P E F D S S T I K N I S S - - - - - A K G L

LevS  D V W D S W A L Q D A K T G A V A N Y H G Y N I V F A L A G Y P K E D N D Q H I Y M L Y T K Y G D T A L N N W K N A G P V F G F - - - - -
SacB  D V W D S W P L Q N A - D G T V A N Y H G Y H I V F A L A G D P K N A D D T S I Y M F Y Q K V G E T S I D S W K N A G R V F K D S D K F D A

LevS  - - - - N A K W N E Q Q W S G S A T V N D D D S I Q L F Y T K T D Q P N T V - Q R L A T A N L S M T Y T D T E V Y V A K V N D D H V L F A G
SacB  N D S I L K D Q T - Q E W S G S A T F T S D G K I R L F Y T D F S G K H Y G K Q T L T T A Q V N V S A S D S S L N I N G V E D Y K S I F D G

LevS  D G E Y Y Q T L Q Q W V D A G Y Y T T G - D N F T M R D P H V I E V N G E R Y L A F E A N T G T N - N Y Q S D D A V N D D T Y Y G G T E E F
SacB  D G K T Y Q N V Q Q F I D E - G N Y S S G D N H T L R D P H Y V E D K G H K Y L V F E A N T G T E D G Y Q G E E S L F N K A Y Y G K S T S F

LevS  N Q Q A K V D T L Q N P - - D K L K L S K K A N G A I G L I K L T K D Q N N P T V A Q V Y S P L L A A N G I T D E I E R A N I V P L N G K F
SacB  F R Q E S Q K L L Q S D K K R T A E L A - - - N G A L G M I E L N D D - - - Y T L K K V M K P L I A S N T V T D E I E R A N V F K M N G K W

LevS  Y L F T D T R L S K S V V P T A D F N I N V G M M G Y V S D S L - F G P Y T P L N G S G S V V T G T Q L F T S R T D T Y S Y Y A V P V E G R
SacB  Y L F T D S R G S K M T I D G I - T S N D I Y M L G Y V S N S L T G P - Y K P L N K T G L V L K M D L D P N D V T F T Y S H F A V P Q A K G

LevS  S D L L L V T S Y M S N R N E K A G T G M N A T F A P S F L I Q I S A D G M S T K V L D T V L - A Q G T W T - - - - -
SacB  - N N V V I T S Y M T N R G - - F Y A D K Q S T F A P S F L L N I K G K - - K T - - - - S V V K D S I L E Q G Q L T V N K

```

Figura 38. Alineamiento de la secuencia primaria del dominio catalítico de la levansacarasa LevS de *Leuconostoc mesenteroides* y SacB de *Bacillus subtilis*.

En este alineamiento se obtuvo que el dominio catalítico de LevS y SacB poseen un 45.61% de identidad, a pesar de esto, se encontró que los residuos de los subsitios de unión a carbohidrato -1, +1, +2, +3 y +4 descritos en SacB se encuentran conservados en LevS, a excepción del residuo Asn394 del subsitio +3, el cual es el homólogo del residuo Asp117 en SacB (Figura 38).

COMPARACIÓN DE LevS CON FRUCTANSACARASAS DE LA SUBFAMILIA GH68_1

Para conocer la ubicación espacial de los residuos pertenecientes a los subsitios de unión a carbohidrato encontrados en LevS durante el alineamiento de secuencia con SacB (PDB ID: 1OYG), se realizó una comparación de la estructura tridimensional de LevS N34Tn22 y SacB ya que estas son levansacarosas productoras de polímero y pertenecen a la subfamilia GH68_1 (Figura 39). En esta comparación se observa que las posiciones de los residuos que conforman los subsitios de unión a carbohidrato -1, +1, +2, +3 y +4 y los residuos que conforman a la triada catalítica son bastante similares. En esta comparación, se observó que los subsitios del -1 al +3 se encuentran en posiciones similares. El subsitio +4 se encuentra en la misma ubicación espacial, pero los residuos de tirosinas se encuentran rotados.

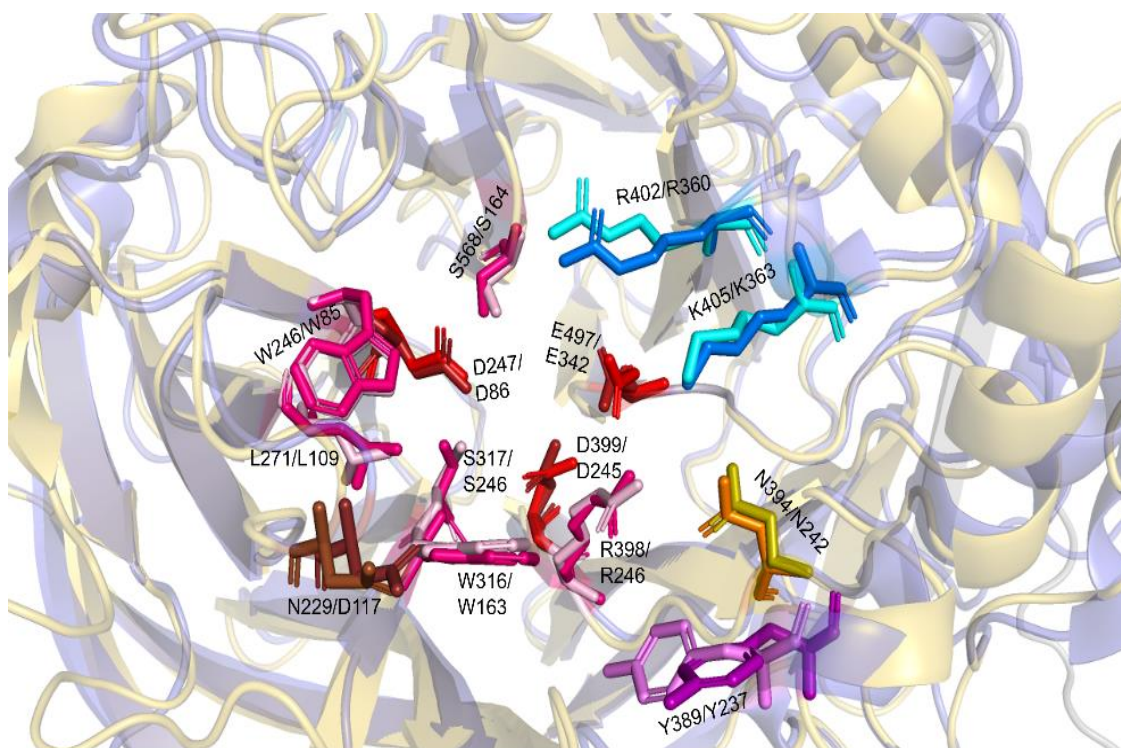


Figura 39. Composición tridimensional de los subsitios de las enzimas SacB y LevS. Subsitio -1 (Rosa claro LevS, Magenta SacB), +1 (Cian LevS, Azul SacB), +2 (Naranja Levs, Amarillo SacB) +3 (Café claro LevS, Café oscuro SacB) y +4 (Morado LevS, Púrpura SacB). Residuos catalíticos en rojo.

Además de la comparación con SacB, también se realizó la comparación con la inulosacarasa InuJ de *Lactobacillus johnsonii* (PDB ID: 2YFT), pues esta enzima es la única fructansacarasa multidominio con una estructura cristalográfica reportada. En este análisis se mostró que los subsitios del -1 al +3 y la triada catalítica se encuentran en posiciones similares; sin embargo, el subsitio +4 no se encuentra en la inulosacarasa InuJ, además, en el subsitio -1 hubo un cambio de residuo de lisina por metionina (L271-M296). Aunado a esto, el subsitio +3 posee un residuo de ácido aspártico en lugar de uno de asparagina (Figura 40).

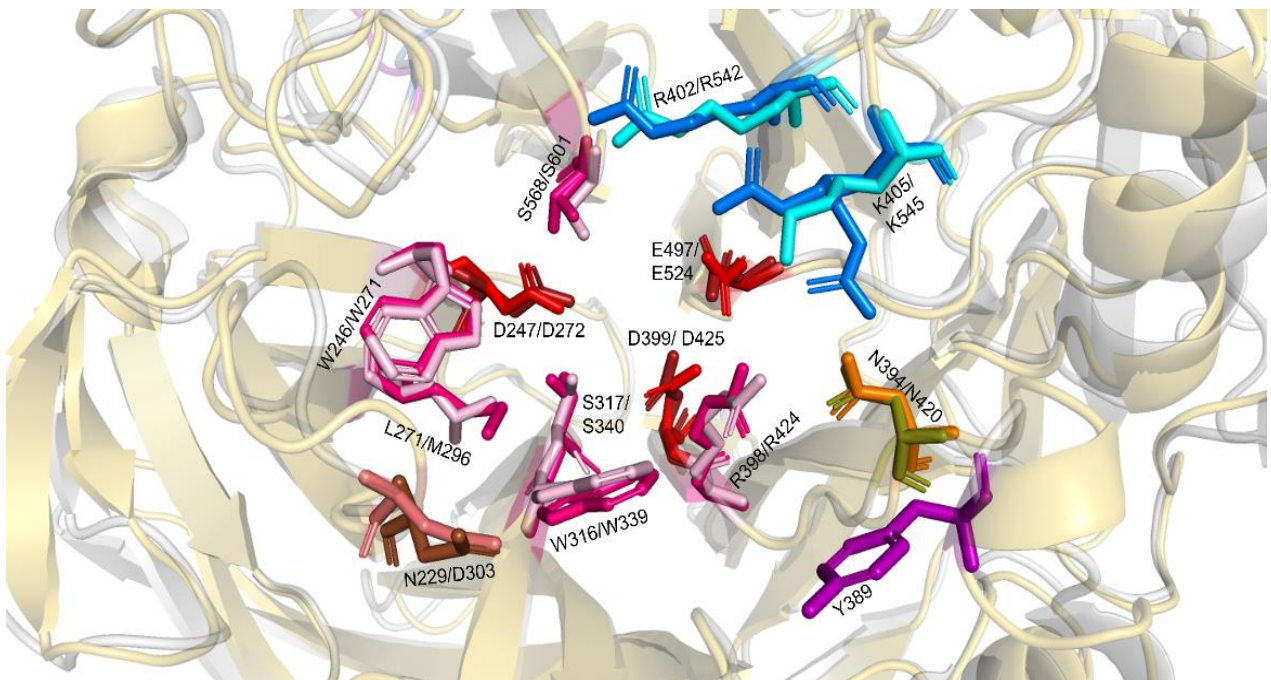


Figura 40. Comparación tridimensional de los subsitios de las enzimas InuJ y LevS. Subsitio -1 (Rosa claro LevS, Magenta InuJ), +1 (Cian LevS, Azul InuJ), +2 (Naranja LevS, Amarillo InuJ) y +3 (Café claro LevS, Café oscuro InuJ). Residuos catalíticos en rojo.

COMPARACIÓN ESTRUCTURAL DE LEVS CON LEVANSACARASAS DE LA SUBFAMILIA GH68_2

Además de las comparaciones con las enzimas de la subfamilia GH68_1, la estructura de LevS N34Tn22 también fue comparada con las levansacarosas productoras de FOS, pertenecientes a la subfamilia GH68_2: EtLSC de *Erwinia tasmaniensis*, LsdA de *Gluconacetobacter diazotrophicus* y Ea Lsc de *Erwinia amylovora* (Figuras 41-43). En estos tres casos las posiciones de los subsitios -1 y +1 coinciden en ubicación espacial; sin embargo, la conservación de los

aminoácidos cambia pues en el subsitio +1, se observa que en este grupo de enzimas la combinación de arginina y lisina cambian por histidina y treonina. Ya se ha reportado que el cambio de el residuo de arginina por histidina (R360H) afecta la síntesis de polímero en la levansacarasa SacB de *B. subtilis* (Chambert y Petit-Glatron, 1991), mientras que en la levansacarasa SacB de *B. megaterium* el cambio de arginina por alanina (R370A) produjo una mayor cantidad de FOS de neokestosa y blastosa (Homann *et al.*, 2007). En el caso de los subsitios +2 y +3 difieren completamente en comparación a LevS, teniendo tanto posiciones y residuos aminoacídicos diferentes, específicamente vemos el cambio del residuo de asparagina del subsitio +2 y +3 de LevS N34Tn22 por tirosina/fenilalanina y ácido glutámico/aspártico respectivamente (Tabla 7). Finalmente, el subsitio +4 identificado en LevS se encuentra ausente en las enzimas de la subfamilia GH68_1.

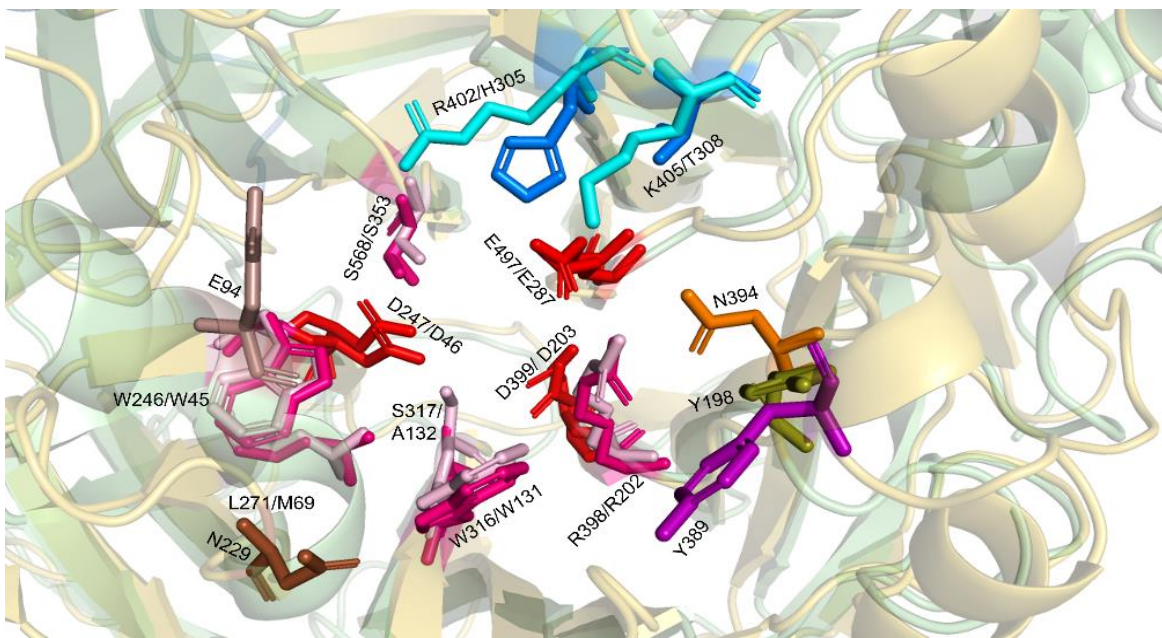


Figura 41. Comparación tridimensional de los subsitios de las enzimas EtLSC y LevS. Subsitio -1 (Rosa claro LevS, Magenta EtLSC), +1 (Cian LevS, Azul EtLSC), +2 (Naranja Levs, Amarillo EtLSC) y +3 (Café claro LevS, Café oscuro EtLSC). Residuos catalíticos en rojo.

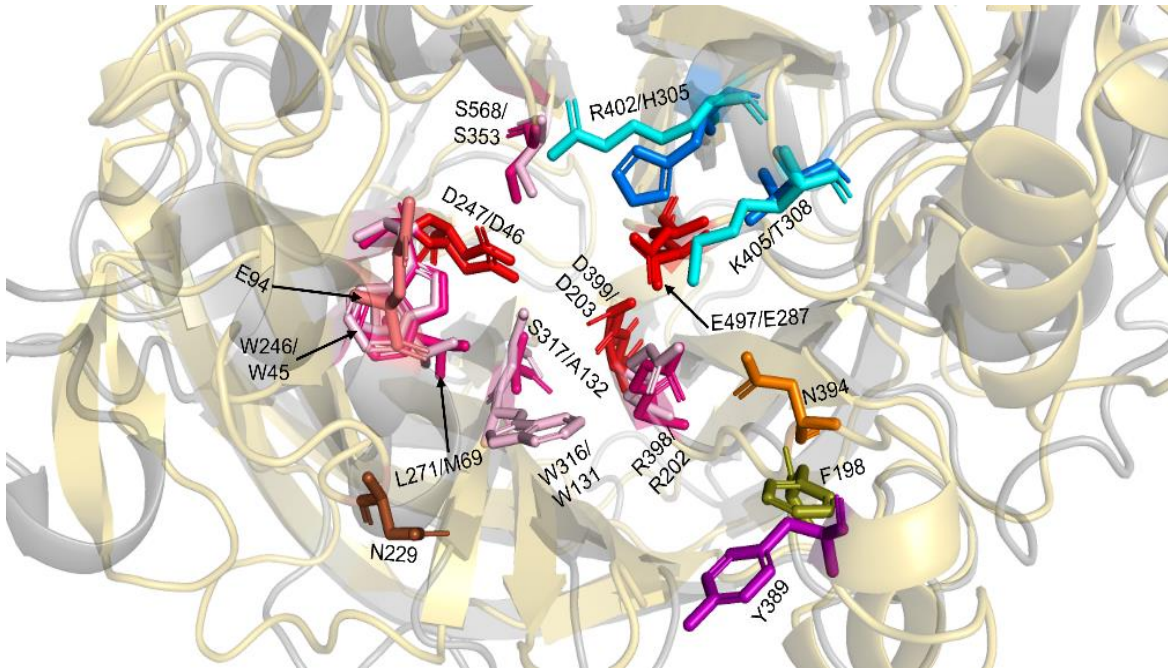


Figura 42. Comparación tridimensional de los subsitios de las enzimas Ea Lsc y LevS. Subsitio -1 (Rosa claro LevS, Magenta Ea Lsc), +1 (Cian LevS, Azul Ea Lsc), +2 (Naranja Levs, Amarillo Ea Lsc) y +3 (Café claro LevS, Café oscuro Ea Lsc). Residuos catalíticos en rojo.

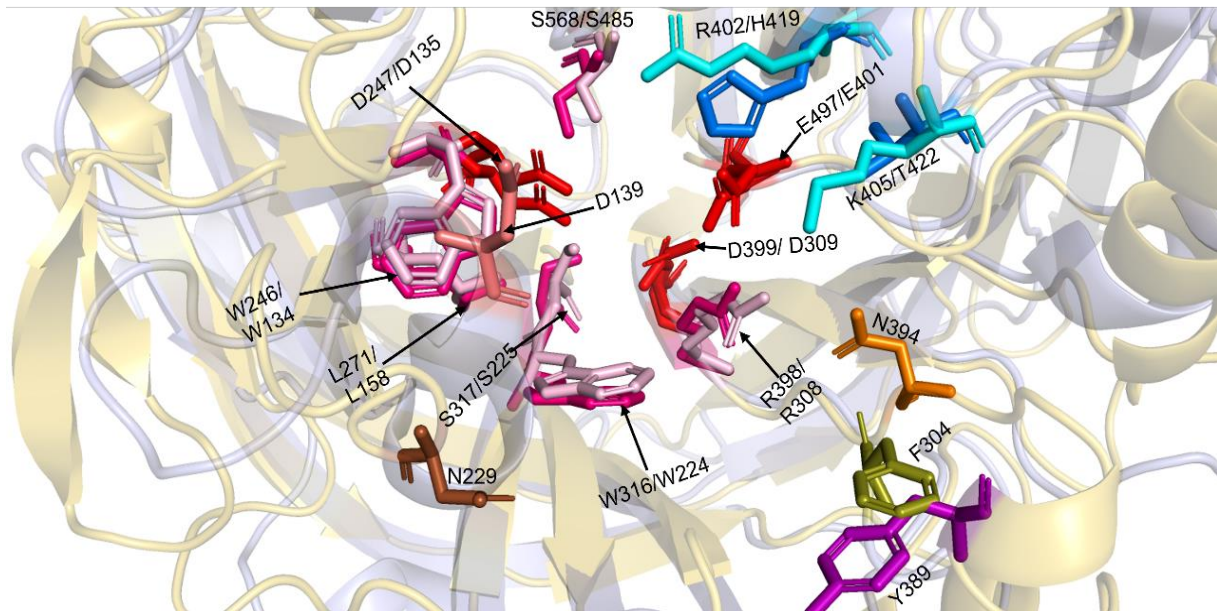


Figura 43. Comparación tridimensional de los subsitios de las enzimas LsdA y LevS. Subsitio -1 (Rosa claro LevS, Magenta LsdA), +1 (Cian LevS, Azul LsdA), +2 (Naranja Levs, Amarillo LsdA) y +3 (Café claro LevS, Café oscuro LsdA). Residuos catalíticos en rojo.

Una comparación de los residuos de los subsitios de unión a carbohidrato de LevS con las demás FNs se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Comparación de los residuos que conforman los subsitios de unión a carbohidrato en base a SacB						
Enzima	Subsitio					
	-1					
LevS	W246	S568	S317	R398	L271	W316
SacB	W85	S412	S164	R246	L109	W163
InuJ	W271	S601	S340	R424	M296	W339
EtLSC	W45	S353	A132	R202	L69	W131
Ea Lsc	W45	S353	A132	R202	L69	W131
LsdA	W134	S485	S225	R308	L158	W224
Enzima	Subsitio					
	+1	+2		+3	+4	
LevS	R515	K518	N394	R398	N229	Y389
SacB	R360	K363	N242	R246	D117	Y237
InuJ	R542	R545	N420	R424	N303	N/D
EtLSC	H305	T308	Y198	R202	E94	N/D
Ea Lsc	H305	T308	F198	R202	E94	N/D
LsdA	H419	T422	F304	R308	D169	N/D

*interacción hidrofóbica | \checkmark participa en dos subsitios

A partir de estos análisis de secuencia primaria y comparaciones de estructura terciaria, se propusieron los subsitios de unión a carbohidrato -1, +1, +2, +3 y +4 en la enzima LevS. Los residuos correspondientes para el subsitio -1 incluyen a los residuos Trp246, Ser568, Ser317, Arg398, Leu271, y Trp316. Para el subsitio +1, se sugieren los residuos Arg515 y Lys518, mientras que en el subsitio +2 se encuentran los residuos Asn394 y Arg398, este último se comparte con el subsitio -1. Los residuos asociados a los subsitios +3 y +4 son Asn394 y Tyr389,

respectivamente. La ubicación espacial de los subsitios de unión a carbohidrato (-1 a +4) de la estructura LevS N34Tn22 se muestran en la Figura 44.

Una vez identificados los residuos pertenecientes a los subsitios de unión a carbohidrato en la enzima LevS, se pueden realizar análisis de acoplamiento molecular para identificar la interacción que pueden tener estos subsitios con diferentes productos de la enzima los cuales pueden actuar como receptores de la reacción de transfructosilación.

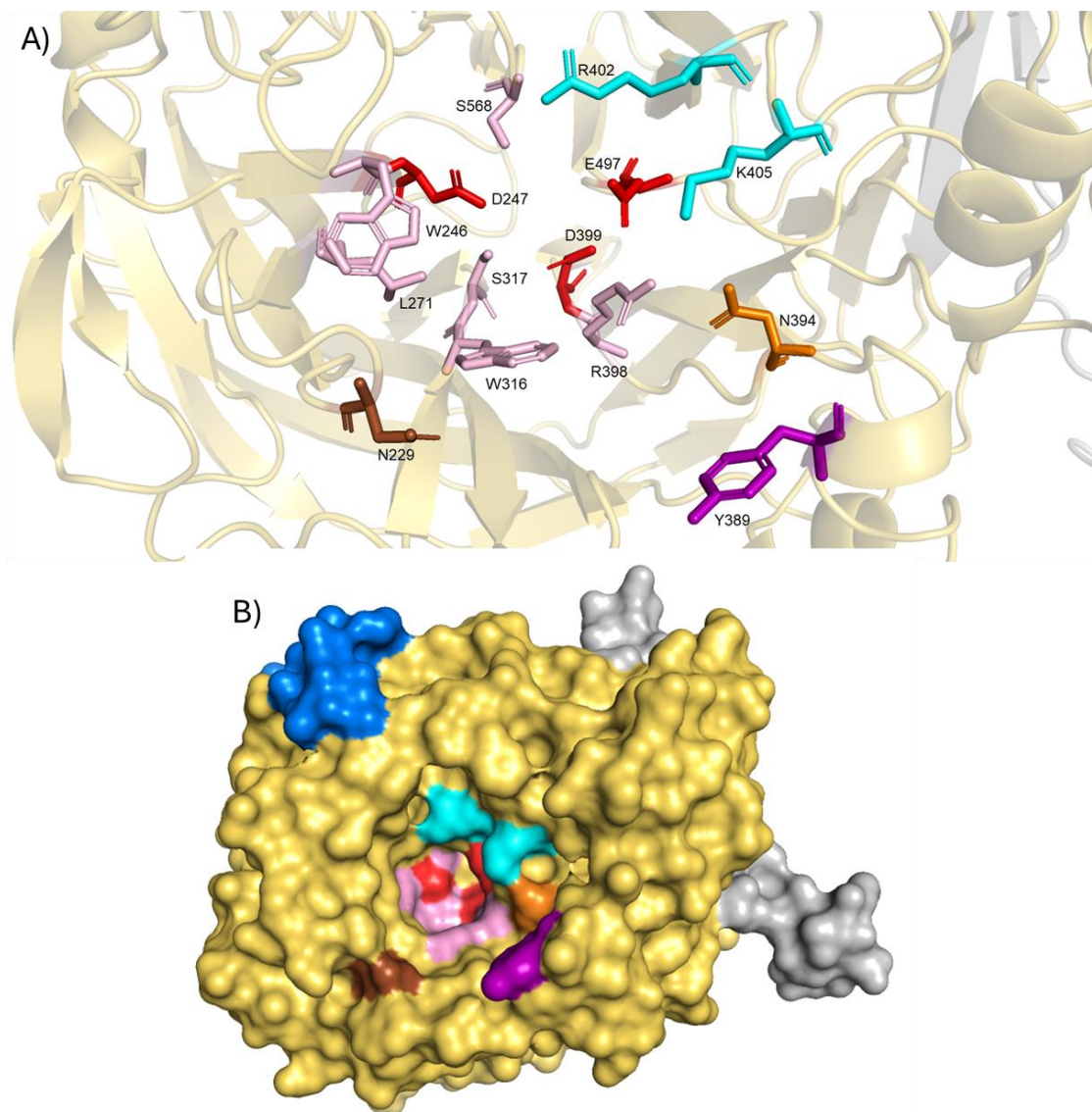


Figura 44. LevS identificación de los residuos pertenecientes a los subsitios -1 (rosa), +1 (cian), +2 (beige), +3 (café) y +4 (gris) A) Representación de las estructuras secundarias B) Representación de superficie

IDENTIFICACIÓN MEDIANTE ACOPLAMIENTO MOLECULAR DE RESIDUOS QUE PUDIERAN INTERACTUAR CON LOS OLIGOSACÁRIDOS PRODUCTO DE LA SÍNTESIS ENZIMÁTICA

ANÁLISIS MEDIANTE ACOPLAMIENTO MOLECULAR DE OTROS RESIDUOS QUE PUDIERAN INTERACTUAR CON EL CARBOHIDRATO

Para observar la posible interacción de los residuos pertenecientes a los subsitios de unión a carbohidrato con moléculas aceptoras que son producidos por la enzima, se realizaron ensayos de acoplamiento molecular utilizando el programa AutoDock Vina (<https://vina.scripps.edu/n>). En estos ensayos se emplearon las moléculas 1-kestosa (DP3), 1F-fructofuranosilnístosa (DP5) y 6-levanohexaosa (DP6), las cuales son FOS de tipo levana (Figura 45).

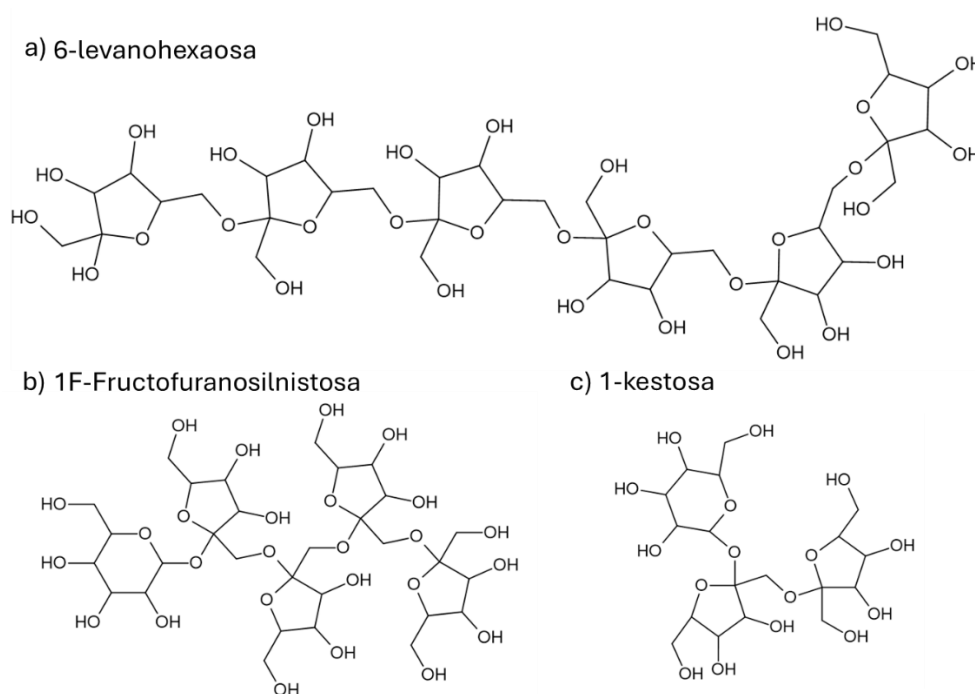


Figura 45. Moléculas empleadas como receptoras durante los ensayos de acoplamiento molecular. a) 6-levanohexaosa b) 1F-fructofuranosilnístosa y c) 1-Kestosa.

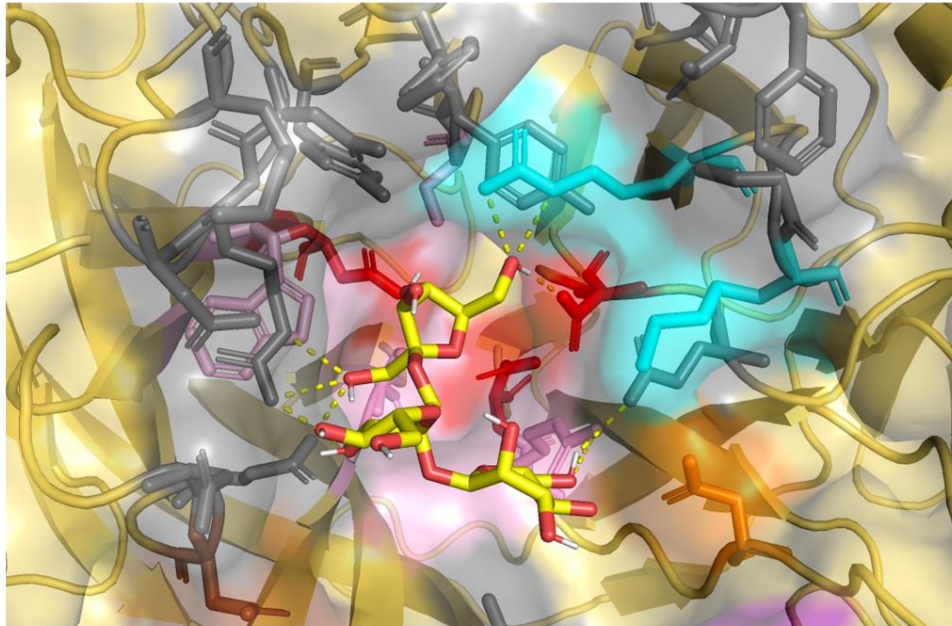
Estas moléculas se probaron dejando al receptor rígido (LevS N34Tn22), al igual que las moléculas de 1-kestosa y 1F-fructofuranosilnístosa. No obstante, la molécula de 6-levanohexaosa se probó de dos formas: una molécula completamente flexible y otra rígida. Las poses mostradas a continuación se escogieron en base a su función biológica, resaltando que todas las moléculas se unen a la enzima en forma de aceptor.

ACOPLAMIENTO MOLECULAR DE LevS N34Tn22 CON UNA MOLÉCULA DE 1-KESTOSA

Los análisis mostraron que la molécula de 1-kestosa posee una energía de unión de -9.0 kcal/mol y mostraron que interactúa con Trp246, Trp316 y Arg398 del subsitio -1 (Figura 46). El residuo de Arg398 forma dos puentes de hidrógeno mediante la interacción del grupo guanidino de este residuo con el oxígeno del hidroxilo unido al carbono 1 del residuo de glucosa de la 1-kestosa. Por otra parte, el programa LigPlot sugiere que los residuos de Trp246 y 316 tienen interacciones hidrofóbicas con esta molécula; sin embargo, sugerimos que estos pueden tener una posible interacción mediada por puentes de hidrógeno, debido a la naturaleza hidrofílica de éstos. Por su parte el residuo de Arg515, perteneciente al subsitio +1, forma dos puentes de hidrógeno con el oxígeno perteneciente al hidroxilo del carbono 6 del residuo F3.

Además, se encontró que esta molécula interactúa con otros residuos pertenecientes a la cavidad catalítica (Figura 46). Mediante la formación de un puente de hidrógeno, esta molécula interactúa con el residuo Gln281 (formado por el grupo amina de su cadena lateral con el oxígeno del hidroxilo perteneciente al carbono 1 del residuo F2) y con el residuo de Arg590 (formando dos puentes de hidrógeno con el oxígeno del mismo grupo hidroxilo). Asimismo, los residuos Asp278, Tyr567 y Tyr586 pueden tener interacciones mediadas por puentes de hidrógeno con esta molécula, mientras que los residuos de tirosina también podrían interactuar mediante interacciones de tipo “stacking”.

A)



B)

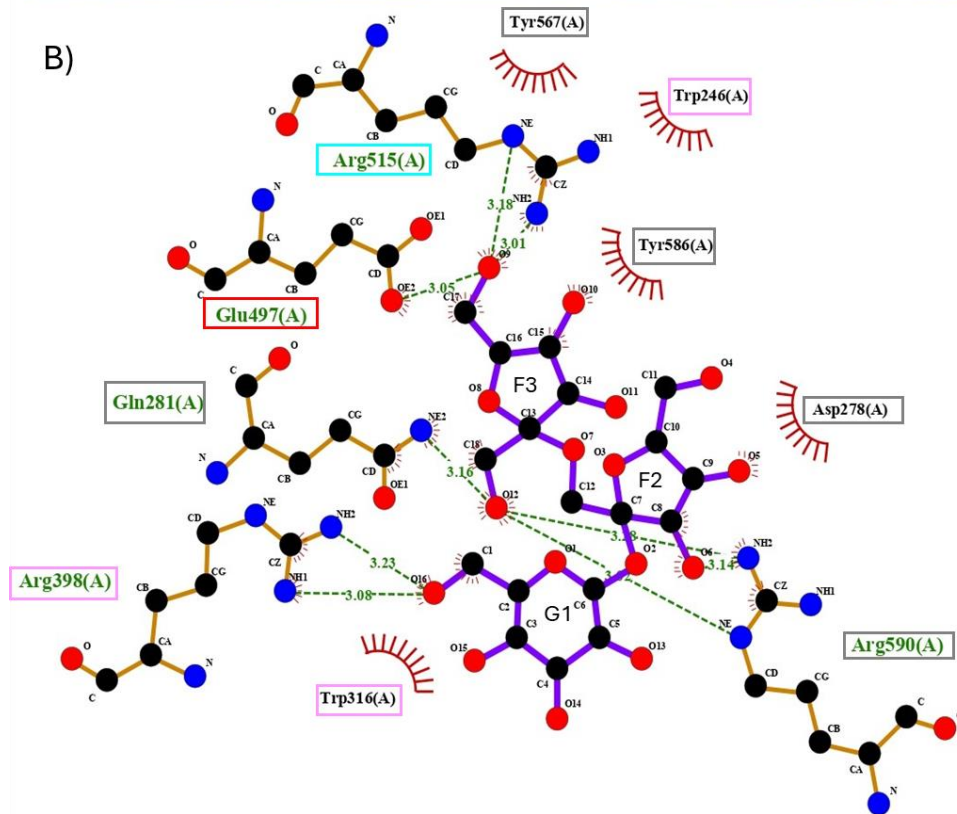


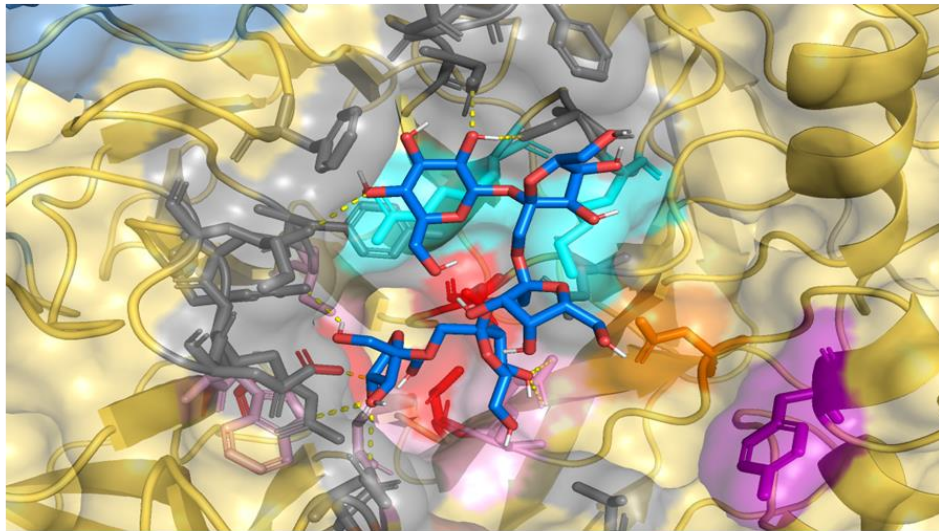
Figura 46. Acoplamiento de la molécula de 1-kestosa con la estructura LevS N34Tn22. A) Visualización tridimensional del acoplamiento; B) Diagrama de interacciones de los residuos de la estructura de la enzima LevS N34Tn22 con la molécula de 1-kestosa.

ACOPLAMIENTO MOLECULAR DE LevS N34Tn22 CON UNA MOLÉCULA DE 1-F-FRUCTOFURANOSILNISTOSA

Los ensayos mostraron que, en la pose elegida, la molécula de 1-F-fructofuranosilnistorosa posee una energía de unión de -12.8 kcal/mol e interactúa con los residuos Trp246, Arg398, Leu271 y Trp316 del subsitio -1 y Arg515 y Lys518 del subsitio +1 (Figura 47). Las interacciones con estos residuos pueden llevarse a cabo mediante la formación de puentes de hidrógeno. Además, se encontró que tanto el residuo catalítico Glu497 (catalizador ácido/base) y Asp247 (nucleófilo) forman uno y dos puentes de hidrógeno con los grupos hidroxilo pertenecientes a los carbonos 6 y 4 del residuo F5 y el hidroxilo unido al carbono 3 del residuo F4 respectivamente.

Además, se encontró que esta molécula parece formar puentes de hidrógeno con residuos aledaños a la cavidad catalítica como la Ser517, Asn529 y Gln281. Estos dos primeros residuos interactúan con el hidrógeno y oxígeno del grupo hidroxilo del carbono 5 del residuo de G1 respectivamente. Por su parte, el residuo Gln281 forma un puente de hidrógeno con el oxígeno del hidroxilo perteneciente al carbono 4 del residuo F5. También, se identificó la participación de los residuos Arg590, Phe560, Glu495 y Phe526, los cuales pueden formar puentes de hidrógenos o interacciones de tipo stacking en el caso de los residuos de fenilalanina.

A)



B)

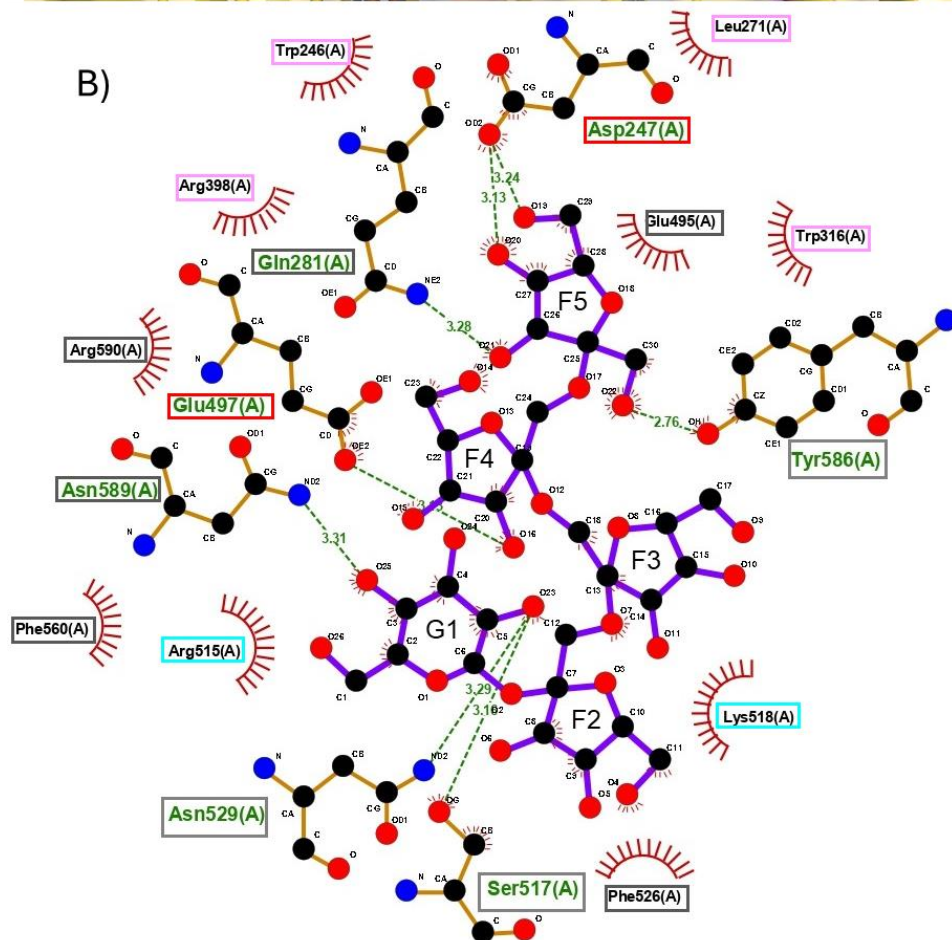


Figura 47. Acoplamiento de la molécula de 1F-fructofuranosilnystosa con la estructura de la enzima LevS N34Tn22. A) Visualización tridimensional del acoplamiento; B) Diagrama de interacciones de los residuos de la estructura de la enzima LevS N34Tn22 con la molécula de 1F-fructofuranosilnystosa.

ACOPLAMIENTO MOLECULAR DE LevS N34Tn22 CON UNA MOLÉCULA DE 6-LEVANOHEXAOSA FLEXIBLE

Los ensayos mostraron que, para esta pose, la molécula de 6-levanohexaosa flexible tiene una energía de unión de -7.8 kcal/mol (entrando en la cavidad catalítica formando una estructura parecida a una “U”) e interactúa con los residuos Trp246, Arg398 y Trp316 del subsitio -1, Arg515 y Lys518 del subsitio +1 y Asn394 del subsitio +2, además de los residuos catalíticos Asp399 (estabilizador) y Asp247 (nucleófilo) (Figura 48). Es importante mencionar que esta conformación en “U” que adopta la molécula podría llegar a explicar la formación de las ramificaciones (β 2-1) que pueden tener las moléculas de levana.

En el caso de los residuos pertenecientes al subsitio -1, los residuos Arg398 y Trp246 forman uno y dos puentes de hidrógeno con los hidroxilos del carbono 1 del residuo F6 (numerando como F1 desde el extremo no reductor del polímero) y carbono 4 del residuo F5 y carbono 3 del residuo F4 respectivamente, mientras que el residuo Trp316 puede interactuar mediante puentes de hidrógeno o interacciones de tipo “stacking” (Figura 48).

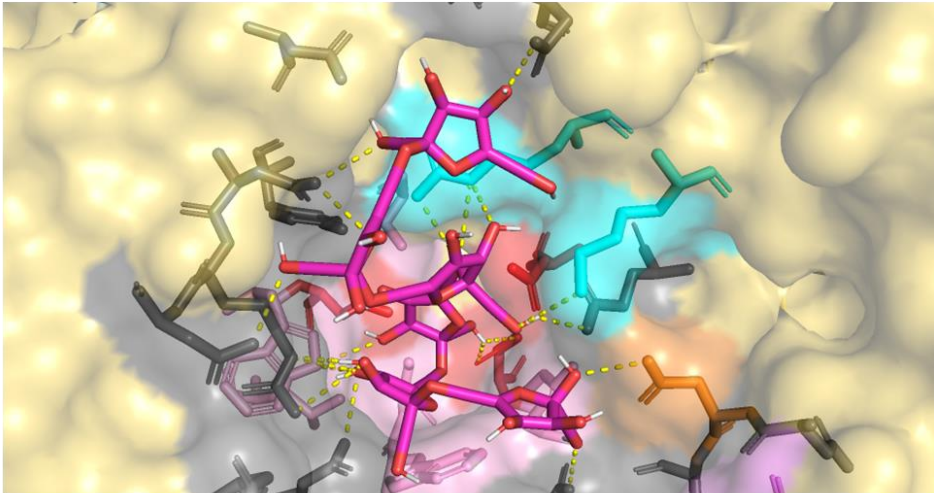
Aunado a esto, la Arg515, perteneciente al subsitio +1, forma tres puentes de hidrógeno con los grupos oxígenos correspondientes a los grupos hidroxilo de los carbonos 3, 6 y 1 de los residuos F3, F5 y F1 respectivamente, mientras que el residuo Lys518 puede tener interacciones mediante puentes de hidrógeno con la molécula de 6-levanohexaosa. Además, el residuo Asn394 del subsitio +2 forma un puente de hidrógeno con el oxígeno del grupo hidroxilo del carbono 2 del residuo F6. Por su parte, el residuo Asp399 forma un puente de hidrógeno con el grupo hidroxilo del carbono 1 del residuo F4 (Figura 48).

Al igual que en los acoplamientos con las moléculas anteriores, la molécula de 6-levanohexaosa podría formar puentes de hidrógeno con residuos pertenecientes a la cavidad catalítica como los residuos Gln342 y Glu495 que interactúan directamente mediante la formación de puentes de hidrógeno con los hidroxilos de

los carbonos 1 y 2, respectivamente en el residuo F6 de la 6-levanohexaosa. En el caso de los residuos Gln281 y Arg590 forman puentes de hidrógeno con los hidroxilos pertenecientes a los carbonos 1 y 3 con el residuo F5. Por otra parte, el residuo Tyr586 forma un puente de hidrógeno con el hidroxilo del carbono 4 del residuo F4. Además, el residuo Arg590 también cuenta con la capacidad de interactuar mediante un puente de hidrógeno con el hidroxilo del carbono 1 del residuo F2, en cambio, el residuo Asn529 forma un puente de hidrógeno con el grupo hidroxilo del carbono 3 del residuo F1 (Figura 48).

Por otra parte, los residuos Glu497, Lys593, Asn591, Phe560, Ser517y Asn427 pueden interactuar con la molécula de 6-levanohexaosa mediante puentes de hidrógeno. Sumado a esto, el residuo Phe560 también puede llegar a formar una interacción de tipo “stacking” con esta molécula.

A)



B)

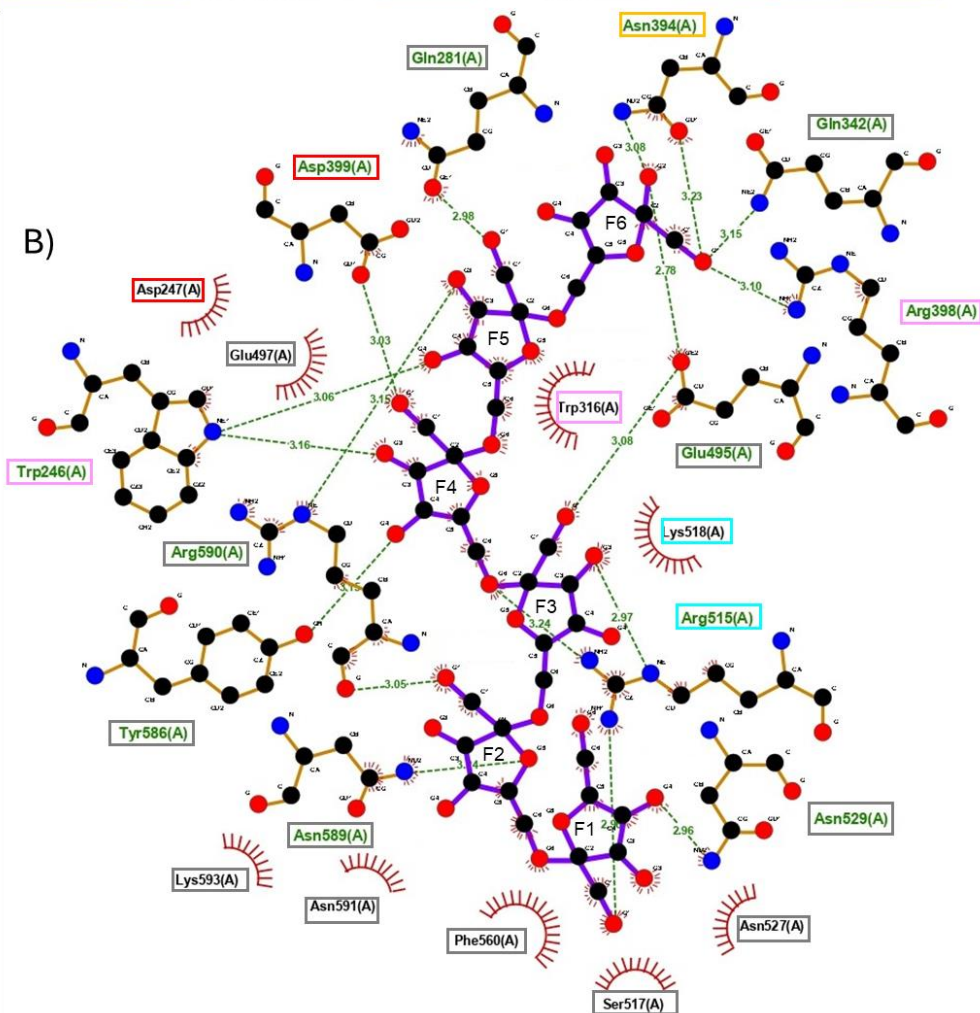
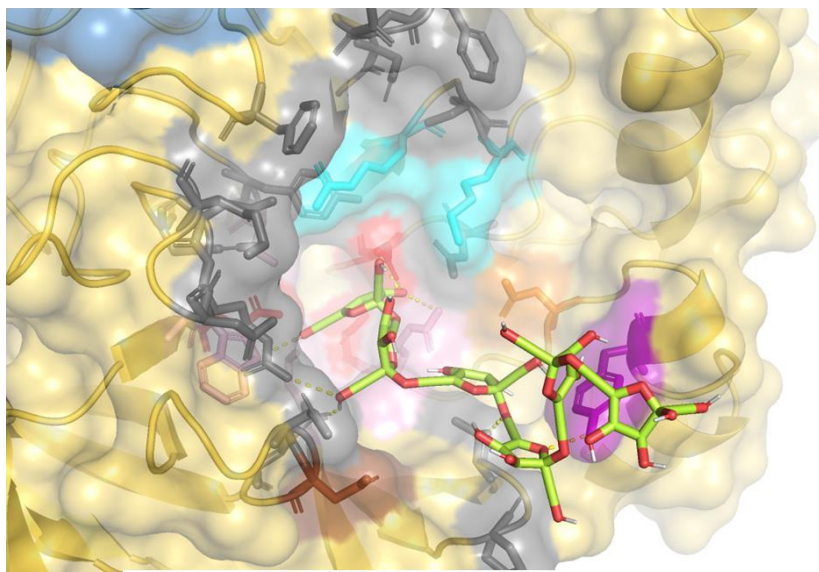


Figura 48. Acoplamiento de la molécula de 6-levanohexaosa flexible con la estructura de la enzima LevS N34Tn22. A) Visualización tridimensional del acoplamiento; B) Diagrama de interacciones de los residuos de la estructura de la enzima LevS N34Tn22 con la molécula de 6-levanohexaosa.

ACOPLAMIENTO MOLECULAR DE LevS N34Tn22 CON 6-LEVANOHEXAOSA RÍGIDA

A diferencia del ensayo con la molécula flexible de 6-levanohexaosa (numerando como F1 desde el extremo no reductor del polímero), la versión rígida entra de manera lineal a la cavidad de la estructura de LevS N34Tn22 (Figura 49) y tiene una energía de unión de -11.7 kcal/mol. Estos análisis de acoplamiento sugieren que el residuo catalítico Glu497 genera dos puentes de hidrógeno con los hidroxilos de los carbonos 3 y 4 del residuo F1, en el hidroxilo del carbono tres de este residuo también se forma un puente de hidrógeno con el residuo Glu495. Por su parte, el residuo Trp246 del subsitio -1 genera un puente de hidrógeno con el grupo hidroxilo del carbono 6 de la fracción F1 de la molécula de 6-levanohexaosa. Por otro lado, los residuos Arg590 y Gln281 forman cada uno un puente de hidrógeno con el hidroxilo del carbono 1 del residuo F2, mientras que el residuo Thr340 forma dos puentes de hidrógeno con los hidroxilos de los carbonos 6 y 3 de la fracción F4 y 3 respectivamente. Finalmente, el residuo del subsitio -4 genera un puente de hidrógeno al interactuar con el oxígeno que forma parte de la estructura del anillo de la fracción F4. Los residuos Asp247, Asp278 y Arg398 pueden interactuar con puentes de hidrógeno con esta molécula. Es necesario recalcar que los residuos F6 y F5 de la molécula de 6-levanohexaosa en la representación tridimensional del acoplamiento parecen no interactuar con residuos al encontrarse fuera de la cavidad catalítica, justo como sucede en la estructura cristalográfica de SacB de Raga *et al.* (2020)

A)



B)

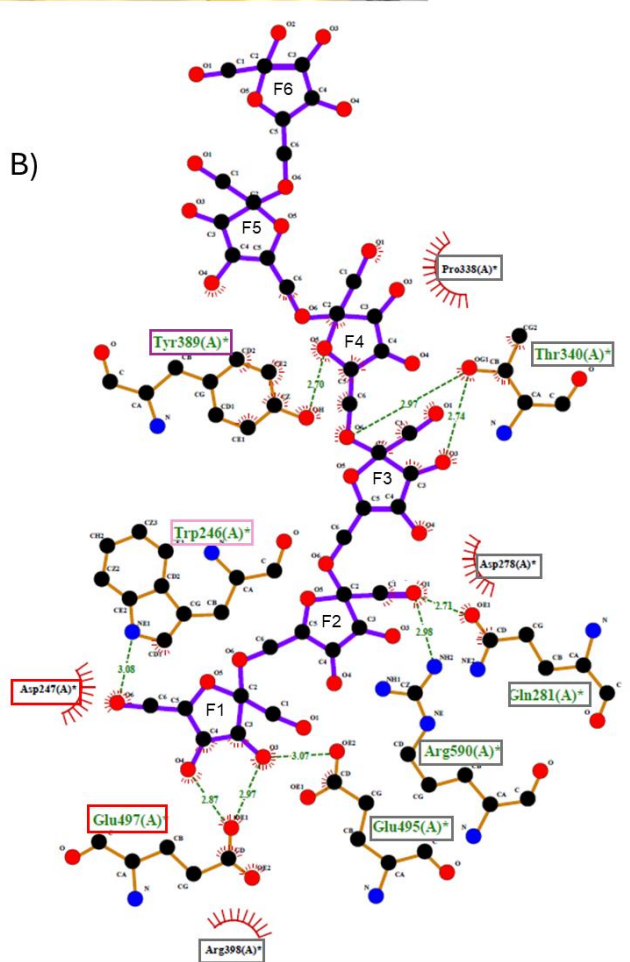


Figura 49. Acoplamiento de la molécula de 6-levanohexaosa rígida con la estructura de la enzima LevS N34Tn22. A) Visualización tridimensional del acoplamiento; B) Diagrama de interacciones de los residuos de estructura de la enzima LevS N34Tn22 con la molécula de 6-levanohexaosa

Durante estos ensayos con estas tres moléculas se identificaron 16 residuos: Gln281, Asp278, Trp311, Thr340, Gln337, Pro3385, Glu495, Ser517, Asn529, Phe256, Phe560, Tyr567, Asn589, Tyr586, Arg590, Asn591 y Lys593 (Figura 50), que se encuentran en la cavidad catalítica y pueden interactuar con los carbohidratos mediante puentes de hidrógeno e interacciones de tipo stacking, en el caso de los residuos aromáticos. En la literatura se ha reportado que residuos de Tyr, Asn, Lys, Gln pertenecientes a la cavidad catalítica actúan en el reconocimiento de carbohidratos, además de las interacciones que tienen los residuos cargados negativamente descritos con anterioridad (Strube *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2018).

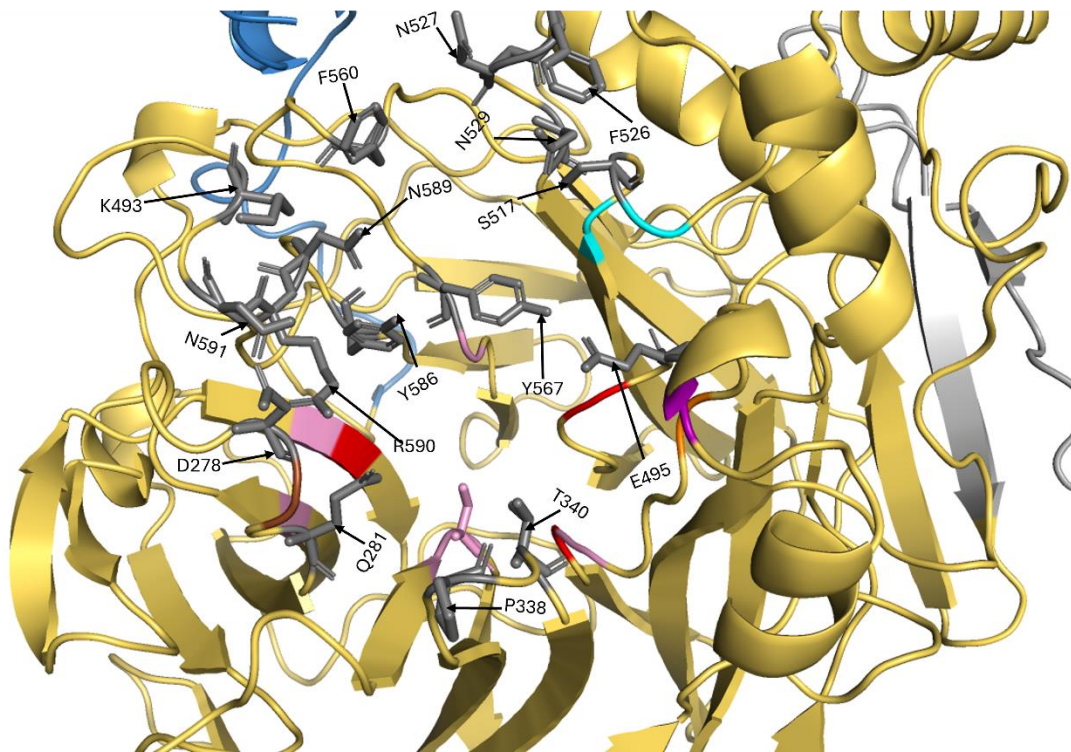


Figura 50. En gris: Residuos identificados con los ensayos de acoplamiento molecular.

Una vez encontrados los posibles residuos importantes en el reconocimiento de carbohidratos en la enzima LevS N70Tn38, se estudió su conservación en otras enzimas, también se identificaron otros posibles determinantes estructurales como son los bucles en este tipo de enzimas.

IDENTIFICACIÓN DE BUCLES PRESENTES EN LevS Y CONSERVACIÓN DE RESIDUOS DEL DOMINIO CATALÍTICO

En los estudios de Wuerges *et al.* (2015) y Polsinelli *et al.* (2019), se ha discutido la participación de los bucles de las fructansacararas en la síntesis de oligosacáridos de fructosa (FOS) y polímero en las levansacararas, al observar las diferencias de éstos en las levansacararas del grupo de las GH68_1 y GH68_2. El bucle I y IX de las enzimas del grupo GH68_1 y GH68_2 respectivamente, influye en el reconocimiento de la porción glicosídica de la sacarosa. Además, se ha hipotetizado que los bucles III y VIII son importantes en la determinación de la longitud de los productos de reacción ya que estos pueden bloquear la elongación del polímero que puede sintetizar la levansacarasa (Wuerges *et al.*, 2015). Finalmente, en la enzima Ea Lsc se ha propuesto que la estructura de los bucles VII, VIII y IX ayuda en la velocidad de recambio de sustrato/producto debido a la topología que producen en la superficie de la enzima (Wuerges *et al.*, 2015).

IDENTIFICACIÓN Y CONSERVACIÓN DE LOS RESIDUOS QUE FORMAN LOS BUCLES DEL DOMINIO CATALÍTICO EN DIVERSAS FRUCTANSACARASAS

A partir de la información recabada de los ensayos de acoplamiento molecular y la información propuesta por Wuerges *et al.* (2015) se realizó un alineamiento de secuencia primaria del dominio catalítico de LevS con la levansacarasa SacB y LsdA, por ser enzimas productoras de polímero y de FOS respectivamente, con el fin de identificar las secuencias aminoacídicas que conforman los bucles de la enzima LevS, así como analizar la conservación de los residuos que componen estas estructuras. Los resultados de este alineamiento se muestran en la Figura 49.

También se marcaron los bucles que conforman el dominio catalítico en la estructura tridimensional de LevS N34Tn22 empleando la secuencia encontrada mediante el alineamiento de secuencia primario. El criterio de selección se realizó en base a la numeración propuesta por Wuerges *et al.* (2015) de la enzima SacB de *Bacillus subtilis*. Los bucles presentes en la estructura LevS N34Tn22 se muestran en la Figura 52A. Estos bucles conforman la mayor parte de la superficie del interior del “embudo” formado por la estructura de la β -propela (Figura 52B).

```

LevS  - - - - - N - - ADGTSTNTMYANLKDVADNI - - - - - ASLNPD - - SVPYFNADA IKNLPAMTTADAQTGQIQDLVDVDSWA
SacB  - - - - - ASMKETNQKPYKETYGI SHITRHDMLQIPEQQ - - - - - K - - - - - NEKYQVPEFDSSTIKNIS - - - - - AKGLDVDSWP
LsdA  AGVPGFPLPSIHTQQAYDPQSDFTARWTRADALQIKAHSDATVAAGQNSLPAQLTMPNIPA - DFPVIN - - - - - PDVWVWDWTW

          Bucle I                               Bucle II
LevS  LQDAKTGAVANYHGYNI VFALAGYP - - - - - KEDNDQHI YMLYTKYGD - - - - - ALNNWKNAGPVVFGF - - - - - NAKWNEQQWSG
SacB  LQNA - DGTVANYHGYHIVFALAGDP - - - - - KNADDTSI YMFYQKVGET - - - - - SIDSWKNAGR VFKDSKFDANDS I LKQDT - QEWSG
LsdA  LIDK - HADQFSYNGWEVIFCLTADPNAGYGFDDRHVHARIGFFYRRAGIPASRRPVGNGWTYGGHLPDGA SAQVYAGQTYTNQ - AEWSG

          Bucle III                               Bucle IV
LevS  SATVND - - DDSIQLFYTKT DQP - - - - - NTV - - - - - QRLATANLSMTYTDTEVYVAKVNDDHVLFA GDGEYYQT LQQWVDAGYYTTG - DNF T
SacB  SATFTS - - DGKIRLFYTD FSGK - - - - - HYGKQTLTTA QVNSASDSSLN INGVEDYKSI FDGDGKTYQN VQQFIDE - GNYSSGDNHT
LsdA  SSRMLQIHGNTVSVFYTDV AFNRDANANNITPPDAIITQLGRIHADFNHVWF TGFTAHTPLLPQDPGVLYQN GAQNE - - - - - FFN

          Bucle V
LevS  MRDPHVI EV - - NGERYLAFEANTGTN - NYQSDDAVNDDTY YGGTEEFNQAKVDTLQNP - - DKLKLSKKA NGAIGL I KLT KDQNNPTVA
SacB  LRDPHYVED - - KGHKYL VFEANTGTEDGYQGEESLFNKAYYKSTSFRRQESQKLLQSDKKRT - - - AELANGALGMIELND - - D - YTLK
LsdA  FRDPFTFEDPKHPGVNYMVFEGNTA - - - - - GQRGVANCTEADLGRPNDPNAETLQEVL - - - DSG - - - AY YQKANIGLA IAT - DST - LSKW

          Bucle VI                               Bucle VII                               Bucle VIII
LevS  QVYSPLLAANGITDEI I ERANIVPLNGKFYLFDT RL SKSVVPTADFN I - - NVGMMGYVSDSL - FGPYTPLN - GSGSVV TGTQ - - - - -
SacB  KVMKPLIASNTVDEI I ERANVFKMNGKWYLFDSR GSKMTID - - - GITSDI I YMLGYVSNLTGP - YKPLN - KTGLVL KMDL - - - - -
LsdA  KFLSPLI SANCVNDQ I TERPQVYLHNGKYYIFTI SHRTTFAAG - - - VDG - - - PDGVYGFVGDGIRSD - FQPMNYGSGLTM GNPTDLNTAAGT

          Bucle IX
LevS  - - - - - LFTSRDTYSY YAVPVEGRSDLLLVTSYMSNRNEKAGTGMNATFAPSFLI QISADGMSTKVLDTVLA - - - - - QGTWT - - - - -
SacB  - - - - - DPNDVTFYSHFAVPQAKG - NNVV I TSYMTNRG - - - FYADKQSTFAPSFLN I KGK - - - - - SVVKD - - - - - SILEQQQLTVN
LsdA  DFDPSPDQNPRAFQSYSHYVMP - - - - - GGLVESFIDTV - - - - - ENRRGGTLAPTVRVRIAQN - - - - - AS - - - - - AVDLRYNGGLGGYGDIPAN

LevS  - - - - -
SacB  K - - - - -
LsdA  RADVNIAGFIQD

```

Figura 51. Alineamiento de secuencia primaria del sitio catalítico con SacB y LsdA. Bucle I (Cian claro) II (Verde), III (Lima) IV (Púrpura), V (Rojo), VI (Verde-azulado), VII (Azul morado), VIII, (Azul Rey) y IX (Magenta)

En el alineamiento de secuencia primaria (Figura 51) se encontró que, de los 16 residuos encontrados durante los ensayos de acoplamiento molecular, sólo cinco de estos se encuentran conservados tanto en SacB como en LevS, siendo estos cinco residuos Glu495, Ser517, Tyr567, Tyr586 y Asn586 (numeración de LevS, tomada desde el primer aminoácido de la enzima completa). Por su parte, LsdA solo comparte el residuo Tyr567 con LevS, este residuo es altamente conservado en levansacarosas debido a su participación en el reconocimiento de la fracción glucosil de la sacarosa (Wuerges *et al.*, 2015).

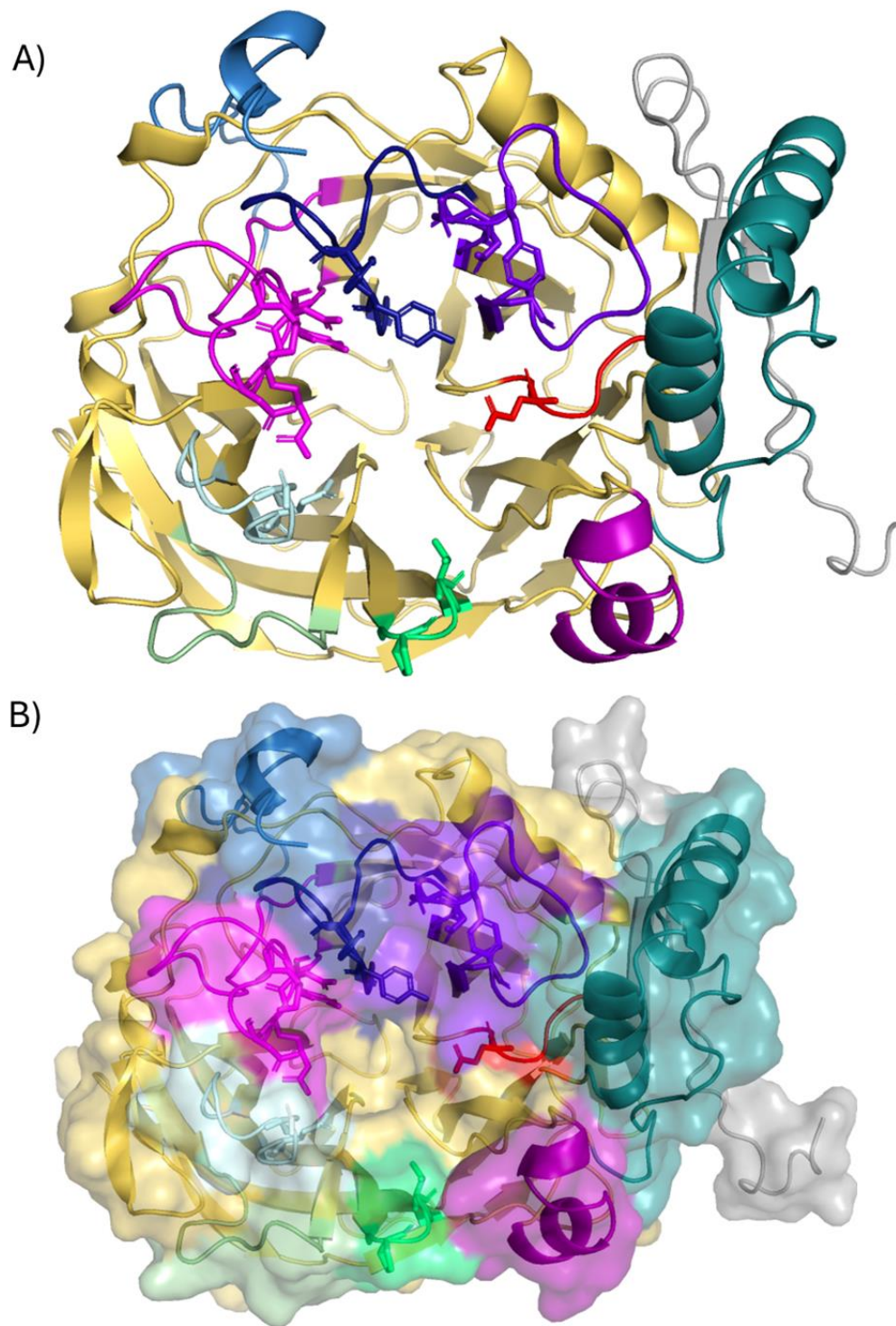


Figura 52. Bucles identificados en la estructura tridimensional LevS N34Tn22 A) Representación de las estructuras secundarias de LevS N34Tn22 B) Representación híbrida. Bucle I (Cian claro) II (Verde), III (Lima), IV (Púrpura), V (Rojo), VI (Verde-azulado), VII (Azul morado), VIII, (Azul rey) y IX (Magenta).

A partir de esta numeración de los bucles, se clasificaron y ubicaron los residuos encontrados durante los ensayos de acoplamiento molecular en los bucles de la estructura de LevS N34Tn22, los cuales se muestran en la Tabla 9 y su ubicación espacial en la Figura 50A. Se encontró que el bucle I aloja dos de los aminoácidos identificados: D278, Q281, y el subsitio +3. El bucle III posee dos aminoácidos identificados: P338 y T340, mientras que el bucle VI cuenta con el residuo E495 identificado en los ensayos de acoplamiento molecular. Por su parte, el bucle VII posee los residuos S517, N529, F526 y N527 y a los residuos R515 y K518 del subsitio +1, mientras que el bucle VIII posee en su arquitectura al residuo S568 del subsitio -1 y a los residuos F560 y Y567. Finalmente, el bucle IX cuenta con cinco residuos identificados que son Y586, N589, R590, N591 y K593.

Tabla 9. Residuos asociados a bucles identificados con los ensayos de acoplamiento molecular						
Bucle	Rango de aa (Total de aa)	Residuos				
I	273-282 (9)	Q281	D278*			
II	303-313 (10)					
III	336-341 (5)	P338*	T340			
IV	380-391 (11)					
V	418-461(43)					
VI	492-496 (4)	E495				
VII	515-530 (15)	S517	N529	F526*	N527	
VIII	555-570 (15)	F560*	Y567*			
IX	584-606 (22)	N589	Y586	R590	K593*	N591*

*Residuos marcados como interacciones hidrofóbicas en el programa LigPlot

De acuerdo con los estudios de Wuerges *et al.* (2015) y Polsinelli *et al.* (2019), el residuo de Arg590 (homólogo al residuo de Arg96 de Ea Lsc y Arg433 en SacB) es un residuo clave perteneciente al bucle IX que interviene en el reconocimiento de la fracción glucosil de la sacarosa. Además, se ha teorizado que los bucles I, IV, VII, VIII y IX son los encargados de definir el grado de polimerización de los productos

sintetizados por las levansacarinas. Aunado a esto, se ha demostrado que en la enzima SacB de *B. subtilis* los residuos Lys363, perteneciente al bucle VI (Lys518 en LevS), y Tyr429 (Tyr586 en LevS) en el bucle IX, interfieren en el proceso de transfructosilación. Esto concuerda con los resultados de los ensayos de acoplamiento molecular, ya que los bucles con más residuos que interactúan con las moléculas ensayadas fueron los bucles I (con dos residuos), VII (con cuatro residuos, incluido S517 el cual se encuentra al lado de Lys518) y IX (con cinco residuos, incluido Tyr586). Sin embargo, se necesitan estudios con mayor profundidad, generando mutantes variando las longitudes de los bucles y/o la obtención de enzima quiméricas con los bucles de otras FNs para conocer con mayor detenimiento el papel de estos bucles en las levansacarinas, incluida la enzima LevS.

CONCLUSIÓN

En este trabajo, se dilucidó la estructura cristalográfica LevS N34Tn22 de la enzima truncada LevS N70Tn38 de la levansacarina LevS de *Leuconostoc mesenteroides* B512F, con una resolución de 2.78 Å. Esta es la primera estructura cristalográfica reportada de una levansacarina multidominio. Se identificaron los residuos catalíticos: Asp247 (nucleófilo), Asp399 (estabilizador) y Glu497 (catalizador general ácido/base) (Figuras 28 y 31), así como los pertenecientes a los subsitios de reconocimiento a carbohidrato (subsitios -1 al +4) con base en comparaciones de secuencia primaria y estructuras tridimensionales de levansacarinas pertenecientes a las subfamilias GH68_1 y GH68_2, anteriormente reportadas. Los residuos correspondientes para el subsitio -1 incluyen a los residuos Trp246, Ser568, Ser317, Arg398, Leu271, y Trp316. Para el subsitio +1, se sugieren los residuos Arg515 y Lys518, mientras que en el subsitio +2 se encuentran los residuos Asn394 y Arg398, este último se comparte con el subsitio -1. Los residuos asociados a los subsitios +3 y +4 son Asn394 y Tyr389, respectivamente (Figura 42). Además, mediante ensayos de acoplamiento molecular, se encontraron 16 residuos (Gln281, Asp278, Trp311, Thr340, Gln337, Pro3385, Glu495, Ser517, Asn529, Phe256, Phe560, Tyr567, Asn589, Tyr586, Arg590, Asn591 y Lys593) que pueden jugar un

papel importante en el reconocimiento de carbohidratos (Figura 48 y Tabla 8). Finalmente, se identificaron las secuencias aminoacídicas y ubicaciones espaciales pertenecientes a los nueve bucles reportados por Wuerges *et al.* (2015) para este tipo de enzimas, destacando a aquellos que se encuentran en los bucles I, IV, VII, VIII y IX, los cuales podrían influir en la síntesis de productos al afectar la topología del dominio catalítico de la levansacarasa LevS.

PROSPECTIVAS

- Purificar y medir la actividad de la mutante LevS N70Tn38 D247A para confirmar la ausencia de actividad catalítica de esta enzima.
- En caso de que la mutante LevS N70Tn38 (D247A) presente actividad catalítica, se deberá producir, purificar y medir la actividad catalítica de la doble mutante LevS N70Tn38 (D247A; D399A) para confirmar su inactividad. Esto permitirá co-cristalizar la versión inactiva de LevS N70Tn38 con sacarosa, kestosa u otro FOS, con el objetivo de observar el posible rol de las regiones adicionales de esta enzima, así como analizar las interacciones de los bucles con estos carbohidratos.
- Generar mutaciones en los bucles I, IV, VII, VIII y IX, principalmente en los aminoácidos encontrados durante los ensayos de acoplamiento molecular, para encontrar el papel que estos podrían tener en el tipo de productos (FOS o polímero) sintetizados por la enzima.
- Mutagenizar el subsitio +1 con los residuos de la subfamilia GH68_2 para esclarecer la importancia de este subsitio en la síntesis de polímero y FOS.

REFERENCIAS

- Barends, T. R. M., & Dijkstra, B. W. (2003). Oils used in microbatch crystallization do not remove a detergent from the drops they cover. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 59(12), 2345-2347. <https://doi.org/10.1107/s0907444903019103>
- Bustamante, M., Oomah, B. D., Oliveira, W. P., Burgos-Díaz, C., Rubilar, M., & Shene, C. (2019). Probiotics and prebiotics potential for the care of skin, female urogenital tract, and respiratory tract. *Folia Microbiologica*, 65(2), 245-264. <https://doi.org/10.1007/s12223-019-00759-3>
- Chambert, R., Treboul, G., & Dedonder, R. (1974). Kinetic Studies of Levansucrase of *Bacillus subtilis*. *European Journal Of Biochemistry*, 41(2), 285-300. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1974.tb03269.x>
- Davies, G. J., Wilson, K. S., & Henrissat, B. (1997). Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases. *Biochemical Journal*, 321(2), 557-559. <https://doi.org/10.1042/bj3210557>
- De María García-Paz, F., Martínez-Bahena, S., & Olvera, C. (2022). Structure–Function Relationship Studies of Multidomain Levansucrases from Leuconostocaceae Family. *Microorganisms*, 10(5), 889. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10050889>
- Del Moral, S., Olvera, C., Rodríguez, M. E., & Munguia, A. L. (2008). Functional role of the additional domains in inulosucrase (IsIA) from *Leuconostoc citreum* CW28. *BMC Biochemistry*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2091-9-6>

Díaz-Ramos, D. I., Ortiz-Basurto, R. I., García-Barradas, O., Chacón-López, M. A., Montalvo-González, E., Pascual-Pineda, L. A., Valenzuela-Vázquez, U., & Jiménez-Fernández, M. (2023). Lauroylated, Acetylated, and Succinylated Agave tequilana Fructans Fractions: Structural Characterization, Prebiotic, Antibacterial Activity and Their Effect on *Lactobacillus paracasei* under Gastrointestinal Conditions. *Polymers*, *15*(14), 3115. <https://doi.org/10.3390/polym15143115>

Dodson, E. (2021). Introduction to molecular replacement: a time perspective. *Acta Crystallographica Section D Structural Biology*, *77*(7), 867-879. <https://doi.org/10.1107/s2059798321004368>

Estudio de la reacción de síntesis de fructooligosacáridos tipo levana empleando la enzima levansacarasa (SacB) de Bacillus subtilis y dos variantes. (2019). [Tesis de Licenciatura]. Universidad Politécnica de Pénjamo.

Evans, P., & McCoy, A. (2007). An introduction to molecular replacement. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, *64*(1), 1-10. <https://doi.org/10.1107/s0907444907051554>

Font-Bardia, M., & Alcobé, X. (2012). X-ray single crystal and powder diffraction: possibilities and applications [Libro digital]. En *Handbook of instrumental techniques for materials, chemical and biosciences research*. Centres Científics i Tecnològics. Universitat de Barcelona. <http://hdl.handle.net/2445/32164>

García-Paz, F. D. M. (s. f.). *Estudio de la relación estructura/función de la fructosiltransferasa multidominio LevS de Leuconostoc mesenteroides* [Tesis de doctorado]. Universidad Nacional Autónoma de México.

Gorrec, F. (2021). A beginner's guide to macromolecular crystallization. *The Biochemist*, 43(1), 36-43. https://doi.org/10.1042/bio_2020_108

Guillen-Tinoco, S. (2022). *Estudio de la encapsulación de insulina en gliconanopartículas de levana producidas mediante síntesis enzimática* [Tesis de maestría, Universidad Nacional Autónoma de México]. <https://ru.dgb.unam.mx/jspui/bitstream/20.500.14330/TES01000832786/3/0832786.pdf>

Hampton Research. (2020). *Microbatch Crystallization*. Recuperado 13 de febrero de 2025, de https://hamptonresearch.com/uploads/cg_pdf/CG101_Microbatch_Crystallization.pdf

Hampton Research. (2023, 6 abril). *Sample Preparation for Crystallization*. <https://hamptonresearch.com/blog-sample-preparation-for-crystallization-336.html>

Hornung, B. V. H., & Terrapon, N. (2023). An objective criterion to evaluate sequence-similarity networks helps in dividing the protein family sequence space. *PLoS Computational Biology*, 19(8), e1010881. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1010881>

Kim, K., Kishu, K., Onkei, R., Taisho, L., & Tetsuko, K. (2003). *Cosmetic composition containing levan having cell-proliferation, skin-moisturizing and*

irritation- alleviating effects (Patent N.º JP2003277225A). Japan Patent Office. <https://patents.google.com/patent/JP2003277225A/en>

Lee, S. Y., Shin, W., Sekhon, S. S., Lee, J., Kim, Y., Ahn, J., & Kim, Y. (2018). Molecular Docking Analysis and Biochemical Evaluation of Levansucrase from *Sphingobium chungbukense* DJ77. *ACS Combinatorial Science*, *20*(7), 414-422. <https://doi.org/10.1021/acscombsci.8b00002>

Li, L., Casalini, T., Arosio, P., & Salvalaglio, M. (2022). Modeling the Structure and Interactions of Intrinsically Disordered Peptides with Multiple Replica, Metadynamics-Based Sampling Methods and Force-Field Combinations. *Journal Of Chemical Theory And Computation*, *18*(3), 1915-1928. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.1c00889>

Martínez-Bahena, S. (2020). *Delimitando la región N-terminal involucrada en la procesividad de la levansacarasa LevS de Leuconostoc mesenteroides*. Cuernavaca, [Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma del Estado de Morelos].

<https://ru.dgb.unam.mx/bitstream/20.500.14330/TES01000803111/3/0803111.pdf>

Martínez-Bahena, S. (2024). *Generación semi-racional y selección de mutantes afectadas en la síntesis de levanas de alto peso molecular de la levansacarasa LevS de Leuconostoc mesenteroides* [Tesis de Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México].

<https://ru.dgb.unam.mx/bitstream/20.500.14330/TES01000851808/3/0851808.pdf>

Martínez-Fleites, C., Ortiz-Lombardía, M., Pons, T., Tarbouriech, N., Taylor, E. J., Arrieta, J. G., Hernández, L., & Davies, G. J. (2005). Crystal structure of levansucrase from the Gram-negative bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Biochemical Journal*, 390(1), 19-27. <https://doi.org/10.1042/bj20050324>

Martínez-Morales, M. J. (2021). *Identificación de la zona mínima funcional de la región de transición responsable en la actividad transferasa y procesividad de la levansacarasa LevS de Leuconostoc mesenteroides* [Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma De México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza]. <https://ru.dgb.unam.mx/jspui/bitstream/20.500.14330/TES01000817094/3/0817094.pdf>

Martínez-Morales, M. J. (2024). *Generación y caracterización de un sistema de nanoacarreo basado en nanopartículas de fructanas capaz de llegar al cerebro* [Tesis de maestría, Universidad Nacional Autónoma de México]. <https://ru.dgb.unam.mx/jspui/bitstream/20.500.14330/TES01000857769/3/0857769.pdf>

McPherson, A., & Gavira, J. A. (2013). Introduction to protein crystallization. *Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications*, 70(1), 2-20. <https://doi.org/10.1107/s2053230x13033141>

Meng, G., & Fütterer, K. (2003). Structural framework of fructosyl transfer in *Bacillus subtilis* levansucrase. *Nature Structural & Molecular Biology*, 10(11), 935-941. <https://doi.org/10.1038/nsb974>

Morales-Arrieta, S. (2007). *Estudio de una fructosiltransferasa de Leuconostoc mesenteroides NRRL512: clonación, producción y análisis de la relación estructura-función* [Tesis de doctorado, Universidad Nacional Autónoma de México].

<https://ru.dgb.unam.mx/bitstream/20.500.14330/TES01000619248/3/0619248.pdf>

Mummaleti, G., Sarma, C., Kalakandan, S. K., Gazula, H., Sivanandham, V., & Anandharaj, A. (2021). Characterization of levan produced from coconut inflorescence sap using *Bacillus subtilis* and its application as a sweetener. *LWT*, 154, 112697. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112697>

Núñez-López, G., Herrera-González, A., Hernández, L., Amaya-Delgado, L., Sandoval, G., Gschaedler, A., Arrizon, J., Remaud-Simeon, M., & Morel, S. (2018). Fructosylation of phenolic compounds by levansucrase from *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Enzyme And Microbial Technology*, 122, 19-25. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2018.12.004>

Olvera, C., Centeno-Leija, S., Ruiz-Leyva, P., & López-Munguía, A. (2012). Design of Chimeric Levansucrases with Improved Transglycosylation Activity. *Applied And Environmental Microbiology*, 78(6), 1820-1825. <https://doi.org/10.1128/aem.07222-11>

Olvera, C., Centeno-Leija, S., Ruiz-Leyva, P., & López-Munguía, A. (2012). Design of Chimeric Levansucrases with Improved Transglycosylation Activity. *Applied And Environmental Microbiology*, 78(6), 1820-1825. <https://doi.org/10.1128/aem.07222-11>

Ozimek, L., Euverink, G., Van Der Maarel, M., & Dijkhuizen, L. (2005). Mutational analysis of the role of calcium ions in the *Lactobacillus reuteri* strain 121 fructosyltransferase (levansucrase and inulosucrase) enzymes. *FEBS Letters*, 579(5), 1124-1128. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.11.113>

Ozimek, L. K., Kralj, S., Kaper, T., Van Der Maarel, M. J. E. C., & Dijkhuizen, L. (2006). Single amino acid residue changes in subsite – 1 of inulosucrase from *Lactobacillus reuteri* 121 strongly influence the size of products synthesized. *FEBS Journal*, 273(17), 4104-4113. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05411.x>

Pang, Y., & Liu, B. (2024). DisoFLAG: accurate prediction of protein intrinsic disorder and its functions using graph-based interaction protein language model. *BMC Biology*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/s12915-023-01803-y>

Phengnoi, P., Charoenwongpaiboon, T., Wangpaiboon, K., Klaewkla, M., Nakapong, S., Visessanguan, W., Ito, K., Pichyangkura, R., & Kuttiyawong, K. (2020). Levansucrase from *Bacillus amyloliquefaciens* KK9 and Its Y237S Variant Producing the High Bioactive Levan-Type Fructooligosaccharides. *Biomolecules*, 10(5), 692. <https://doi.org/10.3390/biom10050692>

Pijning, T., Anwar, M. A., Böger, M., Dobruchowska, J. M., Leemhuis, H., Kralj, S., Dijkhuizen, L., & Dijkstra, B. W. (2011). Crystal Structure of Inulosucrase from *Lactobacillus*: Insights into the Substrate Specificity and Product Specificity of GH68 Fructansucrases. *Journal Of Molecular Biology*, 412(1), 80-93. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.07.031>

Ragab, T. I., Shalaby, A. S. G., Awdan, S. A. E., El-Bassyouni, G. T., Salama, B. M., Helmy, W. A., & Esawy, M. A. (2019). Role of levan extracted from bacterial honey isolates in curing peptic ulcer: In vivo. *International Journal Of Biological Macromolecules*, 142, 564-573.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.09.131>

Roberfroid, M., Gibson, G. R., Hoyles, L., McCartney, A. L., Rastall, R., Rowland, I., Wolvers, D., Watzl, B., Szajewska, H., Stahl, B., Guarner, F., Respondek, F., Whelan, K., Coxam, V., Davicco, M., Léotoing, L., Wittrant,

Y., Delzenne, N. M., Cani, P. D., . . . Meheust, A. (2010). Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *British Journal Of Nutrition*, 104(S2), S1-S63.

<https://doi.org/10.1017/s0007114510003363>

Ruff, K. M., & Pappu, R. V. (2021). AlphaFold and Implications for Intrinsically Disordered Proteins. *Journal Of Molecular Biology*, 433(20), 167208.

<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.167208>

Saleh, S. A., Shawky, H., Ezzat, A., Taie, H. A., Salama, B., El-Bassyouni, G. T., Awdan, S. A. E., Awad, G. E., Hashem, A. M., Esawy, M. A., & Wahab, W. A. A. (2023). Prebiotic-mediated gastroprotective potentials of three bacterial levans through NF-κB-modulation and upregulation of systemic IL-17A. *International Journal Of Biological Macromolecules*, 250, 126278.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.126278>

Shrestha, U. R., Smith, J. C., & Petridis, L. (2021). Full structural ensembles of intrinsically disordered proteins from unbiased molecular dynamics

simulations. *Communications Biology*, 4(1). <https://doi.org/10.1038/s42003-021-01759-1>

Srikanth, R., Siddartha, G., Reddy, C. H. S., BS, N. H., Ramaiah, M. J., & Uppuluri, K. B. (2015). Antioxidant and anti-inflammatory levan produced from *Acetobacter xylinum* NCIM2526 and its statistical optimization. *Carbohydrate Polymers*, 123, 8-16. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.12.079>

Stick, R. V., & Williams, S. J. (2009). Disaccharides, Oligosaccharides and Polysaccharides. En *Elsevier eBooks* (pp. 321-341). <https://doi.org/10.1016/b978-0-240-52118-3.00009-0>

Strube, C. P., Homann, A., Gamer, M., Jahn, D., Seibel, J., & Heinz, D. W. (2011). Polysaccharide Synthesis of the Levansucrase SacB from *Bacillus megaterium* Is Controlled by Distinct Surface Motifs. *Journal Of Biological Chemistry*, 286(20), 17593-17600. <https://doi.org/10.1074/jbc.m110.203166>

Tabernero, A., González-Garcinuño, Á., Sánchez-Álvarez, J. M., Galán, M. A., & Del Valle, E. M. M. (2016). Development of a nanoparticle system based on a fructose polymer: Stability and drug release studies. *Carbohydrate Polymers*, 160, 26-33. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.12.025>

Timofeev, V., & Samygina, V. (2023). Protein Crystallography: Achievements and Challenges. *Crystals*, 13(1), 71. <https://doi.org/10.3390/cryst13010071>

Verma, D. K., Patel, A. R., Thakur, M., Singh, S., Tripathy, S., Srivastav, P. P., Chávez-González, M. L., Gupta, A. K., & Aguilar, C. N. (2021). A review of the composition and toxicology of fructans, and their applications in foods and health. *Journal Of Food Composition And Analysis*, 99, 103884. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.103884>

Vujičić-Žagar, A., Pijning, T., Kralj, S., López, C. A., Eeuwema, W., Dijkhuizen, L., & Dijkstra, B. W. (2010). Crystal structure of a 117 kDa glucansucrase fragment provides insight into evolution and product specificity of GH70 enzymes. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, *107*(50), 21406-21411. <https://doi.org/10.1073/pnas.1007531107>

Wimmerová, M., Kozmon, S., Nečasová, I., Mishra, S. K., Komárek, J., & Koča, J. (2012). Stacking Interactions between Carbohydrate and Protein Quantified by Combination of Theoretical and Experimental Methods. *PLoS ONE*, *7*(10), e46032. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046032>

Wlodawer, A., Minor, W., Dauter, Z., & Jaskolski, M. (2013). Protein crystallography for aspiring crystallographers or how to avoid pitfalls and traps in macromolecular structure determination. *FEBS Journal*, *280*(22), 5705-5736. <https://doi.org/10.1111/febs.12495>

Wuerges, J., Caputi, L., Cianci, M., Boivin, S., Meijers, R., & Benini, S. (2015). The crystal structure of *Erwinia amylovora* levansucrase provides a snapshot of the products of sucrose hydrolysis trapped into the active site. *Journal Of Structural Biology*, *191*(3), 290-298. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2015.07.010>

Xia, Y., & Xun, L. (2016). Revised Mechanism and Improved Efficiency of the QuikChange Site-Directed Mutagenesis Method. *Methods In Molecular Biology*, 367-374. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6472-7_25

Xu, M., Pan, L., Zhou, Z., & Han, Y. (2022). Structural characterization of levan synthesized by a recombinant levansucrase and its application as yogurt stabilizers. *Carbohydrate Polymers*, *291*, 119519. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119519>

Zhang, S., Chen, K. Y., & Zou, X. (2021). Carbohydrate-protein interactions: advances and challenges. *Communications In Information And Systems*, 21(1), 147-163. <https://doi.org/10.4310/cis.2021.v21.n1.a7>

MATERIAL SUPLEMENTARIO O ANEXOS

OBTENCIÓN DE LAS MUTANTES AFECTADAS DE LOS RESIDUOS CATALÍTICOS.

Con la finalidad de obtener una estructura cristalográfica con una mejor resolución y observar la interacción de los residuos de los bucles de la cavidad catalítica con los carbohidratos que pueden fungir como sustrato, se propuso obtener una mutante de la enzima LevS N70Tn38 la cual fuera catalíticamente inactiva para poderla co-cristalizar con una molécula “partner”.

GENERACIÓN DE LA MUTANTE LevS N70Tn38 D247A

PARÁMETROS DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Al usar los cebadores parcialmente sobrelapados, los parámetros de las condiciones de la PCR deben ser ajustados para obtener mejores resultados en la amplificación del producto de PCR. Para llevar a cabo esta optimización, es necesario realizar una PCR exploratoria, los resultados de esta prueba se observan en la Figura 53.

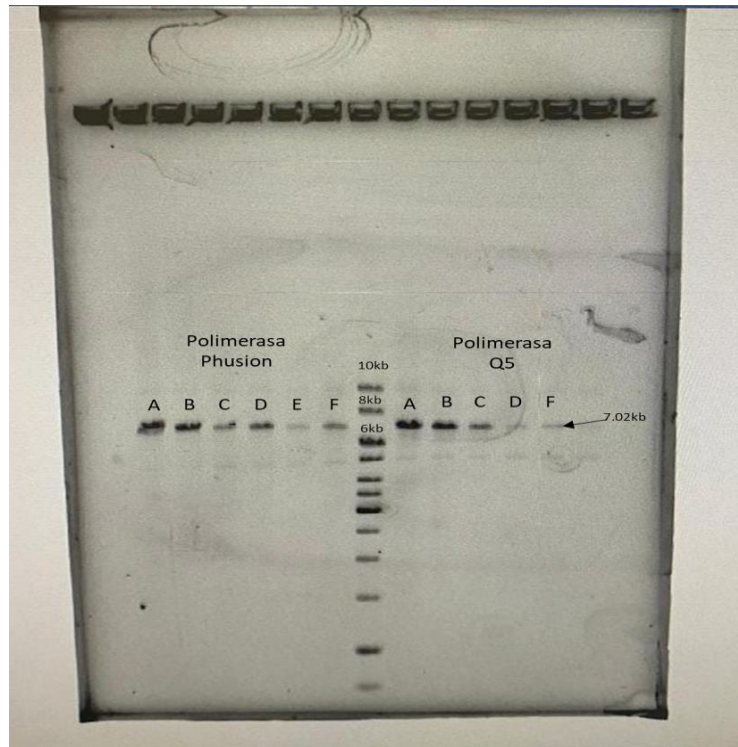


Figura 53. Gel de agarosa de la PCR exploratoria. Temperaturas de alineamiento de los primers: A) 68°C, B) 66°C, C) 64°C, D) 62°C, E) 60°C y F) 58°C.

Como se observa en la Figura 53, las polimerasas Phusion y Q5 fueron capaces de amplificar el plásmido ($\approx 7.2\text{kb}$) en todas las temperaturas de alineamiento, teniendo mejores rendimientos a los 68 y 66°C. Una vez establecida las temperaturas de alineamiento de la PCR mutagénica, se decidió poner una nueva reacción con una temperatura de alineamiento de 68°C siguiendo el mismo protocolo descrito en la Tabla 2, en el apartado de “MATERIALES Y MÉTODOS”.

DIGESTIÓN CON LA ENZIMA DE RESTRICCIÓN *DpnI* Y TRANSFORMACIÓN

Para degradar el DNA parental (DNA molde) de la mezcla de reacción de PCR es necesario realizar una digestión con la enzima *DpnI*, pues esta degrada el DNA metilado. Las condiciones de reacción de digestión con la enzima *DpnI* se muestran en la Tabla 4, ubicada en el apartado de “MATERIALES Y MÉTODOS”. Después de esta reacción de digestión, se tomó una alícuota de 15 μL , la cual se transformó en *E. coli* DH5 α químicamente competente (ver apartado de “MATERIALES Y

MÉTODOS”), se plaqueo en medio LB adicionado con ampicilina y se incubó a 37°C durante 16 horas. Las colonias obtenidas se observan en la Figura 54.

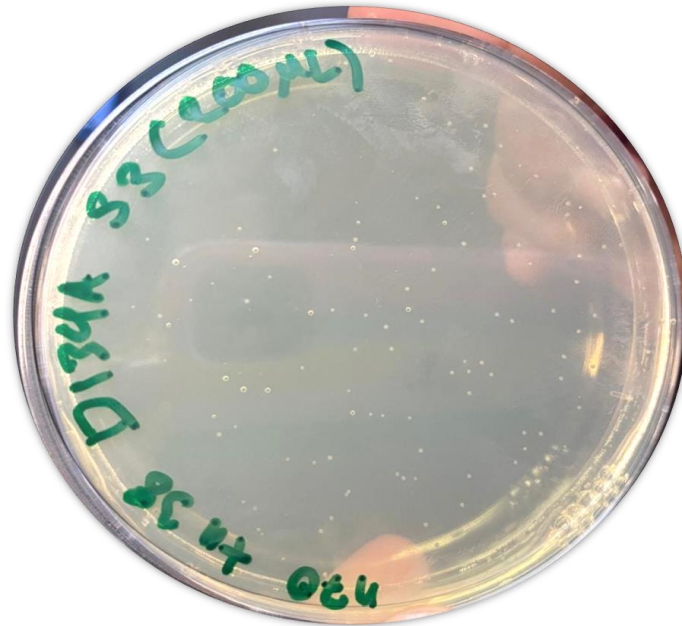


Figura 54. Colonias candidatas obtenidas al final del protocolo de la mutagénesis por QuikChange empleando oligos parcialmente sobrelapados.

EXTRACCIÓN DE PLÁSMIDO Y CONFIRMACIÓN DE LA SECUENCIA

Para confirmar la obtención de la mutante, se tomaron cinco colonias candidatas y se realizó la purificación del plásmido con el kit Zyppy Plasmid Miniprep. Las cinco muestras fueron enviadas a secuenciar a la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Se obtuvieron 4 falsos positivos y un verdadero positivo (Figura 55).

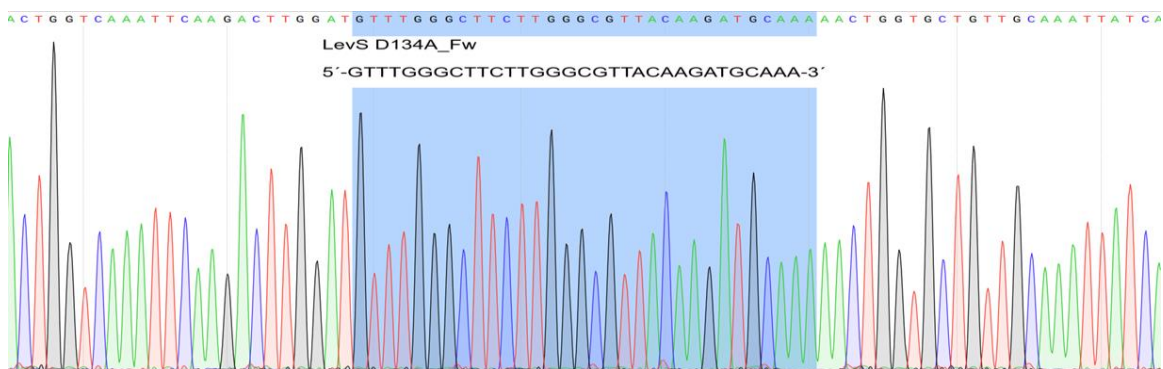


Figura 55. Resultados de la secuenciación del verdadero positivo.

OBTENCIÓN DE LA MUTANTE LevS Δ N85C_HS (LevS Δ N85C E123L)

Con el fin de eliminar un “HotSpot” (que genera la transversión de una guanina en una timina en el triplete que codifica para el residuo Glu123, provocando la aparición de un codón de paro) encontrado en la secuencia nucleotídica del gen que codifica para la versión truncada LevS Δ N85C encontrado durante el trabajo de Martínez-Bahena (2024), se decidió cambiar la secuencia del triplete en su totalidad, cuidando que el nuevo codón codifique para un residuo con un tamaño similar. En este caso, se eligió una secuencia que codifica para una Lys, debido a que cuenta con un tamaño similar al del Glu y su secuencia difiere completamente con los codones de paro.

Nota: Las secuencias de los codones que codifican para Glu y Asp (residuos cargados negativamente) se parecen al codón de paro GAA, por lo que el criterio de propiedades similares tuvo que descartarse.

DISEÑO DE CEBADORES

Los cebadores parcialmente sobrelapados se diseñaron bajo los criterios de Xia y Xun (2016). Los cebadores diseñados se observan en la Figura 56.

a) Secuencia Blanco

```
5´ -ACTACCACTTTCTGATTCAGACGTATTAAGTCTGTT TTTGT TTCAGCTACTGCGGTAGTTGATGTTGTCAT -3´  
3´ -TGATGGTGAAAGACTAAGTCT GCATAATTGACGACAAAACA AAGTCGATGACGCCATCAACTACAACAGTA -5´
```

b) Mutagénesis del HotSpot: E123L

```
5´ -ACTACCACTTTCTGATTCAGACGTATTAAGTCTGTT TTTGT CAGAGCTACTGCGGTAGTTGATGTTGTCAT -3´  
3´ -TGATGGTGAAAGACTAAGT CTGCATAATTGACGACAAAACA GTC TCGATGACGCCATCAACTACAACAGTA -5´
```

Figura 56. Comparación de la a) secuencia blanco y b) la secuencia mutagenizada. Las regiones Fo y Ro se muestran en color verde, las regiones Fc y Rc se muestran en azul y el sitio de mutación se resalta en rojo.

GENERACIÓN DE LA MUTANTE LevS Δ N85C_HS

Al usar los cebadores parcialmente sobrelapados, los parámetros de las condiciones de la PCR deben ser ajustados para obtener mejores resultados en la amplificación del producto de PCR. Para llevar a cabo esta optimización, es

necesario realizar una PCR exploratoria (condiciones de reacción mostradas en la Tabla 10 y componentes de la PCR en las Tablas 11 y 12)

Tabla 10. Condiciones de la PCR exploratoria			
Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	Ciclos
Desnaturalización Inicial	98	30	1
Desnaturalización	98	15	20
Alineamiento (Gradiente)	58	30	
	60		
	62		
	64		
	66		
68			
Extensión	72	240	
Extensión Final	72	600	1

MEZCLA DE REACCIÓN

Los componentes empleados para el master mix de las reacciones de PCR empleando las DNA polimerasas Phusion y Q5 se muestran en las Tablas 10 y 11.

Tabla 11. Componentes de una reacción de PCR de 20 µL		
Componente	Volumen (µL) (1 reacción de 20 µL)	Volumen Master Mix (µL) (6 reacciones de 20 µL)
H ₂ O	10.9	91.7

Buffer (5x)	4	28
dNTPs [10mM]	0.4	2.8
Primer Fw [20 μ M]	1	7
Primer Rv [20 μ M]	1	7
Δ N85C [83.3 ng/ μ L] (30ng)	0.36	2.52
Phusion [2 U/ μ L]	0.2	1

Tabla 12. Componentes de una reacción de PCR (Q5)		
Componente	Volumen (μL) (1 reacción de 20 μL)	Volumen Master Mix (μL) (6 reacciones de 20 μL)
H ₂ O	10.9	92.52
Buffer (5x)	4	28
dNTPs [10mM]	0.4	2.8
Primer Fw [20 μ M]	1	7
Primer Rv [20 μ M]	1	7
Δ N85C [83.3 ng/ μ L] (20ng)	0.24	2.52
Phusion [2 U/ μ L]	0.2	1

RESULTADOS PCR EXPLORATORIA

Los resultados de la PCR exploratoria con la DNA polimerasa Phusion y Q5 se muestran a continuación en la Figura 57.

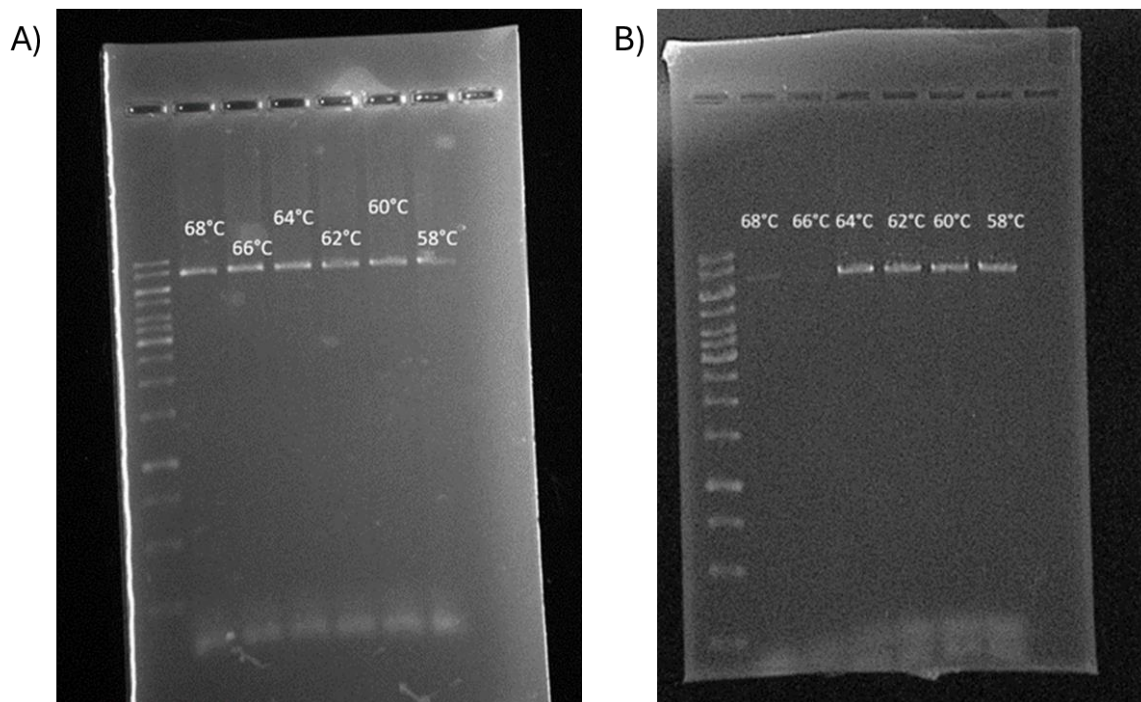


Figura 57. Resultados de la PCR exploratoria A) Empleando la DNA polimerasa Phusion B) Empleando la DNA Polimerasa Q5

Como se observa en la Figura 57, se obtuvo un producto de reacción de alrededor de 7.2kb con las seis temperaturas probadas para el caso de la reacción con la DNA polimerasa Phusion y, únicamente, se obtuvo un producto de reacción de alrededor de 7.2kb con el rango de temperaturas de 58 a 64°C, teniendo una banda ligeramente visible a 68°C para el caso de la DNA polimerasa Q5. Para las siguientes reacciones se optó por utilizar 64°C y 62°C como temperatura de alineamiento empleando la DNA polimerasa Phusion y Q5, respectivamente.

DIGESTIÓN CON LA ENZIMA *DpnI* Y ELECTROPORACIÓN

La degradación del DNA parental de la mezcla de reacción de PCR se realiza mediante la digestión con la enzima *DpnI* (condiciones de reacción mostradas en la Tabla 4, ubicada en el apartado de “MATERIALES Y MÉTODOS”). Después de esta reacción de digestión, se purificaron los productos de reacción con el kit DNA Clean & Concentrator-5 de Zymo Research. Posteriormente, se tomó una alícuota de 5 µL del producto de PCR purificado y se electroporó en *E. coli* DH5α electrocompetente como se describe a continuación:

Se mezclaron 5 μL del producto de reacción purificado con 50 μL de células electrocompetentes y se incubaron en hielo por 1 minuto. Después, se transfirió la mezcla en una celda de electroporación de 0.2 cm previamente enfriada en hielo. Posteriormente, se colocó la celda en la cámara del electroporador, se deslizó hasta que la celda estuviera en contacto con los electrodos de la cámara y se sometió a un pulso de 1.8 kV. Rápidamente, se agregaron 500 μL de medio LB, se mezcló el medio y las células y se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 mL. El cultivo se incubó a 37°C durante 1.5 horas. Finalmente, se plaquearon 300 y 200 μL del cultivo en placas Petri con medio LB adicionado con ampicilina y se incubaron a 37°C durante 12-16 horas. Las colonias obtenidas se observan en la Figura 58.

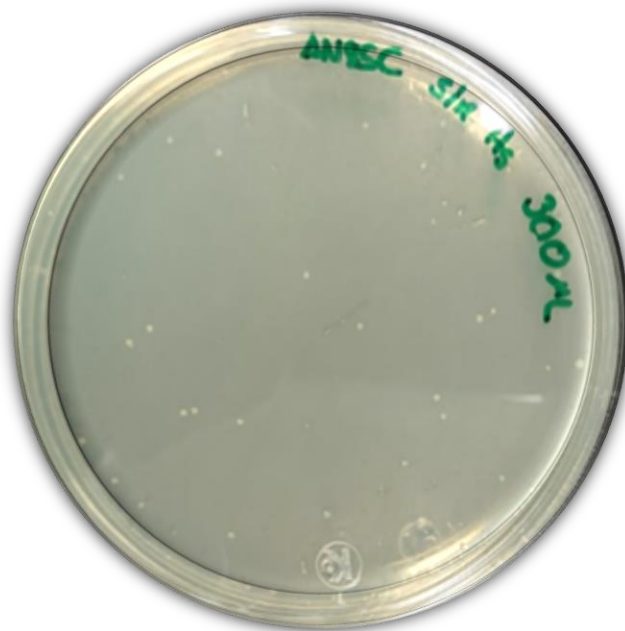


Figura 58. Colonias candidatas obtenidas al final del protocolo de la mutagénesis por QuikChange empleando oligos parcialmente sobrelapados.

CONFIRMACIÓN DE LA MUTACIÓN

Para confirmar la obtención de la mutante, se tomaron cinco colonias candidatas y se purificó el plásmido de estas cinco colonias candidatas con el kit Zyppy Plasmid Miniprep. Se enviaron las cinco muestras para su secuenciación a la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Se obtuvieron 3 falsos positivos y 2 verdaderos positivos (Figura 59).

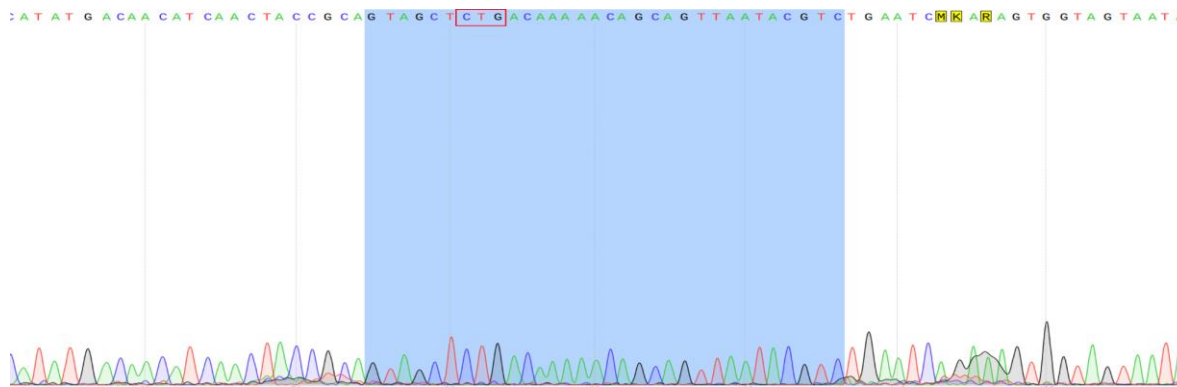


Figura 59. Resultado de la secuenciación del plásmido con la mutación. En azul se muestra la secuencia del primer utilizado y en rojo el cambio de la secuencia del codón.

ANÁLISIS COMPLETO DE LAS ESTRUCTURAS SECUNDARIAS DE LA ESTRUCTURA LevS N34TN22

En la Tabla 13 se muestra de forma detallada las estructuras secundarias presentes en cada dominio de LevS N34Tn22, así como los residuos a los que corresponde dicha estructura.

Tabla 13. Estructuras secundarias de la enzima LevS N70Tn38 con los residuos que comprende		
Dominio	Estructura	Residuos que comprende
Dominio N-terminal	Bucle 1	K151 - S164
	Hoja-β 1	V165 - K167
	Bucle 2	L168 - K179
Dominio N-terminal/ Dominio Catalítico	Hoja-β 2	T180 - N186
	Giro 1	A187 - D188

Dominio catalítico	Hoja- β 3	G189 - N194
	Giro 2	M195 - T196
	Hélice 1	Y197 - S209
	Bucle 3	L210 - N220
	Hélice 2	A221 - A223
	Giro 3	I224 - L227
	Hélice 3	P228 - M230
	Hoja- β 4	T231 - D234
	Giro 4	A235 - T237
	Hoja- β 5	G238 - D242
	Giro 5	L243
Pala I	Hoja I	D244 - A250
	Bucle 4	L251 - G264
	Hoja II	Y265 - G273
	Bucle 5	Y274 - Q281
	Hoja III	H282 - K289
	Bucle 6	Y290 - A294

	Hélice 4	L295 - N297
	Giro 6	W298
	Hoja IV	K299 - P303
Dominio Catalítico	Bucle 7	V304 - N312
Pala II	Hoja I	E313 - W316
	Bucle 8	S317 - G318
	Hoja I	S319 - N323
	Bucle 9	D324 - D325
	Hoja II	D326 - D336
	Bucle 10	Q337 - T340
	Hoja III	V341 - Y353
	Bucle 11	T354 - E357
	Hoja IV	V358 - N364
	Bucle 12	D365 - D366
	Hoja IV	H367 - F370
		Bucle 13

Dominio catalítico	Hélice 5	L380 - D385
	Bucle 14	A386 - Y388
	Hélice 6	Y389 - T391
	Bucle 15	G392 - P400
Pala III	Hoja I	H401 - V405
	Bucle 16	N406 - G407
	Hoja II	E408 - N416
	Bucle 17	T417 - T437
	Hélice 7	E438 - Q448
	Bucle 18	N449
	Hélice 8	P450 - K460
	Bucle 19	A461 - N462
	Hoja III	G463 - L470
	Bucle 20	T471 - V479
	Hoja IV	A480 - V482
	Bucle 21	Y483 - P485
	Hoja IV	L486 - A488

Dominio Catalítico	Bucle 22	A489 - A499
Pala IV	Hoja I	N500 - L504
	Bucle 23	N505 - G506
	Hoja II	K507 - R515
	Bucle 24	L516 - N529
	Hoja III	V530 - S537
	Bucle 25	D538 - S552
	Hoja IV	V553 - T555
Dominio Catalítico	Bucle 26	G556 - Y569
Pala V	Hoja I	Y570 - P573
	Bucle 27	V574 - D579
	Hoja II	L580 - T584
	Bucle 28	S585 - S605
	Hoja III	F606 - I610
	Bucle 29	S611 - S616
	Hoja IV	T617 - V619

Dominio catalítico/ Región de transición	Bucle 30	L620 - N644
Región de transición	Hélice 9	K645 - S648
	Bucle 31	E649 - D652