# **UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL**

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctor en Ciencias Biológicas

# Caracterización estructural y funcional de enzimas del metabolismo redox y de la partición del carbono en *Euglena gracilis*. Estudio de la importancia en la regulación de la síntesis y degradación de paramilón.

Lic. Rodrigo Daniel Calloni

Director de Tesis: Dr. Sergio Adrián Guerrero Co-director de Tesis: Dr. Diego Gustavo Arias

Instituto de Agrobiotecnología del Litoral (UNL-CONICET) Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas Universidad Nacional del Litoral -2024-

Agradecimientos

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a las Instituciones que hicieron posible el desarrollo de esta Tesis Doctoral. A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas y al Instituto de Agrobiotecnología del Litoral y a su directora, Dra. Raquel L. Chan, por brindarme el espacio para llevar a cabo esta etapa de formación.

A los organismos que financian el trabajo que se desarrolla en nuestro laboratorio. A la ANPCyT y al CONICET por otorgarme las becas que me permitieron llevar adelante este trabajo de Tesis.

A mí director, el Dr. Sergio A. Guerrero por confiar en mí y darme la oportunidad de formar parte de su línea de investigación y dirigir este trabajo. Por todos sus aportes, consejos y exigencias que han impulsado el desarrollo de este trabajo de Tesis.

A mi co-director, Diego G. Arias por todas las enseñanzas e indicaciones. Particularmente por las discusiones que moldearon este trabajo.

Quiero agradecer al Dr. Alberto A. Iglesias por permitirme ser parte del grupo de trabajo del Laboratorio de Enzimología Molecular, por los comentarios y sugerencias en el desarrollo del trabajo durante estos años.

A Sergio Garay, por sus valiosos aportes que enriquecieron el trabajo.

A todos los compañeros de laboratorio con los que compartí estos años. Especialmente a Robertino, por su inestimable ayuda y compañerismo. A Ana por sus enseñanzas y dulzura con todos nosotros. A Alem, Naty, Franco, Pau y Nadia por su alegría y ayuda en el día a día del laboratorio.

Gracias a Agustín y Fátima por permitirme acompañarlos en la introducción al trabajo de laboratorio, por su sencillez y motivación.

A todos los compañeros "de al lado" por su buena onda y disposición. Especialmente a Anto, Romi, Danisa, Mati, Tomi, Vicky, Mariana y Ceci.

Darle las gracias a mis padres por todo el amor que me tienen, por trasmitirme la importancia de la educación y siempre darlo todo. A Jime, Agus y Juli, mi vida sin ellas sería totalmente distinta

Agradecerle a Mai, mi esposa, por todo el amor que me da. Por ser la más hermosa y mejor compañía que hubiera deseado tener a mi lado. Por ser mi sostén y alegría estos años. A Vere, mi hija, por llenarme de felicidad y ternura todos los días.

A todos mis amigos, especialmente a Dardo, Antonio y Yamil, con los cuales puedo contar siempre y hemos compartido incontables risas. A todos "los de la facu": Rocio, Anita, Flo, Pri, Aylen y Aquiles, con los cuales compartí tantos momentos en la facultad, en los viajes, preparando materias y en las juntadas que todavía siguen. A todos mis hermanos en la fe, especialmente a mi comunidad, por siempre recibirme, animarme durante estos años.

Y finalmente darle las gracias a Dios. Hoy hago propio el Salmo 126: Grandes cosas hizo el Señor por mi y estoy lleno de alegría.

# **APORTES CIENTÍFICO-TECNOLÓGICOS**

Parte de los resultados de esta tesis fueron publicados en:

 Calloni, R. D., Muchut, R. J., Garay, A. S., Arias, D. G., Iglesias, A. A., & Guerrero, S. A. (2023). Functional and structural characterization of an endo-β-1,3-glucanase from *Euglena gracilis*. *Biochimie*, 208, 117–128. https://doi.org/10.1016/j.biochi.2022.12.016

Otras publicaciones relacionadas:

- Muchut, R. J., Calloni, R. D., Arias, D. G., Arce, A. L., Iglesias, A. A., & Guerrero, S. A. (2021). Elucidating carbohydrate metabolism in *Euglena gracilis*: Reverse genetics-based evaluation of genes coding for enzymes linked to paramylon accumulation. *Biochimie*, 184, 125-131. https://doi.org/10.1016/j.biochi.2021.02.016
- Muchut, R. J., Calloni, R. D., Herrera, F. E., Garay, S. A., Arias, D. G., Iglesias, A. A., & Guerrero, S. A. (2018). Elucidating paramylon and other carbohydrate metabolism in *Euglena gracilis*: Kinetic characterization, structure and cellular localization of UDP-glucose pyrophosphorylase. *Biochimie*, 154, 176-186. https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.09.006.

# ÍNDICE

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	1
RESUMEN	3
ABSTRACT	6
INTRODUCCIÓN	9
Euglena gracilis: Clasificación, características y aplicaciones	9
Clasificación evolutiva de Euglena gracilis	
Morfología	
Cultivo axénico	
Aplicaciones biotecnológicas	
Metabolismo redox en E. gracilis	
Agentes antioxidantes no enzimáticos en E. gracilis	
Sistemas antioxidantes enzimáticos en E. gracilis	
Metabolismo del carbono en <i>E. gracilis</i>	
Enzimas del metabolismo de carbohidratos	
Síntesis del paramilón	
Degradación del paramilón	
OBJETIVOS	
Objetivos específicos	
CAPÍTULO 1: Estudio de enzimas involucradas en el metabolismo redo	x de <i>E. gracilis</i> 28
Introducción	
Relevancia del GSH en <i>E. gracilis</i>	
Síntesis de GSH	
Objetivos	
Materiales y Métodos	
Reactivos químicos y materiales	
Microorganismos, plásmidos, medios de cultivo y antibióticos	
Cepas procariotas	
Medios de cultivos	
Plásmidos	
Antibióticos	
Metodología utilizada en Biología molecular	
Digestión de ADN con enzimas de restricción	
Ligación de fragmentos de ADN	
Purificación de ADN a partir de gel de agarosa	

Transformación de bacterias competentes	
Minipreparación de ADN plasmídico	
Métodos fisicoquímicos básicos	
Electroforesis en gel de agarosa	
Electroforesis en gel de poliacrilamida	
Cuantificación del contenido proteico	
Concentración de proteínas	
Expresión y purificación de la proteína recombinante	
Expresión de la proteína recombinante	
Purificación de la proteína recombinante	
Metodología de análisis enzimático	
Cuantificación de fosfato inorgánico	
Determinación de parámetros cinéticos	
Cromatografía de exclusión molecular	
Modelado molecular	
Resultados y Discusión	
Análisis de la secuencia aminoacídica	
Modelado molecular	
Producción de la proteína recombinante	40
Caracterización estructural de EgrGCL	
Caracterización cinética de EgrGCL	43
CAPÍTULO 2: Caracterización estructural y funcional de una glicosil fo	osforilasa de la
familia GH149 en <i>E. gracilis</i>	
Introducción	
Actividad β-1,3-fosforilasa en <i>E. gracilis</i>	
Objetivos	
Materiales y Métodos	50
Reactivos químicos y materiales	
Microorganismos, plásmidos, medios de cultivo y antibióticos	
Cepas procariotas	
Microalgas	50
Plásmidos	
Medios de cultivo	
Antibióticos	
Metodología utilizada en biología molecular	51
Extracción de ARN total	
Determinación de la concentración y pureza del ARN	

Reacción de la transcripción reversa del ARN	
Amplificación de ADN. Reacción en cadena de la polimerasa	
Purificación de ADN a partir de gel de agarosa	
Transformación de bacterias competentes	53
Minipreparación de ADN plasmídico	53
Secuenciación de ADN	53
Síntesis de ARN doble cadena para ARN de interferencia	
Electroporación de células de E. gracilis para realizar ARN de interferencia	
Mutagénesis sitio dirigida	55
Análisis fisicoquímico básico	55
Electroforesis en gel de agarosa	55
Electroforesis en gel de poliacrilamida	55
Electrotransferencia seguida de inmunodetección	
Cuantificación del contenido proteico	56
Concentración de proteínas	
Extracto de proteínas de <i>E. gracilis</i>	57
Purificación del suero policional	
Expresión y purificación de la proteína recombinante	57
Expresión de la proteína recombinante	
Purificación de la proteína recombinante	
Cromatografía de exclusión molecular	
Metodología de análisis enzimático	59
Reacción de fosforólisis inversa	59
Reacción de fosforólisis y arsenólisis	59
Determinación de parámetros cinéticos	60
Ensayo de unión a sustratos insolubles	60
Electroforesis de afinidad	61
Modelado molecular	61
Modelado molecular	61
Dinámica molecular de laminarisacáridos en el modelo de EgrGH149	61
Inmunolocalización por microscopia confocal	62
Resultados y Discusión	63
Caracterización estructural de EgrGH149	
Cromatografía de exclusión molecular	
Modelado molecular	64
Dinámica molecular	65
Caracterización funcional de EgrGH149	66

Caracterización cinética en sentido de síntesis	67
Caracterización en el sentido de degradación	68
Ensayos de unión	70
Caracterización de las enzimas mutagenizadas	71
Silenciamiento e inmunolocalización subcelular de EgrGH149 en E. gracilis	72
Silenciamiento de EgrGH149	
Microscopía confocal de la <i>Egr</i> GH149	75
CAPÍTULO 3: Caracterización estructural y funcional de la GH64 de E. gracilis	77
Introducción	77
Actividad β-1,3-endoglucanasa en <i>E. gracilis</i>	77
Objetivos	79
Materiales y Métodos	80
Reactivos químicos y materiales	80
Microorganismos, plásmidos, medios de cultivo y antibióticos	80
Cepas procariotas	80
Microalgas	80
Plásmidos	81
Medios de cultivo	81
Antibióticos	81
Metodología utilizada en biología molecular	81
Digestión de ADN con enzimas de restricción	81
Ligación de fragmentos de ADN	
Purificación de ADN a partir de gel de agarosa	82
Transformación de bacterias competentes	82
Minipreparación de ADN plasmídico	82
Métodos fisicoquímicos básicos	83
Electroforesis en gel de agarosa	83
Electroforesis en gel de poliacrilamida	83
Electrotransferencia seguida de inmunodetección	84
Cuantificación del contenido proteico	
Concentración de proteínas	
Extracto de proteínas de <i>E. gracilis</i>	
Purificación del suero policional	
Expresión y purificación de la proteína recombinante	
Expresión de la proteína recombinante	85
Purificación de la proteína	86
Cromatografía de exclusión molecular	

Metodología de análisis enzimático	
Cuantificación de extremos reductores	
Determinación de parámetros cinéticos	
Ensayo de unión a sustratos insolubles	
Procesividad	
Cromatografía en capa delgada	
Metodología computacional	
Árbol filogenético	
Modelado molecular	
Condiciones de Cultivo de E. gracilis	
Resultados y Discusión	
Análisis secuencia aminoacídica	
Producción recombinante de EgrGH64	
Caracterización estructural de EgrGH64	94
Determinación estructura cuaternaria	
Modelado molecular	
Caracterización funcional de EgrGH64	
Cuantificación de azúcares reductores	
Caracterización cinética de EgrGH64	
Determinación de parámetros cinéticos	
Análisis de los productos de hidrólisis de EgrGH64	
Efecto antifúngico de <i>Egr</i> GH64	
Procesividad	
Inmunolocalización EgrGH64 en E. gracilis	110
CONCLUSIONES	
BIBLIOGRAFÍA	

# ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

[E]	Concentración de enzima
×g	Fuerza centrífuga relativa
°Č	Grado Celsius
γ-GC	γ-glutamilcisteína
μL	Microlitro
μm	Micrómetro
μM	Micromolar
umol	Micromol
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNdc	Ácido ribonucleico doble cadena
ARNi	Ácido ribonucleico de interferencia
ARNm	Ácido ribonucleico mensaiero
ATP	Adenosina-5´-triosfato
BcG-GH149	Fosforilasa de la familia GH149 de origen bacteriano
BC-PCL	ß-glucano de pared celular de levadura
BSA	Albúmina sérica boyina
CAZy	Base de datos de Carbohydrates Active en Tymes
CAZymes	Carbohydrates Active enZymes
CBM	Módulo de unión a carbohidratos
CIM	Concentración inhibitoria mínima
CO	Dióxido de carbono
conv <b>MM</b>	Michaelis-Menten convencional
CyM	Medio de cultivo Cromer y Myers
	Cistoína
Суз	Ácido docosebayaonoico
DNS	3.5 dinitrosalicilico
DNS	Densided ántice
DO E	Concentración file de enzime
	Á aida atilandiaminatatragaétian
	Clutemate sisteina ligasa da Euclana anacilia
EgrocL EgrocL140	Englandi Cistellia ligasa de Euglena gracuis
EgrGH149	Clianci hidrologo de la familia CH64 de Euglena gracilia
	Concesti individasa de la familia Ofio4 de Eugletia gracias
$\mathbf{E}_{n}$	Concentración variable de enzima
	Constante de Michaelis-menten para "Mivi. Offidades másicas.
ERUS	Éspècies reactivas de oxigeno
EFA C	Actua elcosapentaelloico
U CCI	Gramo Clutomete sisteíre lisese
GCL	Glutamato cistema ligasa
	Gilcosii nidroiasa
GH04-GBI	Subfamilia GH04-GluB-like
	Subfamilia CH(4 LHaa lila
GH04-LPHI	Sublamina GH04-LHase-like
	Glucosa
GIC-I-P	α-Glucosa-1-Iostato
	Glutamico
GD	Glicina
GP	Glicosil fostorilasa
GSSG	Glutation disulturo
GI	Glicosiltransferasa
Н	Hora

$H_2O_2$	Peróxido de hidrógeno
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-sulfónico
HRP	Peroxidasa de rábano picante
IMAC	Cromatografía de afinidad por metal inmovilizado
<sup>inv</sup> K <sub>M</sub>	Constante de Michaelis-menten para <sup>inv</sup> MM. Unidades molares.
<sup>inv</sup> MM	Michaelis-Menten inverso
IPTG	Isopropil-B-D-tiogalactopiranósido
Kav	Coeficiente de partición
k <sub>cat</sub>	Constante catalítica
$k_{\rm cat}/K_{\rm M}$	Eficiencia catalítica
kDa	Kilo Dalton
K <sub>M</sub>	Constante de Michaelis-Menten para <sup>conv</sup> MM
LB	Medio de cultivo Lysogeny Broth
Mg	Miligramo
Min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MMM	Marcador de masa molecular
MOPS	Ácido 3-[N-morfolino] propano sulfónico
NCBI	National Center for Biotechnology Information
Nm	Nanómetro
O2 <sup>-</sup>	Anión superóxido
-P	Ester fosfato
p/v	Peso en volumen
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
Pb	Pares de bases
PBS	Buffer fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDB	Código de Protein Data Bank
PET	Tereftalato de polietileno
Pi	Fosfato inorgánico
plDDT	Test de diferencia distancia local predicha por residuo
PsGH94	Laminaribiosa fosforilasa de la familia GH94 de Paenibacillus sp.
S	Segundo
$S_0$	Concentración fija de sustrato
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SN	Somogyi-Nelson
Sn	Concentración variable de sustrato
TAE	Solución Tris-acético-EDTA
TB	Medio de cultivo <i>terrific broth</i>
TLC	cromatografía de capa delgada
U	Unidad de actividad enzimática
UDP	Uridina-5´-difosfato
UTP	Uridina-5´-trifosfato
V	Velocidad inicial
Vmax	Velocidad máxima
ľ	Densidad de sitios de ataque

### RESUMEN

El clado Euglenophyceae comprende flagelados unicelulares fototróficos y se encuentra dentro del supergrupo Excavata. Este último incluye flagelados unicelulares entre los que se destacan simbiontes y algunos importantes parásitos humanos. La especie más relevante del clado Euglenophyceae es *Euglena gracilis*. Este microorganismo ha demostrado una amplia capacidad metabólica y un rápido crecimiento en comparación a otras especies del mismo género, haciéndola adecuada para su comercialización. *E. gracilis* ha llamado la atención por su resistencia al estrés causado por metales pesados y por sintetizar metabolitos de interés comercial como  $\beta$ -carotenos,  $\alpha$ -tocofenorol, ácido ascórbico, ácidos grasos poliinsaturados esenciales, lípidos aptos para la producción de biodisel y paramilón. Este último es su polímero de reserva, un  $\beta$ -1,3-glucano sin ramificaciones, insoluble en agua y altamente cristalino.

La información enzimológica referente al metabolismo redox y del paramilón en *E. gracilis* aún es limitada. Por esta razón, seleccionamos enzimas que podrían estar involucradas en estos procesos para estudiarlas desde distintos enfoques.

Para mantener la homeostasis redox intracelular, E. gracilis cuenta con defensas enzimáticas y no enzimáticas. Una de las moléculas tiol de baja masa molecular fundamentales en este metabolismo es el glutatión (GSH) debido a que capaz de inactivar especies reactivas de oxígeno de forma intrínseca y participar en sistemas acoplados o en la síntesis de otras moléculas antioxidantes. El GSH es sintetizado mediante una reacción de dos etapas ATP dependientes. La primera es sintetizada por la glutamato cisteína ligasa (GCL, EC 6.3.2.2), formando  $\gamma$ glutamilcisteína. La síntesis se completa cuando la glutatión sintetasa (EC 6.3.2.3) añade glicina (Gly) al dipéptido. La primera reacción es el paso regulador de la síntesis de GSH en otros organismos. Dentro de una base de datos de transcriptómica de E. gracilis identificamos un mensajero candidato para la codificación de la subunidad catalítica de GCL. Diseñamos un gen sintético que nos permitiera realizar la expresión de esta subunidad en E. coli. Realizamos la producción recombinante y la purificación empleando una cromatografía de afinidad por metal inmovilizado. Evidenciamos actividad del polipéptido purificado con un método capaz de cuantificar fosfato inorgánico (Pi) empleando como sustratos ATP, cisteína y glutámico. Realizamos curvas de saturación para cada uno de los tres sustratos y calculamos los parámetros cinéticos correspondientes para cada uno. Ensayos de cromatografía de exclusión molecular nos permitieron clasificar a esta enzima como monomérica. El modelado molecular del polipéptido nos permitió observar una estructura terciaria similar a la adoptada por este tipo de enzima en otros organismos.

Las glicosil fosforilasas (EC 2.4.1), son un grupo de enzimas que catalizan la fosforólisis reversible de glucanos en presencia de Pi en los correspondientes azúcares 1-fosfatos y cadenas

de glucano acortadas. En E. gracilis, se reportó la existencia de una fosforilasa perteneciente a la recientemente descripta familia glicosil hidrolasa 149. Esta enzima, EgrGH149, fue caracterizada cinéticamente en el sentido de síntesis, por lo que nos propusimos extender su estudio desde distintos enfoques. Por medio de cromatografía de exclusión molecular evidenciamos que EgrGH149 presenta una estructura cuaternaria homodimérica como se ha observado en otras fosforilasas. Estudios in silico y de mutagénesis sitio dirigida nos permitieron comparar propiedades de posibles sitios de unión a laminarisacáridos e identificar residuos relevantes en la catálisis. Realizamos ensayos de actividad enzimática en ambos sentidos de reacción que nos permitieron ampliar el conocimiento de EgrGH149. Esta enzima es específica para la utilización de  $\beta$ -1,3-glucanos de baja masa molecular como sustrato, sin evidenciar actividad con  $\beta$ -1,3glucanos de alta masa molecular como laminarina y paramilón. EgrGH149 demostró una mayor eficiencia catalítica a medida que el grado de polimerización disminuía. Ensayos de promiscuidad empleando distintos dadores como sustratos nos permitieron observar especificidad de EgrGH149 por α-Glucosa-1-P. Evidenciamos que EgrGH149 utiliza un mecanismo de reacción con inversión de la configuración anomérica. Mediante la utilización de un suero policional específico contra EgrGH149 realizamos ensayos que nos aportaron información sobre su ubicación intracelular. Nuestros resultados indicarían que esta enzima se encuentra contigua a los gránulos de paramilón formando agrupaciones. Toda la información obtenida en este trabajo ayuda a entender el rol de EgrGH149 en el metabolismo de E. gracilis. También aportamos información relevante en el conocimiento de la familia GH149, siendo que aún son escasas las caracterizaciones de proteínas de esta familia.

En *E. gracilis*, el paramilón se degrada en condiciones de requerimiento energético. Se ha observado actividad  $\beta$ -1,3-glucanasa en extractos de este microorganismo. Sin embargo, es insuficiente la identificación y estudio de enzimas implicada en este proceso. Realizamos una búsqueda en una base de datos de transcriptómica para identificar transcriptos candidatos a codificar endo-β-1,3-glucanasas (EC 3.2.1.39). Seleccionamos un mensajero codificante para una proteína de la familia GH64 y posteriormente diseñamos un gen sintético para realizar la expresión recombinante del mismo. La proteína (EgrGH64) fue expresada en E. coli y purificada por cromatografía de afinidad por metal inmovilizado con posterior cromatografía de exclusión molecular. Esta es la primera vez que una β-1,3-endoglucanasa de E. gracilis es producida recombinantemente usando un sistema de expresión procariota. EgrGH64 evidenció actividad enzimática empleando los sustratos laminarina, paramilón y  $\beta$ -glucano de la pared celular de levadura (BG-PCL). La actividad máxima se observó a pH 4,0-5,0 y 50°C. No observamos hidrólisis de  $\beta$ -1,4-glucanos. El principal producto de hidrólisis de EgrGH64 fue laminaripentaosa tanto para laminarina como para paramilón. Estas características son las predominantes en otras glucanasas de la misma familia previamente caracterizadas. Para calcular los parámetros cinéticos utilizamos un enfoque que incluye el análisis Michaelis-Mentes convencional complementado

con Michaelis-Menten inverso. Con esta metodología observamos un menor  $K_M$  para BG-PCL en comparación a los otros dos sustratos. La eficiencia catalítica mostró el siguiente patrón: paramilón<laminarina<br/>SBG-PCL. La densidad de sitios de ataque reconocidos por *Egr*GH64 es<br/>similar en laminarina y paramilón, mientras que este valor es mayor en BG-PCL. Cuantificamos<br/>los extremos reductores solubles e insolubles generados por *Egr*GH64. El patrón observado<br/>sugiere que *Egr*GH64 es una endo-glucanasa procesiva. Obtuvimos un suero policional con<br/>anticuerpos específicos contra *Egr*GH64. Mediante western blot, evidenciamos la presencia de<br/>esta enzima en cultivos heterotróficos y en condiciones de anaerobiosis. No observamos señal en<br/>condiciones de autotrofia. Evaluamos el efecto antifúngico de *Egr*GH64. Estudiamos la influencia<br/>de esta enzima en la viabilidad de *Kluyveromyces lactis*. Observamos una significativa capacidad<br/>de *Egr*GH64 para disminuir la viabilidad de forma dosis dependiente en las condiciones<br/>evaluadas. Estos estudios sugieren que *Egr*GH64 estarían involucrada en la degradación del<br/>paramilón hidrolizando el mismo y/o productos de hidrólisis de este.

Visto de manera global, los conocimientos generados en este trabajo de Tesis por estudios *in vivo, in silico* e *in vitro,* relacionados al metabolismo redox y del paramilón nos aportan una mejor comprensión del contexto metabólico de *E. gracilis.* El conocimiento básico en esta área es valioso para el entendimiento de un microorganismo de relevancia en la naturaleza y con perspectivas biotecnológicas promisorias.

### ABSTRACT

The Euglenophyceae clade comprises phototrophic unicellular flagellates and it's found within the supergroup Excavata. This includes unicellular flagellates, among which some symbionts and important human parasites. The most relevant species of Euglenophyceae is *Euglena gracilis*. This microorganism has demonstrated a wide metabolic capacity and rapid growth when compared to other microorganisms of the genus. *E. gracilis* has attracted attention because of its resistance to stress caused by heavy metals and for synthesizing metabolites of commercial interest such as  $\beta$ -carotenes,  $\alpha$ -tocophenolol, ascorbic acid, essential polyunsaturated fatty acids, paramylon, and lipids suitable to produce biodiesel. The paramyon is a reserve polymer, an unbranched, water-insoluble, and highly crystalline  $\beta$ -1,3-glucan. Thus, *E. gracilis* stands as a microorganism of interest in different types of industry.

Ther is a lack of enzymological information regarding *E. gracilis* redox and paramylon metabolism. We select enzymes that could be involved in these processes and study them with different approaches.

E. gracilis has enzymatic and non-enzymatic defenses to preserve intracellular redox homeostasis. The glutathione (GSH) is a low molecular mass thiol crucial in this regulation. GSH it is capable of inactivating reactive oxygen species intrinsically and participating in coupled systems or in the synthesis of other antioxidant molecules. It is synthesized in a two-step ATPdependent reaction. The first step, is catalyzed by glutamate cysteine ligase (GCL, EC 6.3.2.2), forming  $\gamma$ -glutamylcysteine. The synthesis is completed when GSH synthetase (EC 6.3.2.3) adds glycine to the dipeptide. The first reaction is the regulatory step of GSH synthesis in other organisms. Within an E. gracilis transcriptomics database we identified a candidate messenger encoding a catalytic subunit of GCL. We designed a synthetic gene to perform a recombinant expression of the catalytic subunit in E. coli. We performed the expression and purification using immobilized metal affinity chromatography. With a method capable of quantifying inorganic phosphate (Pi), we show activity of the purified polypeptide using ATP, cysteine, and glutamic acid as substrates. We performed saturation curves for each of the substrates and calculated the corresponding kinetic parameters. With size exclusion chromatography assays, we classify this enzyme as monomeric. Molecular modeling of the polypeptide showed a tertiary structure similar to that adopted by other GCL's.

Glycosyl phosphorylases (EC 2.4.1) are a group of enzymes that catalyze the reversible phosphorolysis of glycans in the presence of Pi into the corresponding sugar-1-phosphate and shortened glycan chains. In *E. gracilis*, a phosphorylase belonging to the recently described glycosyl hydrolase 149 family was reported. This enzyme, *Egr*GH149, was characterized kinetically in synthesis sense and we extended its study from different approaches. With size exclusion chromatography we showed that *Egr*GH149 has a homodimeric quaternary structure.

This structure has been observed in other phosphorylases. To compare properties of possible binding sites to laminarisacharides and identify residues relevant to catalysis in both directions of the reaction, we performed in silico and site-directed mutagenesis studies. We performed enzyme activity assays in the senses of phosphorolysis and reverse phosphorolysis. This enzyme is specific in the use of low molecular weight  $\beta$ -1,3-glucans as substrate, without showing activity with high molecular weight  $\beta$ -1,3-glucans such as laminarin and paramylon. Promiscuity assays with several donors as substrates allowed us to observe specificity of *Egr*GH149 for  $\alpha$ -Glucose-1-P. We show that *Egr*GH149 has a reaction mechanism with inversion of the anomeric configuration. We performed assays that provided information on intracellular location by using a specific polyclonal serum against *Egr*GH149. Confocal microscopy would indicate that the enzyme forms clusters next to the paramylon granules. This information helps to understand the role of *Egr*GH149 in E. gracilis metabolism. We contribute relevant information to the knowledge of the GH149 family because there are still few characterizations of proteins in this family.

In E. gracilis matabolism, paramylon is degraded under lack of energy conditions. Endo and exo- $\beta$ -1,3-glucanase activity has been observed in extracts of this microorganism. However, the identification and characterization of enzymes involved in this process is still limited. We performed a search within a transcriptomics database to identify candidate transcripts encoding endo-β-1,3-glucanases (EC 3.2.1.39). We selected a mRNA coding to a protein from the GH64 family and we designed a synthetic gene to perform its recombinant expression. This protein (EgrGH64) was expressed in E. coli and purified by immobilized metal affinity chromatography with subsequent size exclusion chromatography. This is the first time that a  $\beta$ -1,3-glucanase from E. gracilis has been produced recombinantly using a prokaryotic expression system. EgrGH64 showed enzymatic activity using laminarin, paramylon and yeast cell wall  $\beta$ -glucan (BG-PCL) as substrates. Maximum activity was observed at pH 4.0-5.0 and 50°C. We did not observe  $\beta$ -1,4glucans hydrolysis. We analyzed the hydrolysis products of laminarin and paramylon. The main hydrolysis product was laminaripentaose. These characteristics have been observed in other characterized glucanases of the same family. The methodology used to calculate kinetic parameters includes conventional Michaelis-Mentes complemented by inverse Michaelis-Menten. We observed a lower  $K_{\rm M}$  for BG-PCL compared to laminarin and paramylon. The catalytic efficiency showed the following pattern: paramylon <laminarin <BG-PCL. The attack sites density recognized by EgrGH64 is similar in laminarin and paramylon, while this value is higher in BG-PCL. We quantified the soluble and insoluble reducing ends generated by EgrGH64. The observed pattern suggests a processive endo-glucanase mode of action. We obtained a specific serum against EgrGH64. We evidence the presence of this enzyme in heterotrophic cultures and anaerobic conditions by western blot. We did not observe signal under autotrophy conditions. We evaluated the antifungal effect of EgrGH64. We studied the EgrGH64 influence on the viability of *Kluyveromyces lactis*. We observed that the enzyme decreases viability in a dose-dependent manner under the evaluated conditions. These studies suggest that *Egr*GH64 would be involved in the degradation of paramylon. It would accomplish this action by directly hydrolyzing the paramylon and/or its hydrolysis products.

In a global viewed, the knowledge generated in this work with in vivo, in silico and in vitro studies, related to redox and paramylon metabolism, provide us with a better understanding of the metabolic context of *E. gracilis*. Basic science studies in this area are valuable for understanding a microorganism of relevance in nature and promising biotechnological perspectives.

## INTRODUCCIÓN

# Euglena gracilis: Clasificación, características y aplicaciones

#### Clasificación evolutiva de Euglena gracilis

Los protistas fueron de los primeros organismos en ser visualizados y descritos por los microbiólogos del siglo XVII. Su categorización y caracterización se fue desarrollando a lo largo de los siglos. Actualmente, el término "protista" se utiliza para describir todos los eucariotas distintos a animales, plantas y fungi. Cabe destacar que el ancestro común a todos los protistas es también el ancestro de todos los eucariotas. Por esta razón se lo considera un grupo parafilético. A la luz de los estudios filogenéticos modernos, se ha cuestionado profundamente la tradicional clasificación en cinco reinos (monera, fungi, vegetal, animal y protoctista) y se ha propuesto una división, donde los eucariotas se ubican en siete supergrupos monofiléticos y 11 linajes independientes (**Figura 1**) (Pawlowski, 2014). Cabe destacar que la mayoría de los organismos modelo establecidos pertenecen al supergrupo Opisthokonta, que incluye fungi y animales. Esta dinámica de investigación ha descuidado a los protistas (que representan la mayor parte de la diversidad eucariota) y que se suelen considerar como eucariotas primitivos (Pawlowski et al., 2012). Trabajos más recienten proponen un enfoque "protista-céntrico", el cual postula que estos organismos son el "estándar eucariótico", mientras que otros linajes son una desviación de esta generalidad (Kostygov et al., 2021).



**Figura 1**. Árbol filogenético de organismos eucariotas. División entre 7 supergrupos y 11 linajes independientes. Figura modificada de Pawloski, 2014.

El supergrupo Excavata comprende flagelados unicelulares de diversas características: organismos de vida libre, simbiontes y algunos importantes parásitos de humanos (Adl et al., 2012). La mayoría de los organismos de este grupo son heterótrofos y presentan un surco de alimentación ventral "excavado", de allí su nombre. Uno de los linajes más estudiados de Excavata es el filo Euglenozoa. Algunos informes indican que Euglenozoa es el primer grupo que se separó de la evolución principal del linaje de los eucariotas (Burki, 2014; Cavalier-Smith, 2010).

Euglenozoa comprende tres clases bien definidas: Euglenida, Kinetoplastea y Diplonemea, y algunos autores distinguen, además, la clase Symbiontida como se muestra en la **Figura 2** (Yubuki & Leander, 2018; Adl et al., 2019). Los estudios realizados en diversos organismos de este filo revelan que los mismos se diferencian de otros eucariotas por transcribir los genes nucleares de forma policistrónica (Kostygov et al., 2021). A diferencia de lo observado en los operones procariotas, los genes co-transcriptos no requieren estar funcionalmente relacionados (Clayton, 2016). El procesamiento del ARNm policistrónico en mensajero de menor longitud implica el uso de *trans-splicing* (Campbell et al., 2003). Por otro lado, sean simple o doble flagelados, los euglenoides presentan una estructura extra-axonémica denominada vara para-flagelar, encargada de anclar el flagelo. Se encuentra compuesta por proteínas y solo ha sido observada en organismos del filo Euglenozoa (Alves et al., 2020). Desde un punto de vista morfológico, las mitocondrias presentan una disposición de crestas discoidales (Cavalier-Smith, 2016).



**Figura 2**. Árbol filogenético del filo Euglenozoa en las clases Euglenida, Diplonemea y Kinetoplastea. La división de Symbiontida (línea discontinua) aún se encuentra en discusión. Se muestran fotos de microscopia de organismos representativos de cada clase. Figura modificada de Kostygov et al., 2021.

Los kinetoplástidos poseen una masa de ADN extranuclear concentrado dentro de una sola mitocondria, esta estructura se denomina kinetoplasto (Moreira et al., 2004). Esta clase comprende diversos parásitos responsables de graves enfermedades en los seres humanos, en los animales, y en las plantas. Tal vez los más conocidos en nuestra región son las distintas especies de los géneros *Leishmania y Trypanosoma*, agentes etiológicos de patologías infecciosas en humanos. Por otro lado, los diplonémidos marinos constituyen uno de los linajes planctónicos más abundantes y diversos, pese a que fueron descubiertos recién en el corriente siglo (Gawryluk et al., 2016; López-García et al., 2001). Determinados linajes de euglenozoos se han desarrollado de forma simbiótica con bacterias epibióticas y viven con bajas concentraciones de oxígeno y sedimentos marinos anóxicos, por ejemplo, *Calkinsia aureus* (Yubuki & Leander, 2018). Estudios de biología molecular filogenética del último tiempo ubican a estos últimos organismos en un clado denominado Symbiontida (Lax et al., 2021).

El grupo de los euglenoides contiene flagelados marinos y de agua dulce con modos diversos de nutrición, incluyendo fagotrofía (bacterívora y eucarívora), osmotrofía y fototrofía (Leander, 2004). Es distintivo de este clado la presencia de pelicle: una cubierta celular compuesta

por haces longitudinales o helicoidales de proteína sustentada por el sistema de microtúbulos (Leander et al., 2001). Esta película es mucho más flexible que la mayoría de las paredes celulares y permite el cambio de forma rítmico fundamental en el movimiento de los euglenoides. La morfología y la organización de los haces proteicos del pelicle se correlacionan con la plasticidad celular. Células con menos haces tienden a ser más rígidas que las que presentan mayor cantidad, estas últimas presentan con mayor claridad el movimiento denominado "*metaboly*" (Noselli et al., 2019). Si bien este movimiento suele ser utilizado por células fagotróficas para engullir su presa, se mantiene presente en el género *Euglena* (osmotróficas and fotosintéticas) (Chen & Huang, 2021).

La morfología de los euglenidos y su organización celular se correlacionan bien con el modo de nutrición. Dentro de esta clase se pueden distinguir distintos clados: Peranemida, Aphagea, Anisonemidae, Alistosa, Petalomonadida y Euglenophyceae (**Figura 3**). Este último es el más estudiado, ya que contiene las especies más representativas (Kostygov et al., 2021).



**Figura 3**. Árbol genético de Euglenida. Se distinguen los clados Peranemida, Aphagea, Anisonemidae, Alistosa, Petalomonadida y Euglenophyceae con los géneros documentados para cada uno de ellos. Figura modificada de Kostygov et al., 2021.

Euglenophyceae comprende flagelados unicelulares fototróficos. La adquisición de capacidad fotosintética es el resultado de un notable evento evolutivo: una endosimbiósis secundaria entre un euglénido eucariovoro fagotrófico y un alga verde relacionada a miembros

del género *Pyramimonas*. Sin embargo, teniendo en cuenta que una proporción significativa de genes de organismos dentro del clado Euglenophyceae son potencialmente derivados de otros grupos de algas, es posible que se hayan efectuado múltiples rondas de transferencia por endosimbiosis (Novák Vanclová et al., 2020). Los cloroplastos de este grupo son similares a los observados en otras algas verdes: presentan clorofila *a* y *b*, y los tilacoides se encuentran arreglados en grupos de tres. Algunas especies (como, por ejemplo, *Euglena longa*) han perdido la capacidad fotosintética, y conservan plástidos inactivos y un genoma cloroplastídico reducido (Gockel & Hachtel, 2000).

El género del cual deriva el nombre Euglenophyceae es *Euglena* (**Figura 4**), el cual posee una importancia histórica destacable. Fue observado microscópicamente por primera vez en el 1684 por Antonie Van Leeuwenhoek (Dobell, 1932). Posteriormente, en el año 1830, Ehrenberg describió el "*Eyespot*": una estructura rojiza, rica en carotenoides estableciendo el nombre de este género (hermoso "eu", ojo "glena") (Zoltner & Field, 2022). Es característico de este género la presencia de cloroplastos extensos y pirenoides. Estos últimos son una zona donde se concentra la enzima ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa (RuBisCo). También es característico la presencia de mucoquistes: pequeños cuerpos unidos al pelicle con aberturas que contienen hilos mucilaginosos ubicados debajo de esta membrana.

Una de las cualidades más distintivas de este género es el paramilón (Kim et al., 2016). El paramilón es un polímero de almacenamiento ( $\beta$ -1,3-glucano), que puede ser encontrado libremente en el citoplasma o asociado a pirenoides con distintas morfologías dependiendo de la especie (Schwartzbach & Shigeoka, 2017). La presencia de granos pequeños y grandes se denomina "dimórfica" en contraste con "monomórfica" cuando solo hay granos pequeños presentes en la célula (Monfils et al., 2011).



Figura 4. Características distintivas de *Euglena*. (A) Esquema del pelicle, formado por haces proteicos en la superficie de la célula. Modificado a partir de Noselli et. al., 2019. (B) Micrografías de microscopio electrónica de barrido de sequencia de conformaciones adoptadas en distintas etapas del *metaboly*. Extraído de Dubreuil et. al., 1985. (C) Aspectos morfológicos de distintas cepas de *Euglena deses*. PV: Granulo de paramilón con forma de vara. F: Flagelo principal. ES: *Eyespot*. CV: Vacuola contráctil. PE: Granulo de paramilón con forma de elipse. Pi: Pirenoide. Figura modificada de Kim et. al., 2016.

Tal como se introdujo previamente, el género *Euglena* incluye más de 200 especies. De todas ellas, *E. gracilis* ha mostrado una tasa de crecimiento mucho más rápido que otras especies del género, bajo condiciones óptimas (Suzuki et al., 2015), lo que la hace más adecuada para el cultivo masivo y comercialización. Por esta razón, se ha convertido en modelo de estudios bioquímicos y de biología molecular.

#### <u>Morfología</u>

Las células de *E. gracilis* se presentan de 50  $\mu$ m de largo x 10  $\mu$ m de ancho aproximadamente. La célula, al no presentar una pared rígida, adopta formas altamente flexibles, desde esféricas hasta forma de husillo alargado (Schwartzbach & Shigeoka, 2017).

En la **Figura 5** pueden apreciarse las diferentes estructuras celulares de *E. gracilis*. La célula presenta una invaginación, que consiste de un canal tubular y un reservorio, similar a los citostomas encontrados en otros protozoos, relacionado con la obtención de alimento por fagotrofia (Buetow, 1982). Asociado a este reservorio, se encuentra una vacuola contráctil, la cual se cree estaría involucrada en la osmorregulación (Coppellotti et al., 1979; Sánchez-Thomas et al., 2020). Asimismo, en la pared dorsal del reservorio, se encuentra dos flagelos con características diferenciales, uno que emerge del canal y es utilizado para la movilidad o locomoción de la célula, mientras que el otro es corto y no alcanza a emerger del reservorio (Hammond et al., 2021). Como mencionamos anteriormente, en la parte anterior de la célula, cercano al reservorio, se encuentra además una estructura roja o naranja, conocido como *eyespot* 

(o estigma). El estigma es una estructura cuyo interior se encuentra lleno de carotenoides, siendo el principal la anteraxantina. Esta estructura posee la función de ser fotorreceptora, habiéndose encontrado que cuando la estructura del estigma es afectada por la presencia de antibióticos, las células disminuyen la fototaxis (Tamaki et al., 2020). Otras estructuras que se pueden observar en células de *E. gracilis* son los cloroplastos, las mitocondrias y aparatos de Golgi. En *E. gracilis* los gránulos de paramilón son elípticos y monomórficos (Monfils et al., 2011).



**Figura 5**. Morfología celular de *E. gracilis*. (**A**) Esquema de la célula en la que se desta can las principales partes y organelas. (**B**) Imagen de microscopía de célula de *E. gracilis* crecida en condición autotrófica. Figura modificada de Buetow 1982.

#### Cultivo axénico

El cultivo de *E. gracilis* es relativamente sencillo debido a su amplia capacidad metabólica. Puede hacer uso de sus cloroplastos y crecer en condiciones fotoautotróficas. También es capaz de consumir distintas fuentes de carbono orgánico en cultivos heterotróficos o mixotróficamente en presencia de luz y fuente de carbono orgánico. Más aún, esta microalga se puede cultivar en presencia o ausencia de oxígeno. Dentro de la amplia variedad de compuestos orgánicos que pueden ser utilizadas por *E. gracilis* como fuente de carbono podemos mencionar la glucosa, lactato, acetato, glicerol, etanol, glutamato, serina, Gly, entre otros (Buetow, 1982; Khanra, A & Rai, M P, s. f.). Además de la diversidad de condiciones de cultivos, *E. gracilis* puede crecer en líquidos contaminados, tolerando un amplio rango de pH, como así también la presencia de metales pesados (Krajčovič et al., 2015).

El cultivo anaeróbico inicia una fermentación, en la cual el paramilón es degradado para obtener ATP a través de glicólisis. En consecuencia, las células sintetizan ácidos grasos, alcoholes grasos y finalmente ceras en mayores cantidades. La acumulación de ceras se ha visto que puede alcanzar valores superiores al 50% respecto de la biomasa seca (Matsuda et al., 2011) en anaerobiosis y oscuridad. Las mismas están compuestas por ácidos grasos y alcoholes con cadenas de entre 10 a 18 carbonos de longitud, siendo predominante el ácido mirístico y el alcohol miristílico (ambos de 14 carbonos), seguido por cadenas de 13 y 15 carbonos (Inui et al., 1982).

#### Aplicaciones biotecnológicas

En general, las microalgas poseen diversas aplicaciones, como suplementos alimentarios para humanos y animales (Christaki et al., 2011; Dineshbabu et al., 2019), en la producción de combustible (Mofijur et al., 2019), en la industria cosmecéutica (Ariede et al., 2017) y en medicina (Nethravathy et al., 2019). Además, las microalgas se muestran prometedoras en su aplicación en el tratamiento de aguas residuales (De Francisci et al., 2018) y la reducción de las emisiones de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) (Klinthong et al., 2015). Estas características han conducido a un aumento en el interés en la producción de biomasa obtenida a partir de microalgas, tanto en el campo de la ciencia básica como la aplicada. Una gran ventaja que presentan estos organismos es que no requieren tierras agrícolas para su crecimiento, por lo que la producción a gran escala no compite con la producción de cultivos, lo que contribuirá a la remediación del problema alimentario (**Figura 6**). Particularmente, el cultivo comercial de *E. gracilis* comenzó en 2005 en la empresa japonesa *euglena Co., Ltd* y desde entonces se han hecho distintos estudios para mejorar su comercialización (Schwartzbach & Shigeoka, 2017).

Esta microalga atrae atención tanto por su buena adaptabilidad física y metabólica como también por su resistencia al estrés causado por metales pesados como  $Cd^{2+}$ ,  $Cr^{3+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Cr^{6+}$ ,  $Pb^{2+}$  y  $Zn^{2+}$  (García-García et al., 2018). Incluso, en los últimos años, se han investigado y desarrollado métodos de ingeniería metabólica para cultivos de *E. gracilis* en búsqueda de lograr mayores rendimientos en biomasa (Chen et al., 2022). Se espera que el uso industrial de esta microalga crezca aún más teniendo en cuenta la inclusión de nuevas tecnologías para el cultivo masivo del organismo.



**Figura 6**. Aprovechamiento comercial de *E. gracilis*. En la actualidad, se encuentran bioproductos de *E. gracilis* en el mercado (**A**) Cultivo al aire libre a gran escala de *E. gracilis*. (**B**) Algunos productos nutricionales y de cosmética comercializados por la empresa *euglena co*. (Japón). Figura modificada de Schwartzbach & Shigeoka, 2017.

*E. gracilis* es capaz de sintetizar diversos metabolitos de interés comercial, como  $\beta$ carotenos,  $\alpha$ -tocoferol y ácido ascórbico (Takeyama et al., 1997). Posee ruta de síntesis para ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA), ambos ácidos grasos poliin saturados esenciales (Schwarzhans et al., 2015). De esta manera, es posible obtener una variedad de productos nutricionales para consumo humano y animal, lo que incrementa su potencial comercial. Tiene la capacidad de sintetizar los 20 aminoácidos que se encuentran en las proteínas (Rodríguez-Zavala et al., 2010), ocho de los cuales se consideran esenciales para la dieta humana. La comercialización de este organismo como alimento es una práctica ya establecida en varios países, incluidos Japón, Canadá y los Estados Unidos (Gissibl, et al., 2019a). Sumando a esto, a diferencia de otras microalgas, *E. gracilis* carece de pared celular y, por lo tanto, es fácil de digerir cuando se consume siendo esta una característica deseable en los suplementos nutricionales.

Dentro de los metabolitos de interés comercial que derivan de *E. gracilis* se puede destacar el paramilón. Del mismo se han reportado propiedades inmunoestimulatorias (Guo et al., 2020), incluyendo mejoras en la respuesta a infecciones por el virus responsable de la influenza (Nakashima et al., 2017), la dermatitis atópica (Sugiyama et al., 2010) y los trastornos reumáticos autoinmunes (K. Suzuki et al., 2018). Nutricionalmente, el paramilón es clasificado como fibra insoluble y se ha mostrado su efecto beneficioso en distintos modelos de síndrome metabólico (Shibakami et al., 2019; Aoe et al., 2021).

Se han propuesto varias aplicaciones industriales para el paramilón, incluido su uso como sustrato para la termoplastificación (Shibakami et al., 2014). También se lo ha utilizado en la producción de nanofibras auto-ensamblantes. Estas nanofibras pueden ser modificadas con

grupos funcionales y pueden ser utilizadas en sistemas de "*drug delivery*" (Shibakami et al., 2013; Shibakami, 2021). Por otro lado, el uso de fertilizantes con *E. gracilis* y paramilón podría estimular el crecimiento y mejorar la tolerancia al estrés abiótico (Harada et al., 2020).

Por otra parte, la mayor parte de los lípidos derivados de *E. gracilis* son adecuados para la producción de biodisel, debido a que son saturados o tienen bajo grado de insaturación. La fermentación de ceras es única, debido a que los productos finales tienen masas moleculares altas, insolubles en agua y se acumulan en las células, en contraste con los productos finales de fermentación comunes, como el ácido láctico y el etanol. A su vez, las ceras producidas por *E. gracilis*, son biocombustibles prometedores porque el ácido mirístico (C14:0), a diferencia de otros ácidos grasos producidos por algas, como el ácido palmítico (C16:0) y el ácido esteárico (C18:0), tiene un punto de congelación bajo, lo que lo hace adecuado como combustible para aviones (Schwartzbach & Shigeoka, 2017).

La parte comercial de la industria se basa en el denominado "5F" (del inglés: *Food*, *Fiber*, *Feed*, *Fertilizer* y *Fuel*) que hace referencia al uso de la biomasa para alimento, fibra, alimentación animal, fertilizantes y combustibles, lo que asegura un amplio repertorio de usos para la biomasa, características que *E. gracilis* tiene el potencial para cumplimentarlas, haciendo redituable su utilización (Harada et al., 2020).

## Metabolismo redox en E. gracilis

Para los organismos aerobios el oxígeno es necesario para un correcto crecimiento celular. Sin embargo, como subproducto del metabolismo aeróbico (respiración y fotosíntesis) se observa la formación de especies reactivas de oxígeno (EROs). Entre estas especies podemos destacar el anión superóxido ( $O_2^{-}$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo. Las EROs inducen un daño oxidativo sobre las biomoléculas como las proteínas, ADN, lípidos, hidratos de carbono y otros componentes celulares, produciendo modificaciones químicas que pueden desencadenar daño irreversible. Por otro lado, estas especies reactivas cumplen un rol importante como moléculas de señalización en situaciones de estrés. Para controlar los niveles de EROs intracelular, los organismos aeróbicos han desarrollado sistemas regulatorios que incluyen compuestos químicos de baja masa molecular y enzimas. Condiciones de estrés pueden variar el balance entre la concentración de especies reactivas y las defensas antioxidantes que presentan las células. Estas defensas pueden ser del tipo enzimática y no enzimáticas.

#### Agentes antioxidantes no enzimáticos en E. gracilis

En *E. gracilis*, se observan agentes antioxidantes hidrofóbicos e hidrofílicos. Dentro del primer grupo se han reportado carotenoides y tocofenorol. Mientras que dentro de las defensas

antioxidantes solubles en agua se encuentran el ácido ascórbico, el glutatión (GSH), el tripanotión y el ovotiol (O'Neill, 2020). El GSH es un tripétido compuesto de cisteína (Cys), ácido glutámico y Gly que se encuentra presente en la mayor parte de los eucariotas (**Figura 7A**). El ovotiol (**Figura 7B**) es un tiol derivado de histidina que ha sido observado en invertebrados marinos y tripanosomátidos (Ariyanayagam, 2001). El tripanotion, característico de los tripanosomátidos, está compuesto por dos unidades de GSH unidas por espermidina. En *E. gracilis*, se ha encontrado no solamente tripanotión, sino también una versión del mismo con un esqueleto de espermidina de un carbono menos, como se muestra en la **Figura 7C** (O'Neill et al., 2015a).



**Figura 7**. Tioles de baja masa molecular en *E. gracilis*. (A) GSH. (B) Ovotiol. (C) Tripanotión canónico (n=2) y tripanotión de menor masa molecular (n=1). Figura modificada de O'Neill et al., 2015 a.

#### Sistemas antioxidantes enzimáticos en E. gracilis

Para evitar llegar a niveles tóxicos de radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) en la célula, *E. gracilis* cuenta con dos isoformas de superóxido dismutasa. Esta enzima cataliza la dismutación de  $O_2^{\bullet-}$  en  $H_2O_2$  y  $O_2$  (Kanematsu & Asada, 1979). Debido a la ausencia de catalasa, para controlar los niveles de  $H_2O_2$  podemos destacar dos sistemas acoplados en *E. gracilis* (Škodová-Sveráková et al., 2020).

El ciclo del glutatión-ascorbato emplea la enzima ascorbato peroxidasa para reducir H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en agua (Ishikawa et al., 2010). Las enzimas monodehidroascorbato peroxidasa, dehidroascorbato reductasa, glutatión reductasa y glutatión peroxidasa junto a los metabolitos ascorbato, GSH y NAD(P)H también forman parte de este ciclo (Schwartzbach & Shigeoka, 2017).

En adición al ciclo del glutatión-ascorbato, *E. gracilis* también cuenta con el sistema peroxirredoxina-tiorredoxina. En este sistema, las peroxirredoxinas son las encargadas de reducir

peróxidos mediante reacciones de intercambio ditiol/disulfuro de residuos cisteína y luego son regeneradas por tiorredoxinas para ciclos catalíticos posteriores (Tamaki et al., 2014). Estas tiorredoxinas usan NADPH como dador de electrones en la reacción de reducción catalizada por la enzima tiorredoxina reductasa (Schürmann & Buchanan, 2008).

### Metabolismo del carbono en E. gracilis

*E. gracilis* es capaz de fijar  $CO_2$  a través de la fotosíntesis y consumir diversas fuentes de carbono orgánico. A través de una serie de reacciones enzimáticas, este carbono se utiliza para sintetizar la biomasa celular (Noor et al., 2010). Dependiendo de la condición de cultivo, *E. gracilis* acumula diferentes compuestos dentro de la célula, principalmente paramilón y ceras (Teerawanichpan & Qiu, 2010; Barsanti & Gualtieri, 2019). Ambos son bioproductos de interés académico y comercial como se describió anteriormente. Estas diferentes formas de acumular el carbono son una de las tantas herramientas de *E. gracilis* para adaptarse con facilidad a distintas condiciones de cultivo (**Figura 8**).

El paramilón se acumula en condiciones autotróficas o heterotróficas en presencia de oxígeno, llegando a un máximo de 90% del peso seco celular (Barsanti et al., 2001). Las ceras se acumulan hasta un 62% del contenido lipídico total en condiciones anaeróbicas (Tucci et al., 2010). Transferir células en crecimiento en un ambiente aeróbico a uno anaeróbico (y en oscuridad) dispara la conversión de paramilón a cera, mientras que el paso inverso genera la conversión de ceras a paramilón (Coleman et al., 1988).



**Figura 8**. Plasticidad metabólica en dos formas de acumular carbono en *E. gracilis*. (**A**) Consumo del paramilón en períodos de oscuridad en cultivos autotróficos. Cuadrado lleno: Biomasa en peso seco. Circulo lleno: Contenido proteico total. Triangulo lleno: ARN total. Circulo vacío: paramilón total. Extraído de Cook 1966. (**B**) Variación en el contenido de ceras y paramilón debido a la transferencia de células de *E. gracilis* crecidas en condiciones aeróbicas a anaerobiosis, y de regreso a aerobiosis. Circulo vacío: Ceras. Triangulo vacío: paramilón. Figura modificada de Inui et al., 1982.

Los genomas completos de cloroplastos y mitocondrias de *E. gracilis* se determinaron en 1993 y 2015, respectivamente (Hallick et al., 1993; Dobáková et al., 2015). Sin embargo, no se ha determinado la secuencia completa del genoma nuclear de *E. gracilis*, dada la dificultad en el ensamblado del mismo por el tamaño, los nucleótidos hipermodificados, la heterocigosidad y una alta frecuencia de secuencias repetitivas (Ebenezer et al., 2019). Actualmente, solo se dispone de un borrador del genoma y se está trabajando en conjunto para lograr avances en este aspecto (Ebenezer et al., 2022). No obstante, a partir de trabajos de secuenciación de transcriptomas, se ha logrado revelar la enorme capacidad metabólica de este organismo. De hecho, el transcriptoma de *E. gracilis* codifica para más de 36000 proteínas (Ebenezer et al., 2017). Análogamente a lo observado en tripanosomátidos, la regulación del metabolismo se hace efectiva a nivel postranscripcional, más que a nivel transcripcional (Yoshida et al., 2016; Ebenezer et al., 2019).

Es particularmente notable el gran número de enzimas activas en carbohidratos (CAZymes, por su sigla en inglés correspondiente a *Carbohydrates Active enZymes*) comparable en número a animales multicelulares, y mucho más alto que en otras algas unicelulares (O'Neill et al., 2017). Los trabajos de transcriptomas actuales han enriquecido considerablemente los conocimientos previos sobre las enzimas del metabolismo del carbono, que habían sido escasamente estudiados a partir de las purificaciones y caracterizaciones de las mismas extraídas de fuente (O'Neill et al., 2015a; Yoshida et al., 2016).

#### Enzimas del metabolismo de carbohidratos

Como mencionaba anteriormente, se observó la existencia de más CAZymes que en otras algas para las cuales el genoma se encuentra secuenciado, aunque mucho menos que en plantas superiores terrestres, que requieren complejas paredes celulares que permitan su crecimiento. Este elevado número de enzimas del metabolismo de carbohidratos fue observado también en otros en otros miembros del grupo Euglenozoa cuyo genoma está completamente secuenciado (Trypanozoma brucei y Leishmania braziliensis). Una particularidad de E. gracilis, en comparación con los organismos antes mencionados, es la falta de enzimas involucradas en la biosíntesis de  $\alpha$ -glucanos y el incremento en enzimas involucradas en la síntesis de  $\beta$ -glucanos (O'Neill et al., 2015b). Esto se refleja en la acumulación del paramilón, ( $\beta$ -1,3-glucano) (Rodríguez-Zavala et al., 2010), como polisacárido de reserva, a diferencia de los glucanos unidos por enlaces  $\beta$ -1,4/6, utilizados comúnmente como reserva de energía y carbono en plantas, animales y bacterias (almidón y glucógeno, respectivamente). A partir de los distintos proyectos transcriptoma en E. gracilis, se encontraron también enzimas de vías metabólicas principales, incluyendo la glucolítica y gluconeogénica, ciclo del ácido cítrico y la vía de las pentosas fosfatos, como así también enzimas de la vía de síntesis de carotenoides y del ciclo de Calvin, requerido para la fotosíntesis. Se reportó la presencia de transcriptos codificantes para enzimas

pertenecientes a las familias de glicosiltransferasas (GT) 2 y 48 (GT2 y GT48), y transcriptos codificantes para enzimas pertenecientes a las familias de glicosil hidrolasas (GH) 1, 2, 3, 5, 17, 30, 55, 64, 81 y 149. Solamente algunas de estas enzimas han sido caracterizadas funcionalmente en *E. gracilis*, por lo que es importante continuar con los trabajos de asignación estructura-función de estas proteínas para conseguir un mayor entendimiento del metabolismo del carbono en *E. gracilis*.

#### Síntesis del paramilón

El paramilón es sintetizado por la enzima paramilón sintasa (UDP-glucosa:  $\beta$ -1,3-glucan  $\beta$ -glucosiltransferasa), una proteína de transmembrana que utiliza UDP-glucosa como dador de glucosa (Glc)(Marechal & Goldemberg, 1964; Tomos & Northcote, 1978). Esta enzima fue purificada a partir de extractos de *E. gracilis* crecidas en condiciones heterotróficas y posteriormente caracterizadas funcionalmente (Baumer et al., 2001). Trabajos de transcriptómica mostraron dos transcriptos codificantes para dos probables paramilón sintasas con 14 y 19 dominios transmembrana cada una (Yoshida et al., 2016). Estudios de silenciamiento génico realizados sobre ambos transcriptos mostraron que uno de ellos es esencial en la síntesis del polímero (Tanaka et al., 2017).

En nuestro grupo de trabajo hemos estudiado enzimas involucradas en la síntesis del azúcar activado (UDP-glucosa) que es sustrato de la paramilón sintasa. Realizamos un estudio detallado de la UDP-glucosa pirofosforilasa, enzima que cataliza la reacción entre  $\alpha$ -glucosa-1-fosfato (Glc-1-P) y UTP, la regulación redox de su actividad y su ubicación citosólica (Muchut et al., 2018). Identificamos un transcripto codificante para una posible UDP-azúcar-pirofosforilasa, y mediante ensayos de silenciamiento génico demostramos su influencia en el contenido total del paramilón (Muchut et al., 2021). Observamos una disminución de la acumulación del polisacárido de reserva del 60% al silenciar la UDP-glucosa pirofosforilasa y del 30% al silenciar UDP-azúcar pirofosforilasa (**Figura 9**).



**Figura 9**. Esquema metabólico de la partición del carbono y las principales enzimas involucradas en la célula de *E. gracilis*. Se detallan la vía principal de producción de la UDP-Glucosa y posibles vías alternativas con las enzimas involucradas, además del destino de la UDP-Glucosa generada hacia la síntesis de paramilón. Asimismo, se indican las enzimas relacionadas con la degradación del  $\beta$ -1,3-glucano y su movilización hacia otros productos finales. Figura modificada de Muchut et al., 2021.

El polisacárido es guardado como carbono de reserva en gránulos discoidales que presentan un alto grado de cristalinidad con una compleja estructura de fibrillas, compuestas de hélices triples no ramificadas (Marchessault & Deslandes, 1979), rodeadas por una membrana del tipo bicapa lipídica (Kiss et al., 1988). En la **Figura 10** se puede observar esquemáticamente la estructura de los gránulos de paramilón, con las fibrillas que lo atraviesan en un patrón concéntrico, donde cada fibrilla está compuesta por hélices triples de cadenas del glucano.



**Figura 10**. Gránulos de paramilón. (**A**) Representación esquemática del gránulo mostrando las fibrillas compuestas de las hélices triples. Figura modificada de Marchessault y Deslandes, 1979. (**B**) Modelo que muestra la composición de capas con fibras que lo atraviesan en un patrón concéntrico general con dos tipos de segmentos, cuñas y sólidos rectangulares. La membrana que rodea el gránulo se muestra en solo la mitad de este con fines ilustrativos. Figura modificada de Kiss et al., 1987. (**C**) Imagen tomada por microscopía electrónica de barrido de gránulos de paramilón. Figura modificada de Gissibl et al., 2019a.

#### Degradación del paramilón

Los gránulos de paramilón muestran un grado de cristalinidad mayor al observado en carbohidratos de reserva de plantas y algas. Estos gránulos han mostrado ser recalcitrantes a la degradación enzimática y es muy plausible que un consorcio de enzimas sea necesario para ejecutar esta acción (Gissibl, et al., 2019a). A partir de los estudios de transcriptómica, se ha propuesto un escenario metabólico en el que se incluyen enzimas que podrían actuar en forma sinérgica como se muestra en la **Figura 11**, entre ellas se pueden destacar:

- Glucanasas oxidativas, que generan cortes al azar de forma análoga a lo observado en la digestión de la celulosa (Johansen, 2016).
- β-1,3-glucanasas hidrolíticas de tipo endo y exo que generarían oligosacáridos y unidades de glucosa.
- β-1,3-fosforilasas capaces de clivar laminaribiosa y/o laminarisacáridos acortando la cadena en una unidad y liberando Glc-1-P utilizando Pi.



**Figura 11**. Esquema del consorcio de enzimas que podrían estar involucradas en la degradación del paramilón. Figura modificada de Gissibl et al., 2019a.

Gran parte de la información enzimática con la que contamos actualmente se deriva de purificaciones realizadas a partir de extractos celulares de *E. gracilis*. Hasta la fecha, solamente se ha confirmado la asignación estructura-función a partir de unas pocas enzimas recombinantes: Una endo- $\beta$ -1,3-glucanasa de la familia GH17 (Takeda et al., 2015) y una  $\beta$ -1,3-fosforilasa de la familia GH149 (Kuhaudomlarp et al., 2018). En este sentido, son necesarios más estudios enzimáticos que permitan continuar el entendimiento de la degradación del paramilón. En el presente trabajo, nos propusimos avanzar en la caracterización de este tipo de enzimas.

### **OBJETIVOS**

El objetivo general de este proyecto es el estudio exhaustivo en *E. gracilis* del metabolismo de degradación de paramilón, y la caracterización enzimática y estructural de las distintas enzimas involucradas en esta ruta metabólica. Nos interesa estudiar in vitro las propiedades cinéticas, estructurales y regulatorias de glicosil hidrolasas (GH81, GH17, GH64), (Kitaoka et al., 2012; O'Neill et al., 2015a) recientemente descriptas en estudios transcriptómicos realizados en *E. gracilis*. También forma parte de nuestros objetivos la obtención de enzimas quiméricas por inclusión en los extremos amino o carboxi-terminal de las glicohidrolasas, de secuencias aminoacídicas características de módulos de unión a carbohidratos. En cada caso se evaluará *in-vitro* e *in-vivo* el efecto que los distintos módulos de unión a carbohidratos tienen en la eficiencia catalítica de las enzimas para degradar paramilón u otros  $\beta$ -1,3-glucanos. Nos proponemos también estudiar la importancia del metabolismo redox no sólo en el mantenimiento de la homeostasis redox intracelular, sino también en la regulación redox de la actividad de la  $\beta$ -1, 3-glucanasa de la familia GH64.

## **Objetivos específicos**

- Identificar en la base de datos<sup>1</sup> la secuencia de aminoácidos de la  $\beta$ -1, 3glucanasas de la familia GH64 (g.63754).
- Clonar el gen que codifica para GH64, g.63754. Confirmar su identidad por secuenciación.
- Expresar el gen que codifica GH64 g.63754, purificar cromatográficamente la enzima recombinante y caracterizarla enzimáticamente.
- Evaluar la trascripción de g.63754 en distintas condiciones de cultivo, y a distintos tiempos para analizar el proceso de degradación de paramilón y la importancia de la enzima en el mismo.
- Realizar ensayos de interferencia de ARN (ARNi) para evaluar la relevancia de la glucanasa en la acumulación final del paramilón. Conocer la localización a nivel celular de la glucanasa.
- Identificar en la base de datos CAZYs<sup>2</sup>, las distintas secuencias CBMs asociadas a enzimas con actividad β-1,3-glucanasa (GH64). Generar fusiones quiméricas. Expresar las quimeras en forma recombinante en el sistema de expresión *E. coli*, y purificarlas cromatográficamente. Caracterizar enzimáticamente las enzimas puras.

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> http://jicbio.nbi.ac.uk/euglena/

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> http://www.cazy.org/

- Evaluar la actividad *in vitro* de las distintas enzimas recombinantes obtenidas para degradar paramilón. Diseñar sistemas de degradación con combinaciones de glucanasas para optimizar la obtención de mostos enriquecidos en azúcares reductores.
- Evaluar la utilidad de las herramientas desarrolladas en otros sistemas de potencial interés biotecnológico. Evaluar la actividad antifúngica de β-1,3-glucanasas, *in vitro* (determinación de la concentración inhibitoria mínima, CIM) e *in vivo* (evaluación del efecto sobre la tolerancia al estrés biótico causado por infección con *Botrytis cinerea* sobre mutantes de *Arabidopsis thaliana*).
- Evaluar la presencia de proteínas que, en *E. gracilis*, se presenten con modificaciones redox in vivo. Clonar los genes que codifiquen para aquellas enzimas del metabolismo redox que se identifiquen y estudiar sus participaciones en la regulación posttranscripcional de la actividad de glucanasa u otras enzimas del metabolismo de carbohidratos. Utilizando datos del trabajo de transcriptómica (O'Neill et al. 2015), clonar el gen que codifica para tiorredoxina y proceder mediante metodología estándar a obtener la proteína recombinante para su caracterización.
# <u>Capítulo 1:</u> Estudio de enzimas involucradas en el metabolismo redox de *E. gracilis*

# **INTRODUCCIÓN**

#### Relevancia del GSH en E. gracilis

El GSH es una molécula tiol de baja masa molecular que cumple diversas funciones y en *E. gracilis* se lo ha detectado en concentraciones milimolares intracelularmente (Shigeoka, et al., 1987b). La función primaria de esta molécula es mantener la homeostasis redox intracelular. Esto último debido a que es capaz de inactivar EROs de forma intrínseca y participando en sistemas acoplados.

En el ciclo glutatión-ascorbato, el GSH es usado como dador de electrones por la dehidroascorbato reductasa para regenerar ácido ascórbico. De esta forma, la oxidación de GSH genera el glutatión disulfuro (GSSG). Los disulfuros a nivel celular causan daño oxidativo cuando están presentes en altas concentraciones y su formación en exceso contribuye al estrés oxidativo (Giles & Jacob, 2002). A nivel celular el GSSG puede ser reducido por la enzima glutatión reductasa, habiéndose localizados a los miembros de esta cascada metabólica en el citosol (Shigeoka, et al., 1987a).

El GSH también es necesario para la síntesis de otro tiol de baja masa molecular: el tripanotión. El sistema redox de los tripanosomátidos se encuentra centrado en tripanotión, ya que carecen de glutatión reductasa y tiorredoxina reductasa. Sin embargo, *E. gracilis* presenta todos estos diferentes sistemas redox y los mismos no son redundantes, sino funcionalmente diferenciados cuya función aparenta ser diferencial (Schwartzbach & Shigeoka, 2017).

*E. gracilis* ha demostrado tener la habilidad de acumular metales pesados como  $Cd^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Tc^{7+}$  y  $Cr^{6+}$  contribuyendo a la remediación de aguas contaminadas (Rodriguez-Zavala et al., 2007). De forma similar a lo que ocurre con otros tipos de estreses ambientales, las elevadas concentraciones de metales pesados conducen a la formación de EROs. Para inactivar el accionar de los metales pesados, *E. gracilis* es capaz de emplear metabolitos tiolicos para formar complejos con Cys, GSH y fitoquelatina como agentes quelantes. Las fitoquelatinas son oligómeros de GSH sintetizadas en el citosol que presentan elevada capacidad quelante (Santiago-Martínez et al., 2015). Como parte del repertorio de moléculas quelantes de *E. gracilis*, también se han reportado fitoquelatinas no canónicas, donde la Gly de la fitoquelatina clásica es reemplazada por otros aminoácidos como alanina, glutamina, ácido glutámico, entre otros (Sánchez-Thomas et al., 2020). En todos los casos el GSH es un actor relevante en este

metabolismo, per se o como sustrato en la síntesis de fitoquelatina (Gekeler et al., 1988; Santiago-Martínez et al., 2015). Así, se ha mostrado un incremento de hasta 12 veces del contenido de GSH en células de *E. gracilis* expuestas a Cd<sup>2+</sup> (Mendoza-Cozatl et al., 2002; Jasso-Chávez et al., 2010).

El GSH se encuentra también involucrado en el mantenimiento de la estructura y función de proteínas, y en la regulación redox de la actividad de enzimas mediante la reducción de puentes disulfuro o a través de la formación de disulfuros mixtos con tioles de proteínas (Schafer & Buettner, 2001; Fernandes & Holmgren, 2004).

#### Síntesis de GSH

El GSH es sintetizado *de novo* en su forma reducida por la mayoría de los organismos mediante una reacción en dos etapas ATP dependientes. En la primera etapa, catalizada por la glutamato cisteína ligasa (GCL, EC 6.3.2.2), se forma  $\gamma$ -glutamilcisteína ( $\gamma$ -GC) a partir de glutamato y Cys empleando Mg<sup>2+</sup> como cofactor, de acuerdo a la reacción (1). Luego se añade Gly por acción de la glutatión sintetasa (EC 6.3.2.3) para así formar el tripéptido GSH, como se muestra en la reacción (2).

$$L-Glu + L-Cys + ATP \rightarrow \gamma - GC + ADP + Pi$$
(1)

$$\gamma$$
-GC + L-Gly + ATP  $\rightarrow$  GSH + ADP + Pi (2)

La enzima GCL cumple un papel importante en la homeostasis redox intracelular. Esta enzima cataliza el paso limitante en la síntesis de GSH y posee diversos mecanismos de regulación como se ha reportado en bacterias, algas, fungi, plantas y animales (García-García et al., 2012; H. Zhang & Forman, 2012). Hay reportes de regulación de la actividad de GCL por la disponibilidad de Cys, inhibición tipo *feed-back* negativo ejercida por GSH, y modulaciones a nivel transcripcional y post-transcripcional (Tateishi et al., 1974; Lu, 2009).

En base a análisis de secuencia, las GCL se clasifican en tres grupos. El grupo 1 conformado por secuencias de gama-proteobacterias; el grupo 2, donde se encuentran secuencias de eucariotas excluyendo plantas; y el grupo 3 en el que se distinguen secuencias de alfaproteobacterias y plantas. Si bien la identidad de secuencia entre grupos es insignificante, se pueden observar motivos con residuos aminoácidos conservados (Biterova & Barycki, 2009; Lagos et al., 2012). Dentro del grupo 2, las GCL de eucariotas complejos (por ejemplo, humano, rata, *Drosophila*) presentan una subunidad regulatoria formando un heterodímero con la subunidad catalítica. Sin embargo, en eucariotas inferiores, las GCL constan de un solo polipéptido (Franklin et al., 2009). En el marco del estudio de la respuesta de *E. gracilis* a Cd<sup>2+</sup>, se realizaron purificaciones parciales en las cuales se evidenció la actividad GCL (Avilés et al., 2005; García-García et al., 2012). De esta forma, se observó inhibición de esta actividad por GSH, y que en condiciones de estrés por Cd<sup>2+</sup>, se determinaba una mayor actividad GCL e incremento en el contenido de GSH. Esto proponía la hipótesis según la cual mediante el secuestro de GSH el metal disminuye la inhibición de tipo *feed-back* sobre GCL y que el complejo ion-GSH no inhibe la actividad GCL (Avilés et al., 2005; García-García et al., 2012).

Con el objetivo de realizar una correcta asignación estructura-función, realizamos una búsqueda en una base de datos transcriptómicos (GenBank: GEFR00000000.1) empleando secuencias de GCL correspondientes a subunidades catalíticas y regulatorias previamente caracterizadas (O'Neill et al., 2015a). De esta manera identificamos un transcripto (light\_m43917) el cual comparte un porcentaje de identidad mayor al 40% con otras subunidades catalíticas de GCL. Por otro lado, no encontramos ningún transcripto que codifique para polipéptidos relacionados con la subunidad regulatoria de GCL. Realizamos un análisis del transcripto light\_m43917 y diseñamos un gen sintético que nos permitiera expresar esta subunidad. Purificamos este polipéptido y realizamos estudios cinéticos y estructurales que nos aporten información sobre este polipéptido.

# **OBJETIVOS**

- Analizar el trascripto light\_m43917. Identificar la región codificante para la proteína de interés.
- Diseñar una estrategia que permita sintetizar *de novo* el gen *egrgcl* y clonarlo en un vector de expresión.
- Realizar la expresión en células *E. coli* y purificar el polipéptido resultante.
- Evaluar la estructura cuaternaria de *Egr*GCL y realizar análisis bioinformáticos que aporten información estructural de la enzima.
- Realizar ensayos de actividad enzimática con los sustratos canónicos y determinar los parámetros cinéticos correspondientes.

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

# Reactivos químicos y materiales

Todos los reactivos utilizados fueron de la máxima calidad disponible, de grado "proanálisis" o similar. Los materiales y reactivos químicos empleados en este trabajo se obtuvieron comercialmente de las siguientes compañías:

• Componentes de medios de cultivos: Britania, Cicarelli, Anhedra.

• Reactivos de biología molecular: Promega, Invitrogen, Fermentas, Novagen, Genbiotech, New England BioLabs.

• Materiales utilizados en la purificación de proteínas y otros reactivos relacionados a proteínas: GE Healthcare.

- Filtros y columnas de desalado: Millipore, Bio-Rad.
- Reactivos químicos: Sigma-Aldrich, Merck, Genbiotech.
  Oligonucleótidos sintéticos: GBT Genbiotech

# Microorganismos, plásmidos, medios de cultivo y antibióticos

# Cepas procariotas

Para el clonado de los diferentes genes y la expresión recombinante de las distintas proteínas caracterizadas en este trabajo de tesis, se emplearon las cepas de *E. coli* y los plásmidos que se disponen en nuestro grupo de trabajo, según lo detallado a continuación.

• Escherichia coli **Top10** F':  $[lacI^q Tn10(Tet^R)]$  mcrA (mrr-hsdRMS-mcrBC)  $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ lacX74 recA1 deoR araD139  $\Delta$ (ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG. Esta cepa fue empleada durante las etapas de biología molecular para generar las distintas construcciones génicas.

• *Escherichia coli* **BL21 (DE3)**: F<sup>-</sup> *ompT hsdS* (r<sup>-</sup> m<sup>-</sup>) *gal dcm* (DE3). Se empleó para la expresión recombinante.

# Medios de cultivo

#### **Bacterias**:

- Lysogeny Broth (LB): extracto de levadura 5 g.L<sup>-1</sup>; tripteína bacteriológica 10 g.L<sup>-1</sup> y NaCl 10 g.L<sup>-1</sup>.
- LB-agar: Medio LB suplementado con agar-agar 1,6% (p/v).

# **Plásmido**

• Vector **pET28(c+)** (Novagen), vector inducible por IPTG que permite incorporar una etiqueta de poli-histidinas (His-x6) en el extremo N-terminal de la proteína para facilitar su posterior purificación. Posee marcador de selección que confiere resistencia a kanamicina. Inducible por IPTG.

### **Antibióticos**

• Kanamicina: Concentración final 50 µg.mL<sup>-1</sup>.

# Metodología utilizada en biología molecular

Las técnicas estándares de microbiología y biología molecular fueron realizadas, fundamentalmente, según protocolos ya establecidos (Sambrook & Russell, 2001).

### Digestión de ADN con enzimas de restricción

Para realizar el subclonado de los genes, los mismos se liberaron a partir del vector de clonado con las enzimas de restricción que permitirán su incorporación de manera adecuada en el vector de expresión seleccionado, previamente digerido con las mismas enzimas de restricción. Además, el análisis de restricción es útil para confirmar la presencia del gen de interés en el vector en estudio. Las reacciones de digestión comúnmente contenían: 1 a 2 µg de ADN plasmídico, el *buffer* de reacción correspondiente que provee el fabricante y de 10 a 20 U de la enzima de restricción. Esta mezcla se incubó durante 3 h a 37°C. Las digestiones se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa.

## Ligación de fragmentos de ADN

Para ligar el gen de interés y el vector de expresión correspondiente, ambos digeridos con las mismas enzimas de restricción, se utilizó la enzima T4 ADN ligasa (Promega). La mezcla de reacción contenía típicamente una relación molar 3:1 de inserto:vector. Posteriormente, se agregó a ese mismo tubo una cantidad adecuada de *buffer* de reacción 10 X que provee el fabricante y 2 U de T4 ADN ligasa.

La mezcla final se incubó durante 16 h a 8°C. Para obtener los clones de expresión, con la mezcla de ligación se transformaron células competentes de *E. coli* Top10 F', se seleccionaron los clones que poseían el inserto por análisis de restricción y con los clones seleccionados se transformaron las células de *E. coli* escogidas para la expresión de la proteína recombinante.

#### Purificación de ADN a partir de gel de agarosa

Para purificar fragmentos de ADN a partir del gel de agarosa se utilizó el sistema *Easy Pure Gel Extraction Kit* (TRANS), siguiendo el protocolo especificado en el fabricante.

#### Transformación de bacterias competentes

Para permitir la incorporación de ADN plasmídico exógeno, las células de E. coli se hicieron competentes utilizando el método de CaCl2. Brevemente, un cultivo crecido durante toda la noche en medio LB se diluyó 1/50 en medio de cultivo fresco y se incubó a 37°C hasta DO 600 ~ 0,4; se tomaron alícuotas de 1 mL en tubos eppendorf de 1,5 mL, se centrifugaron a 5000  $\times g$  por 5 min y las células se resuspendieron en 500 µL de solución ST1 [10 mM MOPS-NaOH pH 7,0; 10 mM KCl]. Se volvió a centrifugar a 5000 ×g por 5 min, para 500 resuspender células μL de solución ST2 luego las en [100 mM MOPS-NaOH pH 6,5; 10 mM KCl; 100 mM CaCl<sub>2</sub>] e incubarlas durante 15 min en hielo. Las células se centrifugaron nuevamente a 5000  $\times g$  por 5 min y se resuspendieron en 100  $\mu$ L de ST2. A las células competentes se les agregaron entre 2-5  $\mu$ L de plásmido o de mezcla de ligación y se incubaron en hielo durante 60 min. Se realizó un choque térmico a 42°C durante 40 s y luego se recuperaron las células adicionando 1 mL de medio LB e incubando durante 60 min a 37°C. Por último, las células se volvieron a centrifugar a 5000  $\times$  g durante 5 min, se resuspendieron en los 100 µL remanentes y se sembraron en placas de LB-agar suplementado con el/los antibióticos correspondientes para permitir la selección de las células transformadas. Las placas se incubaron toda la noche a 37°C y se seleccionaron clones para continuar con el análisis.

# Minipreparación de ADN plasmídico

Para la extracción de ADN plasmídico a partir de células transformadas de *E. coli*, los clones de interés se repicaron en 4 mL de medio LB líquido suplementado con el antibiótico correspondiente y se cultivaron toda la noche a 37°C. Las células se cosecharon por centrifugación a 3000  $\times g$  durante 10 min y se extrajo el ADN plasmídico utilizando el sistema comercial *EasyPure Plasmid MiniPrep Kit* (TRANS), siguiendo el protocolo establecido en el mismo. La obtención del plásmido se corroboró por electroforesis en gel de agarosa.

# Métodos fisicoquímicos básicos

#### Electroforesis en gel de agarosa

Las electroforesis de fragmentos de ADN fueron resueltas por electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) en solución TAE 1X (40 mM Tris-HCl pH 8,0; 40 mM ácido acético; 1 mM EDTA) con la adición de Gel Green a una concentración final de 0,3 µg.mL<sup>-1</sup>. Las muestras se

acondicionaron antes de su corrida con glicerol 3% (v/v) y Azul de Bromofenol 0,05% (p/v). Se utilizó el sistema Mini-Sub<sup>®</sup>Cell GT (Bio-Rad) para la corrida propiamente dicha. Los fragmentos se visualizaron en un transiluminador UltraSlim Led illuminator 470 nm (MaestroGen).

### Electroforesis en gel de poliacrilamida

La electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) como se ha descripto previamente (Laemmli 1970). La concentración de acrilamida del gel de apilamiento fue de 4%, mientras que la concentración del gel de separación fue de 10-15%. Las muestras fueron desnaturalizadas antes de su siembra mediante el agregado de *buffer* de siembra SDS-PAGE 4X (SDS 1% (p/v), 2-mercaptoetanol 100 mM, en Tris-HCl 50 mM pH 6,8) y su posterior calentamiento a 100°C durante 5 min. Una vez sembradas las muestras, la corrida electroforética se realizó aplicando una corriente de intensidad constante de 25 mA por cada placa, en buffer de corrida [Tris-base 0,3% (p/v), Gly 1,44% (p/v), SDS 0,1% (p/v)], empleando un equipo Mini Protean II (Bio-Rad). Finalizada la corrida electroforética, las proteínas en el gel se visualizaron por tinción con Coomassie® Brilliant Blue R-250 en una solución de metanol 30% (v/v) y ácido acético 10% (v/v); y su posterior decoloración en una solución de metanol 5% (v/v) y ácido acético 7,5% (v/v). También se utilizó SDS-PAGE en condiciones no reductoras, utilizando el mismo procedimiento descripto con la omisión del agente reductor en el buffer de siembra. En el caso de PAGE en condiciones nativas se omitió la adición de SDS tanto en el buffer de siembra como en los geles poliacrilamida. En este caso la concentración de monómero utilizado fue de 7% p/v y se utilizó tinción con Coomassie® Brilliant Blue R-250 para la visualización de las proteínas en el gel (Arndt et al., 2012).

## Cuantificación del contenido proteico

Para determinar la concentración de las proteínas totales presentes en las muestras se utilizó la técnica de Bradford (Bradford, 1976), utilizando como patrón una solución de BSA (Sigma-Aldrich). Las lecturas de absorbancia se realizaron a 595 nm en un espectrofotómetro *Multiskan GO* (Thermo Scientific). Alternativamente se realizó cuantificación del contenido proteico midiendo absorbancia a 280 nm.

## Concentración de proteínas

Para cambiar el medio de las soluciones proteicas y/o para concentrar las proteínas se emplearon dispositivos comerciales de ultrafiltración Amicon (Millipore) de MWCO apropiado para cada proteína y se procedió según las indicaciones del fabricante.

# Expresión y purificación de la proteína recombinante

## Expresión de la proteína recombinante

Para la producción de la proteína recombinante utilizamos células *E. coli* BL21 (DE3) previamente transformadas con la construcción plasmídica correspondiente. Brevemente, las células transformadas se repicaron a medio LB líquido suplementado con kanamicina, y se incubaron en agitación a 37°C hasta su saturación. El cultivo se utilizó como *starter* para inocular 4 erlenmeyers con 0,5 L de medio de cultivo LB en cada uno de ellos. El medio de cultivo inoculado se incubó a 37°C en agitador orbital a 180 rpm hasta alcanzar una DO 600 ~ 0,8, momento en el cual se agregó el inductor IPTG a una concentración final de 0,2 mM. Luego de la inducción, las células continuaron cultivándose a 37°C en agitador orbital a 180 rpm durante 4 h. Para cosechar las células, se centrifugó el cultivo a 5000 × g durante 10 min y se conservaron a -20°C hasta el inicio del procedimiento de purificación cromatográfica de la proteína.

# Purificación de la proteína recombinante

Las células almacenadas a -20°C se diluyeron en *buffer* A (imidazol 10 mM; NaCl 400 mM; 20 mM Tris-HCl pH 8,0). La suspensión celular se enfrió en un baño de hielo y se sonicó con un procesador ultrasónico de alta intensidad VibraCell<sup>TM</sup> VCX 130 (Sonics). La suspensión resultante se centrifugó a 4°C y 18000 × g durante 20 min con el objeto de separar fracciones solubles e insolubles. El sobrenadante conteniendo la proteína recombinante soluble se utilizó para la correspondiente purificación.

La cromatografía de afinidad por metal inmovilizado (IMAC) fue utilizada debido a que las proteínas recombinantes contienen etiqueta de poli-histidinas en el extremo N-terminal. El sobrenadante se sembró en una columna comercial con la resina quelante cargada con Ni<sup>2+</sup> (Hi-Trap, GE Healthcare) previamente equilibrada con *buffer* A. Una vez sembrada, la remoción de proteínas inespecíficas y la elusión de la proteína de interés se logró mediante un gradiente lineal de imidazol en un rango de 10-300 mM utilizando el denominado *buffer* B (Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, NaCl 500 mM, imidazol 300 mM). Alícuotas de las fracciones fueron evaluadas por actividad enzimática y SDS-PAGE. Las fracciones más puras/activas se reunieron, y se concentraron por ultra centrifugación.

# Metodología de análisis enzimático

# Cuantificación de fosfato inorgánico

La actividad de *Egr*GCL se siguió con una reacción colorimétrica basada en la propiedad que tiene el Pi de formar un complejo de color fosfo-molibdato-verde de Malaquita, el cual es

mensurable espectrofotométricamente a 630 nm (Fusari et al., 2006). Las reacciones se desarrollaron durante 10 min a 37°C, sin alcanzar un consumo de sustrato mayor al 10%. La reacción se detuvo con la adición de 375  $\mu$ L del reactivo de color, seguido por el agregado de 50  $\mu$ L de citrato de sodio 34% (p/v). A partir de esta mezcla, se dispensó una alícuota de 250  $\mu$ L en policubetas de ELISA y se determinó la absorbancia a 630 nm. En paralelo, se estableció una curva de calibrado con testigos de Pi y se obtuvo un factor de conversión de DO a nmoles. El reactivo de color se preparó mezclando 3 volúmenes de verde de malaquita al 0,045% (p/v) y 1 volumen de molibdato de amonio 4,2% (p/v) en HCl 5N. Luego de homogeneizar durante 20 min y filtrar, a 5 mL de la solución obtenida se le adicionaron 100  $\mu$ L de Tween 20 al 2% (v/v). La mezcla de reacción se realizó incluyendo 100 mM *buffer* Tris-HCl pH 8,0, ATP 1 mM, L-Cys 20 mM, L-Glu 20 mM y MgCl<sub>2</sub> 10 mM.

#### Determinación de parámetros cinéticos

Los parámetros cinéticos  $V_{\text{max}}$  y  $K_{\text{M}}$  fueron determinados realizando ensayos donde se hizo variar la concentración de uno de los sustratos, manteniendo los restantes a concentración fija y saturante. Los datos cinéticos obtenidos se graficaron como velocidad inicial en U.mg<sup>-1</sup>, versus la concentración del sustrato variable en mM. Los parámetros cinéticos fueron calculados mediante ajuste por regresión no lineal utilizando la ecuación de Hill y el programa informático *GraphPad Prism* Software (GRAPH PAD Software Inc, California, USA). La constante catalítica ( $k_{\text{cat}}$ ) se calculó como resultado de dividir  $V_{\text{max}}$  con la concentración de enzima en la reacción [E].

# Cromatografía de exclusión molecular

La cromatografía de exclusión molecular se utilizó con fines analíticos para la determinación de la masa molecular de las proteínas de estudio. En el equipo ÄKTA Explorer (GE Healthcare) se conectó una columna Tricorn 10/300 (GE Healthcare) cargada con resina Superdex G-200 (GE Healthcare). Las corridas se realizaron a 0,75 mL.min<sup>-1</sup> en *buffer* G (HEPES pH 8,0 50 mM; NaCl 100 mM; EDTA 0,1 mM). Se empleó para la calibración de la columna un conjunto de patrones de masa molecular conocida (GE Healthcare). Los estándares analizados incluyeron: tiroglobulina (669 kDa), ferritina (440 kDa), aldolasa (158 kDa), conalbúmina (75 kDa), ovoalbúmina (44 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa) y ribonucleasa (13,7 kDa). El volumen muerto de la columna se determinó empleando una solución de Azul de Dextrano. Las masas moleculares se determinaron por interpolación de la curva logarítmica, donde se grafica el log de la masa molecular de los marcadores comerciales vs K<sub>av</sub>. K<sub>av</sub> se obtiene a partir de la siguiente ecuación: K<sub>av</sub>= (V<sub>e</sub>-V<sub>0</sub>)/(V<sub>c</sub>-V<sub>0</sub>); donde V<sub>e</sub> es el volumen de elusión, V<sub>o</sub> es el volumen muerto y V<sub>c</sub> es el volumen de columna.

# Modelado molecular

Se realizaron modelos tridimensionales empleando el software AlphaFold 2.0, el cual utiliza un algoritmo de *Deep learning* que ha demostrado tener mayor exactitud que otros métodos de modelado (Jumper et al., 2021; Tunyasuvunakool et al., 2021). La fiabilidad del modelo se evaluó con el sistema de puntuación plDDT, el cual representa una medida de la similitud local que tendría nuestro modelo si se compara con una proteína resuelta experimentalmente (Mariani et al., 2013). Se utilizó el software UCSF-Chimera para visualizar las estructuras y confeccionar las imágenes (Pettersen et al., 2004).

# **RESULTADOS**

# Análisis de la secuencia aminoacídica

Al realizar una exhaustiva búsqueda en la base de datos transcriptómicos de E. gracilis realizada en el grupo del Dr. Robert Field del Instituto de Biotecnología de Manchester, identificamos un transcripto codificante para una subunidad catalítica de GCL. No encontramos ningún transcripto codificante para una subunidad regulatoria de GCL. Esto último se encuentra en línea con la idea de que las GCL heterodiméricas solo se encuentran en organismos eucariotas superiores (Franklin et al., 2009). Realizamos un análisis de la traducción de la secuencia nucleotídica del transcripto de interés (light m43917) empleando diversas herramientas bioinformáticas (O'Neill et al., 2015a). El ARN mensajero maduro codifica para una cadena polipeptídica de 1074 aminoácidos y una masa molecular de 122 kDa. Los servidores empleados (SignalP 6.0 y Phobius) no detectaron secuencias correspondientes para posibles péptidos señales (Kall et al., 2007; Teufel et al., 2022). Tampoco encontramos evidencia dominios transmembrana con el predictor DeepTMHMM (Hallgren et al., 2022). Incluimos el servidor de clasificación de proteínas InterPro para evaluar la secuencia polipeptídica completa (Paysan-Lafosse et al., 2023). De esta manera, observamos que los  $\approx$ 640 aminoácidos del extremo N-terminal se encuentran asociados con la familia de subunidades catalíticas de GCL, con un porcentaje de identidad entre 43% y 45% con las subunidades catalíticas de GCL reportadas de Homo sapiens, Mus musculus y Ratus *norvegicus*. Por otro lado, los  $\approx$  330 aminoácidos del extremo C-terminal presentan un máximo de 32% de identidad con proteínas de la familia de questina oxidasa. Esta familia se encuentra formada por oxidorreductasas involucradas en la síntesis de policétidos y sus derivados, principalmente questina (Fujii et al., 1988). Esta última es una dihidroxiantraquinona relacionada a la emodina. Una de las enzimas más estudiadas de dicha familia, es una oxigenasa fúngica dependiente de hierro no hémico capaz de degradar la questina (Hou et al., 2022). Aproximadamente 60 aminoácidos se encuentran entre los dominios GCL y questina oxidasa. Esta región intermedia no presenta homología con otros dominios o motivos reportados en otras bases de datos consultadas (Paysan-Lafosse et al., 2023). Esta región presentó puntuaciones elevadas en los predictores de "región intrínsecamente desordenada" IUPread2A y DEPICTER empleados (Barik et al., 2020; Erdős & Dosztányi, 2020; Mészáros et al., 2018). Por estos motivos, inferimos que esta región cumple una función de unión flexible entre ambos dominios. Teniendo en cuenta toda esta información bioinformática, realizamos un esquema representando la ubicación de estos dominios en el transcripto (Figura 12).



**Figura 12**. Esquema de la traducción del transcripto light\_m43917 según la búsqueda bioinformática realizada. El extremo N-terminal (rojo) observamos homología con la familia de subunidad catalítica de GCL. En el C-terminal (azul) se encuentra una región que se encuentra asociada con proteínas de la familia questina oxidasa. En el intermedio (verde) encontramos una región flexible que conecta ambos dominios.

# Modelado molecular

Realizamos un modelado molecular de todo el polipéptido correspondiente a la traducción del transcripto light\_m43917 empleando el servidor Alphafold 2.0 (Jumper et al., 2021b). La estructura tridimensional predicha para estos 1074 aminoácidos se muestra en la **Figura 13**. La región correspondiente al dominio catalítico de GCL es la región del modelo que mayor fiabilidad presentó según el sistema de puntuación plDDT (Mariani et al., 2013). La región que menor valor plDDT presentó fue la intermedia, esto es esperable teniendo en cuenta que cumpliría la función de unir flexiblemente dos dominios, para lo cual no se necesitan estructuras secundarias rígidas. El valor plDDT correspondiente al dominio asociado a la familia de questina oxidasa es menor.



**Figura 13**. Modelado tridimensional del polipéptido completo. En la imagen se diferencian la subunidad catalítica de GCL (rojo), la región de unión de ambos dominios (verde) y el dominio asociado a la familia questina oxidasa (azul).

# Producción de la proteína recombinante

Teniendo en cuenta el análisis bioinformático realizado sobre la secuencia aminoacídica diseñamos un gen sintético con la información nucleotídica necesaria para clonar el dominio

GCL. Por esta razón el polipéptido resultante comprende desde el aminoácido inicial hasta el 645, es decir, no se incluye el dominio questina oxidasa. Se empleó un uso de codones optimizado para *E. coli* y se incluyeron sitios de restricción de interés flanqueando el gen. La síntesis *de novo* del gen (*egrgcl*) fue realizada en un vector pUC57 por *BIO BASIC INC*. A partir de este, clonamos en el vector pET28c en los sitios de restricción *Nde*I y *Hind*III. De esta forma, se adiciona una etiqueta de poli-histidinas en el extremo N-terminal para facilitar la purificación.

Transformamos células *E. coli* (BL21) DE3 con la construcción pET28c/NdeI-egrgcl-HindIII. Realizamos la inducción de estas células con una concentración final de IPTG 0,2 mM a 27°C durante 4 h en agitación. Posteriormente, realizamos una IMAC para purificar la proteína recombinante. Fracciones recolectadas a partir de la elusión con imidazol se muestran en la **Figura 14**. La masa molecular teórica de *Egr*GCL es 74,1 kDa. Recolectamos las fracciones correspondientes a las calles 4 a 8. Se procedió a concentrar el pool obtenido empleando un centricón. De esta manera, obtuvimos suficiente enzima soluble y purificada que nos permitió realizar la caracterización.



**Figura 14**. SDS-PAGE (10%) purificación de *Egr*GCL por IMAC. **Calle 1**: Marcador de masa molecular. **Calles 2-10**: Elusiones por gradiente de imidazol (10 -300 mM).

# Caracterización estructural de EgrGCL

Con el objeto de determinar la masa molecular en estado nativo de la proteína purificada se realizó una cromatografía de exclusión molecular empleando una columna *Superdex* 200 (GE-Healthcare). De esta forma, *Egr*GCL eluyó exhibiendo un único pico correspondiente a una forma monomérica de masa molecular (**Figura 15**). Esta disposición ha sido reportada para la mayoría

de las GCL estudiadas que no presentan subunidad regulatoria (Biterova & Barycki, 2010; Huang et al., 1988).



**Figura 15**. Cálculo masa molecular nativa de *Egr*GCL según elusión en cromatografía de exclusión molecular.

Teniendo en cuenta la información sobre la estructura cuaternaria monomérica, realizamos un modelado molecular exclusivo de EgrGCL. Para esto utilizamos el servidor Alphafold 2.0 (Jumper et al., 2021). En el centro del modelado de la proteína se observa una serie de láminas- $\beta$  anti-paralelas rodeadas de  $\alpha$ -hélices (**Figura 16A**). Esta disposición general también ha sido descripta en las estructuras cristalizadas de *E. coli* (grupo 1), *Brassica juncea* (grupo 3) y Saccharomyces cerevisiae (grupo 2) (Biterova & Barycki, 2010; Y. Yang et al., 2019). Previamente, se han descripto residuos relevantes en la unión a Glu y ADP en la GCL de *S. cerevisiae* (Biterova & Barycki, 2009). Mediante alineamiento de secuencia comprobamos que estos aminoácidos se encuentran conservados en EgrGCL. Estos residuos se muestran en la **Figura 16B**.



**Figura 16**. Modelo *Egr*GCL. (**A**) Clasificación por estructura secundaria. Laminas- $\beta$  en amarillo,  $\alpha$ -hélices en azul y *loops* en gris. (**B**) Aminoácidos involucrados en la unión a Glu (azul) y Mg<sup>2+</sup>(rojo). Se muestran las cadenas laterales en bolas y palitos. Los aminoácidos relevantes en la unión a Glu son: Glu-57, Glu-107, Arg-296, Cys-249, Tyr-338 y Arg-439; y a ADP son los siguientes: Glu-55, Gln-251 y Glu 437.

# Caracterización cinética de EgrGCL

El primer paso en la síntesis enzimática del GSH es catalizado por GCL. Esta reacción consiste en la unión peptídica entre la Cys y el Glu formando  $\gamma$ -GC. En este sentido, medimos la actividad enzimática de *Egr*GCL empleando los sustratos canónicos: Glu, Cys y ATP-Mg<sup>2+</sup>. Como la reacción implica la liberación de Pi, realizamos la detección utilizando el método del verde de malaquita (Fusari et al., 2006). Realizamos cinéticas de saturación para cada uno de los tres sustratos dejando fija la concentración de los restantes. Las reacciones enzimáticas se realizaron en *buffer* Tris-HCl pH 8,0 100 Mm a 37°C. La reacción se detuvo a los 10 min mediante la adición del reactivo de color. Las curvas de saturación se muestran en la **Figura 17**.



**Figura 17**. Cinética de saturación *Egr*GCL. (**A**) Saturación de ATP, concentraciones fijas de Cys (20 mM) y Glu (20 mM). (**B**) Saturación de Cys, concentraciones fijas de ATP (1 mM) y Glu (20 mM). (**C**) Saturación de Glu, concentraciones fijas de ATP (1 mM) y Cys (20 mM).

A partir de los ajustes realizados en estas curvas, obtuvimos el valor  $K_{M app}$  y  $V_M$ . El parámetro  $k_{cat app}$  es independiente de la concentración de enzima empleada en la reacción, y para calcularlo dividimos  $V_M$  por la concentración de *Egr*GCL utilizada. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 1**.

Co-sustrato	Sustrato	$K_{\rm M app}$ (mM)	$k_{\text{cat app}}$ (min <sup>-1</sup> )	$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ (mM <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )
20 mM L-Cys 20 mM L-Glu	ATP	$0,25 \pm 0,03$	$69 \pm 3,1$	276 ± 3,2
1 mM ATP 20 mM L-Glu	L-Cys	$1,00 \pm 0,35$	$54 \pm 2,7$	$54 \pm 3,0$
1 mM ATP 20 mM L-Cys	L-Glu	$0,82 \pm 0,06$	$54 \pm 1,2$	$66 \pm 1,2$

Tabla 1. Parámetros cinéticos aparentes de EgrGCL. Mediciones realizadas a pH 8,0 y 37°C.

Los resultados obtenidos para el parametro  $k_{cat app}$  indican que *Egr*GCL presenta número de recambio similar a los observado en enzimas pertenecientes a *T. brucei* y *A. thaliana* (Abbott et al., 2002; Jez et al., 2004), pero inferior a lo encontrado en *L. interrogans* y *M. musculus* (Chen et al., 2005; Sasoni et al., 2019). El  $K_{Mapp}$  aporta información sobre la interacción de cada sustrato con la enzima saturada con los dos sustratos restantes (Abbott et al., 2002). Al comparar este parámetro para L-Cys y L-Glu observamos valores similares para cada sustrato. Los valores obtenidos de  $K_{M app}$  para los tres sustratos son similares a los observados en las GCL caracterizadas de humano, *Ratus norvegicus* y *T. brucei* (Lueder & Phillips, 1996; Franklin et al., 2009). Mientras que la eficiencia catalítica ( $k_{cat}/K_M$ ) calculada para ATP, evidenció ser superior a lo reportado para *M. musculus* y *A. thaliana* (Jez et al., 2004; Chen et al., 2005).

En conclusión, el diseño del gen sintético y la expresión en *E. coli*, nos permitió identificar el transcripto light\_m43917 como el codificante para una subunidad catalítica de GCL. Los parámetros cinéticos de *Egr*GCL son similares a lo reportado a enzimas pertenecientes a otros organismos. La información transcriptómica publicada indica que esta sería la única GCL presente en *E. gracilis*. Todo esto, sugiere que *Egr*GCL cumpliría un rol fundamental en la homeostasis redox de *E. gracilis*, así como también en rutas metabólicas asociadas a la acumulación de metales pesados.

# Capítulo 2:

# Caracterización estructural y funcional de una glicosil fosforilasa de la familia GH149 en *E. gracilis*

# **INTRODUCCIÓN**

Las enzimas activas en carbohidratos son una clase de enzimas que poseen funciones implicadas en la alteración de los enlaces glucosídicos (escisión y/o formación). Estas se clasifican en tres categorías: glicosil hidrolasas (GH), glicosiltransferasas (GT) o glicosil fosforilasas (GP) (Nakai et al., 2013). Estas últimas, que llamaremos fosforilasas a partir de ahora, son un grupo de enzimas que catalizan la fosforólisis reversible de glucanos en presencia de Pi en los correspondientes azúcares-1-fosfatos y cadenas de glucanos acortadas (EC 2.4.1). La reversibilidad de la reacción también permite la producción de glucanos alargados a partir del donante de azúcar 1-fosfato y el aceptor de glucanos de elección (Pergolizzi et al., 2017). El término fosforólisis define el proceso de descomposición del enlace O-glucosídico de un determinado glucano asociado con la transferencia del glucósido a un Pi en el extremo no reductor que conduce a la formación del correspondiente azúcar-1-fosfato (Puchart, 2015).

Si observamos el glucano original y el azúcar-fosfato resultante, existen dos tipos de fosforilasas con respecto a la configuración anomérica resultante: con retención o inversión anomérica. Es decir, un mecanismo de acción con inversión cambia la configuración anomérica produciendo  $\alpha$ -glicosil-fosfato a partir de  $\beta$ -glicósido o generando  $\beta$ -glicosil-fosfato a partir de  $\alpha$ -glicósido. La mayoría de las  $\beta$ -fosforilasas conocidas se clasifican en la familia de la glicosil hidrolasa 94 (GH94), que incluye cinco especificidades de fosforilasa diferentes. Entre todas estas especificidades destacamos laminaribiosa fosforilasa, el disacárido de glucosa con unión  $\beta$ -1,3. La enzima de *Paenibacillus* sp. YM-1 fue parcialmente caracterizada cinética y estructuralmente (Kitaoka et al., 2012; Kuhaudomlarp, et al., 2019b).

Tecnológicamente, las reacciones de fosforólisis inversa pueden ser utilizadas en la síntesis de disacáridos, o para aprovechar la degradación de oligosacáridos produciendo azúcares-1-fosfatos de interés biotecnológico. Esta reversibilidad permite utilizar azúcares naturales de gran disponibilidad como material de partida (Suzuki et al., 2009; Sun et al., 2019). Las fosforilasas se pueden utilizar como catalizadores únicos o en combinación con otras fosforilasas u otras enzimas activas en carbohidratos para producir pequeñas moléculas glicoconjugadas y disacáridos raros (Sun & You, 2021).

# Actividad $\beta$ -1,3-fosforilasa en *E. gracilis*

Estudios realizados a partir de extractos de *E. gracilis* revelaron la presencia de actividad fosforilasa utilizando laminaribiosa (también puede utilizar laminaritriosa, laminaritetraosa y laminaripentaosa) y Pi como sustratos. También mostraron la capacidad de la misma para utilizar laminaritriosa, laminaritetraosa y laminaripentaosa como sustratos (Goldemberg et al., 1966). Distintas técnicas de purificación permitieron identificar dos entidades enzimáticas con el mismo tipo de actividad enzimática (Marechal, 1967a), pero con diferente preferencia por distintos laminarisacáridos (Marechal, 1967b). Una de ellas presentó mayor actividad de fosforólisis por laminaribiosa y esta actividad disminuyó conforme se incrementó el grado de polimerización del sustrato. Se denominó laminaribiosa fosforilasa. La segunda enzima presentó la misma actividad con laminaribiosa, laminaritetraosa y laminaripentaosa pero menos actividad con laminaribiosa. Se denominó  $\beta$ -1,3-oligoglucan-fosforilasa (**Figura 18A**).

En el sentido de síntesis, cuando Glc-1-P actúa como dador de unidades glucosa, laminaribiosa fosforilasa libera más Pi cuando la Glc participa de la reacción como aceptor. En el caso de la  $\beta$ -1,3-oligoglucan-fosforilasa, la actividad fue mayor cuando laminaribiosa, u otros laminarisacáridos de mayor grado de polimerización participaban en la reacción como aceptores (**Figura 18B**).



**Figura 18**. Comparación cinética entre laminaribiosa fosforila y oligo-glucan fosforilasa de *E. gracilis*. (A) Reacción de fosforólisis con distintos laminarisacáridos de sustratos. (B) Reacción de fosforólisis inversa con Glc-1-P de dador y distintos aceptores con laminaribiosa fosforilasa (línea discontinua) y oligo-glucan fosforilasa (línea continua). Figura modificada de Marechal, 1967b.

Mas recientemente, se realizaron búsquedas de secuencias de transcriptos codificantes para enzimas pertenecientes a la familia GH94 en proyectos transcriptoma reportados para *E*.

gracilis (O'Neill et al., 2015a; Yoshida et al., 2016). Esto debido a que solamente en esta familia se habían encontrado enzimas con actividad  $\beta$ -1,3-fosforilasa (Kitaoka et al., 2012; Nihira et al., 2012). Sin embargo, no se encontró ningún transcripto que cumpla con este requisito.

Para identificar la secuencia de las proteínas responsables de la actividad fosforilasa, fue necesario realizar ensayos de proteómica sobre extractos parcialmente purificados (Kuhaudomlarp et al., 2018). De esta forma, se determinó que las fosforilasas de *E. gracilis* pertenecen a una nueva agrupación en la clasificación CAZyme: la familia GH149. Alineamientos entre las secuencias de esta nueva familia y GH94 revelaron conservación en aminoácidos claves para la actividad fosforilasa, lo cual sugiere una conservación en el mecanismo de acción de ambas familias. En este trabajo los autores presentan una serie de ensayos de análisis cualitativos de la actividad enzimática, y una caracterización cinética en el sentido de fosforólisis inversa de la GH149 de *E. gracilis (Egr*GH149), sin completar el análisis en el sentido de fosforólisis (Kuhaudomlarp et al., 2018). En la **Figura 19**, se muestran los dos sentidos de reacción catalizados por *Egr*GH149 de acuerdo con estos experimentos.



**Figura 19**. Reacción reversible catalizada por *Egr*GH149. Figura modificada de Kuhaudomlarp et al., 2018.

Se identificó un ortólogo de *Egr*GH149 en una base de datos de metagenómica mediante una búsqueda tBLASTN (Kuhaudomlarp et al., 2018). La secuencia identificada, denominada a partir de ahora como BcG-GH149, comparte un 45% de identidad con *Egr*GH149. Debido a que esta secuencia fue encontrada en una base de datos de metagenómica, no se tiene certeza del organismo de origen, solo que se trata de una bacteria gram-negativa (Kuhaudomlarp, et al., 2019a). BcG-GH149 se produjo de forma recombinante y se realizaron ensayos cinéticos revelando que esta enzima cataliza la misma reacción que *Egr*GH149 (Kuhaudomlarp et al., 2018). La resolución cristalográfica de BcG-GH149 permitió avanzar en la resolución cristalográfica de esta familia. Al comparar esta estructura con la laminaribiosa fosforilasa de *Paenibacillus* sp. perteneciente a la familia GH94 (*P*sGH94), los autores encontraron una disposición de dominios estructurales similares en ambas enzimas, los dominios β-sandwich y el dominio catalítico (α/ α)<sub>6</sub> (Kuhaudomlarp, et al., 2019a). También se identificaron dos dominios adicionales flanqueando el dominio catalítico en BcG-GH149 ("Dom 1" y "Dom 2" en **Figura**  **20A**). Al cristalizar BcG-GH149 con laminarihexaosa, los autores observaron que este oligosacárido se ubica en un sitio alejado al sitio de catálisis supuesto por alineamientos con proteínas GH94 (**Figura 20B**).



**Figura 20**. Estructura resuelta cristalográficamente de BcG-GH149. (**A**) Comparación de los dominios tridimensionales de la laminaribiosa fosforilasa de *Paenibacillus* sp. (*Ps*GH94) con la GH149 de origen bacteriano (BcG-GH149). (**B**) Estructura tridimensional con los dominios diferenciados por colores y la laminaribexaosa (entre línea discontinua). Figura modificada de Kuhaudomlarp, et al., 2019a.

Recientemente, un estudio de silenciamiento por RNAi realizado en condiciones de anaerobiosis, demostró que *Egr*GH149 participa de forma sinérgica con otras fosforilasas y glucanasas en la formación de ceras a partir de paramilón (Tanaka et al., 2022a). Como parte de este trabajo de tesis, continuamos con la caracterización cinética y estructural de *Egr*GH149, identificamos aminoácidos relevantes en la catálisis y estudiamos la localización celular de esta enzima a través de inmunodetección.

# **OBJETIVOS**

- Adaptar la estrategia de expresión y purificación reportada a nuestras condiciones de trabajo.
- Realizar ensayos promiscuidad de *Egr*GH149 empleando distintos aceptores y dadores. Obtener los parámetros cinéticos correspondientes.
- Identificar la estructura cuaternaria de *Egr*GH149 y modelar molecularmente la enzima.
- Caracterizar cinéticamente a *Egr*GH149 en el sentido de degradación. Calcular los parámetros cinéticos empleando laminarisacáridos de distinto peso molecular.
- Comparar dos probables sitios de unión a sustrato mediante dinámica molecular.
- Identificar aminoácidos relevantes para la catálisis mediante mutagénesis sitio dirigida y posterior caracterización cinética.
- Evaluar la unión de *Egr*GH149 a sustratos solubles e insolubles.
- Inmunolocalizar *Egr*GH149 en células de *E. gracilis* crecidas en distintas condiciones de cultivo.
- Silenciar el transcripto codificante para *Eg*GH149 en células de *E. gracilis*.

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

# Reactivos químicos y materiales

Todos los reactivos utilizados fueron de la máxima calidad disponible, de grado "proanálisis" o similar. Los materiales y reactivos químicos empleados en este trabajo se obtuvieron comercialmente de las siguientes compañías:

• Componentes de medios de cultivos: Britania, Cicarelli, Anhedra.

• Reactivos de biología molecular: Promega, Invitrogen, Fermentas, Novagen, Genbiotech, New England BioLabs.

• Materiales utilizados en la purificación de proteínas y otros reactivos relacionados a proteínas: GE Healthcare.

- Filtros y columnas de desalado: Millipore, Bio-Rad.
- Reactivos químicos: Sigma-Aldrich, Merck, Genbiotech.
- Oligonucleótidos sintéticos: GBT Genbiotech

# Microorganismos, plásmidos, medios de cultivo y antibióticos

### Cepas procariotas

Para el clonado de los diferentes genes y la expresión recombinante de las distintas proteínas caracterizadas en este trabajo de tesis, se emplearon las cepas de *E. coli* y los plásmidos que se disponen en nuestro grupo de trabajo, según lo detallado a continuación.

• Escherichia coli **Top10** F':  $[lacI^q Tn10(Tet^R)]$  mcrA (mrr-hsdRMS-mcrBC)  $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ lacX74 recA1 deoR araD139  $\Delta$ (ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG. Esta cepa fue empleada durante las etapas de biología molecular para generar las distintas construcciones génicas.

• Escherichia coli Lemo (DE3): fhuA2 [lon] ompT gal ( $\lambda$  DE3) [dcm]  $\Delta hsdS/pLemo(CamR) \lambda DE3 = \lambda sBamHIo \Delta EcoRI-B int:: (lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21 \Delta nin5. pLemo = pACYC184-PrhaBAD-lysY. La expresión se ajusta variando el nivel de lisozima (lysY), el inhibidor natural de la ARN polimerasa T7. El nivel de lisozima se modula añadiendo L-ramnosa al cultivo.$ 

# Microalgas

*Euglena gracilis* UTEX 753 proveniente del Centro de Cultivo Algal de la Universidad de Texas (USA).

# <u>Plásmidos</u>

• Vector **pEASY®-Blunt** (Trans), vector de clonado para productos de PCR con extremos romos (provenientes de Phusion o Pfu polimerasa). Presenta dos marcadores de selección con resistencia a ampicilina y kanamicina.

• Vector **pOPINF** (Novagen), este vector es apto para expresar en sistemas de expresión en bacterias, insectos y mamíferos. Posee marcador de selección por resistencia a ampicilina. Inducible por IPTG (Berrow et al., 2007).

# Medios de cultivo

# Bacterias:

• Lysogeny Broth (LB) (extracto de levadura 5 g.L<sup>-1</sup>; tripteína bacteriológica 10 g.L<sup>-1</sup> y NaCl 10 g.L<sup>-1</sup>).

Microalgas:

• Cramer y Myers (CyM) (Cramer & Myers, 1952). Componentes detallados en Tabla 2.

Componente	Abreviatura	Concentración (mg.mL <sup>-1</sup> )		
Citrato de sodio	C6H5O7Na3	800		
Fosfato monobásico de potasio	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1000		
Fosfato dibásico de amonio	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1000		
Sulfato de magnesio	MgSO <sub>4</sub>	200		
Cloruro de calcio	CaCl <sub>2</sub>	20		
Sulfato férrico	$Fe_2(SO_4)_3$	3		
Sulfato de zinc	ZnSO <sub>4</sub>	0,4		
Cloruro de manganeso	MnCl <sub>2</sub>	1,8		
Molibdato de sodio	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0,02		
Cloruro de cobalto	CoCl <sub>2</sub>	1,8		
Sulfato de cobre	CuSO <sub>4</sub>	0,02		
Tiamina	Vitamina B1	0,01		
Cianocobalamina	Vitamina B12	0,0004		

# Tabla 2. Componentes medio de cultivo CyM.

# Antibióticos

- Ampicilina: Concentración final 100 µg.mL<sup>-1</sup>.
- Cloranfenicol: Concentración final 100 µg.mL<sup>-1</sup>.

# Metodología utilizada en biología molecular

Las técnicas estándares de microbiología y biología molecular fueron realizadas, fundamentalmente, según los protocolos ya establecidos (Sambrook & Russell, 2001).

# Extracción de ARN total

A partir de un cultivo de células de *E. gracilis* crecidas en la condición deseada se cosecharon aproximadamente 1 millón de células por centrifugación a  $2000 \times g$  durante 5 min y se extrajo el ARN total utilizando el sistema comercial *EasyPure RNA kit* (TransGen Biotech Co) siguiendo el protocolo establecido en el mismo (Han et al., 2018). El producto obtenido fue luego cuantificado y almacenado a -80°C hasta su utilización.

# Determinación de la concentración y pureza del ARN

La calidad e integridad del ARN obtenido fue examinada en geles de agarosa 1 % (p/v) mediante la visualización de las bandas de ARN ribosomal. La concentración de este fue determinada en espectrofotómetro NanoDrop<sup>™</sup> 2000 (Thermo).

# Reacción de la transcripción reversa del ARN

Alícuotas de ARN total obtenido de las diferentes extracciones fueron utilizadas para evaluar la presencia de fragmentos de ARNm de interés. Para este paso se utilizó la *RevertAid Reverse Transcriptase* (Thermo Scientific) polimerasa siguiendo el protocolo indicado por el fabricante para muestras de alto contenido de GC y utilizando los oligonucleótidos detallados en **Tabla 3** (Burrell, 1993).

<b>Tuble 5.</b> Secucitera de ongonucieoridos utilizados en la transcripción reversa de 7 na v.				
Nombre	Secuencia (5´-3´)			
FwEgActin	ATGAATCCCAAGAGCAATCG	54		
RvEgActin	GTTTCCATCAGGCAACTCGT	57		
FwGH149tg1	GGGTGTTCAGCCAGATGCCTCCGTCCAGG	72		
RvGH149tg1	GGGTACGCCAACGTCCCGTACATCATCCG	72		
FwGH149tg2	GGGATGACGTTGCGTGCCAGGAACGGC	73		
RvGH149tg2	GGGCGATGCTGGACGCACTTGGGGAG	73		

Tabla 3. Secuencia de oligonucleótidos utilizados en la transcripción reversa de ARN.

# Amplificación de ADN. Reacción en cadena de la polimerasa

Para realizar la amplificación de ADN se utilizaron oligonucleótidos específicos. Se empleó la PFU ADN Polimerasa (Productos, Bio-Lógicos).

Se utilizaron las condiciones de ciclado informadas por los respectivos fabricantes, usando un termociclador T100 Thermal Cycler (Bio-Rad). Las mezclas de reacción se separaron electroforéticamente en gel de agarosa al 1% (p/v) y se purificaron a partir del gel, para luego ligarlas al vector de clonado. Para el cálculo de la TA óptima, se utilizó el servidor de *New England BioLabs*<sup>3</sup> (Owczarzy et al., 2004).

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup> https://tmcalculator.neb.com/#!/main

# Purificación de ADN a partir de gel de agarosa

Para purificar fragmentos de ADN a partir del gel de agarosa se utilizó el sistema *Easy Pure Gel Extraction Kit* (TransGen Biotech Co), siguiendo el protocolo especificado en el fabricante.

# Transformación de bacterias competentes

Para permitir la incorporación de ADN plasmídico exógeno, las células de E. coli se hicieron competentes utilizando el método de CaCl<sub>2</sub> (Aich et al., 2012). Los pasos seguidos se indican a continuación. Un cultivo crecido durante toda la noche en medio LB se diluyó 1/50 en medio de cultivo fresco y se creció a 37°C hasta una DO600~0,4; se tomaron alícuotas de 1 mL en tubos eppendorf de 1,5 mL, se centrifugaron a 5000  $\times g$  por 5 min y las células se suspendieron en 500 µL de solución ST1 [10 mM MOPS-NaOH pH 7,0; 10 mM KCl]. Se volvió a centrifugar a 5000 ×g por 5 min, para luego resuspender las células en 500 µL de solución ST2 [100 mM MOPS-NaOH pH 6,5; 10 mM KCl; 100 mM CaCl<sub>2</sub>] e incubarlas durante 15 min en hielo. Las células se centrifugaron nuevamente a 5000  $\times g$  por 5 min y se suspendieron en 100  $\mu$ L de ST2. A las células competentes se les agregaron entre 2-5 µL de plásmido o de mezcla de ligación y se incubaron en hielo durante 60 min. Se realizó un choque térmico a 42°C durante 40 s y luego se recuperaron las células adicionando 1 mL de medio LB e incubando durante 60 min a 37°C. Por último, las células se volvieron a centrifugar a 5000  $\times$  g durante 5 min, se suspendieron en los 100 µL remanentes y se sembraron en placas de LB-agar suplementado con el/los antibióticos correspondientes para permitir la selección de las células transformadas. Las placas se incubaron toda la noche a 37°C y se seleccionaron clones para continuar con el análisis.

#### Minipreparación de ADN plasmídico

Para la extracción de ADN plasmídico a partir de células transformadas de *E. coli*, los clones de interés se repicaron en 4 mL de medio LB líquido suplementado con el antibiótico correspondiente y se cultivaron toda la noche a 37°C. Las células se cosecharon por centrifugación a 3000  $\times g$  durante 10 min y se extrajo el ADN plasmídico utilizando el sistema comercial *EasyPure Plasmid MiniPrep Kit* (TransGen Biotech Co), siguiendo el protocolo establecido en el mismo. La obtención del plásmido se corroboró por electroforesis en gel de agarosa.

# Secuenciación de ADN

Los plásmidos que contenían los genes de interés se enviaron a secuenciar para corroborar que la secuencia del gen sea la correcta. Para esto una alícuota de una miniprepración de ADN plasmídico, de una concentración aproximada de 100 µg.µL<sup>-1</sup> se envió a la empresa Macrogen Inc (Corea) para ser secuenciada de forma automatizada utilizando oligonucleótidos específicos que hibridan en una región del plásmido cercana al sitio de inserción del gen.

# Síntesis de ARN doble cadena para ARN de interferencia

A partir de la secuencia codificante del gen de interés, se diseñaron oligonucleótidos que permitan amplificar fragmentos de tamaños cercano a 400 pb. Al par de oligonucleótidos se les adiciona en el extremo 5' la secuencia promotora para la T7 ARN polimerasa (TAATACGACTCACTATAGGG). En la **Tabla 4** se muestra la secuencia de los oligos utilizados para la síntesis de ARNdc. De este modo, al realizar la PCR, el fragmento de ~400 pb deseado quedó flanqueado por las secuencias promotora de la T7 ARN polimerasa en ambos extremos. Así se utilizó el producto de PCR como molde para la reacción in vitro de la T7 ARN polimerasa (TRANS) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Finalizada la reacción, se adicionó ADNasa con el fin de degradar el ADN utilizado como molde y se procede a realizar un paso de purificación para obtener el ARNdc libre del ADN utilizado como molde con el uso del kit Easy Pure RNA kit Purification (TRANS) siguiendo las especificaciones del fabricante. El ARNdc se almacena a -80°C hasta su utilización en la electroporación de células de *E. gracilis* para realizar silenciamiento mediante ARN de interferencia.

**Tabla 4.** Secuencia de oligonucleótidos utilizados para producir el molde de ADN para la síntesis del ARNdc. En negrita se encuentra resaltado la secuencia T7 promotora.

Nombre	Secuencia (5´-3´)
FwGH149tg1T7prom	<b>TAATACGACTCACTATAGGG</b> TGTTCAGCCAGATGC
RvGH149tg1T7prom	TAATACGACTCACTATAGGGTACGCCAACGTCCCGTAC
FwGH149tg2T7prom	TAATACGACTCACTATAGGGATGACGTTGCGTGCCAGGAAC
RvGH149tg2T7prom	TAATACGACTCACTATAGGGCGATGCTGGACGCACTTGG

# Electroporación de células de E. gracilis para realizar ARN de interferencia

A partir de un cultivo en crecimiento exponencial de *E. gracilis* se toman  $1.10^6$  células, seguidamente se procede a realizar dos lavados con la solución de electroporación *MAX Efficiency*<sup>TM</sup> *Transformation Reagent for Algae* (Invitrogen), luego se resuspende las células en 400 µL de la solución, se adicionan ~10 µg de ARNdc y se procede a la electroporación utilizando una cubeta de 2 mm de separación (400 µL de volumen), resistencia infinita, 450 V, 75 µF. Se realizan 2 pulsos con descanso de 15 s. Seguidamente se colocan las células en frasco T, llevando el cultivo a 3 mL de medio CyM suplementado con 0,5% de Glc durante 2 días hasta recuperación de las células. Pasado este tiempo, se puede cambiar el medio de cultivo de acuerdo con los requerimientos del ensayo.

# Mutagénesis sitio dirigida

Se introdujeron mutaciones puntuales mediante la técnica de *QuickChange*. Esta técnica se basa en la utilización de un par de oligonucleótidos portadores de la mutación que son complementarios entre sí y que llevan en el centro una región portadora de la mutación. Por medio de PCR se extendieron ambas cadenas de la construcción plasmídica de interés. Luego, el templado se removió de la reacción de PCR mediante digestión con la enzima de restricción *DpnI* y con el producto de reacción se transformaron células de *E. coli* TOP10. Una vez que se seleccionaron clones resistentes al agente de selección, se purificó el ADN plasmídico y se envió a secuenciar para comprobar la presencia de la mutación. Los cebadores utilizados se detallan en la **Tabla 5**.

Nombre	Secuencia (5´-3´)	Tm (°C)
FwGH149R477H	CAGGGCAATTGGCaTGATATTTTTCAGAATTG	60
RvGH149R477H	CAATTCTGAAAAATATCAtGCCAATTGCCCTG	60
FwGH149D478A	GGGCAATTGGCGTGCTATTTTTCAG	61
RvGH149D478A	CTGAAAAATAGCACGCCAATTGCCC	61
FwGH149D660A	GTCCGGAATGGAATGCTGCCAATAATGC	64
RvGH149D660A	GCATTATTGGCAGCATTCCATTCCGGAC	64

Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados para amplificar los genes en estudio.

# Análisis fisicoquímico básico

#### Electroforesis en gel de agarosa

Las electroforesis de fragmentos de ADN fueron resueltas por electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) en solución TAE 1X (40 mM Tris-HCl pH 8,0; 40 mM ácido acético; 1 mM EDTA) con la adición de Gel Green a una concentración final de 0,3  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>. Las muestras se acondicionaron antes de su corrida con glicerol 3% (v/v) y Azul de Bromofenol 0,05% (p/v). Se utilizó el sistema Mini-Sub<sup>®</sup>Cell GT (Bio-Rad) para la corrida propiamente dicha. Los fragmentos se visualizaron en un transiluminador UltraSlim Led illuminator 470 nm (MaestroGen).

# Electroforesis en gel de poliacrilamida

La electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes como se ha descripto previamente (Laemmli 1970). La concentración de acrilamida del gel de apilamiento fue de 4%, mientras que la concentración del gel de separación fue de 10-15%. Las muestras fueron desnaturalizadas antes de su siembra mediante el agregado de *buffer* de siembra SDS-PAGE 4X (SDS 1% (p/v), 2-mercaptoetanol 100 mM, en Tris-HCl 50 mM pH 6,8) y su posterior calentamiento a 100°C durante 5 min. Una vez sembradas las muestras, la corrida

electroforética se realizó aplicando una corriente de intensidad constante de 25 mA por cada placa, en *buffer* de corrida [Tris-base 0,3% (p/v), Gly 1,44% (p/v), SDS 0,1% (p/v)], empleando un equipo Mini Protean II (Bio-Rad). Finalizada la corrida electroforética, las proteínas en el gel se visualizaron por tinción con Coomassie® Brilliant Blue R-250 en una solución de metanol 30% (v/v) y ácido acético 10% (v/v); y su posterior decoloración en una solución de metanol 5% (v/v) y ácido acético 7,5% (v/v). También se utilizó SDS-PAGE en condiciones no reductoras, utilizando el mismo procedimiento descripto con la omisión del agente reductor en el *buffer* de siembra. En el caso de PAGE en condiciones nativas se omitió la adición de SDS tanto en el *buffer* de siembra como en los geles poliacrilamida. En este caso la concentración de monómero utilizado fue de 7% p/v y se utilizó tinción con Coomassie® Brilliant Blue R-250 para la visualización de las proteínas en el gel (Arndt et al., 2012).

#### Electrotransferencia seguida de inmunodetección

Finalizada la separación electroforética, se efectuó la electrotransferencia sobre una membrana de nitrocelulosa (GE Healthcare) durante 35 min a 200 mA en un equipo semi-seco (Analytik Jena). La solución empleada contenía Tris-base 25 mM, Gly 192 mM y etanol 20% (v/v). La membrana de nitrocelulosa transferida se bloqueó con una solución de leche descremada al 5% (p/v) en *buffer* PBS-Tween (8 g.L<sup>-1</sup> NaCl, 0.2 g.L<sup>-1</sup> KCl, 1.44 g.L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.24 g.L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4, 0,05% v/v Tween 20), incubándose 1 h a 25°C. Luego, la membrana se incubó con el anticuerpo primario en solución PBS-leche descremada 1% (p/v) durante 1 h a 25 °C o, eventualmente, toda la noche a 4°C. Los anticuerpos fueron generados en conejo en el Centro de Experimentaciones Biológicas y Bioterio, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNL, Argentina; acorde a lo descripto anteriormente (Vaitukaitis, 1981). Entre cada paso, la membrana fue enjuagada con 3 lavados con *buffer* PBS-Tween 20 de 5 min cada uno.

Posteriormente, la membrana se incubó con una dilución 1/1000 en PBS 1X del anticuerpo secundario (anti-IgG totales de conejo, Sigma) conjugado a peroxidasa de rábano picante (HRP) durante 1 h a 25 °C. El revelado se llevó a cabo utilizando el método de quimioluminiscencia. Posterior a la incubación con el anticuerpo secundario, se embebió la membrana con una solución de *SuperSignal West Pico* (Thermo). Una vez embebida con el sustrato, se expuso la membrana a una placa radiográfica en oscuridad, la cual captó la señal lumínica y nos permitió obtener el revelado del Western blot.

## Cuantificación del contenido proteico

Para determinar la concentración de las proteínas totales presentes en las muestras se utilizó la técnica de Bradford (Bradford, 1976), utilizando como patrón una solución de BSA (Sigma-Aldrich). Las lecturas de absorbancia se realizaron a 595 nm en un espectrofotómetro *Multiskan GO* (Thermo Scientific). Alternativamente se realizó cuantificación del contenido proteico midiendo absorbancia a 280 nm.

#### Concentración de proteínas

Para cambiar el medio de las soluciones proteicas y/o para concentrar las proteínas se emplearon dispositivos comerciales de ultrafiltración Amicon (Millipore) de MWCO apropiado para cada proteína y se procedió según las indicaciones del fabricante.

#### Extracto de proteínas de E. gracilis

Extractos totales de *E. gracilis* se prepararon resuspendiendo células en *buffer* de lisis (100 mM Tris-HCl pH 8,0; NaCl 100 mM; Urea 4 M; EDTA 1 mM; SDS 1%) e incubando las mismas a 100°C durante 10 min. A continuación, se adicionaron 10 volúmenes de acetona fría (-20°C) a todas las muestras y se incubaron durante 60 min a -20°C. Luego de centrifugar las mismas por 10 min a 15,000 × g (4°C) se descartó el sobrenadante con el cuidado de no disgregar el pellet. El precipitado se disolvió en *buffer* de siembra de SDS-PAGE reductor a 100°C por 10 min.

#### Purificación del suero policional

Para realizar una purificación del suero policional obtenido de la inmunización de animales con la proteína recombinante purificada, empleamos un método de purificación por afinidad. Este método consiste en usar un fragmento de membrana de nitrocelulosa conteniendo el antígeno para realizar una purificación de afinidad (Kurien, 2009). Brevemente, se realizó un SDS-PAGE utilizando como muestra la proteína recombinante previamente purificada. Realizamos una electrotransferencia del gel resultante a una membrana de nitrocelulosa. Identificamos la región de la membrana donde se encontraba inmovilizado el antígeno mediante coloración con Rojo Ponceau y procedimos a escindir este fragmento. Se realizó el bloqueo con una solución de leche descremada al 5% (p/v) en buffer PBS-Tween, incubándose 1 h a 25°C. Posteriormente, se incubó la membrana con una dilución 1/5 del suero durante 30 min. Se realizaron 3 lavados con buffer PBS-Tween 20 de 5 min cada uno. Se incubó la membrana en 1 mL de buffer Gly 100 mM pH 2,5 durante 5 min en agitación. Se recolectó el buffer Gly 100 mM pH 2,5 junto con anticuerpos extraídos y se mezcló con 200 µL de buffer Tris-HCl 1 M pH 8,0. Se realizaron 3 de estas extracciones buffer Gly 100 mM pH 2,5. La membrana se neutralizó con PBS-Tween 20 y se volvió a incubar en suero policional diluido 1/5, repitiendo todo el proceso tres veces. Los anticuerpos purificados se concentraron empleando dispositivos comerciales de ultrafiltración Amicon (Millipore).

# Expresión y purificación de la proteína recombinante

## Expresión de la proteína recombinante

Para la producción de proteínas recombinantes utilizamos células *E. coli* LEMO (DE3) previamente transformadas con la construcción plasmídica correspondiente. Brevemente, las células transformadas se repicaron a medio LB líquido suplementado con cloranfenicol y ampicilina, y se incubaron en agitación a 37°C hasta su saturación. El cultivo se utilizó como *starter* para inocular 4 erlenmeyers con 0,5 L de medio de cultivo LB en cada uno de ellos. El medio de cultivo inoculado se incubó a 37°C en agitador orbital a 180 rpm hasta alcanzar una DO 600 ~ 0,8, momento en el cual se agregó el inductor IPTG a una concentración final de 0,2 mM. Luego de la inducción, las células continuaron cultivándose a 18°C en agitador orbital a 180 rpm durante 48 h. Para cosechar las células, se centrifugó el cultivo a 5000 × g durante 10 min y se conservaron a -20°C hasta el inicio del procedimiento de purificación cromatográfica de la proteína.

## Purificación de la proteína recombinante

Las células almacenadas a -20°C se diluyeron en *buffer* A (imidazol 10 mM; NaCl 400 mM; 20 mM Tris-HCl pH 8,0). La suspensión celular se enfrió en un baño de hielo y se sonicó con un procesador ultrasónico de alta intensidad VibraCell<sup>TM</sup> VCX 130 (Sonics). La fracción sonicada resultante se centrifugó a 4°C y 18000 × g durante 20 min con el objeto de separar fracciones solubles e insolubles. El sobrenadante conteniendo la proteína recombinante soluble se utilizó para la correspondiente purificación.

Utilizamos una cromatografía de afinidad por metal inmovilizado (IMAC) debido a que las proteínas recombinantes contienen una etiqueta de poli-histidinas en el extremo N-terminal. El sobrenadante se sembró en una columna comercial con la resina quelante cargada con Ni<sup>2+</sup> (Hi-Trap, GE Healthcare) previamente equilibrada con *buffer* A. Una vez sembrada, la remoción de proteínas inespecíficas y la elusión de la proteína de interés se logró mediante un gradiente lineal de imidazol en un rango de 10-300 mM utilizando el denominado *buffer* B (Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, NaCl 500 mM, imidazol 300 mM). Alícuotas de las fracciones fueron evaluadas por actividad enzimática y SDS-PAGE. Las fracciones más puras/activas se reunieron, y se concentraron por ultracentrifugación.

A continuación, se realizó una cromatografía de exclusión molecular preparativa para incrementar la pureza de la muestra. En el equipo ÄKTA Explorer (GE Healthcare) se conectó una columna HiLoad 16/600 Superdex (GE Healthcare) cargada con resina Superdex G-200 (GE Healthcare). Las corridas se realizaron a 0,75 mL.min<sup>-1</sup> en *buffer* G (HEPES pH 8,0 50 mM; NaCl 100 mM; EDTA 0,1 mM). Alícuotas de las fracciones fueron evaluadas por actividad enzimática y SDS-PAGE. Las fracciones más puras/activas se reunieron, se concentraron por ultracentrifugación.

# Cromatografía de exclusión molecular

La cromatografía de exclusión molecular se utilizó con fines analíticos para la determinación de la masa molecular de las proteínas de estudio. En el equipo ÄKTA Explorer (GE Healthcare) se conectó una columna Tricorn 10/300 (GE Healthcare) cargada con resina Superdex G-200 (GE Healthcare). Las corridas se realizaron a 0,75 mL.min<sup>-1</sup> en *buffer* G (HEPES pH 8,0 50 mM; NaCl 100 mM; EDTA 0,1 mM). Se empleó para la calibración de la columna un conjunto de patrones de masa molecular conocida (GE Healthcare). Los estándares analizados incluyeron: tiroglobulina (669 kDa), ferritina (440 kDa), aldolasa (158 kDa), conalbúmina (75 kDa), ovoalbúmina (44 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa) y ribonucleasa (13,7 kDa). El volumen muerto de la columna se determinó empleando una solución de Azul de Dextrano. Las masas moleculares se determinaron por interpolación de la curva logarítmica, donde se grafica el log de la masa molecular de los marcadores comerciales vs K<sub>av</sub>. K<sub>av</sub> se obtiene a partir de la siguiente ecuación: K<sub>av</sub>= (V<sub>e</sub>-V<sub>o</sub>)/ (V<sub>c</sub>-V<sub>o</sub>); donde V<sub>e</sub> es el volumen de elusión, V<sub>o</sub> es el volumen muerto y V<sub>c</sub> es el volumen de columna.

# Metodología de análisis enzimático

Debido a que la *Egr*GH149 cataliza una reacción reversible estudiamos la actividad enzimática en ambos sentidos de reacción:

#### Reacción de fosforólisis inversa

Para caracterizar la reacción en el sentido de síntesis (fosforólisis inversa) se incubó la enzima de estudio con aceptor (10 mM) y dador (2 mM) durante 10 min a 40°C.

A continuación, se realizó la cuantificación de Pi basada en la propiedad de formar un complejo Pi-Verde de Malaquita, el cual es cuantificable a 630 nm. La formación del complejo ocurre al agregar una cantidad adecuada de una solución de Verde de Malaquita y molibdato de amonio que, además, detiene la reacción (Fusari et al., 2006).

#### Reacción de fosforólisis y arsenólisis

Para caracterizar la reacción en sentido de degradación se realizaron reacciones de fosforólisis y arsenólisis según corresponda a cada oligosacárido. En ambos casos la reacción se detuvo incubando 10 min a 100°C y luego se cuantificó la Glc liberada.

La fosforólisis se utilizó con el disacárido: se incubaron 2,5 mM de laminaribiosa junto a 12 mM de Pi.

La arsenólisis se utilizó para los oligosacáridos con mayor grado de polimerización que el disacárido: se incubaron 2,5 mM de oligosacárido junto a 12 mM de arseniato de sodio. La Glc-1-arseniato producida es altamente inestable por lo que se obtiene Glc como producto (Marechal, 1967a).

Para cuantificar la Glc libre utilizamos el kit de glicemia enzimática (Wiener). El mismo, utiliza glucosa oxidasa, peroxidasa y 4-hidroxibenzoato para formar un producto coloreado en presencia de Glc. Brevemente, 30 uL de muestra se adicionaron a 70 uL de reactivo en una placa de 384 pocillos y se incubó a 37°C por 10 min. A continuación, se midió espectrofotométricamente a 505 nm. La curva de calibrado se realizó con Glc (Sigma).

#### Determinación de parámetros cinéticos

Los parámetros cinéticos  $V_{\text{max}}$  y  $K_{\text{M}}$  (siendo este último la concentración de sustrato a la que se alcanza el 50% de la velocidad máxima,  $V_{\text{max}}$ ) fueron determinados realizando ensayos donde se hizo variar la concentración de uno de los sustratos, manteniendo el otro a concentración fija y saturante. Los datos cinéticos obtenidos se graficaron como velocidad inicial en U.mg<sup>-1</sup>, versus la concentración del sustrato variable en mM o mg.mL<sup>-1</sup>. Los parámetros cinéticos fueron calculados mediante ajuste por regresión no lineal utilizando la ecuación de Hill y el programa informático GraphPad Prism Software (GRAPH PAD Software Inc, California, USA). La constante catalítica ( $k_{\text{cat}}$ ) se calculó como resultado de la dividir  $V_{\text{max}}$  con la concentración de enzima en la reacción [E]. Los valores obtenidos implican un promedio de un mínimo de tres juegos de determinaciones independientes de los parámetros que fueran reproducibles dentro de un marco de variación de ±10%.

### Ensayo de unión a sustratos insolubles

Este ensayo se realizó incubando 10 mg.mL<sup>-1</sup> de paramilón con 160  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> de *Egr*GH149 en *buffer* HEPES pH 7,4 100 mM. La mezcla de reacción se incubó por 60 min a 50°C a 10000 × g. Como control de absorción no específica se reemplazó *Egr*GH149 con albúmina sérica bovina (BSA). El sobrenadante, donde se encuentra la proteína no unida, fue separado del polisacárido insoluble centrifugando a 6000 × g por 5 min. Se cuantificó la concentración de proteína en el sobrenadante utilizando el método de Bradford. La diferencia entre la cantidad de proteína adicionada a la mezcla de reacción y la detectada en el sobrenadante se consideró proteína unida al polisacárido (Purushotham & Podile, 2012).

### Electroforesis de afinidad

La unión de *Egr*GH149 al sustrato soluble laminarina se evaluó mediante la observación del retraso de la migración electroforética en geles de afinidad (Bragatto et al., 2010). Se prepararon geles nativos de poliacrilamida (8%), con y sin laminarina (1 mg.mL<sup>-1</sup>) adicionada previamente a la polimerización. Los geles se prepararon separadamente y se corrieron en paralelo a 4°C. La BSA se utilizó como control negativo. Las proteínas en el gel se visualizaron por tinción con *Coomassie*<sup>®</sup> *Brilliant Blue* R-250 en una solución de metanol 30% (v/v) y ácido acético 10% (v/v).

# Modelado molecular

# Modelado molecular

La búsqueda de moldes o templados acordes se realizó utilizando la herramienta de Swiss Model Workspace (Biasini et al., 2014). A partir de los resultados arrojados por el software se seleccionó la mejor opción de las diferentes opciones de cristales resueltos de proteínas homologas. Las secuencias de los templados seleccionados fueron alineados utilizando el programa HHBlits (Remmert et al., 2012) y al menos 10 diferentes modelos fueron obtenidos utilizando el software Modeller 9.15 (Webb & Sali, 2016). Especial atención fue tenida en cuenta para evitar gaps dentro de estructuras secundarias. El mejor modelo se estableció a partir del análisis del mejor puntaje global de Verify3D (Eisenberg et al., 1997), mayor puntaje de z-DOPE (Shen & Sali, 2006) y de QMEAN (Benkert et al., 2009, 2011).

Se utilizó como molde la estructura cristalina resuelta de la GH149 bacterial (código PDB, 6HQ8) que mostró homología a la *Egr*GH149 con alto porcentaje de identidad (45%) (Kuhaudomlarp, et al., 2019a).

#### Dinámica molecular de laminarisacáridos en el modelo de EgrGH149

El software *Vina-carb* se utilizó para realizar el acoplamiento de laminarisacáridos de distinto tamaño (dímero, trímero, tetrámero y hexámero) en el modelo de *Egr*GH149 descrito previamente (Nivedha et al., 2016). Se delimitaron dos regiones del mismo para hacer la simulación: el predicho como el posible sitio activo por alineamiento estructural con fosforilasas GH94 y donde se observó unión de un laminarihexaosa en la GH149 bacteriana previamente cristalizada (Kuhaudomlarp, et al., 2019a).

Las puntuaciones utilizadas para evaluar las dinámicas moleculares fueron las siguientes:

• El *Vina-chi-score*: El método de evaluación del software que considera un término de penalización energética que depende de los ángulos diédricos que

permiten la rotación de los anillos piranósicos (Trott & Olson, 2009; Nivedha et al., 2016).

• El *Size-ind-score*: Método de puntuación derivado del *Vina-chi-score* que considera el número de átomos pesados en la molécula (Nissink, 2009).

# Inmunolocalización por microscopia confocal

Células de cultivos de *E. gracilis* obtenidas por crecimiento autotrófico o heterotrófico fueron lavadas por 15 min a temperatura ambiente en PBS y fijadas con 4% (v/v) de formaldehido. Posteriormente al lavado, se permeabilizaron y bloquearon durante h en un medio que contenía PBS suplementando con 0,1% (v/v) Tween 20 y 3% (p/v) BSA.

Seguidamente las muestras fueron incubadas con el anticuerpo policional primario (dilución 1/100) y posteriormente con anticuerpo secundario marcado con fluoróforo Cy3 (dilución 1/500). Todas las incubaciones fueron realizadas a 4°C durante 6 h. Después del lavado, las muestras fueron montadas en los portaobjetos con una solución de montaje conteniendo *ProLong antifade* (Thermo). Seguidamente para la visualización de las muestras se utilizó el microscopio confocal Leica TCS SP8 ubicado en el SeCeGrIn del Centro Científico Tecnológico (CCT-Santa Fe).

# **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Las glicosil fosforilasas (EC 2.4.1) catalizan la fosforólisis de polisacáridos produciendo el correspondiente azúcar-1-fosfato y una cadena del polisacárido acortada (n-1). Esta reacción es reversible, lo que permite la producción de oligosacáridos a partir de un azúcar-1-fosfato y un azúcar libre adecuado regio y estereoespecíficamente. Las glicosilfosforilasas específicas de enlaces  $\beta$ -1,3 han sido agrupadas en la familia GH94.

En el marco de una cooperación con el grupo del Dr. Robert Field del Instituto de Biotecnología de Manchester, recibimos la construcción [pOPINf/*egrgh149*], la cual contiene un gen sintético codificante para *Egr*GH149 (Kuhaudomlarp et al., 2018). Se transformaron células competentes *E. coli* LEMO (DE3) y, posteriormente, las células transformadas se crecieron e indujeron con 0,2 mM de IPTG por 48 hs a 18°C. Adaptamos el protocolo de purificación de la *Egr*GH149 previamente reportado a las condiciones de nuestro laboratorio (Kuhaudomlarp et al., 2018). Brevemente, purificamos la proteína de interés mediante cromatografía de afinidad a metales inmovilizados (IMAC) utilizando Ni<sup>2+</sup> en la resina y un gradiente de imidazol (10-300 mM). Se colectaron las fracciones correspondientes a las calles 4 a 9 (**Figura 21A**) para generar un pool, el cual se concentró hasta llegar a una concentración de 10 mg.mL<sup>-1</sup>. Posteriormente, realizamos una cromatografía de exclusión molecular preparativa. Colectamos las fracciones correspondientes a las calles 3 a 7 (**Figura 21B**) y estas fueron concentradas y almacenadas a -80°C hasta su uso.



**Figura 21**. Purificación de *Egr*GH149 en dos pasos. (A) IMAC-Ni<sup>2+</sup>. Calle 1: Marcador de masa molecular. Calles 2-9: Elusiones de la purificación. (B) Cromatografía de exclusión molecular. Calle 1: Marcador de masa molecular. Calles 2-9: Elusiones de la purificación.
### Caracterización estructural de EgrGH149

#### Cromatografía de exclusión molecular

Con el objetivo de conocer la estructura cuaternaria de *Egr*GH149 realizamos una cromatografía de exclusión molecular analítica. Mediante esta metodología observamos un volumen de elusión correspondiente a un tamaño molecular de 252,9 kDa (**Figura 22**), a partir de lo cual se deduce una estructura cuaternaria homodimérica para *Egr*GH149, si consideramos que la masa molecular teórica del monómero es de 127,0 kDa.



Figura 22. Cromatografía de exclusión molecular de EgrGH149.

#### Modelado molecular

Realizamos el modelado tridimensional de *Egr*GH149 por homología utilizando como molde la GH149 de origen bacteriana (PDB ID: 6HQ8). Teniendo en cuenta el resultado de la cromatografía de exclusión molecular, realizamos el modelo con una conformación homodimérica. También ingresamos la secuencia de *Egr*GH149 en el servidor Alphafold 2.0, sin embargo, el software no pudo generar modelos posiblemente debido a que la longitud de la secuencia es muy grande como para que pueda ser resuelta por el algoritmo. Por este motivo, continuamos el modelado obtenido por homología en el servidor SwissModel, el cual presentó buenas puntuaciones de análisis de modelos (z-DOPE, Verify3D y QMEAN).

Las fosforilasas de la familia GH149 presentan dos dominios que no se observan en las de la familia GH94. Por alineamiento de secuencia encontramos los aminoácidos correspondientes a estos dominios y los destacamos en el modelado (**Figura 23A**). Estos se ubican con poco contacto con el resto de la proteína. El plegamiento adoptado por los monómeros de *Egr*GH149 se muestran en la **Figura 23B**.



**Figura 23**. Modelado molecular *Egr*GH149. (**A**) Modelado homodimérico, se resaltan los dominios distintivos de la familia GH149. Dominio 1 en verde y dominio 2 en naranja. (**B**) Modelado 3D. Se diferencian los monómeros (en azul y en rosado). Se muestra el espacio utilizado para describir el Sitio 1 (caja naranja) y el Sitio 2 (caja verde).

#### Dinámica molecular

Previamente, al resolver la estructura tridimensional de BcG-GH149 cristalizada con laminarihexaosa, se observó que esta se ubicaba en una región opuesta a la del posible sitio activo, el cual los autores denominaron superficie de unión a oligosacáridos. Para obtener más información de estos sitios en la fosforilasa de *E. gracilis* realizamos un estudio de dinámica molecular con el modelo obtenido en presencia de distintos sustratos. Para llevar a cabo este objetivo delimitamos dos regiones espaciales: una correspondiente a los aminoácidos que se conservan del sitio activo de las fosforilasas GH94 (denominado **Sitio 1**, caja naranja) y otro que engloba la superficie de unión a oligosacáridos (denominado **Sitio 2**, caja verde).

Se realizaron simulaciones con laminarisacáridos de distinto grado de polimerización. Los programas para realizar experimentos de *docking* han sido diseñados para simular la ubicación de moléculas pequeñas y rígidas en macromoléculas. Al incluir laminarisacáridos en nuestro análisis, es necesario adoptar un sistema de puntuaciones pensado para este tipo de moléculas debido a su flexibilidad intrínseca.

Esto se debe a la flexibilidad que otorgan los enlaces glicosídicos y las interacciones solvente-soluto específicas de carbohidratos (Agostino et al., 2009). Por este motivo, incluimos en el estudio la puntuación *Vina-chi-score*, donde "*chi*" significa "*Carbohydrate Intrinsic*"

(Intríseco de carbohidrato), y fue incluida en el software *Vina-Carb* para el *docking* de carbohidratos (Nivedha et al., 2016). Sin embargo, debido a que un incremento en el tamaño del ligando (en este caso laminarisacáridos) dificulta la unión a la macromolécula, incluimos una puntuación que normalice las penalizaciones energéticas en función del tamaño de la molécula. El *Size-ind-score* (*Size-independent*) incluye una serie de ecuaciones para realizar esta normalización (Nissink, 2009). De esta forma, un aumento del *Size-ind-score* se puede relacionar como una disminución de la afinidad.

Las puntaciones obtenidas en las simulaciones realizadas se muestran en la **Tabla 6**. En la misma se puede observar que en el sitio 1 presenta una disminución del *Size-ind-score* conforme disminuye el grado de polimerización. Por otro lado, el sitio 2 muestra un descenso en la estabilidad energética a medida que se incrementa el tamaño desde el disacárido al tetrasacárido. Sin embargo, la laminarihexaosa rompe este patrón siendo el sacárido con menor penalización normalizada en el sitio 2.

8- m - F						
		Sitio 1		Sitio 2		
	Vina-chi-score	Size-ind-score	Vir	na-chi-score	Size-ind-score	
Laminaribiosa	-7,6	-2,71		-5,4	-1,93	
Laminaritriosa	-7,4	-2,36		-5,4	-1,72	
Laminaritetraosa	-7,1	-2,09		-4,7	-1,38	
Laminarihexaosa	-7,4	-1,72		-9,3	-2,16	

**Tabla 6**. Puntuaciones obtenidas por dinámica molecular al ensayar laminarisacáridos de distinto grado de polimerización. Se compararon dos sitios del modelo obtenido de *Egr*GH149.

Estos datos sugieren una mayor afinidad para laminaribiosa, laminaritriosa y laminaritetraosa en el sitio 1 en comparación al sitio 2. Los autores que publicaron el trabajo de la estructura 3D informan que intentaron cristalizar con variedad de laminarisacáridos pero solo el hexasacárido tuvo éxito (Kuhaudomlarp, et al., 2019a). La relación de estos valores con el parámetro cinético  $K_{\rm M}$  (el más relacionado con la afinidad) de EgrGH149 para distintos laminarisacáridos se discute posteriormente.

## Caracterización funcional de EgrGH149

Previamente, un trabajo publicado por el laboratorio del Dr. Rober Field en el Instituto de Biotecnología de Manchester, describió aspectos enzimáticos de *Egr*GH149 (Kuhaudomlarp et al., 2018). En la publicación correspondiente, se presentó una caracterización cinética de *Egr*GH149 en el sentido de síntesis y estudios cualitativos en el sentido de degradación. Durante el desarrollo de esta tesis doctoral, nos propusimos extender la caracterización funcional de la enzima abarcando diferentes aspectos de la catálisis en sentido de fosforólisis inversa, determinando parámetros cinéticos en sentido de fosforólisis y realizando ensayos de unión a

sustratos. Todos estos estudios son relevantes para aportar información sobre el repertorio enzimático de *E. gracilis* y sobre la familia GH149, de la cual la bibliografía es muy incipiente debido a su reciente descubrimiento.

#### Caracterización cinética en sentido de síntesis

La reacción de fosforólisis inversa se caracterizó, en primer lugar, utilizando Glc y Glc-1-P como sustratos. De esta manera la enzima condensa dos unidades de glucosa liberando Pi al medio. El método de detección del verde de malaquita permite cuantificar el Pi escindido del azúcar-fosfato. Las curvas de saturación de Glc se realizaron fijando la concentración de Glc-1-P en 2 mM. El  $K_M$  y el  $k_{cat}$  calculados fueron de 2,5 mM y 3,6 s<sup>-1</sup>, respectivamente. La eficiencia catalítica calculada en estas condiciones fue de 1,4 s<sup>-1</sup>mM<sup>-1</sup>. Los valores reportados para esta enzima usando 20 mM de Glc-1-P fueron de 0,29 mM y de 1,66 s<sup>-1</sup>, de  $K_M$  y  $k_{cat}$ , respectivamente (Kuhaudomlarp et al., 2018). No encontramos evidencia de que una concentración tan elevada de Glc-1-P sea fisiológica en *E. gracilis* o microalgas estudiadas (A. Krishnan et al., 2015; Matsuda et al., 2011). Esto sumado a las dificultades de trabajar con 20 mM de este metabolito, decidimos continuar las mediciones de actividad empleando 2 mM de azúcar fosfato.

Con el objeto de evaluar la promiscuidad de esta enzima frente a distintos tipos monosacáridos libres, realizamos la fosforólisis inversa con 10 mM de aceptor (fructosa, glucitol, manitol y sorbitol) y 2 mM de Glc-1-P. Como se muestra en la **Tabla 7**, no fue detectada actividad enzimática con los sustratos ensayados. Utilizando 2-deoxi-glucosa como aceptor, observamos una actividad enzimática relativa a la glucosa (100 %) del 19,5%.

GIC-I-P.				
Aceptor	Actividad relativa (%)			
Glucosa	100			
2-deoxi-glucosa	19,5			
Fructosa	ND*			
Glucitol	ND ND			
Manitol				
Sorbitol	ND			
*ND: Actividad enzimática no detectada				

**Tabla 7.** Ensayo de promiscuidad de *Egr*GH149 en sentido de fosforólisis inversa frente a distintos aceptores. Las reacciones se realizaron con 10 mM de aceptor y 2 mM de Glc-1-P.

Con el fin de profundizar nuestro conocimiento sobre la cinética de *Egr*GH149, estudiamos también su capacidad para utilizar distintos azúcares-1-fosfato en presencia de Glc

como aceptor. No detectamos actividad enzimática cuando el ensayo se empleó Galactosa-1-P, Manosa-1-P, N-acetilglucosamina-1-P y β-Glucosa-1-P (**Tabla 8**).

Dador	Actividad relativa (%)			
a-Glucosa-1-P	100			
Galactosa-1-P	ND*			
Manosa-1-P	ND			
N-Acetilglucosamina-1-P	ND			
β-Glucosa-1-P	ND			
*ND: Actividad enzimática no detectada				

**Tabla 8.** Ensayo de promiscuidad de EgrGH149 en sentido de fosforólisis inversa frente a distintos dadores. Las reacciones se realizaron con 10 mM de Glc y 2 mM de dador.

La falta de actividad enzimática cuando se utiliza  $\beta$ -Glucosa-1-P como sustrato, brinda información importante sobre el mecanismo de catálisis, si tenemos en cuenta que la configuración anomérica del sustrato y el producto de la reacción. En este sentido, los mecanismos reportados para otras glicosil fosforilasa se clasifican en tres: inversión de la configuración anomérica, retención de la configuración anomérica o retención de la configuración anomérica usando desplazamiento frontal (Puchart, 2015). En este marco, nuestros resultados confirman que *Egr*GH149 puede utilizar como sustrato el azúcar-fosfato con su carbono anomérico en la configuración  $\alpha$ , y no en la configuración  $\beta$ , lo cual se ajusta a un mecanismo con inversión de la configuración anomérica.

La especificidad para utilizar un solo tipo de dador es común en otras fosforilasas (E. C. O'Neill, 2015c), propiedad que incrementa el interés en este tipo de enzimas para la síntesis de oligosacáridos específicos (Ubiparip et al., 2021).

#### Caracterización en el sentido de degradación

El primer abordaje que hicimos en la caracterización de *Egr*GH149, fue analizar las condiciones óptimas de pH y temperatura para la catálisis en el sentido de fosforólisis. De esta forma observamos actividad máxima entre 35°C y 40°C (**Figura 24A**). *Egr*GH149 mantuvo un 25% de la actividad a 60°C. Evaluamos la reacción a distintos pH utilizando diversas especies *buffer* (HEPES, Tris-HCl y acetato) que no contienen Pi en su composición. Encontramos actividad máxima empleando *buffer* HEPES pH 7,5 100 mM (**Figura 24B**). A pH 4,5 y a pH 11,0 la enzima ya no presentó actividad fosforolítica. Todos estos estudios se realizaron incluyendo laminaribiosa y Pi como sustratos.



**Figura 24**. Condiciones óptimas de reacción de degradación utilizando laminaribiosa 2,5 mM y Pi 12 mM.

Con el objetivo de estudiar el grado de polimerización de unidades de glucosa unidas por enlaces  $\beta$ -1,3 glicosídicos, utilizamos una concentración saturante de Pi (12 mM) en las condiciones previamente establecidas (40°C en *buffer* HEPES 100 mM pH 7,5) y empleamos diferentes  $\beta$ -1,3 oligosacáridos como sustrato. Observamos que, al incrementar el grado de polimerización del sustrato, se observa un significativo descenso en  $k_{cat}$  (**Tabla 9**). La eficiencia catalítica de laminaribiosa es de dos órdenes de magnitud superior al resto de los laminarisacáridos. No observamos actividad enzimática al ensayar laminarina y paramilón como sustratos.

**Tabla 9.** Efecto del grado de polimerización en los parámetros cinéticos de *Egr*GH149 en sentido de degradación. La reacción se realizó incubando 12 mM de Pi a 40°C en *buffer* HEPES 100 mM pH 7,5. La concentración de los sustratos comparados fue 10 mg.mL<sup>-1</sup> para laminarina y paramilón, y de 2,5 mM para el resto de los sustratos analizados.

	Grado de polimerización	$k_{\rm cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$K_{\rm M}$ (mg.mL <sup>-1</sup> )	$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ (mL.mg <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )	
Laminaribiosa	2	$14 \pm 2$	$1,6 \pm 0,4$	19 ± 1	
Laminaritriosa	3	$1,1 \pm 0,4$	$1,4 \pm 0,3$	$0,68 \pm 0,50$	
Laminaritetraosa	4	$0,95 \pm 0,12$	$1,6 \pm 0,4$	$0,59 \pm 0,36$	
Laminarihexaosa	6	$0,87 \pm 0,10$	$0,90\pm0,08$	$0,97 \pm 0,09$	
Laminarina	25-35	ND*			
Paramilón	~3000	ND			
*ND: Actividad enzimática no detectada					

Resumiendo, *Egr*GH149 presentó mayor actividad enzimática con laminaribiosa y el aumento del grado de polimerización disminuyó la velocidad de reacción, sin observar actividad catalítica con laminarina y paramilón. Este patrón catalítico se asemeja al observado para una

enzima purificada parcialmente de fuente, que en 1967 Marechal denominó laminaribiosa fosforilasa (Marechal, 1967b). Observamos, sin embargo, en nuestras mediciones un número de recambio un orden de magnitud mayor para la reacción en sentido de degradación contra lo observado en fosforólisis inversa.

Al comparar esta caracterización cinética con los experimentos de *docking* (**Tabla 6**), podemos observar que el sitio 1 presenta un patrón similar al presentado por  $K_{\rm M}$ : una mayor afinidad por el disacárido, disminuyendo la misma a medida que se incrementa el grado de polimerización. En línea con la hipótesis de que el sitio 1 es el responsable de la catálisis.

#### Ensayos de unión

En paralelo a los ensayos de actividad enzimática, evaluamos la capacidad de *Egr*GH149 de unirse a laminarina y paramilón. Teniendo en cuenta que esta enzima presenta una superficie de unión a oligosacáridos al margen del sitio activo y dos dominios de función desconocida consideramos relevante estudiar esta propiedad. Para llevar a cabo este objetivo, implementamos dos diseños experimentales que contemplen las propiedades de cada uno de los polisacáridos.

Para el caso del paramilón, incubamos el mismo con la enzima en agitación. Centrifugamos la muestra y cuantificamos proteínas en sobrenadante. Por diferencia con la concentración incial obtenemos información de cuanta enzima se encuentra unida. Este tipo de ensayos es ampliamente utilizado para el estudio de unión de enzimas a sustratos insolubles (Vaikuntapu et al., 2016). De esta manera, pudimos observar que la mayoría de *Egr*GH149 se mantiene en solución en proporciones similares a BSA, incluida como control negativo (**Figura 25A**).

La solubilidad de la laminarina implica la necesidad de otro tipo de experimento. Por esta razón, evaluamos el retardo en la migración electroforética de *Egr*GH149 en geles nativos con laminarina disuelta. Este tipo de experimentos se fundamentan en la hipótesis de que la migración de la proteína se ralentizará si ésta se une al sustrato disuelto (Mystkowska et al., 2018). Comparamos un gel sin laminarina (**Figura 25B**) y otro con laminarina 1% (p/v) (**Figura 25C**). Seleccionamos ferritina como control negativo ya que no posee relación con  $\beta$ -glucanos y presenta una migración similar en las condiciones ensayadas. Los resultados de este ensayo no muestran diferencias significativas en la migración electroforética de *Egr*GH149 por lo que, al igual de lo que ocurrió con paramilón, *Egr*GH149 no se une al oligosacárido.



**Figura 25**. Ensayos de unión de *Egr*GH149. (**A**) Unión sobre sustratos insolubles. Se cuantifica la proteína en solución (sin unir). Los sustratos utilizados fueron BSA (control negativo) y paramilón. (**B**) PAGE nativo (laminarina 0 %). **Calle 1**: *Egr*GH149 purificada (8 µg). **Calle 2**: Ferritina purificada (8 µg). (**C**) PAGE nativo (laminarina 1 %). **Calle 1**: *Egr*GH149 purificada (8 µg). **Calle 2**: Ferritina purificada (8 µg).

No encontramos evidencia de capacidad de *Egr*GH149 de unirse a laminarina o paramilón. Estos resultados se encuentran en consonancia con lo observado en la caracterización cinética. Si bien existen reportes de celobiosa fosforilasa y celodextrina fosforilasa con capacidad de unión a celulosa amorfa (insoluble) estas se encuentran fusionadas a CBM, al remover estos dominios esta capacidad disminuye considerablemente (Ye et al., 2011; Devendran et al., 2016; Storani et al., 2023).

*Egr*GH149 estaría utilizando sustratos con menor grado de polimerización, por lo que probablemente requiere de la actividad previa de otras endo- $\beta$ -1,3-glucanasas y exo- $\beta$ -1,3. Probablemente requiere de la actividad previa de otras endo- $\beta$ -1,3-glucanasas y exo- $\beta$ -1,3-glucanasas para generar a partir de paramilón oligosacáridos con menor grado de polimerización. Más estudios tienen que realizarse para clarificar las propiedades y funciones de esta superficie.

### Caracterización de las enzimas mutagenizadas

Para identificar los aminoácidos de mayor relevancia en la catálisis enzimática, comparamos el sitio 1 en *Egr*GH149 con las secuencias proteicas de dos fosforilasas de la familia GH94 (laminaribiosa fosforilasa de *Paenibacillus sp.* y celobiosa fosforilasa de *Cellvibrio gilvus*) (Hidaka et al., 2006; Kuhaudomlarp, et al., 2019b). Si bien la identidad de secuencia es baja (~20%), los aminoácidos responsables de la actividad catalítica se encuentran conservados. Realizamos la mutagénesis sitio dirigida por el método *quick change* de 2 residuos que podrían formar parte del sitio activo y un tercero que podría formar parte de la unión a la Glc-1-P. Se empleó la técnica de secuenciación para corroborar la presencia de las mutaciones diseñadas y la ausencia de modificaciones no esperadas. Las tres proteínas se produjeron y purificaron utilizando

el mismo protocolo que para la proteína salvaje. Mediante cromatografía de exclusión molecular corroboramos que las mutaciones no afectaron la estructura cuaternaria homodimérica.

Las mutantes fueron caracterizadas en sus propiedades cinéticas en ambos sentidos de reacción. La reacción de fosforólisis (degradación) se realizó utilizando laminaribiosa y Pi como sustratos, cuantificando Glc liberada por el método de glicemia enzimática (*Wiener*). La caracterización de la fosforólisis inversa (síntesis) se realizó con el método de verde de malaquita en presencia de Glc y Glc-1-P (Fusari et al., 2006).

Al caracterizar las mutantes obtenidas observamos una disminución significativa de la  $k_{cat}$ en D474A y D656A. Debido a que el límite de detección del verde de malaquita es menor al observado en la cuantificación de Glc pudimos caracterizar D474A solamente en sentido de síntesis. Para el caso de R473H no detectamos actividad enzimática en las condiciones ensayadas (**Tabla 10**). De esta manera, pudimos evidenciar por primera vez en la familia GH149 los residuos aminoacídicos con un rol relevante en la catálisis enzimática.

	Fosforólisis			Fosforólisis inversa			
	$k_{\text{cat}}$ (s <sup>-1</sup> )	$\frac{K_{\rm M}}{(\rm mg.mL^{-1})}$	$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ (mL.mg <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )	$k_{\text{cat}}$ (s <sup>-1</sup> )	$\frac{K_{\rm M}}{(\rm mg.mL^{-1})}$	$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ (mL.mg <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )	
EgrGH149	$14 \pm 2$	$1,6 \pm 0,4$	19 ± 1	$6,52 \pm 0,3$	$5,6\pm0,5$	$1,1 \pm 0,1$	
<i>Egr</i> GH149R473H	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
<i>Egr</i> GH149D474A	ND	ND	ND	$7,2 \times 10^{-5}$	$8,4 \pm 0,8$	$8,56 \times 10^{-6} \pm 0,2$	
EgrGH149D656A	$0.64 \times 10^{-3}$ ± 10 <sup>-4</sup>	$0,71 \pm 0,05$	$9,01 \times 10^{-3} \pm 0,2$	$8,6 \times 10^{-4} \pm 9 \times 10^{-5}$	$3,8 \pm 0,4$	$2,26 \times 10^{-4} \pm 0,3$	

Tabla 10. Caracterización cinética de mutantes de EgrGH149 en el sitio activo.

# Silenciamiento e inmunolocalización subcelular de *Egr*GH149 en *E. gracilis*

#### Silenciamiento de EgrGH149

Con el objeto de comprender más con relación a la importancia de *Egr*GH149 en el metabolismo del carbono en *E. gracilis*, se realizó el silenciamiento del transcripto codificante para esta enzima mediante ARNi, de manera de disminuir la cantidad de enzima circundante. Para realizar esta técnica de ARNi, la cual ha sido previamente utilizada con éxito para silenciar diferentes proteínas/enzimas en *E. gracilis* (Iseki et al., 2002; Ntefidou et al., 2003; Ishikawa et al., 2010; Daiker et al., 2011; Nakazawa et al., 2015; Ogawa et al., 2015; Kato et al., 2017; Tanaka et al., 2017; Nasir et al., 2018; Muchut et al., 2021), fue necesario obtener de fuente la secuencia codificante de la enzima en estudio dado que la construcción plasmídica recibida

contaba con la secuencia de *Egr*GH149 con el uso de codones optimizado para la expresión recombinante en *E. coli*.

Brevemente, en la técnica de silenciamiento por ARNi, el ARNdc (generado *in vitro*) ingresa al interior celular y es tomado por la maquinaria propia de la célula produciendo el procesamiento necesario para generar el silenciamiento del ARNm blanco (O'Neill et al., 2015b). Cabe destacar que este mecanismo de silenciamiento tiene ventajas en cuanto a su facilidad, ya que no es necesario establecer líneas de cultivos silenciadas. Sin embargo, el silenciamiento en muchas ocasiones es temporal, siendo esta ventana de aproximadamente 30 días.

Realizamos el silenciamiento en células crecidas en condiciones de cultivo autotrófica y heterotrófica. Para evaluar el efecto de la electroporación del ARNdc sobre la viabilidad celular realizamos la comparación con células del mismo cultivo de origen electroporadas en ausencia de ARNdc cultivadas en las mismas condiciones. Realizamos ensayos observacionales cosechando células a distintos tiempos post-electroporación para evaluar la efectividad del silenciamiento y conocer la evolución de la expresión de la enzima en el tiempo. En primer lugar, utilizamos un fragmento de ARNdc codificante para EgrGH149 de ~400 pb, pero al analizar la presencia del transcripto de interés por RT-PCR no observamos silenciamiento. Por esta razón, decidimos incluir un segundo fragmento de ARNdc en la cuba de electroporación con el objetivo de incrementar la unión al ARNm blanco. Evaluamos la evolución del *knockdown* realizado con dos fragmentos de ARNdc por RT-PCR (**Figura 26**). Observamos disminución casi completa del mensajero a los 6 días. Sin embargo, el transcripto recuperó el nivel observado antes de la electroporación en la siguiente toma de muestra.



**Figura 26**. Evolución del silenciamiento por ARNi. Gel de agarosa de productos de PCR. Se empleó ADNc del cultivo heterotrófico como molde y oligonucleótidos específicos para amplificar el transcripto codificante para *Egr*GH149 (**panel superior**) y actina (**panel inferior**). Se tomaron muestras en el día de la electroporación (**Calle 1**), y de los días 6 (**Calle 2**), 12 (**Calle 3**), 18 (**Calle 4**) y 40 (**Calle 5**) posteriores a la electroporación.

También realizamos un seguimiento del experimento evaluando la presencia de proteína mediante *western blotting*, y la actividad fosforilasa en las fracciones solubles de los extractos solubles. En línea con lo observado en la RT-PCR, la banda con migración similar a la proteína

recombinante desaparece en el día 6 y vuelve a registrarse nítidamente en la siguiente toma de muestra en ambos cultivos, manteniendo la misma intensidad hasta la finalización del experimento (**Figura 27 A y B**). Se observa una banda de menor tamaño que podría tratarse de otra fosforilasa de menor tamaño (predicción de 110 kDa) que conserva un 40% identidad y por eso podría ser reconocida por el suero anti-*Egr*GH149. Distintos transcriptos codificantes para esta fosforilasa se encontraron en cultivos de *E. gracilis* autotróficos (O'Neill et al., 2015a). Si bien observamos ambas señales en ambas condiciones la proporción es diferente: en condiciones heterotróficas la banda de menor migración (*Egr*GH149) se observa con mayor intensidad en comparación a la de menor tamaño. En condiciones autotróficas la proporción de ambas señales es similar.

Cuantificamos la actividad fosforilasa en distintos puntos del experimento de silenciamiento normalizando por contenido proteico. Al medir la actividad en las células electroporadas sin el ARNdc, observamos patrones diferenciales para cada condición de cultivo. Las células de *E. gracilis* cultivadas en condiciones autotróficas evidencia aumento progresivo de la actividad fosforilasa hasta el día 18 y una disminución en la siguiente muestra. El día 18 se encuentra en crecimiento exponencial, mientras que el día 40 se corresponde con la fase estacionaria en este tipo de cultivos (**Figura 27C**). Sin embargo, el perfil de actividad enzimática en condiciones heterotróficas se mantiene sin modificaciones a lo largo del experimento de silenciamiento (**Figura 27D**). En las condiciones analizadas, las células electroporadas con el ARNdc no evidenciaron modificar significativamente la actividad forforilasa como se observa en las **Figuras 27 C** y **D**. Esto indicaría que la disminución de enzima observada por *western blotting* no es suficiente para alterar la actividad enzimática.



**Figura 27**. Ensayos de silenciamiento de *Egr*GH149 en *E. gracilis*. Análisis por western-blot de extractos totales de células crecidas en condiciones autotróficas ( $\mathbf{A}$ ) y heterotróficas ( $\mathbf{B}$ ). Medición de actividad fosforilasa en fracción soluble de células crecidas en condiciones autotróficas ( $\mathbf{C}$ ) y heterotróficas ( $\mathbf{D}$ ).

La ventana de silenciamiento observada contrasta con lo reportado por otros autores y la experiencia de nuestro grupo de trabajo, ya que esta suele durar aproxidamente 30 días. Este hecho dificultó el diseño experimental y el fenotipado de este ensayo. Sorpresivamente, se publicó un trabajo de investigación reciente centrado en estudios de silenciamiento de transcriptos codificantes para fosforilasas en E. gracilis (Tanaka et al., 2022b). Esta publicación nos obligó a redireccionar nuestros estudios para mantener la novedad en el tema de trabajo, por lo que no continuamos con los ensayos de silenciamiento. Sin embargo, esta publicación nos aportó información valiosa para comprender nuestros resultados. Para estudiar la acción fosforilasa involucran el transcripto codificante para EgrGH149 y otros dos de menor tamaño que denominaron "laminaridextrina fosforilasa", las cuales se podrían tratar de las "oligo-glucan fosforilasas" reportadas en trabajos de purificación a partir de fuente (Marechal, 1967b). El diseño experimental adoptado por Tanaka et al., incluye 5 días de crecimiento en condiciones heterotróficas y un día en de anaerobiosis. Evaluaron el silenciamiento solamente por RT-PCR, sin controlar la presencia de proteína. Mediante ensayos de determinación de actividad fosforilasa en extractos del contenido de paramilón y de la concentración de miristil-miristato mostraron que para observar efecto en estos tres apartados es necesario silenciar, al menos, dos fosforilasas: la EgrGH149 y una laminaridextrina fosforilasa. Esto podría indicar que estas enzimas actúan en forma sinérgica en la regulación del metabolismo del paramilón. La corta ventana de silenciamiento observada tanto por nuestro grupo de trabajo como por el de Tanaka et al., podría estar relacionada con una mayor síntesis de ARNm codificante para este tipo de enzimas, acortando el efecto del ARNdc. Sin embargo, mayor cantidad de estudios son necesarios para lograr una mayor comprensión en la función de las fosforilasas en el metabolismo del paramilón, como por ejemplo continuar con trabajos tendientes a obtener las dos entidades enzimáticas y caracterizar productos de la degradación del paramilón u otro  $\beta$ -glucano de elección.

#### Microscopía confocal de la *Egr*GH149

Con el objetivo de tener información sobre la ubicación intracelular de la *Egr*GH149 realizamos microscopía confocal utilizando células de *E. gracilis* cultivadas en condiciones autotróficas y heterotróficas. En ambas condiciones de cultivo observamos señal de reconocimiento en el citosol como se observa en la **Figura 28**. Esta señal no se distribuye de manera homogénea en el citosol, sino formando agrupaciones en los intersticios entre organelas y gránulos de paramilón.



**Figura 28**. Proyección máxima de imágenes de microscopía confocal. Se utilizaron células de *E. gracilis* crecidas en condiciones autotróficas y heterotróficas. Ambas muestras fueron tratadas con anticuerpos primarios contra *Egr*GH149 y anticuerpos secundarios conjugados a Cy3 ( $\alpha$ -*Egr*GH149, rojo). Fluorescencia de clorofila (Clorofila, rojo). Luz transmitida (Vis, gris).

En línea con estos resultados, los estudios de secuencia utilizando los predictores SignalP 6.0 (Teufel et al., 2022) y Phobius (Kall et al., 2007) no encontraron péptidos señales en la secuencia de la *Egr*GH149, y DeepLoc2.0 predijo ubicación citoplasmática de la misma (Thumuluri et al., 2022).

La actividad de la *Egr*GH149 sobre laminarisacáridos de bajo grado de polimerización, sin observar actividad sobre paramilón, se encuentra en línea con la hipótesis de que esta enzima se encuentra en zonas cercanas al paramilón, sin necesidad de estar unida al mismo, y que utilizaría como sustratos los productos de hidrólisis del paramilón con otras endo y exoglucanasas.

# <u>Capítulo 3:</u> Caracterización estructural y funcional de la GH64 de *E. gracilis*

## **INTRODUCCIÓN**

## Actividad β-1,3-endoglucanasa en *E. gracilis*

En E. gracilis, el paramilón se degrada en la medida que exista un requerimiento energético. La actividad laminarinasa se reportó por primera vez en este organismo en 1960. A un pH 5,0 esta actividad fue máxima, aunque no se logró diferenciar si la aparición de extremos reductores se debía a una actividad del tipo endo o exo (Fellig, 1960). El paramilón se degrada parcialmente durante la noche en cultivos autotróficos, ayudando a suplir la necesidad energética cuando hay ausencia de luz (Cook, 1966). Un análisis de los extractos crudos de E. gracilis permitió mostrar que este organismo tiene enzimas con actividad exo y endo-β-1,3-glucanasas capaces de degradar clases de  $\beta$ -1,3-glucanos. El producto final de la hidrólisis (tal vez el más importante fisiológica y biotecnológicamente), fue Glc, mostrando una predominancia de la actividad exo-β-1,3-glucanasa (Barras & Stone, 1969a). Al centrifugar estos extractos, se observó un aumento de la actividad endo-β-1,3-glucanasa en la fracción insoluble, sugiriendo una vinculación de estas enzimas al paramilón o a las membranas asociadas al mismo (Barras & Stone, 1969a). Adicionando pasos de purificación que incluyeron inactivación por pH y temperatura, y cromatografía de intercambio iónico, fue posible purificar dos componentes con actividad exo-β-1,3-glucanasas. La caracterización de uno de ellos develó un pH óptimo en el rango 4,7-5,2 para la degradación de laminarina y paramilón químicamente solubilizado (Barras & Stone, 1969b).

Se mencionó anteriormente, en un trabajo de transcriptómica, en el cual se analizó la respuesta de *E. gracilis* a las condiciones de crecimiento anaeróbico, develó un total 7 transcriptos codificantes para glucanasas: dos de ellos de exo- $\beta$ -1,3-glucanasas (dos GH1) y cinco endo- $\beta$ -1,3-glucanasas (dos GH17 y tres GH81) (Yoshida et al., 2016). Otro trabajo de transcriptómica realizado en dos condiciones, autotrófica y heterotrófica, reportó una diversidad mayor de transcriptos de  $\beta$ -1,3-glucanasas codificantes para más familias de glicosil hidrolasas. Dentro de las exo- $\beta$ -1,3-glucanasas se encuentran GH1, GH2, GH3, GH5, GH30 y GH55; mientras que de las endo- $\beta$ -1,3-glucanasas los autores reportan GH17, GH64 y GH81 (O'Neill et al., 2015a). En este sentido, secuencias de aminoácidos correspondientes a proteínas de estas tres últimas familias se identificaron por proteómica de proteínas unidas al gránulo de paramilón (Gissibl, et al., 2019b). Recientemente, el silenciamiento simultaneo de un transcripto GH17 y dos GH81

mostraron una disminución significativa, pero no total, en la degradación del paramilón en condiciones de hipoxia (Tanaka et al., 2022a). Hasta el momento, solamente una endo-β-1,3-glucanasa ha sido producida de forma recombinante y posteriormente caracterizada. Este es el caso de una GH17 producida en *Aspergillus oryzae* con actividad máxima usando laminarina como sustrato. Cabe destacar que los autores intentaron producir en forma recombinante dos GH81 sin éxito ensayando diversos sistemas de expresión en *E. coli, Brevibacillus choshinensis, A. oryzae* y *Nicotiana benthamiana* (Takeda et al., 2015). En este sentido, la ausencia de trabajos de caracterización de la familia GH64 en *E. gracilis* nos movilizaron a enfocarnos en el estudio de esta posible enzima.

Durante el transcurso de mis estudios de doctorado, encontramos una metodología para producir recombinantemente la GH64 de *E. gracilis (Egr*GH64). Esto nos habilitó a realizar diversos estudios funcionales y estructurales, que nos ayudaron a recolectar información sobre su actividad enzimática, modo de acción y plegamiento. Comparamos la abundancia proteica de *Egr*GH64 en extractos totales de *E. gracilis* crecidas en distintas condiciones de cultivo. Teniendo en cuenta los resultados *in vitro* obtenidos, decidimos estudiar la acción antifúngica de la enzima evaluando la influencia de *Egr*GH64 en la viabilidad de una levadura.

## **OBJETIVOS**

- Realizar un estudio bioinformático del transcripto codificante para EgrGH64.
- Diseñar un gen para su síntesis *de novo* que permita la expresión del gen *egrgh64* de forma recombinante.
- Expresar en forma soluble y activa la proteína de interés.
- Determinar la estructura cuaternaria de *Egr*GH64 y realizar un modelado molecular del polipéptido.
- Estudiar la influencia del pH, la temperatura y la presencia de diversos cationes en la actividad enzimática. Evaluar la termoestabilidad de la enzima.
- Caracterizar cinéticamente a *Egr*GH64 comparando distintos sustratos.
- Evaluar los productos de hidrolisis de la enzima.
- Estudiar la acción antifúngica de *Egr*GH64.
- Realizar una inmunodetección de *Egr*GH64 en células de *E. gracilis* comparando distintas condiciones de cultivo.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

## Reactivos químicos y materiales

Todos los reactivos utilizados fueron de la máxima calidad disponible, de grado "proanálisis" o similar. Los materiales y reactivos químicos empleados en este trabajo se obtuvieron comercialmente de las siguientes compañías:

- Componentes de medios de cultivos: Britania, Cicarelli, Anhedra.
- Reactivos de biología molecular: Promega, Invitrogen, Fermentas, Novagen, Genbiotech, New England BioLabs.

• Materiales utilizados en la purificación de proteínas y otros reactivos relacionados a proteínas: GE Healthcare.

- Filtros y columnas de desalado: Millipore, Bio-Rad.
- Reactivos químicos: Sigma-Aldrich, Merck, Genbiotech.
- Oligonucleótidos sintéticos: GBT Genbiotech
- Gen sintético: Bio Basic Inc.

## Microorganismos, plásmidos, medios de cultivo y antibióticos

#### Cepas procariotas

Para el clonado de los diferentes genes y la expresión recombinante de las distintas proteínas caracterizadas en este trabajo de tesis, se emplearon las cepas de *E. coli* y los plásmidos que se disponen en nuestro grupo de trabajo, según lo detallado a continuación.

• Escherichia coli **Top10** F':  $[lacI^q Tn10(Tet^R)]$  mcrA (mrr-hsdRMS-mcrBC)  $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ lacX74 recA1 deoR araD139  $\Delta$ (ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG. Esta cepa fue empleada durante las etapas de biología molecular para generar las distintas construcciones génicas.

• *Escherichia coli* **BL21 (DE3)**: F<sup>-</sup> *ompT hsdS* (r<sup>-</sup> m<sup>-</sup>) *gal dcm* (DE3). Se empleó para la expresión recombinante.

#### Microalgas

*Euglena gracilis* UTEX 753 proveniente del Centro de Cultivo Algal de la Universidad de Texas (USA).

### <u>Plásmidos</u>

• Vector **pET28(c+)** (Novagen), vector inducible por IPTG que permite incorporar una etiqueta de poli-histidinas (His-x6) en el extremo N-terminal de la proteína para facilitar su posterior purificación. Posee marcador de selección que confiere resistencia a kanamicina. Inducible por IPTG.

### Medios de cultivo

#### Bacterias:

- Lysogeny Broth (LB): extracto de levadura 5 g.L<sup>-1</sup>; tripteína bacteriológica 10 g.L<sup>-1</sup> y NaCl 10 g.L<sup>-1</sup>.
- LB-agar: Medio LB suplementado con agar-agar 1,6% (p/v).
- Terrific broth medium (TB): extracto de levadura 24 g.L<sup>-1</sup>; tripteina 12 g.L<sup>-1</sup>; glicerol 5 g.L<sup>-1</sup>; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 12,5 g.L<sup>-1</sup> y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,3 g.L<sup>-1</sup>.
   Microalgas:
- Medio Cramer y Myers (CyM) (Cramer & Myers, 1952). Componentes detallados en Tabla 2.

### Antibióticos

- Kanamicina: Concentración final 50 µg.mL<sup>-1</sup>.
- Ampicilina: Concentración final 100 µg.mL<sup>-1</sup>

## Metodología utilizada en biología molecular

Las técnicas estándares de microbiología y biología molecular fueron realizadas, fundamentalmente, según los protocolos ya establecidos (Sambrook & Russell, 2001).

## Digestión de ADN con enzimas de restricción

Para realizar el subclonado de los genes, los mismos se liberaron a partir del vector de clonado con las enzimas de restricción que permitirán su incorporación de manera adecuada en el vector de expresión seleccionado, previamente digerido con las mismas enzimas de restricción. Además, el análisis de restricción es útil para confirmar la presencia del gen de interés en el vector en estudio. Las reacciones de digestión comúnmente contenían: 1 a 2  $\mu$ g de ADN plasmídico, el *buffer* de reacción correspondiente que provee el fabricante y de 10 a 20 U de la enzima de restricción. Esta mezcla se incubó durante 3 h a 37°C. Las digestiones se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa.

#### Ligación de fragmentos de ADN

Para ligar el gen de interés y el vector de expresión correspondiente, ambos digeridos con las mismas enzimas de restricción, se utilizó la enzima T4 ADN ligasa (Promega). La mezcla de reacción contenía típicamente una relación molar 3:1 de inserto:vector. Posteriormente, se agregó a ese mismo tubo una cantidad adecuada de *buffer* de reacción 10 X que provee el fabricante y 2 U de T4 ADN ligasa.

La mezcla final se incubó durante 16 h a 8°C. Para obtener los clones de expresión, con la mezcla de ligación se transformaron células competentes de *E. coli* Top10 F<sup>'</sup>, se seleccionaron los clones que poseían el inserto por análisis de restricción y con los clones seleccionados se transformaron las células de *E. coli* escogidas para la expresión de la proteína recombinante.

#### Purificación de ADN a partir de gel de agarosa

Para purificar fragmentos de ADN a partir del gel de agarosa se utilizó el sistema *Easy Pure Gel Extraction Kit* (TRANS), siguiendo el protocolo especificado en el fabricante.

#### Transformación de bacterias competentes

Para permitir la incorporación de ADN plasmídico exógeno, las células de E. coli se hicieron competentes utilizando el método de CaCl<sub>2</sub> (Aich et al., 2012). Los pasos seguidos se indican a continuación. Un cultivo crecido durante toda la noche en medio LB se diluyó 1/50 en medio de cultivo fresco y se creció a 37°C hasta una DO600~0,4; se tomaron alícuotas de 1 mL en tubos eppendorf de 1,5 mL, se centrifugaron a 5000  $\times g$  por 5 min y las células se suspendieron en 500 µL de solución ST1 [10 mM MOPS-NaOH pH 7,0; 10 mM KCl]. Se volvió a centrifugar a 5000  $\times g$  por 5 min, para luego resuspender las células en 500  $\mu$ L de solución ST2 [100 mM MOPS-NaOH pH 6,5; 10 mM KCl; 100 mM CaCl<sub>2</sub>] e incubarlas durante 15 min en hielo. Las células se centrifugaron nuevamente a 5000  $\times g$  por 5 min y se suspendieron en 100  $\mu$ L de ST2. A las células competentes se les agregaron entre 2-5  $\mu$ L de plásmido o de mezcla de ligación y se incubaron en hielo durante 60 min. Se realizó un choque térmico a 42°C durante 40 s y luego se recuperaron las células adicionando 1 mL de medio LB e incubando durante 60 min a 37°C. Por último, las células se volvieron a centrifugar a 5000  $\times$  g durante 5 min, se suspendieron en los 100 µL remanentes y se sembraron en placas de LB-agar suplementado con el/los antibióticos correspondientes para permitir la selección de las células transformadas. Las placas se incubaron toda la noche a 37°C y se seleccionaron clones para continuar con el análisis.

#### Minipreparación de ADN plasmídico

Para la extracción de ADN plasmídico a partir de células transformadas de *E. coli*, los clones de interés se repicaron en 4 mL de medio LB líquido suplementado con el antibiótico

correspondiente y se cultivaron toda la noche a 37°C. Las células se cosecharon por centrifugación a 3000  $\times g$  durante 10 min y se extrajo el ADN plasmídico utilizando el sistema comercial *Easy Pure Plasmid MiniPrep Kit* (TransGen Biotech Co), siguiendo el protocolo establecido en el mismo. La obtención del plásmido se corroboró por electroforesis en gel de agarosa.

## Métodos fisicoquímicos básicos

#### Electroforesis en gel de agarosa

Las electroforesis de fragmentos de ADN fueron resueltas por electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) en solución TAE 1X (40 mM Tris-HCl pH 8,0; 40 mM ácido acético; 1 mM EDTA) con la adición de Gel Green a una concentración final de 0,3  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>. Las muestras se acondicionaron antes de su corrida con glicerol 3% (v/v) y Azul de Bromofenol 0,05% (p/v). Se utilizó el sistema Mini-Sub<sup>®</sup>Cell GT (Bio-Rad) para la corrida propiamente dicha. Los fragmentos se visualizaron en un transiluminador UltraSlim Led illuminator 470 nm (MaestroGen).

#### Electroforesis en gel de poliacrilamida

La electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes como se ha descripto previamente (Laemmli 1970). La concentración de acrilamida del gel de apilamiento fue de 4%, mientras que la concentración del gel de separación fue de 10-15%. Las muestras fueron desnaturalizadas antes de su siembra mediante el agregado de buffer de siembra SDS-PAGE 4X (SDS 1% (p/v), 2-mercaptoetanol 100 mM, en Tris-HCl 50 mM pH 6,8) y su posterior calentamiento a 100°C durante 5 min. Una vez sembradas las muestras, la corrida electroforética se realizó aplicando una corriente de intensidad constante de 25 mA por cada placa, en *buffer* de corrida [Tris-base 0,3% (p/v), Gly 1,44% (p/v), SDS 0,1% (p/v)], empleando un equipo Mini Protean II (Bio-Rad). Finalizada la corrida electroforética, las proteínas en el gel se visualizaron por tinción con Coomassie® Brilliant Blue R-250 en una solución de metanol 30% (v/v) y ácido acético 10% (v/v); y su posterior decoloración en una solución de metanol 5% (v/v)y ácido acético 7,5% (v/v). También se utilizó SDS-PAGE en condiciones no reductoras, utilizando el mismo procedimiento descripto con la omisión del agente reductor en el buffer de siembra. En el caso de PAGE en condiciones nativas se omitió la adición de SDS tanto en el buffer de siembra como en los geles de poliacrilamida. En este caso la concentración de monómero utilizado fue de 7% p/v y se utilizó tinción con Coomassie® Brilliant Blue R-250 para la visualización de las proteínas en el gel (Arndt et al., 2012).

83

#### Electrotransferencia seguida de inmunodetección

Finalizada la separación electroforética, se efectuó la electrotransferencia sobre una membrana de nitrocelulosa (GE Healthcare) durante 35 min a 200 mA en un equipo semi-seco (Analytik Jena). La solución empleada contenía Tris-base 25 mM, Gly 192 mM y etanol 20% (v/v). La membrana de nitrocelulosa transferida se bloqueó con una solución de leche descremada al 5% (p/v) en *buffer* PBS-Tween (8 g.L<sup>-1</sup> NaCl, 0.2 g.L<sup>-1</sup> KCl, 1.44 g.L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.24 g.L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4, 0,05% v/v Tween 20), incubándose 1 h a 25°C. Luego, la membrana se incubó con el anticuerpo primario en solución PBS-leche descremada 1% (p/v) durante 1 h a 25 °C o, eventualmente, toda la noche a 4°C. Los anticuerpos fueron generados en conejo en el Centro de Experimentaciones Biológicas y Bioterio, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNL, Argentina; acorde a lo descripto anteriormente (Vaitukaitis, 1981). Entre cada paso, la membrana fue enjuagada con 3 lavados con *buffer* PBS-Tween 20 de 5 min cada uno.

Posteriormente, la membrana se incubó con una dilución 1/1000 en PBS 1X del anticuerpo secundario (anti-IgG totales de conejo, Sigma) conjugado a HRP durante 1 h a 25 °C. El revelado se llevó a cabo utilizando el método de quimioluminiscencia. Posterior a la incubación con el anticuerpo secundario, se embebió la membrana con una solución de *SuperSignal West Pico* (Thermo). Una vez embebida con el sustrato, se expuso la membrana a una placa radiográfica en oscuridad, la cual captó la señal lumínica y nos permitió obtener el revelado del western-blot.

#### Cuantificación del contenido proteico

Para determinar la concentración de las proteínas totales presentes en las muestras se utilizó la técnica de Bradford (Bradford, 1976), utilizando como patrón una solución de BSA (Sigma-Aldrich). Las lecturas de absorbancia se realizaron a 595 nm en un espectrofotómetro *Multiskan GO* (Thermo Scientific). Alternativamente se realizó cuantificación del contenido proteico midiendo absorbancia a 280 nm.

#### Concentración de proteínas

Para cambiar el medio de las soluciones proteicas y/o para concentrar las proteínas se emplearon dispositivos comerciales de ultrafiltración Amicon (Millipore) de MWCO apropiado para cada proteína y se procedió según las indicaciones del fabricante.

#### Extracto de proteínas de E. gracilis

Extractos totales de *E. gracilis* se prepararon resuspendiendo células en *buffer* de lisis (100 mM Tris-HCl pH 8,0; NaCl 100 mM; Urea 4 M; EDTA 1 mM; SDS 1%) e incubando las mismas a 100°C durante 10 min. A continuación, se adicionaron 10 volúmenes de acetona fría (-20°C) a todas las muestras y se incubaron durante 60 min a -20°C. Luego de centrifugar las

mismas por 10 min a 15,000 × g (4°C) se descartó el sobrenadante con el cuidado de no disgregar el pellet. El precipitado se disolvió en *buffer* de siembra de SDS-PAGE reductor a 100°C por 10 min.

#### Purificación del suero policional

Para realizar una purificación del suero policional obtenido de la inmunización de animales con la proteína recombinante purificada, empleamos un método de purificación por afinidad. Este método consiste en usar un fragmento de membrana de nitrocelulosa conteniendo el antígeno para realizar una purificación de afinidad (Kurien, 2009). Brevemente, se realizó un SDS-PAGE utilizando como muestra la proteína recombinante previamente purificada. Realizamos una electrotransferencia del gel resultante a una membrana de nitrocelulosa. Identificamos la región de la membrana donde se encontraba inmovilizado el antígeno mediante coloración con Rojo ponceau y procedimos a escindir este fragmento. Se realizó el bloqueo con una solución de leche descremada al 5% (p/v) en buffer PBS-Tween, incubándose 1 h a 25°C. Posteriormente, se incubó la membrana con una dilución 1/5 del suero durante 30 min. Se realizaron 3 lavados con buffer PBS-Tween 20 de 5 min cada uno. Se incubó la membrana en 1 mL de buffer Gly 100 mM pH 2,5 durante 5 min en agitación. Se recolectó el buffer Gly 100 mM pH 2,5 junto con anticuerpos extraídos y se mezcló con 200 µL de buffer Tris-HCl 1 M pH 8,0. Se realizaron 3 de estas extracciones buffer Gly 100 mM pH 2,5. La membrana se neutralizó con PBS-Tween 20 y se volvió a incubar en suero policional diluido 1/5, repitiendo todo el proceso tres veces. Los anticuerpos purificados se concentraron empleando dispositivos comerciales de ultrafiltración Amicon (Millipore).

## Expresión y purificación de la proteína recombinante

#### Expresión de la proteína recombinante

Para la producción de proteínas recombinantes utilizamos células *E. coli* BL21 (DE3) previamente transformadas con la construcción plasmídica correspondiente. Brevemente, las células transformadas se repicaron a medio LB líquido suplementado con kanamicina, y se incubaron en agitación a 37°C hasta su saturación. El cultivo se utilizó como *starter* para inocular 4 erlenmeyers con 0,5 L de medio de cultivo TB en cada uno de ellos. El medio de cultivo inoculado se incubó a 37°C en agitador orbital a 180 rpm hasta alcanzar una DO 600 ~ 0,8, momento en el cual se agregó el inductor IPTG a una concentración final de 1 mM. Luego de la inducción, las células continuaron cultivándose a 37°C en agitador orbital a 180 rpm durante 16 h. Para cosechar las células, se centrifugó el cultivo a 5000 × *g* durante 10 min y se conservaron a -20°C hasta el inicio del procedimiento de purificación cromatográfica de la proteína.

#### Purificación de la proteína

Las células almacenadas a -20°C se diluyeron en *buffer* A (imidazol 10 mM; NaCl 400 mM; 20 mM Tris-HCl pH 8,0). La suspensión celular se enfrió en un baño de hielo y se sonicó con un procesador ultrasónico de alta intensidad VibraCell<sup>TM</sup> VCX 130 (Sonics). La fracción sonicada resultante se centrifugó a 4°C y 18000 × g durante 20 min con el objeto de separar fracciones solubles e insolubles. El sobrenadante conteniendo la proteína recombinante soluble se utilizó para la correspondiente purificación.

Utilizamos una cromatografía de afinidad por metal inmovilizado (IMAC) debido a que las proteínas recombinantes contienen una etiqueta de poli-histidinas en el extremo N-terminal. El sobrenadante se sembró en una columna comercial con la resina quelante cargada con Ni<sup>2+</sup> (Hi-Trap, GE Healthcare) previamente equilibrada con *buffer* A. Una vez sembrada, la remoción de proteínas inespecíficas y la elusión de la proteína de interés se logró mediante un gradiente lineal de imidazol en un rango de 10-300 mM utilizando el denominado *buffer* B (Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, NaCl 500 mM, imidazol 300 mM). Alícuotas de las fracciones fueron evaluadas por actividad enzimática y SDS-PAGE. Las fracciones más puras/activas se reunieron, y se concentraron por ultracentrifugación.

A continuación, se realizó una cromatografía de exclusión molecular preparativa para incrementar la pureza de la muestra. En el equipo ÄKTA Explorer (GE Healthcare) se conectó una columna HiLoad 16/600 Superdex (GE Healthcare) cargada con resina Superdex G-200 (GE Healthcare). Las corridas se realizaron a 0,75 mL.min<sup>-1</sup> en *buffer* G (HEPES pH 8,0 50 mM; NaCl 100 mM; EDTA 0,1 mM). Alícuotas de las fracciones fueron evaluadas por actividad enzimática y SDS-PAGE. Las fracciones más puras/activas se reunieron, se concentraron por ultracentrifugación.

#### Cromatografía de exclusión molecular

La cromatografía de exclusión molecular se utilizó con fines analíticos para la determinación de la masa molecular de las proteínas de estudio. En el equipo ÄKTA Explorer (GE Healthcare) se conectó una columna Tricorn 10/300 (GE Healthcare) cargada con resina Superdex G-200 (GE Healthcare). Las corridas se realizaron a 0,75 mL.min<sup>-1</sup> en *buffer* G (HEPES pH 8,0 50 mM; NaCl 100 mM; EDTA 0,1 mM). Se empleó para la calibración de la columna un conjunto de patrones de masa molecular conocida (GE Healthcare). Los estándares analizados incluyeron: tiroglobulina (669 kDa), ferritina (440 kDa), aldolasa (158 kDa), conalbúmina (75 kDa), ovoalbúmina (44 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa) y ribonucleasa (13,7 kDa). El volumen muerto de la columna se determinó empleando una solución de Azul de Dextrano. Las masas moleculares se determinaron por interpolación de la curva logarítmica, donde se grafica el

log de la masa molecular de los marcadores comerciales vs  $K_{av}$ .  $K_{av}$  se obtiene a partir de la siguiente ecuación:  $K_{av} = (V_e - V_o)/(V_c - V_o)$ ; donde  $V_e$  es el volumen de elusión,  $V_o$  es el volumen muerto y  $V_c$  es el volumen de columna.

### Metodología de análisis enzimático

#### Cuantificación de extremos reductores

La medición de la actividad enzimática se llevó a cabo mediante la cuantificación de azúcares reductores utilizando la técnica de Somogyi-Nelson (SN) (Nelson, 1944; Somogyi, 1952). La medida de actividad se llevó a cabo en un volumen final de 50  $\mu$ L en termoagitador (HCM-100Pro Dragon Lab). El ensayo standard de actividad se realizó incubando 2,5 mg.mL<sup>-1</sup> de laminarina en *buffer* acetato de sodio 50 mM pH 4,5 con una dilución adecuada de *Egr*GH64 a 50°C. La reacción enzimática se detuvo adicionando 75  $\mu$ L de reactivo Somogyi e incubando 10 min a 100°C. Posteriormente, se adicionaron 75  $\mu$ L de reactivo Nelson y se midió DO a 630 nm en espectrofotómetro (Nelson, 1944; Somogyi, 1952; González Blair & Castellanos Domínguez, 2003).

El consumo de sustrato se mantuvo por debajo del 10% para asegurar que se midan velocidades iniciales. Los valores obtenidos de azúcares reductores por la técnica SN fueron comparados con una curva de calibrado de Glc. Una unidad de actividad enzimática (U) se definió como la cantidad de equivalentes de Glc liberados por minuto.

#### Determinación de parámetros cinéticos

Para caracterizar cinéticamente a *Egr*GH64 utilizamos un enfoque desarrollado para sistemas heterogéneos (Kari et al., 2017, 2019), aplicando dos modelos: el método de Michaelis-Menten convencional (<sup>conv</sup>MM) y el de Michaelis-Menten inverso (<sup>inv</sup>MM).

Para el <sup>conv</sup>MM, se midió actividad enzimática manteniendo fija la concentración de enzima (E<sub>0</sub>) y realizando una saturación de sustrato ( $S_n$ ). Los datos se ajustaron utilizando la siguiente ecuación:

$$v = \frac{k_{cat}E_0S_n}{K_M + S_n}$$

Donde  $k_{cat}$  es el número de recambio y  $K_M$  la constante de Michaelis-Menten.

El enfoque de <sup>inv</sup>MM consiste en utilizar una concentración fija de sustrato ( $S_0$ ) y variar los niveles de enzima ( $E_n$ ). El ajuste se realiza con la siguiente ecuación:

$$v = \frac{k_{cat}S_0E_n}{invK_M + E_n}$$

Donde <sup>inv</sup> $K_M$  es la constante de Michaelis-Menten para <sup>inv</sup>MM. Hay que destacar que las unidades de <sup>inv</sup> $K_M$  son molares ( $\mu$ M), a diferencia de  $K_M$  (obtenido en <sup>conv</sup>MM) cuyas unidades son másicas (mg.mL<sup>-1</sup>).

A partir del valor obtenido de <sup>inv</sup>K<sub>M</sub> experimentalmente, y teniendo en cuenta la masa molecular de la enzima, es posible calcular una expresión másica de este parámetro (<sup>inv</sup>K<sub>M</sub>). La forma de relacionar ambas expresiones es a través de la densidad de sitios de ataque de la enzima sobre la superficie del sustrato ( $\Gamma$ ).  $\Gamma$  se obtiene mediante la siguiente ecuación:

$$\Gamma = \frac{invK_{M_{\square}}}{masK_{M}}$$

Todas las constantes cinéticas son la media de al menos tres series de datos independientes. El ajuste se realizó con el software GraphPad Prism (GRAPH PAD Software Inc, California, EE. UU.).

#### Ensayo de unión a sustratos insolubles

Este ensayo se realizó incubando  $10 \text{ mg.mL}^{-1}$  de paramilón con  $160 \mu \text{g.mL}^{-1}$  de *Egr*GH64 en *buffer* HEPES pH 7,4 100 mM. La mezcla de reacción se incubó por 60 min a 50°C a 10000 × g. Como control de absorción no específica se reemplazó *Egr*GH64 con BSA. El sobrenadante, donde se encuentra la proteína no unida, fue separado del polisacárido insoluble centrifugando a  $6000 \times g$  por 5 min. Se cuantificó la concentración de proteína en el sobrenadante utilizando el método de Bradford. La diferencia entre la cantidad de proteína adicionada a la mezcla de reacción y la detectada en el sobrenadante se consideró proteína unida al polisacárido (Purushotham & Podile, 2012).

#### Procesividad

Los ensayos para analizar la distribución de azúcares reductores entre las fracciones soluble e insoluble se realizaron por digestión de paramilón (25 mg.mL<sup>-1</sup>) con 0,25 U.mL<sup>-1</sup> de *Egr*GH64 por reacción. Después de 90 min la reacción se detuvo incubando a 100°C por 10 min, y el sobrenadante se separó por centrifugación  $10.000 \times g$  por 5 min. El polímero insoluble se lavó tres veces con *buffer* acetato de sodio pH 4,5 50 mM. El paramilón lavado se resuspendió en *buffer*, y los azúcares reductores se cuantificaron en ambas fracciones por el método de SN. Estos valores se usaron para calcular la relación soluble/insoluble como indicador de procesividad (Zhang et al., 2010).

#### Cromatografía en capa delgada

Los productos de la hidrólisis de laminarina y paramilón generados por *Egr*GH64 se analizaron según lo reportado previamente (Simmons & Fry, 2017). Brevemente, la mezcla de reacción (250 µL) se preparó con laminarina o paramilón 0.1% (w/w) en *buffer* acetato de sodio (50 mM, pH 4.5) y 0.16 mg.mL<sup>-1</sup> de *Egr*GH64. A diferentes tiempos, se tomaron 50 µL de la mezcla de reacción y se incubaron a 100°C por 10 min para su posterior análisis por cromatografía de capa delgada (TLC). Las muestras se sembraron en placas de silica gel 60 F254 (Merck, Darmstadt, Germany) y separadas usando como solvente de corrida la mezcla acetato de etilo, ácido acético y agua (2:2:1, v/v). Los productos se visualizaron al adicionar el reactivo de revelado (25 mg de orcinol, 9.5 mL de etanol absoluto, y 0.5 mL de ácido sulfúrico 98%) y calentar la placa por 5 min a 100°C.

## Metodología computacional

#### Árbol filogenético

El árbol filogenético se generó a partir de las secuencias de aminoácidos de proteínas GH64 previamente estudiadas. El alineamiento de secuencia múltiple se realizó utilizando el algoritmo MUSCLE (Edgar, 2004). Para el árbol filogenético aplicamos el método de unión de vecinos usando el software MEGA 11 0.13 (Newman et al., 2016).

#### Modelado molecular

El modelo tridimensional se realizó a partir de la secuencia de *Egr*GH64 utilizando el software AlphaFold 2.0, el cual utiliza un algoritmo de *Deep learning* que ha demostrado tener mayor exactitud que otros métodos de modelado (Jumper et al., 2021; Tunyasuvunakool et al., 2021). La fiabilidad del modelo se evaluó con el sistema de puntuación plDDT, el cual representa una medida de la similitud local que tendría nuestro modelo si se compara con una proteína resuelta experimentalmente (Mariani et al., 2013).

Se utilizó el software UCSF-Chimera (Pettersen et al., 2004) para realizar un alineamiento estructural usando un alineamiento global Needleman-Wunst como guía inicial, con Blosum62 como matriz de puntuación y penalidad extra tomando en cuenta la estructura secundaria de cada molécula (Pettersen et al., 2004).

Las imágenes de la secuencia y el alineamiento de secuencia se obtuvieron utilizando el programa ESpript 3.0 implementado en el servidor ESPript (Robert & Gouet, 2014).

Se realizaron mapas de potencial electroestático calculados para cada molécula resolviendo la ecuación Poisson-Boltzmann incluida en el programa APBS (*Adaptative Poisson*-

*Boltzmann Solver Program*) (Jurrus et al., 2018). Este potencial se proyectó sobre la superficie excluida del solvente utilizando el software UCSF-Chimera con una sonda de 1,4 Angstroms.

## Condiciones de Cultivo de E. gracilis

Se realizaron tres condiciones de cultivos para el cultivo de E. gracilis.

• Autotrófico: Medio de cultivo CyM sin suplementación de fuente de carbono. Cámara de cultivo con ciclo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad, con una intensidad de luz de 60-80  $\mu$ mol fotones.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> y una temperatura de 23 ± 2°C. Se utilizó como concentración inicial de inóculo 5.10<sup>4</sup> cel.mL<sup>-1</sup>.

• Heterotrófico: Medio de cultivo CyM suplementado con Glc 1% (p/v). Crecimiento en incubadora con temperatura  $28 \pm 1$ °C. Se utilizó como concentración inicial de inóculo  $5.10^4$  cel.mL<sup>-1</sup>.

• Anaerobiosis: Células crecidas en condiciones heterotróficas se cosecharon al llegar a la fase estacionaria y se lavaron con medio CyM manteniendo las condiciones de esterilidad. El lavado se realizó para eliminar los restos de fuente de carbono y los compuestos que podrían haber sido liberados por *E. gracilis*. Las células se resuspendieron en medio de cultivo CyM sin suplementación de fuente de carbono. Se utilizó como concentración inicial  $5.10^5$  cel.mL<sup>-1</sup>. Crecimiento en incubadora con temperatura  $28 \pm 1^{\circ}$ C.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## Análisis secuencia aminoacídica

Identificamos un transcripto codificante (light\_m.63754) para una posible GH64 en la base de datos del trabajo de transcriptómica publicado por el grupo del Dr. Robert Field (GenBank: GEFR00000000.1) y realizamos un análisis de la secuencia aminoacídica derivada de este transcripto.

En la literatura científica identificamos trabajos de caracterización de algunas glucanasas pertenecientes a la familia GH64 (EC 3.2.1.39) de bacterias gram-positivas, a excepción de la GH64 de *Lysobacter enzymogenes* (bacteria gran-negativa) y de *Magnaporthe oryzae* (hongo filamentoso) (Palumbo et al., 2003; Wang et al., 2021). En este sentido, es importante destacar que la *Egr*GH64 es la primera perteneciente a un microorganismo protista que se estudia funcional y estructuralmente.

Estudios filogenéticos muestran que la familia GH64 se encuentra dividida en tres familias: GH64-LHase-like (GH64-LPHI), GH64-GluB-like (GH64-GBI) y GH64-like (GH64-I) (Qin et al., 2017). En la página web del *National Center for Biotechnology Information* podemos encontrar el árbol filogenético construido con las secuencias aminoacídicas utilizadas para la clasificación en subfamilias<sup>4</sup>. Empleando secuencias de glucanasas GH64 reportadas en esta base de datos, algunas de estas caracterizadas, realizamos un alineamiento con la *Egr*GH64. El árbol filogenético derivado de este alineamiento muestra que *Egr*GH64 no se ubica en las ramas representadas por las tres subfamilias (**Figura 29**), sino que podría tratarse de la primer GH64 perteneciente a otra subfamilia. Es importante destacar que, en este estudio, el porcentaje de identidad de *Egr*GH64 con el resto de las enzimas seleccionadas no supera el 28%. Glucanasas (de la familia GH64), y caracterizadas funcionalmente (en todas ellas se observó actividad  $\beta$ -1,3glucanasa), pertenecen a una de estas tres subfamilias, de distintos microorganismos, en su mayoría bacterianos.

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup> https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cddsrv.cgi?hslf=1&uid=185753&#seqalign



**Figura 29**. Ubicación de *Egr*GH64 en árbol filogenético con secuencias del cluster GH64 clasificadas en cada una de las tres subfamilias (GH64-LPHI, GH64-GBI y GH64-I). Entre paréntesis se detalla el número de acceso de las secuencias aminoacídicas En color verde se muestra la ubicación de *Egr*GH64 ( $\beta$ -1,3-endoglucanasa *Euglena gracilis*) en el árbol filogenético.

Estructuras tridimensionalmente resueltas de enzimas pertenecientes a las subfamilias GH64-LHl y GH64-l, están disponibles en el sitio web de NCBI, observándose en las mismas un típico plegamiento de forma de surco compuesto de dos dominios: uno con forma de barril formado por láminas  $\beta$  consecutivas y otro mixto ( $\alpha/\beta$ ) (Bai et al., 2021). El mecanismo de reconocimiento de la triple hélice de  $\beta$ -1,3-glucanos es universal en la familia GH64 (Qin et al., 2017). Dada la, aún, escaza información que se tiene de las enzimas de esta familia, y a la disparidad en los estudios realizados para cada una de las enzimas, es difícil determinar características funcionales y estructurales propias de cada subfamilia. En este contexto, consideramos relevante el aporte del presente trabajo no solo por ubicar a *Egr*GH64 por fuera de las subfamilias reportadas, sino también por ser *Egr*GH64 la primera enzima de esta familia perteneciente a un organismo protista en ser estudiada.

Por alineamiento de secuencia pudimos evidenciar que la secuencia de *Egr*GH64 presenta ambos dominios característicos de la familia GH64 (dominio del tipo barril  $\beta$  con aminoácidos catalíticos y un dominio mixto  $\alpha/\beta$ ). Además, como característica a tener en cuenta en futuros estudios, hay que considerar que los primeros 37 aminoácidos y los últimos 100 residuos no se alinean a secuencias de otras GH64. Utilizando herramientas bioinformáticas *IUPred2A*, *SignalP 6.0 y Phobius* no se encontraron regiones intrínsecamente desordenadas ni péptidos de señalización (Kall et al., 2007; Mészáros et al., 2018; Teufel et al., 2022).

## Producción recombinante de EgrGH64

Diseñamos un gen sintético con codones optimizados para expresión en *E. coli* utilizando la secuencia para una putativa GH64 en *E. gracilis (egrgh64)* flanqueado con sitios de restricción

que permitieron distintas estrategias de clonado. Al realizar un estudio de la secuencia de *Egr*GH64 encontramos que la misma presenta hasta un 30% de identidad con otras enzimas de la familia GH64 caracterizadas de otros microorganismos. Los resultados de predictores de péptido señal utilizados (*SignalP 6.0* y *Phobius*) fueron negativos (Kall et al., 2007; Teufel et al., 2022).

Optamos por la producción de *Egr*GH64 en forma recombinante. Debido a lo recalcitrante de la proteína para ser expresada en forma soluble y activa, ensayamos distintas estrategias de producción. Algunas de las estrategias de producción en *E. coli* BL21 (DE3) se realizaron utilizando las construcciones: pET28c/*NdeI-egrgh64-Hind*III (con etiqueta de histidinas en el N-terminal), pRSFDuet-1/*SacI-egrgh64-Sal*I (con etiquetas de histidinas en el N-terminal), pMAL-TEV-c2/*NdeI-egrgh64-Hind*III (con etiqueta de histidinas en el N-terminal) ensayando distintas temperaturas y concentraciones de inducción con IPTG. También incluimos distintas cepas de *E. coli*, entre ellas: LEMO (DE3), Tunner (DE3), Codon plus-RP (DE3), Rosetta Gami (DE3), SoluBL21 (DE3). Extendimos los ensayos producción de la proteína recombinante incluyendo otros sistemas de expresión: como la bacteria *Mycobacterium smegmatis* mc2155 clonando el gen de interés en el vector pMIP12, utilizado para expresar constitutivamente en este microorganismo adicionando una etiqueta de histidinas en el C-terminal (Le Dantec et al., 2001). Ninguna de estas estrategias nos permitió alcanzar nuestro objetivo: obtener expresión soluble y activa de *Egr*GH64. En la **Figura 30** se muestran geles de SDS-PAGE correspondientes a algunos de los ensayos de expresión mencionados.



**Figura 30**. Ensayos de expresión de *Egr*GH64 analizados por SDS-PAGE. Las flechas negras indican la altura a la que se observa expresión de *Egr*GH64.

(A) SDS-PAGE colonias (Col) de *E. coli* BL21 (DE3) [pET28c/egrgh64]. Calle 1: Marcador de masa molecular. Calle 2: Pellet Col-1. Calle 3: Sobrenadante Col-1. Calle 4: Pellet Col-2. Calle 5: Sobrenadante Col-2. Calle 6: Pellet Col-3. Calle 7: Sobrenadante Col-3. Calle 8: Pellet Col-4. Calle 9: Sobrenadante Col-4.

(B) SDS-PAGE colonias *E. coli* BL21 (DE3) [pRSFDuet/*egrgh64*]. Calle 1: Marcador de masa molecular. Calle 2: Pellet Col-1. Calle 3: Sobrenadante Col-1. Calle 4: Pellet Col-2. Calle 5: Sobrenadante Col-2. Calle 6: Pellet Col-3. Calle 7: Sobrenadante Col-3.

(C) SDS-PAGE colonias *E. coli* LEMO (DE3) [pRSFDuet/*egrgh64*]. Calle 1: Pellet *E. coli* LEMO (DE3) sin transformar. Calle 2: Sobrenadante *E. coli* LEMO (DE3) sin transformar. Calle 3: Marcador de masa molecular. Calle 4: Pellet Col-1. Calle 5: Sobrenadante Col-1. Calle 6: Pellet Col-2. Calle 7: Sobrenadante Col-2. Calle 8: Pellet Col-3. Calle 9: Sobrenadante Col.3.

Previamente, un trabajo realizado en *E. coli* BL21(DE3) demostró que la presencia de etanol en el medio de cultivo favorece la producción en forma soluble de las proteínas ensayadas (Chhetri et al., 2015). Este efecto podría deberse a que la inclusión del alcohol induce la expresión de chaperonas presentes en la bacteria facilitando el correcto plegamiento de la proteína de estudio. Decidimos implementar esta estrategia comparando la producción a 0%, 1,5% y 3% de etanol en medio de cultivo TB. Observamos que la proteína recombinante se producía en forma soluble cuando el medio de cultivo era suplementado con 3% etanol. Realizamos una purificación IMAC de la misma (**Figura 31A**).

Al cuantificar azúcares reductores utilizando laminarina (sustrato) pre-incubada con *Egr*GH64 según lo descripto previamente, comprobamos que la enzima tenía actividad catalítica. Debido a que en el análisis mediante SDS-PAGE observamos una pureza limitada optamos por un segundo paso de purificación. Realizando una cromatografía de exclusión por tamaño molecular (**Figura 31B**). Al concentrar las fracciones de interés observamos una pureza aproximadamente del 80% (**Figura 31C**).



**Figura 31**. Purificación en dos etapas de *Egr*GH64. (**A**) SDS-PAGE purificación por Ni<sup>2+</sup>-IMAC. **Calle** 1: Marcador de masa molecular. **Calles 2-10**: fracciones de elusión de Ni<sup>2+</sup>-IMAC. (**B**) SDS-PAGE purificación por cromatografía de exclusión molecular preparativa. **Calle 1**: Marcador de masa molecular. **Calles 2-12**: fracciones de elusión de cromatografía de exclusión molecular. (**C**) SDS-PAGE de la muestra concentrada después de los dos pasos de purificación. **Calle 1**: Marcador de masa molecular. **Calle 2**: *Egr*GH64 purificada y concentrada.

## Caracterización estructural de EgrGH64

#### Determinación estructura cuaternaria

Con el objeto de obtener información estructural de *Egr*GH64 en condiciones nativas, decidimos realizar una cromatografía de exclusión molecular analítica utilizando una columna con resina Superdex G-200 (GE Healthcare). Con esta metodología, observamos que el volumen

de elusión de la enzima de estudio se corresponde con una proteína de aproximadamente 65 kDa, mostrando de esta manera una estructura monomérica. Esta conformación cuaternaria es similar a lo determinado para otras glucanasas pertenecientes a la familia GH64 (**Tabla 11**). Por otro lado, si resulta llamativa la masa molecular de *Egr*GH64: es la única de las GH64 caracterizadas que presenta una masa molecular mayor a 55 kDa. Este mayor tamaño se puede deber a la secuencia C-terminal de *Egr*GH64 que no se alinea con otras GH64, que podría especularse que se trate de un dominio con otra función. No se profundizó durante esta tesis en este punto, pero de tratarse de un dominio independiente a la actividad glucanasa, el mismo no afecta el arreglo monomérico clásico de las GH64.

Microorganismo de origen	Masa Molecular (kDa)	Estructura cuaternaria	Referencia	
Arthrobacter sp. strain YCWD3	54,5	NI <sup>a</sup>	(Doi et al., 1973)	
Lysobacter enzymogenes N4-7	41,0	NI	(Palumbo et al., 2003)	
Streptomyces matensis DIC-108	39,4	Monómero	(Shrestha et al., 2011)	
Streptomyces matensis ATCC 23935	43,0	NI	(Woo et al., 2014)	
Kribbella flavida NBRC 14399	43,0	NI	(Kumagai et al., 2016)	
Paenibacillus barengoltzii	48,9	Monómero	(Qin et al., 2017)	
Clostridium beijerinckii NCIMB 8052	41,9	Monómero	(Krishnan et al., 2019)	
Cellulosimicrobium funkei HY-13	42,0	NI	(Bai et al., 2021)	
Magnaporthe oryzae Guy11	45,6	NI	(Wang et al., 2021)	
Euglena gracilis var. saccharophila Klebs (1224/7a)	64,3	Monómero	(Este trabajo, O'Neill et al., 2015a)	
<sup>a</sup> No informado				

**Tabla 11**. Masas moleculares calculadas y estructura cuaternaria para otras enzimas pertenecientes a la familia GH64 caracterizadas.

#### Modelado molecular

En vistas de recabar información sobre el plegamiento de *Egr*GH64 como monómero realizamos un modelado tridimensional de la secuencia proteica. Para lograr este objetivo pusimos en práctica distintas estrategias. En primer lugar, realizamos un alineamiento *HHBlits* con la GH64 de *S. matensis*, cuyo número de identificación PDB es 3GD0 (Wu et al., 2009; Remmert et al., 2012). A continuación, realizamos el modelado por homología en el software *Modeller 10.1* (Webb & Sali, 2016). También ensayamos otros servidores de modelado molecular como I-TASSER (basado en la técnica *threading*) y Swiss-Model (modelado por homología) (Biasini et al., 2014; J. Yang & Zhang, 2015). Sin embargo, al analizar la calidad de los modelos obtenidos observamos bajas puntuaciones en QmeanDisco y verify3D (Eisenberg et al., 1997; Studer et al., 2020).

Teniendo en cuenta la baja confiabilidad de los modelos de *Egr*GH64 obtenidos, empleamos la recientemente desarrollada herramienta bioinformática de *Deep-learning* Alphafold 2.0. Esta ha mostrado en múltiples casos la capacidad de predecir estructuras proteicas a nivel atómico incluso en ausencia de estructuras similares (Jumper et al., 2021). El modelo correspondiente reveló buenas puntuaciones de calidad estructural global. Alphafold 2.0 tiene la particularidad que analiza la confianza de la predicción por residuo con el algoritmo denominado *plDDT* (Mariani et al., 2013). Mediante esta evaluación de calidad local, observamos que este modelado presenta una puntuación mayor al 70% en la mayor parte de la proteína (**Figura 32A**). La región con menor puntuación es el extremo N-terminal y aminoácidos particulares en distintas regiones de *Egr*GH64.

En el modelado se pueden distinguir los dos dominios clásicos de la familia GH64 (**Figura 32B**): barril  $\beta$  con aminoácidos catalíticos (azul) y mixto  $\alpha/\beta$  (rojo). En la **Figura 32C** se muestra la secuencia de *Egr*GH64 con los colores correspondientes a cada dominio y las estructuras secundarias predichas. En rosado se distingue el dominio C-terminal que no se alinea con otras GH64, llamativamente el software le asignó un plegamiento compacto formado exclusivamente por láminas  $\beta$ . El plegamiento más frecuente encontrado en módulos de unión a carbohidratos (CBM) es el  $\beta$ -sandwich, el cual consiste en la superposición de láminas- $\beta$  (Boraston et al., 2004).



**Figura 32**. Modelado tridimensional de *Egr*GH64 obtenido por Alphafold 2.0. (**A**) Modelado molecular coloreado según la confianza en la predicción por cada residuo: valor plDDT mayor a 70% en azul (confiable) y valor plDDT menor a 70% en rojo. (**B**) División por dominios en el modelado obtenido: dominio catalítico GH64 (azul), dominio mixto ( $\alpha/\beta$ ) GH64 (rojo) y dominio C-terminal (rosado). (**C**) Secuencia de *Egr*GH64. Se detalla la estructura secundaria predicha y los colores correspondientes a cada dominio.

Evaluamos el potencial electrostático de superficie de los dominios GH64 del modelo de *Egr*GH64 y de estructuras resultas cristalográficamente de las enzimas GH64 de *S. matensis* (PDB ID: 3GD0), *C. beijereinckii* (PDB ID: 5H4E), y *P. barengoltzii* (PDB ID: 5H9X) como se muestra en la **Figura 33A1-4**. En el modelado se observa el característico surco catalítico de las endoglucanasas (Bourne & Henrissat, 2001), y que en la familia GH64 es el sitio de

reconocimiento de la triple hélice  $\beta$ -glucano (Qin et al., 2017). La GH64 de *S. matensis*, además, fue co-cristalizada con laminaritetraosa, aportando información sobre la ubicación del sitio catalítico (Wu et al., 2009). Utilizamos este dato como guía para obtener las imágenes de los modelos de *docking* posicionando el oligosacárido 'también en las GH64 de *E. gracilis, C. beijereinckii* y *P. barengoltzii*. En los cuatro casos, la región catalítica presenta una región de carga negativa (color rojo), aun cuando hay diferencias sustanciales en los potenciales electrostáticos en el resto de la estructura. Esta característica podría ser necesaria para la estabilización del sustrato.

En la **Figura 33B** (1-4), se puede observar el *backbone* de las enzimas mostrando los átomos de las cadenas laterales de aminoácidos descritos como parte del sitio activo y estructuralmente conservados. En todos los casos encontramos residuos aromáticos probablemente para estabilizar la cadena del polisacárido entrante (círculo de línea negra discontinua). Al observar la estructura de GH64 de *S. matensis* co-cristalizada con una lamiraritetraosa en el sitio activo, se visualiza que una de las unidades de Glc se une, formando un apareamiento  $\pi$ -stacking con el triptófano 163. Distintivamente, la *Egr*GH64 presenta un ácido aspártico (D188, en círculo de línea roja discontinua) en el bolsillo catalítico el cual está ausente en las demás GH64 comparadas.



**Figura 33**. Comparación estructural modelado *Egr*GH64 con enzimas GH64 cristalizadas. Superficiede potencial electrostático *Egr*GH64 (**A1**), *S. matensis* (**A2**), *C. beijereinckii* (**A3**), *P. barengoltzii* (**A4**). *Backbone* de las cuatro enzimas mostrado en cintas y los átomos pertenecientes a las cadenas laterales de los aminoácidos (**B1** a **B4**). Los residuos descritos en la bibliografía como parte del sitio activo y que están conservados estructuralmente están etiquetados con colores de fondo.

## Caracterización funcional de EgrGH64

#### Cuantificación de azúcares reductores

La actividad glicosil hidrolasa de *Egr*GH64 se determina a través de la cuantificación de azúcares reductores que resultan de la escisión enzimática del enlace glicosídico en el oligosacárido del sustrato. Evaluamos dos métodos ampliamente utilizados para la caracterización de glucanasas: el método de Somogyi-Nelson (SN) y del ácido 3,5-dinitrosalicilico (DNS). Realizamos curvas de calibrado empleando Glc como patrón. Cada unidad de Glc equivale a un extremo reductor. El rango de linealidad utilizando el método del DNS se observó entre 3 mM y 15 mM de Glc, mientras que con el método de SN el mismo se ubicó entre 0,05 mM y 3 mM de Glc (**Figura 34**). Este menor límite de detección y mayor sensibilidad de SN se ha reportado previamente (Breuil & Saddler, 1985). Más aún, otros autores señalan que el dosaje con DNS no

señal con el grado de polimerización del sustrato (Robyt & Whelan, 1972; Gusakov et al., 2011). De esta manera, decidimos continuar la cuantificación de azúcares reductores producidos por la actividad de *Egr*GH64 con SN.



**Figura 34**. Evaluación de métodos cuantificación de azúcares reductores. Curvas de calibrado de DNS (**A**) y SN (**B**) utilizando Glc como patrón.

#### Caracterización cinética de EgrGH64

Los ensayos de medición de actividad enzimática se realizaron utilizando laminarina como sustrato principal. Otras glucanasas caracterizadas de la familia GH64 han mostrado frente a este sustrato su mayor actividad enzimática (Palumbo et al., 2003; Bai et al., 2021). La laminarina es un  $\beta$ -1,3-glucano con ramificaciones  $\beta$ -1,6 soluble con un grado de polimerización cercano a 25 (Hanashima et al., 2014; Du et al., 2019;. Las reacciones se realizaron incubando 30 min una dilución apropiada de *Egr*GH64 con 2.5 mg.mL<sup>-1</sup> del sustrato. Una unidad de actividad enzimática (U) se definió con la cantidad de equivalentes de Glc liberados por minuto bajo las condiciones especificadas.

Realizamos ensayos para identificar las condiciones óptimas de reacción. En primer lugar, evaluamos *buffers* con distintos valores de pH. Los *buffers* (50 mM) utilizados fueron los siguientes: acetato de sodio (pH 3,5, 4,5 y 5,0), fosfato de sodio (pH 6,0 y 7,5) y Tris-HCl (pH 8,5, 9,0 y 9,5). Observamos actividad enzimática óptima empleando *buffer* acetato de sodio 50 mM pH 4,5 (**Figura 35A**). La actividad relativa se mantuvo por encima del 80% al aumentar el pH hasta 6,0.

Para evaluar la influencia de la temperatura se realizaron las reacciones enzimáticas en *buffer* acetato de sodio pH 4,5 con variaciones del parámetro entre 15°C y 65°C. Como se observa en la **Figura 35B**, la actividad óptima se ubica a 50°C y un aumento de 10°C genera una disminución del 60%.
La estabilidad térmica es un parámetro de interés en la caracterización de glicosil hidrolasas para analizar la robustez estructural y su posible aplicación en sistemas industriales (los cuales suelen requerir temperaturas elevadas). En este sentido, analizamos la termo estabilidad pre-incubando 15 min la *Egr*GH64 a distintas temperaturas y midiendo actividad a los pH y temperatura óptimos determinados previamente. *Egr*GH64 mantuvo aproximadamente un 80% de su actividad al ser pre-incubada hasta los 55°C (**Figura 35C**).

También evaluamos la influencia de distintos iones metálicos (a concentración 5 mM) en la actividad de *Egr*GH64. Observamos una leve disminución de la actividad enzimática con Ni<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup>, mientras que la presencia de Fe<sup>3+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, y Mn<sup>2+</sup> evidenció una mayor inhibición (**Figura 35D**). La presencia del catión Ca<sup>2+</sup> no mostró efecto en la catálisis.



**Figura 35**. Efecto del pH, la temperatura, los iones metálicos y la estabilidad térmica en la actividad enzimática de *Egr*GH64. (A) Efecto del pH en la actividad de *Egr*GH64. El pH óptimo se determinó midiendo la actividad enzimática a pH: 3,5; 4,5; 5,0; 6,0; 7,5; 8,0; 9,5. (B) Efecto de la temperatura en la actividad enzimática de *Egr*GH64. Las temperaturas de reacción ensayadas fueron las siguientes: 30, 40, 45, 50, 55, 60 y 70°C. (C) Estabilidad térmica de *Egr*GH64. La actividad se midió luego de pre-incubar la enzima por 15 min a temperaturas entre 4 y 70°C. (D) Efecto de iones metálicos en la actividad de *Egr*GH64. La actividad se midió luego de pre-incubar la enzima por 15 min a temperaturas entre 4 y 70°C. (D) Efecto de iones metálicos (5mM). Los resultados se presentan como media ± SEM de mediaciones realizadas por triplicado.

Si bien *E. gracilis* es un organismo mesófilo (crecimiento óptimo a 28°C) este perfil de influencia de temperatura en la actividad enzimática se adapta a lo determinado en otras endoglucanasas (Buetow, 1962; Yennamalli et al., 2013). No suele observarse una relación directa entre la temperatura óptima de este tipo de enzimas y la temperatura de mayor crecimiento del organismo huésped. Al comparar directamente los casos de enzimas de la familia GH64 caracterizadas funcionalmente, encontramos que la mayoría presenta actividades máximas entre los pH 4,5 y 6,0, y temperaturas entre 40°C y 55°C como se observa en **Tabla 12**. No se observa dependencia de las condiciones óptimas de reacción por subfamilia.

Microorganismo de origen	Subfamilia	pH óptimo	Temperatura óptima	Referencia	
Arthrobacter sp. strain YCWD3	GH64-LPH1	5,8	55	(Doi et al., 1973)	
Streptomyces matensis DIC- 108	GH64-LPHI	7,5-8,5	55	(Shrestha et al., 2011)	
Streptomyces matensis ATCC 23935	GH64-LPHI	6,0	55	(Woo et al., 2014)	
Kribbella flavida NBRC 14399	GH64-LPHI	5,5	45	(Kumagai et al., 2016)	
Cellulosimicrobium funkei HY-13	GH64-LPHI	5,5	45	(Bai et al., 2021)	
Lysobacter enzymogenes N4- 7	GH64-GB1	4,5	45	(Palumbo et al., 2003)	
Magnaporthe oryzae Guy11	GH64-GB1	9,0	50	(Wang et al., 2021)	
Euglena gracilis var. saccharophila Klebs (1224/7a)	-	4,5	50	(Este trabajo)	

 Tabla 12. Condiciones óptimas de reacción de todas las enzimas pertenecientes a la familia GH64 caracterizadas.

En las endoglucanasas, la estabilidad térmica es un parámetro de interés si consideramos las posibles aplicaciones industriales para la enzima, es dependiente de múltiples factores como la presencia de enlaces disulfuro, la hidrofobicidad, cantidad de aminoácidos cargados positivamente, entre otros (Yennamalli et al., 2013). La GH64 de *M. oryzae* presentó una disminución significativa del 30% en la actividad pre-incubando la enzima a 30°C (Wang et al., 2021), mientras que en el caso de la GH64 de *C. funkei* disminuyó drásticamente su actividad enzimática con temperaturas de pre-incubación a partir de los 45°C (Bai et al., 2021). Nuestro análisis sobre la enzima *Egr*GH64 reveló que la actividad enzimática decae significativamente post incubación a 55°C. Es evidente de estos resultados, que *Egr*GH64 tiene una estabilidad térmica mayor a otras GH64. Es bueno aclarar que existen  $\beta$ -1,3-endoglucanasas de otras familias con aún mayor estabilidad que *Egr*GH64, como por ejemplo la enzima GH16 de *Thermotoga neapolitana* (Zverlov et al., 1997) que pudo conservar hasta un 57% de su actividad inicial después de pre-incubarse a 100°C o la glucanasa GH5 de *Geobacillus* sp. que conserva otras glucanasas GH16 que conservan hasta un 65% pre-incubando a 90°C (Ng et al., 2009).

En presencia de cationes metálicos, algunas endoglucanasas muestran un incremento en la actividad debido a una mejora en la estabilidad estructural y/o la afinidad al sustrato (Akram & Haq, 2020). Sin embargo, no observamos este efecto positivo en la actividad enzimática de *Egr*GH64 (Wooet al., 2014; Bai et al., 2021; Wang et al., 2021). Encontramos un caso especial, el de la GH64 de *C. beijerinckii*, esta presenta una notoria activación en presencia de Ca<sup>2+</sup>, pero este efecto se debe al dominio  $\beta\gamma$ -cristalina que oficia como sensor de Ca<sup>2+</sup> y activador de la actividad glucolítica (Krishnan et al., 2019).

La inhibición enzimática por parte de cationes metálicos puede deberse a la oxidación de grupos sulfidrilos, desestabilizando el plegamiento proteico, o a la formación de enlaces disulfuros en una posición irregular (Ohmiya et al., 1995; Rubini et al., 2010). El efecto inhibitorio de  $Cu^{2+}y$  Fe<sup>2+</sup> es una característica observada en una amplia variedad de endoglucanasas (Karnchanatat et al., 2008). Las GH64-LPHI de *S. matensis* y *C. funkei* no presentaron inhibición enzimática con los cationes ensayados a excepción de Hg<sup>2+</sup> (Woo et al., 2014; Bai et al., 2021). La **Figura 35D** muestra para el caso de *Egr*GH64, el comportamiento de la función enzimática frente a distintos cationes metálicos (5 mM). La enzima se inhibe en proporciones variables en cada caso. El ácido aspártico (D188) observado solamente en el modelo de la enzima de estudio (**Figura 33B1**) podría generar un ambiente potencialmente favorable para la unión de iones Mn<sup>2+</sup>, afectando la unión del sustrato y explicando la pérdida de actividad en presencia del ión metálico. Un patrón más semejante encontramos en la GH64-GBl de *M. oryzae*, donde los cationes Ca<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> y Fe<sup>3+</sup> evidenciaron disminuir la actividad enzimática con una concentración 1 mM (Wang et al., 2021).

#### Determinación de parámetros cinéticos

La determinación de los parámetros cinéticos de *Egr*GH64 se realizó considerando que utilizamos sustratos insolubles y sistemas de reacción con propiedades especiales (incertidumbre sobre el tamaño molecular exacto y desconocimiento del número de sitio de ataque). Por esta razón, adoptamos un modelo descrito previamente para analizar este tipo de reacciones que involucra los modelos de Michaelis-Menten convencional (<sup>conv</sup>MM) y Michaelis-Menten inverso (<sup>inv</sup>MM). Con el <sup>conv</sup>MM podemos caracterizar la saturación de la enzima con el sustrato (**Figura 36A**). Análogamente, <sup>inv</sup>MM permite observar la saturación del sustrato con concentraciones variables de enzima (Kari et al., 2017, 2019), como se muestra en la **Figura 36B**.

Implementamos este estudio no solamente con laminarina, sino también con paramilón y el  $\beta$ -glucano de pared celular de levadura (BG-PCL). Todos estos sustratos son  $\beta$ -1,3-glucanos, pero en el caso de laminarina y BG-PCL no son lineales, sino que también poseen ramificaciones  $\beta$ -1,6. La conformación tridimensional de laminarina y paramilón es de triple-hélice. En las concentraciones ensayadas, el único de los sustratos solubles es laminarina. Previamente ensayamos actividad enzimática con carboximetilcelulosa, un  $\beta$ -1,4-glucano, pero no observamos reacción en las condiciones ensayadas. Realizamos las curvas de saturación correspondientes para cada modelo cinético con cada uno de los sustratos descriptos (**Figura 36** C y D).



**Figura 36**. Curvas de saturación de los modelos utilizados. (**A**) Esquema de <sup>conv</sup>MM. Saturación de enzima incrementando la concentración de sustrato. Modificado de Kari et al., 2017. (**B**) Esquema de <sup>inv</sup>MM. Saturación de sustrato incrementando la concentración de enzima. Modificado de Kari et al., 2017. Ajuste <sup>conv</sup>MM (**C**) y <sup>inv</sup>MM (**D**) de *Egr*GH64 con laminarina (círculo, línea sólida), paramilón (cuadrado, línea rayada) y BC-PCL (triángulos, línea de puntos), relativizado a la máxima velocidad alcanzada para cada sustrato.

Los resultados de los ajustes y cálculos para ambos modelos se muestran en la Tabla 13.

 $K_{\rm M}$  es un parámetro que provee la concentración de sustrato a la cual se alcanza la mitad de la actividad máxima. Este fenómeno se encuentra determinado por cuán rápido el complejo enzima-sustrato se convierte en producto y en la afinidad por el sustrato. De esta manera, su valor se puede relacionar con la afinidad de la enzima por el sustrato. Con laminarina y paramilón observamos un  $K_{\rm M}$  similar, pero sorpresivamente observamos un valor significativamente menor con BG-PCL.

La constante catalítica ( $k_{cat}$ ) se obtiene de calcular la relación entre la actividad máxima y la concentración de enzima utilizada. Por esta razón, se interpreta como el máximo número de moléculas de un sustrato que una molécula de enzima puede convertir en producto por unidad de tiempo. El valor máximo lo encontramos con laminarina.

La relación entre los dos parámetros anteriores ( $k_{cat}/K_M$ ) se identifica como eficiencia enzimática (Koshland, 2002). En este apartado, la enzima mostró con BG-PCL presentó una eficiencia catalítica mayor que con los otros sustratos, con una diferencia de un orden de magnitud.

Adicionalmente, investigamos la cinética de estado estacionario con la enzima en exceso con <sup>inv</sup>MM. En este caso, la saturación representa la situación en la que cada sitio de ataque de la superficie del sustrato forma un complejo con la enzima. Previamente, se ha mostrado que la suposición de estado estacionario se puede usar para sustratos insolubles donde la enzima está en exceso. La deducción de las ecuaciones correspondientes se ha desarrollado previamente (Kari et al., 2017; Andersen et al., 2018). Observamos que fueron necesarias concentraciones de enzima más bajas para saturar BG-PCL que para paramilón o laminarina. En consecuencia, el parámetro  $\Gamma$  (que revela la capacidad de una enzima para ubicar sitios catalíticamente competentes en la superficie del sustrato), determinado para el polisacárido de levadura fue un orden de magnitud mayor al parámetro  $\Gamma$  calculado para los otros glucanos ensayados.

**Tabla 13.** Parámetros cinéticos de la *Egr*GH64 frente a distintos sustratos. Laminarina, paramilón y BG-PCL fueron analizados utilizando los ajustes de <sup>conv</sup>MM y <sup>inv</sup>MM. Los datos se presentan como media  $\pm$  SEM.

	K <sub>M</sub>	k <sub>cat</sub>	$k_{\rm cat}/K_{\rm M}$	<sup>enz</sup> K <sub>M</sub>	Г
	(mg.mL <sup>-1</sup> )	( <b>s</b> -1)	(mL.mg <sup>-1</sup> . s <sup>-1</sup> )	(µM)	(µmol.g <sup>-1</sup> )
Laminarina	$23 \pm 4$	$1,2 \pm 0,2$	$0,051 \pm 0,006$	$2,2 \pm 0,6$	$0,028 \pm 0,01$
Paramilón	$20 \pm 3$	$0,23 \pm 0,09$	$0,011 \pm 0,002$	$3,9 \pm 0,9$	$0,028 \pm 0,03$
BG-PCL	$2,1 \pm 0,4$	$0,88 \pm 0,07$	$0,42 \pm 0,07$	$1,5 \pm 0,4$	$0,31 \pm 0,12$

La actividad glucanasa sobre  $\beta$ -1,3-glucanos solubles e insolubles es una característica transversal a todas las enzimas GH64 caracterizadas. La preferencia de sustratos con este tipo de enlaces es clara, ya que ninguna de las GH64 estudiadas (incluyendo la *Egr*GH64) no evidenciaron actividad enzimática contra carboximetilcelulosa (Bai et al., 2021; Shrestha et al., 2011; Wang et al., 2021).

Es de destacar que todas las caracterizaciones encontradas en la literatura solo informan actividad máxima y en algunos casos sin detallar la concentración de proteína. Por esta razón, la comparación de los parámetros cinéticos con otras GH64 es un análisis cuya interpretación es limitada. Sin embargo, de nuestro trabajo surge información acerca de actividades relativas con distintos sustratos para una misma enzima. En este sentido, encontramos que muchas GH64 de diversos orígenes prefieren laminarina a otros sustratos insolubles ensayados, como por ejemplo curdlan (Palumbo et al., 2003; Kumagai et al., 2016; Bai et al., 2021). El curdlan es un  $\beta$ -1,3-glucano de alta masa molecular, insoluble y sin ramificaciones (grado de polimerización entre 135 y 455) extraído de *Alcaligenes faecalis* (Zhang & Edgar, 2014).

La GH64 de *K. flavida* es la única de esta familia que, previo a este trabajo, pudo ser caracterizada con paramilón. Esta enzima presenta actividad máxima con laminarina y un 1% de esta actividad contra el glucano de *E. gracilis*. Similar a lo encontrado en *Egr*GH64, la GH64 de *K. flavida* presenta un  $K_M$  de 21,1 mg.mL<sup>-1</sup> (Kumagai et al., 2016). Algunas GH64 evidenciaron mayor actividad enzimática contra sustratos insolubles. Entre ellas las glucanasas caracterizadas de *S. matensis* DIC-108 y *P. barengoltzii* que tienen 2 y 25 veces más actividad con curdlan que con laminarina, respectivamente (Shrestha et al., 2011; Qin et al., 2017). A partir de la estructura resuelta cristalográficamente de la enzima de *P. barengoltzii*, los autores hipotetizan que el

limitado espacio en el surco limita la ubicación de sustratos con ramificaciones  $\beta$ -1,6 (laminarina y BC-PCL presentan este tipo de uniones).

Por otro lado, la glucanasa de *Arthrobacter* sp. presenta una actividad similar con laminarina y BG-PCL (Doi et al., 1973). Distintivamente, la GH64 de *M. oryzae* Guy11 demostró preferencia por BG-PCL, mientras que la actividad de la misma enzima utilizando laminarina como sustrato decayó por debajo del 1% en relación a BG-PCL (Wang et al., 2021). Mediante un modelado molecular los autores de este último trabajo mostraron que el tamaño del sitio activo es mayor al de *P. barengoltzii* lo que permitiría degradar polisacáridos con ramificaciones.

De forma comparable a estas dos últimas glucanasas, *Egr*GH64 presenta mayor eficiencia catalítica para BG-PCL frente a laminarina y paramilón. Teniendo en cuenta el modelado presentado (**Figura 33**), no observamos diferencias sustanciales en el tamaño del lado cóncavo de la estructura de *Egr*GH64 en comparación a las estructuras cristalizadas.

Este enfoque, que incluye <sup>inv</sup>MM, aporta herramientas para estudiar sistemas con características especiales, que involucran sustratos con incertidumbre en su masa molecular y desconocimiento del número de sitios de ataque. Si bien se desarrolló en el contexto del estudio de enzimas involucradas en la degradación de la celulosa, también se ha aplicado a otro polímero: el tereftalato de polietileno (PET) (Bååth et al., 2021). En este sentido, decidimos exportar este enfoque a la caracterización de *Egr*GH64 con sustratos  $\beta$ -1,3-glucanos de nuestro interés. Para nuestro conocimiento, es la primera vez que se lo utiliza con este tipo de polisacáridos.

El mayor valor de  $\Gamma$  observado para BG-PCL, en comparación a laminarina y paramilón, se interpreta como una mayor cantidad de sitios de catálisis disponibles para *Egr*GH64. Este dato, puede aportar una explicación al menor valor de  $K_{\rm M}$  de BG-PCL, ya que al reconocer más sitios hay mayor afinidad para realizar la hidrólisis.

#### Análisis de los productos de hidrólisis de EgrGH64

Teniendo en cuenta que evidenciamos la actividad  $\beta$ -1,3-glucanasa de la *Egr*GH64 mediante la cuantificación de extremos reductores, decidimos evaluar cuál es el patrón de productos de hidrólisis. Para esto realizamos digestiones de laminarina y paramilón tomando muestras a distintos tiempos. Como se muestra en la **Figura 37**, mediante TLC observamos que el producto de menor tamaño de la degradación de ambos sustratos es el pentasacárido (laminaripentaosa). La intensidad de señal aumenta conforme avanza el tiempo de reacción y es mayor en el caso de laminarina que en la degradación de paramilón. Esto último es de esperar si tenemos en cuenta la mayor  $k_{cat}$  y eficiencia enzimática que tiene *Egr*GH64 utilizando laminarina



**Figura 37**. TLC de los productos de hidrólisis de *Egr*GH64 utilizando laminarina (**A**) y paramilón (**B**) como sustratos. La mezcla de reacción se realizó con 25 mg.mL<sup>-1</sup> de los sustratos en *buffer* acetato de sodio pH 4,5 50 mM. **S**, marcadores (**G**, glucosa; **L2**, laminaribiosa; **L3**, laminaritriosa; **L4**, laminaritetrosa; **L5**, laminaripentaosa; **L6**, laminarihexaosa); Incubación por 15 min (**1**), 30 min (**2**), 60 min (**3**), 120 min (**4**), 180 min (**5**).

En la base de datos CAZy existen distintas familias cuya principal actividad enzimática reportada es  $\beta$ -1,3-glucanasa, como es el caso de GH5, GH16, GH17, GH55, GH64, GH81, GH128, GH152, GH157, GH158, entre otras (Lombard et al., 2014). Una característica distintiva de la familia GH64 se observa al analizar los productos de hidrólisis: todas las GH64 caracterizadas evidencian como principal producto de hidrólisis la laminaripentaosa (Doi et al., 1973; Nakabayashi et al., 1998; Kumagai et al., 2016; Qin et al., 2017; Wang et al., 2021; Bai et al., 2021). Sin embargo, en algunas GH64 se pueden observar como producto secundario laminarisacáridos de menor grado de polimerización (Woo et al., 2014; Krishnan et al., 2019). La *Egr*GH64 muestra el patrón clásico de esta familia de glicosil hidrolasas sin evidenciar productos de menor tamaño que el pentasacárido.

#### Efecto antifúngico de EgrGH64

Debido a los resultados obtenidos para BG-PCL (principalmente la elevada eficiencia catalítica para degradar el mismo) decidimos evaluar el efecto antifúngico de *Egr*GH64 directamente sobre una levadura. En el laboratorio contamos con *Kluyveromyces lactis*: una levadura considerada GRAS (generalmente considerada como segura) ampliamente utilizada en investigación básica y en la industria biotecnológica para producir metabolitos y proteínas heterólogas (Spohner et al., 2016). La pared celular de *K. lactis* está compuesta principalmente por 2 tipos de macromoléculas: polisacáridos, un alto contenido de  $\beta$ -1,3- y  $\beta$ -1,6- glucanos; y proteínas de distinto tipo (Backhaus et al., 2010). Características similares se observan en la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae* (Nguyen et al., 1998; Garcia-Rubio et al., 2020).

Realizamos un ensayo previamente utilizado para evaluar el efecto antifúngico de glucanasas: como se describió previamente, se incubó *K. lactis* con concentraciones variables de *Egr*GH64 y esta mezcla se sembró en placa de petri. Como se observa en la **Figura 38**, el conteo de las colonias resultantes evidencia una disminución en la viabilidad dependiente de la dosis de *Egr*GH64. Utilizando 0,5 mg.mL<sup>-1</sup> de *Egr*GH64 el grado de inhibición fue de aproximadamente 40% respecto al control. Más aún, la enzima inhibió entre 80% y 60% la viabilidad de la levadura a una concentración de 1,0 mg.mL<sup>-1</sup> (15,4  $\mu$ M).



**Figura 38**. Inhibición de la viabilidad de *K. lactis* en función de la concentración de *Egr*GH64. Las levaduras se incubaron con distintas concentraciones en *buffer* citrato de sodio (pH 4,5) a 50°C. (A) Placa de petri de *K. lactis* previamente incubado en ausencia de *Egr*GH64. (B) Placa de petri con *K. lactis* previamente incubado con *Egr*GH64 (4,0 mg.mL<sup>-1</sup>). (C) Curva de inhibición de la viabilidad (número de colonias vs concentración de *Egr*GH64).

Previamente, se estudió para  $\beta$ -1,3-endoglucanasas el efecto inhibitorio del crecimiento de levaduras y hongos, que se debería a su capacidad de hidrolizar  $\beta$ -1,3-polisacáridos, degradando la pared celular (de la Cruz et al., 1995; Hong & Meng, 2003; Caseiro et al., 2022). Esta característica ha llevado a muchas  $\beta$ -1,3-endoglucanasas a ser evaluadas como posibles agentes de biocontrol (no químico) contra patógenos en cultivos (El-Shora et al., 2021). Particularmente, una enzima perteneciente a la familia GH64 mostró inhibición en la germinación de conidios y en la formación de apresorios (estructura de las hifas especializada en la infección) de *Magnaporthe oryzae* (Wang et al., 2021). Debido a que no se han observado efectos citotóxicos de  $\beta$ -1,3-glucanasas en células animales, se ha propuesto utilizar esta actividad antifúngica como un potencial tratamiento contra infecciones fúngicas patógenas. La GH64 de *Streptomyces matensis* mostró una inhibición del crecimiento mayor al 60% en *Candida albicans* trabajando con 2  $\mu$ M de enzima y utilizando la misma metodología que en el presente trabajo (Woo et al., 2014). De igual manera, la GH64 de *Cellulosimicrobium funkei* (1,8  $\mu$ M) inhibió en un 80% el crecimiento de *C. albicans* (Bai et al., 2021).

Por esta razón, considerando la marcada inhibición en la viabilidad de *K. lactis* por *Egr*GH64 de manera dosis-dependiente y los antecedentes observados en otras enzimas de la familia, sería interesante continuar la investigación del efecto antifúngico en patógenos humanos (por ejemplo, género *Candida*) y también trabajar en la generación de plantas transgénicas sobre-expresantes de *Egr*GH64 para evaluar la tolerancia al estrés biótico provocado por patógenos fúngicos de plantas.

#### Procesividad

Se entiende por procesividad a la habilidad de determinadas glucanasas por permanecer unidas al sustrato entre reacciones hidrolíticas consecutivas (Davies & Henrissat, 1995). Esto implica una ventaja, ya que la enzima evita pasos de disociación y asociación entre reacciones de catálisis (van Dongen et al., 2014).

Determinar si una enzima es procesiva no es una tarea sencilla, debido a que diferentes formas de acción pueden dar lugar al mismo producto de hidrólisis (Horn et al., 2012). Uno de los métodos más utilizados consiste en realizar una reacción de hidrólisis del sustrato insoluble, y posteriormente cuantificar los extremos reductores en fase soluble e insoluble y calcular una relación entre ambos valores. Esta técnica se basa en la suposición de que las exo-glucanasas (que presentan mono y/o disacáridos como productos de hidrólisis) siempre son procesivas y generan extremos reductores solubles. Este modo de acción se encuentra asociado con disposición tipo-tunel que presentan este tipo de enzimas (Rouvinen et al., 1990; Divne et al., 1994; S. Wu & Wu, 2020).

En el caso de las endo-glucanasas, que pueden ser procesivas o no, podemos distinguir analizando la relación de concentraciones de extremos reductores en la fracción soluble y en la fracción insoluble. Las endo-glucanasas no procesivas hidrolizan el sustrato en lugares aleatorios, generando extremos reductores solubles e insolubles, la relación en este caso es cercana a uno. Por otro lado, las endo-glucanasas procesivas realizan cortes solamente en el extremo del sustrato (Irwin et al., 1993; X.-Z. Zhang et al., 2010).

En nuestro caso, realizamos la hidrolisis del paramilón con *Egr*GH64 y luego de detener la reacción centrifugamos la muestra para separar las fases soluble e insoluble. Luego de cuantificar los azúcares reductores en ambas fases calculamos la relación indicativa de procesividad. Con esta metodología, obtuvimos el perfil de azúcares reductores mostrado en la **Figura 39** y una relación de 7,5.



**Figura 39**. Ensayo de procesividad de *Egr*GH64 en paramilón. Concentración de azúcares reductores producido en la fracción soluble e insoluble.

Este valor de 7,5 de relación se corresponde con lo informado por otros autores en el estudio de endo-glucanasas. Por ejemplo, en el estudio de una endo-glucanasa de la familia GH5, se informó una relación de 3,4 como endo-glucanasa procesiva (W. Wang et al., 2019). En este sentido, otro grupo de trabajo, caracterizando enzimas de la familia GH9 determinó que la mayoría de endo-glucanasas procesivas presentaron una relación entre 3,1 y 10,3 (Chiriac et al., 2010; Zhang et al., 2010; Horn et al., 2012).

Es importante remarcar que este tipo de análisis no fue previamente utilizado para otros miembros de la familia GH64, por lo que consideramos que este trabajo es el primero en aportar información acerca del modo de acción de las enzimas de esta familia. Algunos autores señalan que el modo de acción procesivo depende, no solamente de la enzima, sino también del sustrato. Algunos polímeros pueden presentar sus sitios de corte internos en formas más accesibles que otros, modificando los resultados de este tipo de ensayos. En este sentido, es importante resaltar que este tipo de ensayos se han realizado ampliamente con sustratos celulósicos, pero nunca con  $\beta$ -1,3-glucanos como el paramilón. Sería de interés cuantificar la relación de extremos solubles/insolubles con enzimas de actividad exo-glucanasa en paramilón con el objeto de tener un valor de comparación.

## Inmunolocalización EgrGH64 en E. gracilis

Con el objeto de obtener anticuerpos específicos contra *Egr*GH64 realizamos la inmunización de un conejo hembra de raza neozolandesa de 14 semanas de edad. Se implementó un protocolo de 4 inoculaciones de *Egr*GH64 purificada en el Centro de Medicina Comparada del Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (CMC-ICIVET Litoral). El suero obtenido del sacrificio del animal fue evaluado mediante dot-blot para conocer el título de este. Posteriormente, realizamos un western-blot de extractos totales de *E. gracilis* obtenida de distintas condiciones de cultivo. De esta manera, observamos una banda más notoria de ≈65 kDa, condiciéndose con el tamaño predicho y la migración de la proteína recombinante purificada. Sin embargo, como aún se diferenciaban otras bandas de menor intensidad de menor tamaño, realizamos una inmunopurificación del suero inmovilizando *Egr*GH64 recombinante en una membrana de nitrocelulosa. La inmunodetección utilizando el anticuerpo primario purificado mostró una importante mejora al analizar extractos de *E. gracilis*.

Para tener información de las condiciones en las que *Egr*GH64 se expresa en *E. gracilis*, evaluamos extractos totales obtenidos de distintos cultivos (**Figura 40**). De esta manera pudimos observar señal de reconocimiento de una banda con la migración correspondiente a una proteína de ~65 kDa en las células de los cultivos heterotróficos y anaerobiosis. Otras dos bandas de menor tamaño (~40 y ~50 kDa) se observaron en estas dos muestras. Llamativamente, no observamos señal de reconocimiento en los dos cultivos autotróficos.

En paralelo, decidimos analizar las mismas muestras con suero con reconocimiento por la GH17 de *E. gracilis (Egr*GH17) para tener un panorama más amplio del uso de glicosil hidrolasas en este microorganismo. Esta enzima tiene un tamaño predicho de  $\approx$ 45 kDa y este es el tamaño de la principal banda observada en la placa de revelado. También observamos una banda secundaria entre 20 y 30 kDa. El perfil de la placa utilizando este suero como anticuerpo primario es similar para las cuatro condiciones de cultivo evaluadas. Este suero había sido previamente examinado en el grupo de trabajo en la fracción soluble de lisados de *E. gracilis* mostrando una banda única de  $\approx$ 45 kDa. En la **Figura 40** también mostramos una foto de la tinción con *Rojo Ponceau* como control de carga en el experimento.



**Figura 40**. Western-blot con anticuerpos específicos anti-*Egr*GH64 (conejo) y anti-*Egr*GH17 (conejo) de extractos totales de células de *E. gracilis* crecidas en distintas condiciones. (**Ana**) Anaerobiosis; (**Het**) Heterotrofico. (**Aut Osc**) Autotrófico + período oscuridad; (**Aut Luz**) Autrotrófico en período de luz. En el panel inferior se muestra una foto de la tinción de la membrana con *Rojo Ponceau*.

Este ensayo muestra que la abundancia intracelular de *Egr*GH64 es regulada dependiendo de la condición de cultivo. De forma contraria, *Egr*GH17 presentó un patrón similar en las condiciones ensayadas. Esto sugiere una función distintiva de ambas glicosil hidrolasas.

En condiciones autotróficas se observa una variación en el contenido de paramilón en función del ciclo de luz/oscuridad. Cuando la maquinaria fotosintética se encuentra en funcionamiento (período de luz) el poder reductor es utilizado para producir Glc, aumentando el contenido de paramilón. En el período de oscuridad, la célula consume paramilón almacenado para suplir los requerimientos energéticos disminuyendo el contenido del polímero de reserva en esta condición (Cook, 1966). Estas dos situaciones se encuentran plasmadas en nuestro diseño experimental como **Aut Luz y Aut Osc (Figura 40**). Sin embargo, no pudimos observar señal correspondiente a *Egr*GH64 en estas condiciones.

La máxima proporción de paramilón por célula fue informada en condiciones de crecimiento heterotrófico en *E. gracilis* sin modificar y mutantes espontaneas sin maquinaria fotosintética (Barsanti et al., 2001). La heterotrofia fue utilizada para cultivar las células y el posterior análisis por western blot se muestra en la **Figura 40** como **Het.** Es posible que en esta

condición se genere una dinámica de síntesis y degradación del polímero, en la cual sea necesaria la presencia de *Egr*GH64.

Para lograr la condición de anaerobiosis (**Ana**) células crecidas en heterotrofia fueron lavadas y cultivadas en un medio sin fuente de carbono en oscuridad. De esta manera, se induce a las células a obtener energía del polímero de reserva. La señal de detección en esta calle se condice con la hipótesis de que *Egr*GH64 participa en la degradación del paramilón: actuando directamente sobre el polímero o sobre los productos de hidrólisis de este.

Para obtener un mayor entendimiento del rol de *Egr*GH64 en *E. gracilis* sería interesante analizar diversos puntos temporales en las condiciones de cultivo, complementado con sueros que tengan reconocimiento con otras endo y exo  $\beta$ -1,3-glucansas.

Conclusiones

### CONCLUSIONES

En los objetivos del presente trabajo nos propusimos, en términos generales, estudiar algunas vías dentro del metabolismo de partición de carbono fotoasimilado y su relación a otras vías metabólicas como la redox mediante la caracterización enzimática y estructural de enzimas involucradas. Utilizando este enfoque, estudiamos una enzima clave en la síntesis de una molécula antioxidante (*Egr*GCL) y dos enzimas implicadas en el proceso de transformación de paramilón en glucosa u otros di- y oligosacáridos (*Egr*GH149 y *Egr*GH64). Durante el transcurso de la tesis, implementamos técnicas *in vitro*, *in vivo* e *in silico* que nos permitieran aportar información relevante para cada una de las proteínas y su papel en el metabolismo de *E. gracilis*.

Mediante una exhaustiva búsqueda bioinformática identificamos un mensajero maduro codificante para el dominio catalítico de una GCL. Sin embargo, no encontramos ningún transcripto codificante para la subunidad regulatoria. Esta ausencia es la esperada para una GCL de origen protista. Realizamos un análisis del transcripto de interés y, además del dominio GCL en el N-terminal, un dominio perteneciente a la familia de questina oxidasa en el C-terminal. Los predictores empleados indican una ubicación citoplasmática del polipéptido. Por alineamiento de secuencia y modelado molecular determinamos los aminoácidos necesarios y suficientes para obtener el dominio GCL catalítico funcional. Con esta información, encargamos un gen sintético codificante para EgrGCL. Realizamos la expresión recombinante en E. coli y una cromatografía IMAC como purificación. Por medio de cromatografía de exclusión molecular observamos elusión de EgrGCL correspondiente a una conformación monomérica. En el modelado molecular realizado, esta enzima presentó una estructura terciaria similar a otras GCL cristalizadas. Los aminoácidos reportados como relevantes en la interacción con Glu y ADP se encuentran conservados y el sitio activo se localiza en una serie de láminas- $\beta$  anti-paralelas. Medimos actividad enzimática cuantificando liberación de Pi por método verde de malaquita. EgrGCL evidenció actividad enzimática empleando Glu, Cys y ATP como sustrato y Mg<sup>2+</sup> como cofactor en las condiciones ensayadas. Realizamos curvas de saturación para los tres sustratos y calculamos los parámetros cinéticos correspondientes. Estos valores son comparables a otras GCL caracterizadas del grupo 2. De esta manera, este estudio aporta información relevante en la asignación secuencia-función de EgrGCL. A nuestro conocimiento, esta enzima es una de las primeras enzimas del metabolismo redox en ser producida recombinante y estudiada cinéticamente.

Con el objeto de recolectar información sobre la fosforólisis en *E. gracilis*, seleccionamos a EgrGH149, una enzima perteneciente a una familia de fosforilasas recientemente reportada. A partir de un gen sintético codificante para EgrGH149 realizamos la expresión y purificación adaptando el protocolo reportado previamente. Esto nos permitió obtenerla en forma soluble y activa. La elevada producción de la proteína recombinante y los dos procedimientos

cromatográficos utilizados en su obtención nos permitieron trabajar con una muestra de elevada pureza apta para su posterior caracterización. Mediante cromatografía de exclusión molecular analítica, demostramos que EgrGH149 presenta una estructura cuaternaria homodimérica. Realizamos un modelado molecular contemplando esta información en el cual pudimos identificar los dominios característicos de la familia GH149. Comparamos las penalizaciones termodinámicas de unión de laminarisacáridos al sitio activo putativo y a la superficie de unión a oligosacáridos mediante dinámica molecular. El primero disminuye la afinidad conforme crece el oligosacárido de manera análoga a los ensayos cinéticos y el segundo presentó menor penalización con el hexasacárido. Los ensayos de mutagénesis sitio dirigida corroboraron que el sitio predicho como catalítico cumple una función crucial en fosforólisis y fosforólisis inversa. Caracterizamos también cinéticamente a EgrGH149 en ambos sentidos de reacción, previa determinación de las condiciones óptimas de reacción. En ambos casos esta enzima demostró una mayor eficiencia catalítica a medida que el grado de polimerización disminuía. La enzima es específica para la utilización de  $\beta$ -1,3-glucanos de baja masa molecular. Confirmamos que EgrGH149 utiliza un mecanismo de reacción con inversión de la configuración anomérica. Esta enzima no presentó actividad ni capacidad de unión a laminarina y paramilón, indicando que la misma solo tendría función en E. gracilis usando laminarisacáridos de baja masa molecular o glucosa como sustratos. Mediante microscopía confocal observamos señal en el citosol formando agrupaciones más intensas en las inmediaciones de los gránulos de paramilón. Todos estos datos se encuentran en la línea de que EgrGH149 actúa sobre laminarisacáridos, principalmente los de menor grado de polimerización. Por esta razón, otras enzimas deberían actuar directamente sobre el paramilón. En este sentido, decidimos incluir en el análisis de esta tesis una endo-glucanasa que pudiera estar involucrada directamente en la hidrólisis del paramilón.

Mediante una búsqueda bioinformática, identificamos un transcripto codificante para una putativa  $\beta$ -1,3-endoglucanasa en el transcriptoma de *E. gracilis*. A través de síntesis *de novo* obtuvimos este gen y realizamos su expresión en *E. coli* BL21(DE3) con una etiqueta de histidinas en el N-terminal. Ensayamos distintas estrategias de expresión debido a la dificultad para expresar *Egr*GH64 en forma soluble y activa. La implementación de un medio de cultivo rico suplementado con etanol permitió expresar una cantidad suficiente de proteína en solución para que la purificación tenga buenos rendimientos. Esta purificación constó de dos etapas: IMAC y cromatografía de exclusión molecular. Obtuvimos un modelado de *Egr*GH64 con buenas puntuaciones de evaluación de estructuras predichas. Los análisis sobre este modelo mostraron una conservación en los dominios principales y los aminoácidos catalíticos descriptos previamente en la familia GH64 con un posible plegamiento  $\beta$ -sandwich en el dominio Cterminal. La proteína purificada exhibió actividad enzimática con  $\beta$ -1,3-glucanos de distintas características (laminarina, paramilón y BG-PCL), sin poder hidrolizar  $\beta$ -1,4-glucanos. Las condiciones óptimas de reacción se establecieron a pH 4,0-5,0 y 50°C. El principal producto de

Conclusiones

hidrólisis de laminarina y paramilón fue laminaripentaosa, de igual manera a lo observado en la mayoría de las GH64. Implementamos un enfoque de caracterización cinética que más adecuado que el clásico para el trabajo con sustratos poliméricos e insolubles basado en realizar dos tipos de ajustes. La eficiencia catalítica de esta enzima mostró el siguiente patrón: paramilón < laminarina < BG-PCL. Este patrón refleja el menor valor de  $K_{\rm M}$  para BG-PCL en comparación a los otros dos sustratos. De esta manera, pudimos observar que EgrGH64 reconoce la misma densidad de sitios de ataque en laminarina y paramilón, mientras que este valor es mayor en BG-PCL. También mostramos que el patrón de azucares reductores soluble e insolubles generados se corresponde con el de endoglucanasas procesivas. Evidenciamos la presencia de esta enzima por western-blot en cultivos heterotróficos y en condiciones de anaerobiosis utilizando anticuerpos específicos. Observamos una significativa capacidad de EgrGH64 para disminuir la viabilidad de K. lactis de forma dosis dependiente en las condiciones evaluadas. EgrGH64 es la primer  $\beta$ -1,3-endoglucanasa de *E. gracilis* producida en forma recombinante usando un sistema de expresión procariota. Su caracterización soporta la idea de que, in vivo, se encuentra involucrada en el metabolismo del paramilón. Esto podría ser hidrolizando directamente este polímero y/o actuando sobre productos de hidrólisis de este (laminarisacáridos).

En los últimos años, ha crecido el interés en *E. gracilis* debido a su potencial comercial y tecnológico, y con esto se han incrementado significativamente los trabajos científicos que buscan entender su metabolismo. Sin embargo, la información en el área de la enzimología aún es limitada, por eso consideramos que el enfoque empleado en el presente trabajo es adecuado para ayudar al entendimiento de este euglénido. Consideramos que los estudios realizados en *Egr*GCL, *Egr*GH149 y *Egr*GH64 aportan información valiosa sobre el repertorio enzimático de *E. gracilis*.

Bibliografía

# **BIBLIOGRAFÍA**

Abbott, J. J., Ford, J. L., & Phillips, M. A. (2002). Substrate Binding Determinants of *Trypanosoma brucei* γ-Glutamylcysteine Synthetase. *Biochemistry*, *41*(8), 2741-2750. https://doi.org/10.1021/bi0159128

Adl, S. M., Simpson, A. G. B., Lane, C. E., Lukeš, J., Bass, D., Bowser, S. S., Brown, M.
W., Burki, F., Dunthorn, M., Hampl, V., Heiss, A., Hoppenrath, M., Lara, E., le Gall, L., Lynn,
D. H., McManus, H., Mitchell, E. A. D., Mozley-Stanridge, S. E., Parfrey, L. W., ... Spiegel, F.
W. (2012). The Revised Classification of Eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, *59*(5),
429-514. https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2012.00644.x

Adl, S. M., Bass, D., Lane, C. E., Lukeš, J., Schoch, C. L., Smirnov, A., Agatha, S., Berney, C., Brown, M. W., Burki, F., Cárdenas, P., Čepička, I., Chistyakova, L., Campo, J., Dunthorn, M., Edvardsen, B., Eglit, Y., Guillou, L., Hampl, V., ... Zhang, Q. (2019). Revisions to the Classification, Nomenclature, and Diversity of Eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, *66*(1), 4-119. https://doi.org/10.1111/jeu.12691

Agostino, M., Jene, C., Boyle, T., Ramsland, P. A., & Yuriev, E. (2009). Molecular Docking of Carbohydrate Ligands to Antibodies: Structural Validation against Crystal Structures. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 49(12), 2749-2760. https://doi.org/10.1021/ci900388a

Aich, P., Patra, M., Chatterjee, A. K., Roy, S. S., & Basu, T. (2012). Calcium Chloride Made E. coli Competent for Uptake of Extraneous DNA Through Overproduction of OmpC Protein. *The Protein Journal*, *31*(5), 366-373. https://doi.org/10.1007/s10930-012-9411-z

Akram, F., & Haq, I. ul. (2020). Overexpression and characterization of TnCel12B, a hyperthermophilic GH12 endo-1,4-β-glucanase cloned from Thermotoga naphthophila RKU-10T. *Analytical Biochemistry*, 599, 113741. https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113741

Alves, A. A., Gabriel, H. B., Bezerra, M. J. R., de Souza, W., Vaughan, S., Cunha-e-Silva, N. L., & Sunter, J. D. (2020). Control of assembly of extra-axonemal structures: The paraflagellar rod of trypanosomes. *Journal of Cell Science*, *133*(10), jcs242271. https://doi.org/10.1242/jcs.242271

Andersen, M., Kari, J., Borch, K., & Westh, P. (2018). Michaelis–Menten equation for degradation of insoluble substrate. *Mathematical Biosciences*, 296, 93-97. https://doi.org/10.1016/j.mbs.2017.11.011

Aoe, S., Yamanaka, C., & Mio, K. (2021). Microarray Analysis of Paramylon, Isolated from Euglena Gracilis EOD-1, and Its Effects on Lipid Metabolism in the Ileum and Liver in Diet-Induced Obese Mice. *Nutrients*, *13*(10), 3406. https://doi.org/10.3390/nu13103406

Ariede, M. B., Candido, T. M., Jacome, A. L. M., Velasco, M. V. R., de Carvalho, J. C. M., & Baby, A. R. (2017). Cosmetic attributes of algae—A review. *Algal Research*, *25*, 483-487. https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.05.019

Ariyanayagam, M. (2001). Ovothiol and trypanothione as antioxidants in trypanosomatids. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *115*(2), 189-198. https://doi.org/10.1016/S0166-6851(01)00285-7

Arndt, C., Koristka, S., Bartsch, H., & Bachmann, M. (2012). Native Polyacrylamide Gels. En B. T. Kurien & R. H. Scofield (Eds.), *Protein Electrophoresis* (Vol. 869, pp. 49-53). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-821-4\_5

Avilés, C., Torres-Márquez, M. E., Mendoza-Cózatl, D., & Moreno-Sánchez, R. (2005). Time-course development of the Cd2+ hyper-accumulating phenotype in Euglena gracilis. *Archives of Microbiology*, *184*(2), 83-92. https://doi.org/10.1007/s00203-005-0013-4

Bååth, J. A., Borch, K., Jensen, K., Brask, J., & Westh, P. (2021). Comparative Biochemistry of Four Polyester (PET) Hydrolases\*\*. *ChemBioChem*, 22(9), 1627-1637. https://doi.org/10.1002/cbic.202000793

Backhaus, K., Heilmann, C. J., Sorgo, A. G., Purschke, G., de Koster, C. G., Klis, F. M., & Heinisch, J. J. (2010). A systematic study of the cell wall composition of Kluyveromyces lactis. *Yeast*, *27*(8), 647-660. https://doi.org/10.1002/yea.1781

Bai, L., Kim, J., Son, K.-H., Shin, D.-H., Ku, B.-H., Kim, D. Y., & Park, H.-Y. (2021). Novel Anti-Fungal d-Laminaripentaose-Releasing Endo-β-1,3-glucanase with a RICIN-like Domain from Cellulosimicrobium funkei HY-13. *Biomolecules*, *11*(8), 1080. https://doi.org/10.3390/biom11081080

Barik, A., Katuwawala, A., Hanson, J., Paliwal, K., Zhou, Y., & Kurgan, L. (2020). DEPICTER: Intrinsic Disorder and Disorder Function Prediction Server. *Journal of Molecular Biology*, *432*(11), 3379-3387. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.12.030

Barras, D. R., & Stone, B. A. (1969a). β-1,3-Glucan hydrolases from Euglena gracilis. I. The nature of the hydrolases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology*, *191*(2), 329-341. https://doi.org/10.1016/0005-2744(69)90252-6

Barras, D. R., & Stone, B. A. (1969b). β-1,3-glucan hydrolases from Euglena gracilis. II. Purification and properties of the β-1,3.glucan exo-hydrolase. *Biochimica et Biophysica Acta* (*BBA*) - *Enzymology*, 191(2), 342-353. https://doi.org/10.1016/0005-2744(69)90253-8

Barsanti, L., Vismara, R., Passarelli, V., & Gualtieri, P. (2001). Paramylon ( $\beta$ -1,3-glucan) content in wild type and WZSL mutant of Euglena gracilis. Effects of growth conditions. *Journal of Applied Phycology*, *13*(1), 59-65. https://doi.org/10.1023/A:1008105416065

Barsanti & Gualtieri. (2019). Paramylon, a Potent Immunomodulator from WZSL Mutant of Euglena gracilis. *Molecules*, 24(17), Article 17. https://doi.org/10.3390/molecules24173114

Baumer, D., Preisfeld, A., & Ruppel, H. G. (2001). ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF PARAMYLON SYNTHASE FROM EUGLENA GRACILIS (EUGLENOPHYCEAE)1. *Journal of Phycology*, *37*(1), 38-46. https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2001.037001038.x

Benkert, P., Künzli, M., & Schwede, T. (2009). QMEAN server for protein model quality estimation. *Nucleic Acids Research*, *37*(suppl\_2), W510-W514. https://doi.org/10.1093/nar/gkp322

Benkert, P., Biasini, M., & Schwede, T. (2011). Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics*, 27(3), 343-350. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq662

Berrow, N. S., Alderton, D., Sainsbury, S., Nettleship, J., Assenberg, R., Rahman, N., Stuart, D. I., & Owens, R. J. (2007). A versatile ligation-independent cloning method suitable for high-throughput expression screening applications. *Nucleic Acids Research*, *35*(6), e45-e45. https://doi.org/10.1093/nar/gkm047

Biasini, M., Bienert, S., Waterhouse, A., Arnold, K., Studer, G., Schmidt, T., Kiefer, F., Cassarino, T. G., Bertoni, M., Bordoli, L., & Schwede, T. (2014). SWISS-MODEL: Modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Research*, 42(W1), W252-W258. https://doi.org/10.1093/nar/gku340

Biterova, E. I., & Barycki, J. J. (2009). Mechanistic Details of Glutathione Biosynthesis Revealed by Crystal Structures of Saccharomyces cerevisiae Glutamate Cysteine Ligase. *Journal* of Biological Chemistry, 284(47), 32700-32708. https://doi.org/10.1074/jbc.M109.025114

Biterova, E. I., & Barycki, J. J. (2010). Structural Basis for Feedback and Pharmacological Inhibition of Saccharomyces cerevisiae Glutamate Cysteine Ligase. *Journal of Biological Chemistry*, 285(19), 14459-14466. https://doi.org/10.1074/jbc.M110.104802

Boraston, A. B., Bolam, D. N., Gilbert, H. J., & Davies, G. J. (2004). Carbohydratebinding modules: Fine-tuning polysaccharide recognition. *Biochemical Journal*, *382*(3), 769-781. https://doi.org/10.1042/BJ20040892

Bourne, Y., & Henrissat, B. (2001). Glycoside hydrolases and glycosyltransferases: Families and functional modules. *Current Opinion in Structural Biology*, *11*(5), 593-600. https://doi.org/10.1016/S0959-440X(00)00253-0

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254. https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3

Bragatto, I., Genta, F. A., Ribeiro, A. F., Terra, W. R., & Ferreira, C. (2010). Characterization of a  $\beta$ -1,3-glucanase active in the alkaline midgut of Spodoptera frugiperda larvae and its relation to  $\beta$ -glucan-binding proteins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 40(12), 861-872. https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2010.08.006 Breuil, C., & Saddler, J. N. (1985). Comparison of the 3,5-dinitrosalicylic acid and Nelson-Somogyi methods of assaying for reducing sugars and determining cellulase activity. *Enzyme and Microbial Technology*, 7(7), 327-332. https://doi.org/10.1016/0141-0229(85)90111-5

Buetow, D. E. (1962). Differential effects of temperature on the growth of Euglena gracilis. *Experimental Cell Research*, 27(1), 137-142. https://doi.org/10.1016/0014-4827(62)90051-4

Buetow, D. E. (1982). *The Biology of Euglena*. Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-139903-0.X5001-X

Burki, F. (2014). The Eukaryotic Tree of Life from a Global Phylogenomic Perspective. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *6*(5), a016147-a016147. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016147

Burrell, M. M. (1993). *Enzymes of Molecular Biology* (Vol. 16). Humana Press. https://doi.org/10.1385/0896032345

Campbell, D. A., Thomas, S., & Sturm, N. R. (2003). Transcription in kinetoplastid protozoa: Why be normal? *Microbes and Infection*, *5*(13), 1231-1240. https://doi.org/10.1016/j.micinf.2003.09.005

Caseiro, C., Dias, J. N. R., de Andrade Fontes, C. M. G., & Bule, P. (2022). From Cancer Therapy to Winemaking: The Molecular Structure and Applications of  $\beta$ -Glucans and  $\beta$ -1, 3-Glucanases. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(6), 3156. https://doi.org/10.3390/ijms23063156

Cavalier-Smith, T. (2010). Kingdoms Protozoa and Chromista and the eozoan root of the eukaryotic tree. *Biology Letters*, 6(3), 342-345. https://doi.org/10.1098/rsbl.2009.0948

Cavalier-Smith, T. (2016). Higher classification and phylogeny of Euglenozoa. *European Journal of Protistology*, *56*, 250-276. https://doi.org/10.1016/j.ejop.2016.09.003

Chen, Y., Shertzer, H. G., Schneider, S. N., Nebert, D. W., & Dalton, T. P. (2005). Glutamate Cysteine Ligase Catalysis. *Journal of Biological Chemistry*, 280(40), 33766-33774. https://doi.org/10.1074/jbc.M504604200

Chen, Y., & Huang, G. (2021). Flagellum Malfunctions Trigger Metaboly as an Escape Strategy in *Euglena gracilis. Journal of Eukaryotic Microbiology*, *68*(3). https://doi.org/10.1111/jeu.12842

Chen, Z., Zhu, J., Du, M., Chen, Z., Liu, Q., Zhu, H., Lei, A., & Wang, J. (2022). A Synthetic Biology Perspective on the Bioengineering Tools for an Industrial Microalga: Euglena gracilis. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *10*, 882391. https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.882391 Chhetri, G., Kalita, P., & Tripathi, T. (2015). An efficient protocol to enhance recombinant protein expression using ethanol in Escherichia coli. *MethodsX*, *2*, 385-391. https://doi.org/10.1016/j.mex.2015.09.005

Chiriac, A. I., Cadena, E. M., Vidal, T., Torres, A. L., Diaz, P., & Javier Pastor, F. I. (2010). Engineering a family 9 processive endoglucanase from Paenibacillus barcinonensis displaying a novel architecture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *86*(4), 1125-1134. https://doi.org/10.1007/s00253-009-2350-8

Christaki, E., Florou-Paneri, P., & Bonos, E. (2011). Microalgae: A novel ingredient in nutrition. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 62(8), 794-799. https://doi.org/10.3109/09637486.2011.582460

Clayton, C. (2016). Gene expression in Kinetoplastids. *Current Opinion in Microbiology*, 32, 46-51. https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.04.018

Coleman, L. W., Rosen, B. H., & Schwartzbach S. D. (1988). Environmental Control of Carbohydrate and Lipid Synthesis in Euglena. *Plant and Cell Physiology*. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a077510

Cook, J. R. (1966). Photosynthetic Activity during the Division Cycle in Synchronized *Euglena gracilis. Plant Physiology*, *41*(5), 821-825. https://doi.org/10.1104/pp.41.5.821

Coppellotti, O., Piccinni, E., Colombetti, G., & Leno, F. (1979). Responses of *Euglena* gracilis to Cytochalasins B and D. *Bolletino Di Zoologia*, 46(1-2), 71-75. https://doi.org/10.1080/11250007909440280

Cramer, M., & Myers, J. (1952). Growth and photosynthetic characteristics of euglena gracilis. *Archiv F* **¢***r Mikrobiologie*, *17*(1-4), 384-402. https://doi.org/10.1007/BF00410835

Daiker, V., Häder, D.-P., Richter, P. R., & Lebert, M. (2011). The involvement of a protein kinase in phototaxis and gravitaxis of Euglena gracilis. *Planta*, 233(5), 1055-1062. https://doi.org/10.1007/s00425-011-1364-5

Davies, G., & Henrissat, B. (1995). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*, *3*(9), 853-859. https://doi.org/10.1016/S0969-2126(01)00220-9

De Francisci, D., Su, Y., Iital, A., & Angelidaki, I. (2018). Evaluation of microalgae production coupled with wastewater treatment. *Environmental Technology*, *39*(5), 581-592. https://doi.org/10.1080/09593330.2017.1308441

de la Cruz, J., Pintor-Toro, J. A., Benítez, T., Llobell, A., & Romero, L. C. (1995). A novel endo-beta-1,3-glucanase, BGN13.1, involved in the mycoparasitism of Trichoderma harzianum. *Journal of Bacteriology*, *177*(23), 6937-6945. https://doi.org/10.1128/jb.177.23.6937-6945.1995

Devendran, S., Abdel-Hamid, A. M., Evans, A. F., Iakiviak, M., Kwon, I. H., Mackie, R. I., & Cann, I. (2016). Multiple cellobiohydrolases and cellobiose phosphorylases cooperate in the

ruminal bacterium Ruminococcus albus 8 to degrade cellooligosaccharides. *Scientific Reports*, 6(1), 35342. https://doi.org/10.1038/srep35342

Dineshbabu, G., Goswami, G., Kumar, R., Sinha, A., & Das, D. (2019). Microalgae– nutritious, sustainable aqua- and animal feed source. *Journal of Functional Foods*, 62, 103545. https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103545

Divne, C., Ståhlberg, J., Reinikainen, T., Ruohonen, L., Pettersson, G., Knowles, J. K. C., Teeri, T. T., & Jones, T. A. (1994). The Three-Dimensional Crystal Structure of the Catalytic Core of Cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. *Science*, *265*(5171), 524-528. https://doi.org/10.1126/science.8036495

Dobáková, E., Flegontov, P., Skalický, T., & Lukeš, J. (2015). Unexpectedly Streamlined Mitochondrial Genome of the Euglenozoan *Euglena gracilis*. *Genome Biology and Evolution*, 7(12), 3358-3367. https://doi.org/10.1093/gbe/evv229

Dobell, C. (1932). Antony van Leeuwenhoek and his "Little Animals": Being some Account of the Father of Protozoology and Bacteriology and his Multifarious Discoveries in these Disciplines. *Nature*, *130*(3288), 679-680. https://doi.org/10.1038/130679a0

Doi, K., Doi, A., Ozaki, T., & Fukui, T. (1973). Lytic β-1,3 Glucanase from *Arthrobacter*: Pattern of Action. *Agricultural and Biological Chemistry*, *37*(7), 1629-1633. https://doi.org/10.1080/00021369.1973.10860881

Du, B., Meenu, M., Liu, H., & Xu, B. (2019). A Concise Review on the Molecular Structure and Function Relationship of β-Glucan. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(16), 4032. https://doi.org/10.3390/ijms20164032

Ebenezer, T. E., Carrington, M., Lebert, M., Kelly, S., & Field, M. C. (2017). Euglena gracilis Genome and Transcriptome: Organelles, Nuclear Genome Assembly Strategies and Initial Features. En S. D. Schwartzbach & S. Shigeoka (Eds.), *Euglena: Biochemistry, Cell and Molecular Biology* (Vol. 979, pp. 125-140). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-54910-1\_7

Ebenezer, T. E., Zoltner, M., Burrell, A., Nenarokova, A., Novák Vanclová, A. M. G., Prasad, B., Soukal, P., Santana-Molina, C., O'Neill, E., Nankissoor, N. N., Vadakedath, N., Daiker, V., Obado, S., Silva-Pereira, S., Jackson, A. P., Devos, D. P., Lukeš, J., Lebert, M., Vaughan, S., ... Field, M. C. (2019). Transcriptome, proteome and draft genome of Euglena gracilis. *BMC Biology*, *17*(1), 11. https://doi.org/10.1186/s12915-019-0626-8

Ebenezer, T. E., Low, R. S., O'Neill, E. C., Huang, I., DeSimone, A., Farrow, S. C., Field, R. A., Ginger, M. L., Guerrero, S. A., Hammond, M., Hampl, V., Horst, G., Ishikawa, T., Karnkowska, A., Linton, E. W., Myler, P., Nakazawa, M., Cardol, P., Sánchez-Thomas, R., ... Field, M. C. (2022). Euglena International Network (EIN): Driving euglenoid biotechnology for the benefit of a challenged world. *Biology Open*, *11*(11), bio059561. https://doi.org/10.1242/bio.059561 Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, *32*(5), 1792-1797. https://doi.org/10.1093/nar/gkh340

Eisenberg, D., Lüthy, R., & Bowie, J. U. (1997). [20] VERIFY3D: Assessment of protein models with three-dimensional profiles. En *Methods in Enzymology* (Vol. 277, pp. 396-404). Elsevier. https://doi.org/10.1016/S0076-6879(97)77022-8

El-Shora, H. M., El-Sharkawy, R. M., Khateb, A. M., & Darwish, D. B. (2021). Production and immobilization of  $\beta$ -glucanase from Aspergillus niger with its applications in bioethanol production and biocontrol of phytopathogenic fungi. *Scientific Reports*, *11*(1), 21000. https://doi.org/10.1038/s41598-021-00237-2

Erdős, G., & Dosztányi, Z. (2020). Analyzing Protein Disorder with IUPred2A. *Current Protocols in Bioinformatics*, 70(1). https://doi.org/10.1002/cpbi.99

Fellig, J. (1960). Laminarase of *Euglena gracilis*. Science, 131(3403), 832-832. https://doi.org/10.1126/science.131.3403.832

Fernandes, A. P., & Holmgren, A. (2004). Glutaredoxins: Glutathione-Dependent Redox Enzymes with Functions Far Beyond a Simple Thioredoxin Backup System. *Antioxidants & Redox Signaling*, *6*(1), 63-74. https://doi.org/10.1089/152308604771978354

Franklin, C. C., Backos, D. S., Mohar, I., White, C. C., Forman, H. J., & Kavanagh, T. J. (2009). Structure, function, and post-translational regulation of the catalytic and modifier subunits of glutamate cysteine ligase. *Molecular Aspects of Medicine*, *30*(1-2), 86-98. https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.08.009

Fujii, I., Ebizuka, Y., & Sankawa, U. (1988). A Novel Anthraquinone Ring Cleavage Enzyme from Aspergillus terreus. *The Journal of Biochemistry*, *103*(5), 878-883. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a122365

Fusari, C., Demonte, A. M., Figueroa, C. M., Aleanzi, M., & Iglesias, A. A. (2006). A colorimetric method for the assay of ADP-glucose pyrophosphorylase. *Analytical Biochemistry*, *352*(1), 145-147. https://doi.org/10.1016/j.ab.2006.01.024

García-García, J. D., Olin-Sandoval, V., Saavedra, E., Girard, L., Hernández, G., & Moreno-Sánchez, R. (2012). Sulfate uptake in photosynthetic Euglena gracilis. Mechanisms of regulation and contribution to cysteine homeostasis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, *1820*(10), 1567-1575. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.05.002

García-García, J. D., Peña-Sanabria, K. A., Sánchez-Thomas, R., & Moreno-Sánchez, R. (2018). Nickel accumulation by the green algae-like Euglena gracilis. *Journal of Hazardous Materials*, *343*, 10-18. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.09.008

Garcia-Rubio, R., de Oliveira, H. C., Rivera, J., & Trevijano-Contador, N. (2020). The Fungal Cell Wall: Candida, Cryptococcus, and Aspergillus Species. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 2993. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02993

Gawryluk, R. M. R., del Campo, J., Okamoto, N., Strassert, J. F. H., Lukeš, J., Richards, T. A., Worden, A. Z., Santoro, A. E., & Keeling, P. J. (2016). Morphological Identification and Single-Cell Genomics of Marine Diplonemids. *Current Biology*, *26*(22), 3053-3059. https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.09.013

Gekeler, W., Grill, E., Winnacker, E.-L., & Zenk, M. H. (1988). Algae sequester heavy metals via synthesis of phytochelatin complexes. *Archives of Microbiology*, *150*(2), 197-202. https://doi.org/10.1007/BF00425162

Giles, G. I., & Jacob, C. (2002). Reactive Sulfur Species: An Emerging Concept in Oxidative Stress. *Biological Chemistry*, 383(3-4). https://doi.org/10.1515/BC.2002.042

Gissibl, A., Sun, A., Care, A., Nevalainen, H., & Sunna, A. (2019a). Bioproducts From Euglena gracilis: Synthesis and Applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *7*, 108. https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00108

Gissibl, A., Care, A., Sun, A., Hobba, G., Nevalainen, H., & Sunna, A. (2019b). Development of screening strategies for the identification of paramylon-degrading enzymes. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 46(6), 769-781. https://doi.org/10.1007/s10295-019-02157-7

Gockel, G., & Hachtel, W. (2000). Complete Gene Map of the Plastid Genome of the Nonphotosynthetic Euglenoid Flagellate Astasia longa. *Protist*, *151*(4), 347-351. https://doi.org/10.1078/S1434-4610(04)70033-4

Goldemberg, S. H., Maréchal, L. R., & De Souza, B. C. (1966). β-1,3-Oligoglucan: Orthophosphate Glucosyltransferase from Euglena gracilis. *Journal of Biological Chemistry*, 241(1), 45-50. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)96955-3

González Blair, G. H., & Castellanos Domínguez, Ó. F. (2003). Alternativas de modificación del método de Somogyi-Nelson para la determinación de azúcares reductores a partir de sus posibilidades químicas. *52*, 5-17.

Guo, Q., Bi, D., Wu, M., Yu, B., Hu, L., Liu, C., Gu, L., Zhu, H., Lei, A., Xu, X., & Wang, J. (2020). Immune activation of murine RAW264.7 macrophages by sonicated and alkalized paramylon from Euglena gracilis. *BMC Microbiology*, 20(1), 171. https://doi.org/10.1186/s12866-020-01782-y

Gusakov, A. V., Kondratyeva, E. G., & Sinitsyn, A. P. (2011). Comparison of Two Methods for Assaying Reducing Sugars in the Determination of Carbohydrase Activities. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2011, 1-4. https://doi.org/10.1155/2011/283658

Hallgren, J., Tsirigos, K. D., Pedersen, M. D., Almagro Armenteros, J. J., Marcatili, P., Nielsen, H., Krogh, A., & Winther, O. (2022). *DeepTMHMM predicts alpha and beta transmembrane proteins using deep neural networks* [Preprint]. Bioinformatics. https://doi.org/10.1101/2022.04.08.487609 Hallick, R. B., Hong, L., Drager, R. G., Favreau, M. R., Monfort, A., Orsat, B., Spielmann, A., & Stutz, E. (1993). Complete sequence of *Euglena gracilis* chloroplast DNA. *Nucleic Acids Research*, *21*(15), 3537-3544. https://doi.org/10.1093/nar/21.15.3537

Hammond, M., Zoltner, M., Garrigan, J., Butterfield, E., Varga, V., Lukeš, J., & Field,
M. C. (2021). The distinctive flagellar proteome of *Euglena gracilis* illuminates the complexities of protistan flagella adaptation. *New Phytologist*, 232(3), 1323-1336. https://doi.org/10.1111/nph.17638

Han, X., Wang, R., Zhou, Y., Fei, L., Sun, H., Lai, S., Saadatpour, A., Zhou, Z., Chen, H., Ye, F., Huang, D., Xu, Y., Huang, W., Jiang, M., Jiang, X., Mao, J., Chen, Y., Lu, C., Xie, J., ... Guo, G. (2018). Mapping the Mouse Cell Atlas by Microwell-Seq. *Cell*, *172*(5), 1091-1107.e17. https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.02.001

Hanashima, S., Ikeda, A., Tanaka, H., Adachi, Y., Ohno, N., Takahashi, T., & Yamaguchi, Y. (2014). NMR study of short  $\beta$ (1-3)-glucans provides insights into the structure and interaction with Dectin-1. *Glycoconjugate Journal*, *31*(3), 199-207. https://doi.org/10.1007/s10719-013-9510-x

Harada, R., Nomura, T., Yamada, K., Mochida, K., & Suzuki, K. (2020). Genetic Engineering Strategies for Euglena gracilis and Its Industrial Contribution to Sustainable Development Goals: A Review. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *8*, 790. https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00790

Hidaka, M., Kitaoka, M., Hayashi, K., Wakagi, T., Shoun, H., & Fushinobu, S. (2006). Structural dissection of the reaction mechanism of cellobiose phosphorylase. *Biochemical Journal*, *398*(1), 37-43. https://doi.org/10.1042/BJ20060274

Hong, T.-Y., & Meng, M. (2003). Biochemical characterization and antifungal activity of an endo-1,3-β-glucanase of Paenibacillus sp. Isolated from garden soil. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *61*(5-6), 472-478. https://doi.org/10.1007/s00253-003-1249-z

Horn, S. J., Sørlie, M., Vårum, K. M., Väljamäe, P., & Eijsink, V. G. H. (2012). Measuring Processivity. En *Methods in Enzymology* (Vol. 510, pp. 69-95). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415931-0.00005-7

Hou, X., Xu, H., Deng, Z., Yan, Y., Yuan, Z., Liu, X., Su, Z., Yang, S., Zhang, Y., & Rao, Y. (2022). Discovery of the Biosynthetic Pathway of Beticolin 1 Reveals a Novel Non-Heme Iron-Dependent Oxygenase for Anthraquinone Ring Cleavage. *Angewandte Chemie International Edition*, *61*(37). https://doi.org/10.1002/anie.202208772

Huang, C. S., Moore, W. R., & Meister, A. (1988). On the active site thiol of gammaglutamylcysteine synthetase: Relationships to catalysis, inhibition, and regulation. *Proceedings* of the National Academy of Sciences, 85(8), 2464-2468. https://doi.org/10.1073/pnas.85.8.2464

Inui, H., Miyatake, K., Nakano, Y., & Kitaoka, S. (1982). Wax ester fermentation in *Euglena gracilis. FEBS Letters*, 150(1), 89-93. https://doi.org/10.1016/0014-5793(82)81310-0

Irwin, D. C., Spezio, M., Walker, L. P., & Wilson, D. B. (1993). Activity studies of eight purified cellulases: Specificity, synergism, and binding domain effects. *Biotechnology and Bioengineering*, *42*(8), 1002-1013. https://doi.org/10.1002/bit.260420811

Iseki, M., Matsunaga, S., Murakami, A., Ohno, K., Shiga, K., Yoshida, K., Sugai, M., Takahashi, T., Hori, T., & Watanabe, M. (2002). A blue-light-activated adenylyl cyclase mediates photoavoidance in Euglena gracilis. *Nature*, *415*(6875), 1047-1051. https://doi.org/10.1038/4151047a

Ishikawa, T., Tajima, N., Nishikawa, H., Gao, Y., Rapolu, M., Shibata, H., Sawa, Y., & Shigeoka, S. (2010). *Euglena gracilis* ascorbate peroxidase forms an intramolecular dimeric structure: Its unique molecular characterization. *Biochemical Journal*, 426(2), 125-134. https://doi.org/10.1042/BJ20091406

Jasso-Chávez, R., Pacheco-Rosales, A., Lira-Silva, E., Gallardo-Pérez, J. C., García, N., & Moreno-Sánchez, R. (2010). Toxic effects of Cr(VI) and Cr(III) on energy metabolism of heterotrophic Euglena gracilis. *Aquatic Toxicology*, *100*(4), 329-338. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.08.006

Jez, J. M., Cahoon, R. E., & Chen, S. (2004). Arabidopsis thaliana Glutamate-Cysteine Ligase. *Journal of Biological Chemistry*, 279(32), 33463-33470. https://doi.org/10.1074/jbc.M405127200

Johansen, K. S. (2016). Lytic Polysaccharide Monooxygenases: The Microbial Power Tool for Lignocellulose Degradation. *Trends in Plant Science*, 21(11), 926-936. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.07.012

Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., ... Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, *596*(7873), 583-589. https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2

Jurrus, E., Engel, D., Star, K., Monson, K., Brandi, J., Felberg, L. E., Brookes, D. H., Wilson, L., Chen, J., Liles, K., Chun, M., Li, P., Gohara, D. W., Dolinsky, T., Konecny, R., Koes, D. R., Nielsen, J. E., Head-Gordon, T., Geng, W., ... Baker, N. A. (2018). Improvements to the APBS biomolecular solvation software suite. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, *27*(1), 112-128. https://doi.org/10.1002/pro.3280

Kall, L., Krogh, A., & Sonnhammer, E. L. L. (2007). Advantages of combined transmembrane topology and signal peptide prediction—The Phobius web server. *Nucleic Acids Research*, *35*(Web Server), W429-W432. https://doi.org/10.1093/nar/gkm256

Kanematsu, S., & Asada, K. (1979). Ferric and manganic superoxide dismutases in Euglena gracilis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 195(2), 535-545. https://doi.org/10.1016/0003-9861(79)90380-1 Kari, J., Andersen, M., Borch, K., & Westh, P. (2017). An Inverse Michaelis–Menten Approach for Interfacial Enzyme Kinetics. *ACS Catalysis*, 7(7), 4904-4914. https://doi.org/10.1021/acscatal.7b00838

Kari, J., Christensen, S. J., Andersen, M., Baiget, S. S., Borch, K., & Westh, P. (2019). A practical approach to steady-state kinetic analysis of cellulases acting on their natural insoluble substrate. *Analytical Biochemistry*, *586*, 113411. https://doi.org/10.1016/j.ab.2019.113411

Karnchanatat, A., Petsom, A., Sangvanich, P., Piapukiew, J., Whalley, A. J. S., Reynolds, C. D., Gadd, G. M., & Sihanonth, P. (2008). A novel thermostable endoglucanase from the wooddecaying fungus Daldinia eschscholzii (Ehrenb.:Fr.) Rehm. *Enzyme and Microbial Technology*, *42*(5), 404-413. https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.11.009

Kato, S., Soshino, M., Takaichi, S., Ishikawa, T., Nagata, N., Asahina, M., & Shinomura, T. (2017). Suppression of the phytoene synthase gene (EgcrtB) alters carotenoid content and intracellular structure of Euglena gracilis. *BMC Plant Biology*, *17*(1), 125. https://doi.org/10.1186/s12870-017-1066-7

Khanra, A & Rai, M P. (s. f.). Evaluation of Mixotrophic Cultivation of Euglena gracilis for Lipid Synthesis and FAME Characterization towards Biodiesel Application.

Kim, J. I., Linton, E. W., & Shin, W. (2016). Morphological and genetic diversity of Euglena deses group (Euglenophyceae) with emphasis on cryptic species. *ALGAE*, *31*(3), 219-230. https://doi.org/10.4490/algae.2016.31.9.9

Kiss, J. Z., Vasconcelos, A. C., & Triemer, R. E. (1988). The intramembranous particle profile of the paramylon membrane during paramylon synthesis in *Euglena* (euglenophyceae). *Journal of Phycology*, *24*(2), 152-157. https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1988.tb04229.x

Kitaoka, M., Matsuoka, Y., Mori, K., Nishimoto, M., & Hayashi, K. (2012). Characterization of a Bacterial Laminaribiose Phosphorylase. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 76(2), 343-348. https://doi.org/10.1271/bbb.110772

Klinthong, W., Yang, Y.-H., Huang, C.-H., & Tan, C.-S. (2015). A Review: Microalgae and Their Applications in CO2 Capture and Renewable Energy. *Aerosol and Air Quality Research*, *15*(2), 712-742. https://doi.org/10.4209/aaqr.2014.11.0299

Koshland, D. E. (2002). The Application and Usefulness of the Ratio kcat/KM. *Bioorganic Chemistry*, *30*(3), 211-213. https://doi.org/10.1006/bioo.2002.1246

Kostygov, A. Y., Karnkowska, A., Votýpka, J., Tashyreva, D., Maciszewski, K., Yurchenko, V., & Lukeš, J. (2021). Euglenozoa: Taxonomy, diversity and ecology, symbioses and viruses. *Open Biology*, *11*(3), 200407. https://doi.org/10.1098/rsob.200407

Krajčovič, J., Matej Vesteg, & Schwartzbach, S. D. (2015). Euglenoid flagellates: A multifaceted biotechnology platform. *Journal of Biotechnology*, 202, 135-145. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.11.035

Krishnan, A., Kumaraswamy, G. K., Vinyard, D. J., Gu, H., Ananyev, G., Posewitz, M. C., & Dismukes, G. C. (2015). Metabolic and photosynthetic consequences of blocking starch biosynthesis in the green alga *C hlamydomonas reinhardtii sta6* mutant. *The Plant Journal*, *81*(6), 947-960. https://doi.org/10.1111/tpj.12783

Krishnan, B., Srivastava, S. S., Sankeshi, V., Garg, R., Srivastava, S., Sankaranarayanan, R., & Sharma, Y. (2019). Bγ-Crystallination Endows a Novel Bacterial Glycoside Hydrolase 64 with Ca <sup>2+</sup> -Dependent Activity Modulation. *Journal of Bacteriology*, 201(23). https://doi.org/10.1128/JB.00392-19

Kuhaudomlarp, S., Patron, N. J., Henrissat, B., Rejzek, M., Saalbach, G., & Field, R. A. (2018). Identification of Euglena gracilis β-1,3-glucan phosphorylase and establishment of a new glycoside hydrolase (GH) family GH149. *Journal of Biological Chemistry*, 293(8), 2865-2876. https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.000936

Kuhaudomlarp, S., Stevenson, C. E. M., Lawson, D. M., & Field, R. A. (2019a). The structure of a GH149  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  3) glucan phosphorylase reveals a new surface oligosaccharide binding site and additional domains that are absent in the disaccharide-specific GH94 glucose- $\beta$ -(1  $\rightarrow$  3)-glucose (laminaribiose) phosphorylase. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 87(10), 885-892. https://doi.org/10.1002/prot.25745

Kuhaudomlarp, S., Walpole, S., Stevenson, C. E. M., Nepogodiev, S. A., Lawson, D. M., Angulo, J., & Field, R. A. (2019b). Unravelling the Specificity of Laminaribiose Phosphorylase from *Paenibacillus* sp. YM-1 towards Donor Substrates Glucose/Mannose 1-Phosphate by Using X-ray Crystallography and Saturation Transfer Difference NMR Spectroscopy. *ChemBioChem*, 20(2), 181-192. https://doi.org/10.1002/cbic.201800260

Kumagai, Y., Okuyama, M., & Kimura, A. (2016). Heat treatment of curdlan enhances the enzymatic production of biologically active  $\beta$ -(1,3)-glucan oligosaccharides. *Carbohydrate Polymers*, *146*, 396-401. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.03.066

Kurien, B. T. (2009). Affinity Purification of Autoantibodies from an Antigen Strip Excised from a Nitrocellulose Protein Blot. En B. T. Kurien & R. H. Scofield (Eds.), *Protein Blotting and Detection* (Vol. 536, pp. 201-211). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-542-8\_22

Laemmli U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 (5259), 680–685. https://doi.org/10.1038/227680a0

Lagos, C. F., Araya-Secchi, R., Thomas, P., Pérez-Acle, T., Tapia, R. A., & Salas, C. O. (2012). Molecular modeling of Trypanosoma cruzi glutamate cysteine ligase and investigation of its interactions with glutathione. *Journal of Molecular Modeling*, *18*(5), 2055-2064. https://doi.org/10.1007/s00894-011-1224-z

Lax, G., Kolisko, M., Eglit, Y., Lee, W. J., Yubuki, N., Karnkowska, A., Leander, B. S., Burger, G., Keeling, P. J., & Simpson, A. G. B. (2021). Multigene phylogenetics of euglenids based on single-cell transcriptomics of diverse phagotrophs. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 159, 107088. https://doi.org/10.1016/j.ympev.2021.107088

Le Dantec, C., Winter, N., Gicquel, B., Vincent, V., & Picardeau, M. (2001). Genomic Sequence and Transcriptional Analysis of a 23-Kilobase Mycobacterial Linear Plasmid: Evidence for Horizontal Transfer and Identification of Plasmid Maintenance Systems. *Journal of Bacteriology*, *183*(7), 2157-2164. https://doi.org/10.1128/JB.183.7.2157-2164.2001

Leander, B. S., Witek, R. P., & Farmer, M. A. (2001). TRENDS IN THE EVOLUTION OF THE EUGLENID PELLICLE. *Evolution*, 55(11), 2215-2235. https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2001.tb00737.x

Leander, B. S. (2004). Did trypanosomatid parasites have photosynthetic ancestors? *Trends in Microbiology*, *12*(6), 251-258. https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.04.001

Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P. M., & Henrissat, B. (2014). The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Research*, 42(D1), D490-D495. https://doi.org/10.1093/nar/gkt1178

López-García, P., Rodríguez-Valera, F., Pedrós-Alió, C., & Moreira, D. (2001). Unexpected diversity of small eukaryotes in deep-sea Antarctic plankton. *Nature*, 409(6820), 603-607. https://doi.org/10.1038/35054537

Lu, S. C. (2009). Regulation of glutathione synthesis. *Molecular Aspects of Medicine*, 30(1-2), 42-59. https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.05.005

Lueder, D. V., & Phillips, M. A. (1996). Characterization of  $\gamma$ -Glutamylcysteine Synthetase, an Essential Enzyme in the Biosynthesis of Trypanothione (Diglutathionylspermidine). *Journal of Biological Chemistry*, 271(29), 17485-17490. https://doi.org/10.1074/jbc.271.29.17485

Nethravathy, M. U., N., Mehar, J. G., Mudliar, S. N., & Shekh, A. Y. (2019). Recent Advances in Microalgal Bioactives for Food, Feed, and Healthcare Products: Commercial Potential, Market Space, and Sustainability. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *18*(6), 1882-1897. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12500

Marchessault, R. H., & Deslandes, Y. (1979). Fine structure of  $(1\rightarrow 3)$ - $\beta$ -d-glucans: Curdlan and paramylon. *Carbohydrate Research*, 75, 231-242. https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)84642-X

Marechal, L. R., & Goldemberg, S. H. (1964). Uridine Diphosphate Glucose-β-1,3-Glucan β-3-Glucosyltransferase from Euglena gracilis. *Journal of Biological Chemistry*, 239(10), 3163-3167. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)97699-4

Marechal, L. R. (1967a).  $\beta$ -1,3-oligoglucan: Orthophosphate glucosyltransferases from Euglena gracilis. I. Isolation and some properties of a  $\beta$ -1,3-oligoglucan phosphorylase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology*, 146(2), 417-430. https://doi.org/10.1016/0005-2744(67)90226-4 Marechal, L. R. (1967b). β-1,3-Oligoglucan:orthophosphate glucosyltransferases from Euglena gracilis. II. Comparative studies between laminaribiose- and β-1,3-oligoglucan phosphorylase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology*, *146*(2), 431-442. https://doi.org/10.1016/0005-2744(67)90227-6

Mariani, V., Biasini, M., Barbato, A., & Schwede, T. (2013). IDDT: A local superposition-free score for comparing protein structures and models using distance difference tests. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 29(21), 2722-2728. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt473

Matsuda, F., Hayashi, M., & Kondo, A. (2011). Comparative Profiling Analysis of Central Metabolites in *Euglena gracilis* under Various Cultivation Conditions. *Bioscience*, *Biotechnology, and Biochemistry*, 75(11), 2253-2256. https://doi.org/10.1271/bbb.110482

Mendoza-Cozatl, D., Devars, S., Loza-Tavera, H., & Moreno-Sánchez, R. (2002). Cadmium accumulation in the chloroplast of *Euglena gracilis*. *Physiologia Plantarum*, *115*(2), 276-283. https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2002.1150214.x

Mészáros, B., Erdős, G., & Dosztányi, Z. (2018). IUPred2A: Context-dependent prediction of protein disorder as a function of redox state and protein binding. *Nucleic Acids Research*, *46*(W1), W329-W337. https://doi.org/10.1093/nar/gky384

Mofijur, M., Rasul, M. G., Hassan, N. M. S., & Nabi, M. N. (2019). Recent Development in the Production of Third Generation Biodiesel from Microalgae. *Energy Procedia*, *156*, 53-58. https://doi.org/10.1016/j.egypro.2018.11.088

Monfils, A. K., Triemer, R. E., & Bellairs, E. F. (2011). Characterization of paramylon morphological diversity in photosynthetic euglenoids (Euglenales, Euglenophyta). *Phycologia*, *50*(2), 156-169. https://doi.org/10.2216/09-112.1

Moreira, D., López-García, P., & Vickerman, K. (2004). An updated view of kinetoplastid phylogeny using environmental sequences and a closer outgroup: Proposal for a new classification of the class Kinetoplastea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *54*(5), 1861-1875. https://doi.org/10.1099/ijs.0.63081-0

Muchut, R. J., Calloni, R. D., Herrera, F. E., Garay, S. A., Arias, D. G., Iglesias, A. A., & Guerrero, S. A. (2018). Elucidating paramylon and other carbohydrate metabolism in Euglena gracilis: Kinetic characterization, structure and cellular localization of UDP-glucose pyrophosphorylase. *Biochimie*, *154*, 176-186. https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.09.006

Muchut, R. J., Calloni, R. D., Arias, D. G., Arce, A. L., Iglesias, A. A., & Guerrero, S. A. (2021). Elucidating carbohydrate metabolism in Euglena gracilis: Reverse genetics-based evaluation of genes coding for enzymes linked to paramylon accumulation. *Biochimie*, *184*, 125-131. https://doi.org/10.1016/j.biochi.2021.02.016

Mystkowska, A. A., Robb, C., Vidal-Melgosa, S., Vanni, C., Fernandez-Guerra, A., Höhne, M., & Hehemann, J. (2018). Molecular recognition of the beta-glucans laminarin and pustulan by a SusD-like glycan-binding protein of a marine *Bacteroidetes*. *The FEBS Journal*, 285(23), 4465-4481. https://doi.org/10.1111/febs.14674

Nakabayashi, M., Nishijima, T., Ehara, G., Nikaidou, N., Nishihashi, H., & Watanabe, T. (1998). Structure of the gene encoding laminaripentaose-producing  $\beta$ -1,3-glucanase (LPHase) of Streptomyces matensis DIC-108. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 85(5), 459-464. https://doi.org/10.1016/S0922-338X(98)80062-7

Nakashima, A., Suzuki, K., Asayama, Y., Konno, M., Saito, K., Yamazaki, N., & Takimoto, H. (2017). Oral administration of Euglena gracilis Z and its carbohydrate storage substance provides survival protection against influenza virus infection in mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 494(1-2), 379-383. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.09.167

Nakazawa, M., Andoh, H., Koyama, K., Watanabe, Y., Nakai, T., Ueda, M., Sakamoto, T., Inui, H., Nakano, Y., & Miyatake, K. (2015). Alteration of Wax Ester Content and Composition in Euglena gracilis with Gene Silencing of 3-ketoacyl-CoA Thiolase Isozymes. *Lipids*, *50*(5), 483-492. https://doi.org/10.1007/s11745-015-4010-3

Nasir, A., Le Bail, A., Daiker, V., Klima, J., Richter, P., & Lebert, M. (2018). Identification of a flagellar protein implicated in the gravitaxis in the flagellate Euglena gracilis. *Scientific Reports*, 8(1), 7605. https://doi.org/10.1038/s41598-018-26046-8

NCBI. (2020). *cd09214: Glycosyl hydrolase 64 family*. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cddsrv.cgi?hslf=1&uid=185753&#seqalign

Nelson, N. (1944). A PHOTOMETRIC ADAPTATION OF THE SOMOGYI METHOD FOR THE DETERMINATION OF GLUCOSE. *Journal of Biological Chemistry*, *153*(2), 375-380. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)71980-7

Newman, L., Duffus, A. L. J., & Lee, C. (2016). Using the Free Program MEGA to Build Phylogenetic Trees from Molecular Data. *The American Biology Teacher*, 78(7), 608-612. https://doi.org/10.1525/abt.2016.78.7.608

Ng, I.-S., Li, C.-W., Yeh, Y.-F., Chen, P. T., Chir, J.-L., Ma, C.-H., Yu, S.-M., Ho, T. D., & Tong, C.-G. (2009). A novel endo-glucanase from the thermophilic bacterium Geobacillus sp. 70PC53 with high activity and stability over a broad range of temperatures. *Extremophiles*, *13*(3), 425-435. https://doi.org/10.1007/s00792-009-0228-4

Nguyen, T. H., Fleet, G. H., & Rogers, P. L. (1998). Composition of the cell walls of several yeast species. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 50(2), 206-212. https://doi.org/10.1007/s002530051278

Nihira, T., Saito, Y., Kitaoka, M., Nishimoto, M., Otsubo, K., & Nakai, H. (2012). Characterization of a laminaribiose phosphorylase from Acholeplasma laidlawii PG-8A and production of  $1,3-\beta$ -d-glucosyl disaccharides. *Carbohydrate Research*, *361*, 49-54. https://doi.org/10.1016/j.carres.2012.08.006

Nissink, J. W. M. (2009). Simple Size-Independent Measure of Ligand Efficiency. Journal of Chemical Information and Modeling, 49(6), 1617-1622. https://doi.org/10.1021/ci900094m

Nivedha, A. K., Thieker, D. F., Makeneni, S., Hu, H., & Woods, R. J. (2016). Vina-Carb: Improving Glycosidic Angles during Carbohydrate Docking. *Journal of Chemical Theory and Computation*, *12*(2), 892-901. https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00834

Noor, E., Eden, E., Milo, R., & Alon, U. (2010). Central Carbon Metabolism as a Minimal Biochemical Walk between Precursors for Biomass and Energy. *Molecular Cell*, *39*(5), 809-820. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.08.031

Noselli, G., Beran, A., Arroyo, M., & DeSimone, A. (2019). Swimming Euglena respond to confinement with a behavioural change enabling effective crawling. *Nature Physics*, *15*(5), 496-502. https://doi.org/10.1038/s41567-019-0425-8

Novák Vanclová, A. M. G., Zoltner, M., Kelly, S., Soukal, P., Záhonová, K., Füssy, Z., Ebenezer, T. E., Lacová Dobáková, E., Eliáš, M., Lukeš, J., Field, M. C., & Hampl, V. (2020). Metabolic quirks and the colourful history of the *Euglena gracilis* secondary plastid. *New Phytologist*, 225(4), 1578-1592. https://doi.org/10.1111/nph.16237

Ntefidou, M., Iseki, M., Watanabe, M., Lebert, M., & Häder, D.-P. (2003). Photoactivated Adenylyl Cyclase Controls Phototaxis in the Flagellate *Euglena gracilis*. *Plant Physiology*, *133*(4), 1517-1521. https://doi.org/10.1104/pp.103.034223

Ogawa, T., Kimura, A., Sakuyama, H., Tamoi, M., Ishikawa, T., & Shigeoka, S. (2015). Identification and characterization of cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase in *Euglena gracilis*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 79*(12), 1957-1964. https://doi.org/10.1080/09168451.2015.1069694

Ohmiya, Y., Takeda, T., Nakamura, S., Sakai, F., & Hayashi, T. (1995). Purification and properties of wall-bound endo-1, 4-beta-glucanase from suspension-cultured poplar cells. *Plant & Cell Physiology*, *36*(4), 607-614.

O'Neill, E. C., Trick, M., Hill, L., Rejzek, M., Dusi, R. G., Hamilton, C. J., Zimba, P. V., Henrissat, B., & Field, R. A. (2015a). The transcriptome of Euglena gracilis reveals unexpected metabolic capabilities for carbohydrate and natural product biochemistry. *Molecular BioSystems*, *11*(10), 2808-2820. https://doi.org/10.1039/C5MB00319A

O'Neill, E. C., Trick, M., Henrissat, B., & Field, R. A. (2015b). Euglena in time: Evolution, control of central metabolic processes and multi-domain proteins in carbohydrate and natural product biochemistry. *Perspectives in Science*, *6*, 84-93. https://doi.org/10.1016/j.pisc.2015.07.002

O'Neill, E. C., & Field, R. A. (2015c). Enzymatic synthesis using glycoside phosphorylases. *Carbohydrate Research*, 403, 23-37. https://doi.org/10.1016/j.carres.2014.06.010 O'Neill, E., Kuhaudomlarp, S., Rejzek, M., Fangel, J., Alagesan, K., Kolarich, D., Willats, W., & Field, R. (2017). Exploring the Glycans of Euglena gracilis. *Biology*, *6*(4), 45. https://doi.org/10.3390/biology6040045

O'Neill, E. (2020). Using new techniques to study old favorites: A case study of Euglena. En *Handbook of Algal Science, Technology and Medicine* (pp. 161-170). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818305-2.00010-3

Owczarzy, R., You, Y., Moreira, B. G., Manthey, J. A., Huang, L., Behlke, M. A., & Walder, J. A. (2004). Effects of Sodium Ions on DNA Duplex Oligomers: Improved Predictions of Melting Temperatures. *Biochemistry*, *43*(12), 3537-3554. https://doi.org/10.1021/bi034621r

Palumbo, J. D., Sullivan, R. F., & Kobayashi, D. Y. (2003). Molecular Characterization and Expression in *Escherichia coli* of Three  $\beta$ -1,3-Glucanase Genes from *Lysobacter enzymogenes* Strain N4-7. *Journal of Bacteriology*, *185*(15), 4362-4370. https://doi.org/10.1128/JB.185.15.4362-4370.2003

Pawlowski, J., Audic, S., Adl, S., Bass, D., Belbahri, L., Berney, C., Bowser, S. S., Cepicka, I., Decelle, J., Dunthorn, M., Fiore-Donno, A. M., Gile, G. H., Holzmann, M., Jahn, R., Jirků, M., Keeling, P. J., Kostka, M., Kudryavtsev, A., Lara, E., ... de Vargas, C. (2012). CBOL Protist Working Group: Barcoding Eukaryotic Richness beyond the Animal, Plant, and Fungal Kingdoms. *PLoS Biology*, *10*(11), e1001419. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001419

Pawlowski, J. (2014). Protist Evolution and Phylogeny. En John Wiley & Sons, Ltd (Ed.), *eLS* (1.<sup>a</sup> ed.). Wiley. https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0001935.pub2

Paysan-Lafosse, T., Blum, M., Chuguransky, S., Grego, T., Pinto, B. L., Salazar, G. A., Bileschi, M. L., Bork, P., Bridge, A., Colwell, L., Gough, J., Haft, D. H., Letunić, I., Marchler-Bauer, A., Mi, H., Natale, D. A., Orengo, C. A., Pandurangan, A. P., Rivoire, C., ... Bateman, A. (2023). InterPro in 2022. *Nucleic Acids Research*, *51*(D1), D418-D427. https://doi.org/10.1093/nar/gkac993

Pergolizzi, G., Kuhaudomlarp, S., Kalita, E., & Field, R. A. (2017). Glycan Phosphorylases in Multi-Enzyme Synthetic Processes. *Protein & Peptide Letters*, 24(8). https://doi.org/10.2174/0929866524666170811125109

Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 25(13), 1605-1612. https://doi.org/10.1002/jcc.20084

Puchart, V. (2015). Glycoside phosphorylases: Structure, catalytic properties and biotechnological potential. *Biotechnology Advances*, 33(2), 261-276. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.02.002

Purushotham, P., & Podile, A. R. (2012). Synthesis of Long-Chain Chitooligosaccharides by a Hypertransglycosylating Processive Endochitinase of Serratia proteamaculans 568. *Journal* of Bacteriology, 194(16), 4260-4271. https://doi.org/10.1128/JB.06473-11

Qin, Z., Yang, D., You, X., Liu, Y., Hu, S., Yan, Q., Yang, S., & Jiang, Z. (2017). The recognition mechanism of triple-helical  $\beta$ -1,3-glucan by a  $\beta$ -1,3-glucanase. *Chemical Communications*, 53(67), 9368-9371. https://doi.org/10.1039/C7CC03330C

Remmert, M., Biegert, A., Hauser, A., & Söding, J. (2012). HHblits: Lightning-fast iterative protein sequence searching by HMM-HMM alignment. *Nature Methods*, *9*(2), 173-175. https://doi.org/10.1038/nmeth.1818

Robert, X., & Gouet, P. (2014). Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Research*, 42(W1), W320-W324. https://doi.org/10.1093/nar/gku316

Robyt, J. F., & Whelan, W. J. (1972). Reducing value methods for maltodextrins. Analytical Biochemistry, 45(2), 510-516. https://doi.org/10.1016/0003-2697(72)90213-8

RodrÍguez-Zavala, J. S., GarcÍa-GarcÍa, J. D., Ortiz-Cruz, M. A., & Moreno-Sánchez, R. (2007). Molecular mechanisms of resistance to heavy metals in the protist *Euglena gracilis*. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, *42*(10), 1365-1378. https://doi.org/10.1080/10934520701480326

Rodríguez-Zavala, J. S., Ortiz-Cruz, M. A., Mendoza-Hernández, G., & Moreno-Sánchez, R. (2010). Increased synthesis of α-tocopherol, paramylon and tyrosine by Euglena gracilis under conditions of high biomass production: Metabolites biosynthesis by E. gracilis. *Journal of Applied Microbiology*, *109*(6), 2160-2172. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04848.x

Rouvinen, J., Bergfors, T., Teeri, T., Knowles, J. K., & Jones, T. A. (1990). Three-Dimensional Structure of Cellobiohydrolase II from *Trichoderma reesei*. *Science*, 249(4967), 380-386. https://doi.org/10.1126/science.2377893

Rubini, M. R., Dillon, A. J. P., Kyaw, C. M., Faria, F. P., Poças-Fonseca, M. J., & Silva-Pereira, I. (2010). Cloning, characterization and heterologous expression of the first *Penicillium echinulatum* cellulase gene. *Journal of Applied Microbiology*, *108*(4), 1187-1198. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04528.x

Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual* (3rd ed). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sánchez-Thomas, R., García-García, J. D., Marín-Hernández, Á., Pardo, J. P., Rodríguez-Enríquez, S., Vera-Estrella, R., López-Macay, A., & Moreno-Sánchez, R. (2020). The intracellular water volume modulates the accumulation of cadmium in Euglena gracilis. *Algal Research*, *46*, 101774. https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101774 Santiago-Martínez, M. G., Lira-Silva, E., Encalada, R., Pineda, E., Gallardo-Pérez, J. C., Zepeda-Rodriguez, A., Moreno-Sánchez, R., Saavedra, E., & Jasso-Chávez, R. (2015). Cadmium removal by Euglena gracilis is enhanced under anaerobic growth conditions. *Journal of Hazardous Materials*, 288, 104-112. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.02.027

Sasoni, N., Ferrero, D. M. L., Guerrero, S. A., Iglesias, A. A., & Arias, D. G. (2019). First evidence of glutathione metabolism in Leptospira interrogans. *Free Radical Biology and Medicine*, *143*, 366-374. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.08.028

Schafer, F. Q., & Buettner, G. R. (2001). Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biology and Medicine*, *30*(11), 1191-1212. https://doi.org/10.1016/S0891-5849(01)00480-4

Schürmann, P., & Buchanan, B. B. (2008). The Ferredoxin/Thioredoxin System of Oxygenic Photosynthesis. *Antioxidants & Redox Signaling*, *10*(7), 1235-1274. https://doi.org/10.1089/ars.2007.1931

Schwartzbach, S. D., & Shigeoka, S. (Eds.). (2017). *Euglena: Biochemistry, Cell and Molecular Biology* (Vol. 979). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-54910-1

Schwarzhans, J.-P., Cholewa, D., Grimm, P., Beshay, U., Risse, J.-M., Friehs, K., & Flaschel, E. (2015). Dependency of the fatty acid composition of Euglena gracilis on growth phase and culture conditions. *Journal of Applied Phycology*, 27(4), 1389-1399. https://doi.org/10.1007/s10811-014-0458-4

Shen, M., & Sali, A. (2006). Statistical potential for assessment and prediction of protein structures. *Protein Science*, *15*(11), 2507-2524. https://doi.org/10.1110/ps.062416606

Shibakami, M., Tsubouchi, G., Nakamura, M., & Hayashi, M. (2013). Preparation of carboxylic acid-bearing polysaccharide nanofiber made from euglenoid β-1,3-glucans. *Carbohydrate Polymers*, *98*(1), 95-101. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.05.026

Shibakami, M., Tsubouchi, G., & Hayashi, M. (2014). Thermoplasticization of euglenoid  $\beta$ -1,3-glucans by mixed esterification. *Carbohydrate Polymers*, *105*, 90-96. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.01.053

Shibakami, M., Shibata, K., Akashi, A., Onaka, N., Takezaki, J., Tsubouchi, G., & Yoshikawa, H. (2019). Creation of Straight-Chain Cationic Polysaccharide-Based Bile Salt Sequestrants Made from Euglenoid  $\beta$ -1,3-Glucan as Potential Antidiabetic Agents. *Pharmaceutical Research*, *36*(1), 23. https://doi.org/10.1007/s11095-018-2553-8

Shibakami, M. (2021). Organic-solvent-dispersible paramylon nanofibers: Hygroscopicity and extended dye release from its cast films. *Polymer*, 230, 124082. https://doi.org/10.1016/j.polymer.2021.124082

Shigeoka, S., Yasumoto, R., Onishi, T., Nakano, Y., & Kitaoka, S. (1987a). Properties of Monodehydroascorbate Reductase and Dehydroascorbate Reductase and Their Participation in the Regeneration of Ascorbate in Euglena gracilis. *Microbiology*, *133*(2), 227-232. https://doi.org/10.1099/00221287-133-2-227

Shigeoka, S., Onishi, T., Nakano, Y., & Kitaoka, S. (1987b). Photoinduced Biosynthesis of Glutathione in *Euglena gracilis*. *Agricultural and Biological Chemistry*, *51*(8), 2257-2258. https://doi.org/10.1080/00021369.1987.10868354

Shrestha, K. L., Liu, S.-W., Huang, C.-P., Wu, H.-M., Wang, W.-C., & Li, Y.-K. (2011). Characterization and identification of essential residues of the glycoside hydrolase family 64 laminaripentaose-producing- -1, 3-glucanase. *Protein Engineering Design and Selection*, 24(8), 617-625. https://doi.org/10.1093/protein/gzr031

Simmons, T. J., & Fry, S. C. (2017). Bonds broken and formed during the mixed-linkage glucan: Xyloglucan endotransglucosylase reaction catalysed by *Equisetum* hetero-trans-β-glucanase. *Biochemical Journal*, 474(7), 1055-1070. https://doi.org/10.1042/BCJ20160935

Škodová-Sveráková, I., Záhonová, K., Bučková, B., Füssy, Z., Yurchenko, V., & Lukeš, J. (2020). Catalase and Ascorbate Peroxidase in Euglenozoan Protists. *Pathogens*, *9*(4), 317. https://doi.org/10.3390/pathogens9040317

Somogyi, M. (1952). NOTES ON SUGAR DETERMINATION. Journal of Biological Chemistry, 195(1), 19-23. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)50870-5

Spohner, S. C., Schaum, V., Quitmann, H., & Czermak, P. (2016). Kluyveromyces lactis: An emerging tool in biotechnology. *Journal of Biotechnology*, 222, 104-116. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.02.023

Storani, A., Guerrero, S. A., & Iglesias, A. A. (2023). Insights to improve the activity of glycosyl phosphorylases from Ruminococcus albus 8 with cello-oligosaccharides. *Frontiers in Chemistry*, *11*, 1176537. https://doi.org/10.3389/fchem.2023.1176537

Studer, G., Rempfer, C., Waterhouse, A. M., Gumienny, R., Haas, J., & Schwede, T. (2020). QMEANDisCo—Distance constraints applied on model quality estimation. *Bioinformatics*, *36*(6), 1765-1771. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz828

Sugiyama, A., Hata, S., Suzuki, K., Yoshida, E., Nakano, R., Mitra, S., Arashida, R., Asayama, Y., Yabuta, Y., & Takeuchi, T. (2010). Oral Administration of Paramylon, a .BETA.-1,3-D-Glucan Isolated from Euglena gracilis Z Inhibits Development of Atopic Dermatitis-Like Skin Lesions in NC/Nga Mice. *Journal of Veterinary Medical Science*, 72(6), 755-763. https://doi.org/10.1292/jvms.09-0526

Sun, S., Wei, X., & You, C. (2019). The Construction of an In Vitro Synthetic Enzymatic Biosystem that Facilitates Laminaribiose Biosynthesis from Maltodextrin and Glucose. *Biotechnology Journal*, *14*(4), 1800493. https://doi.org/10.1002/biot.201800493

Sun, S., & You, C. (2021). Disaccharide phosphorylases: Structure, catalytic mechanisms and directed evolution. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 6(1), 23-31. https://doi.org/10.1016/j.synbio.2021.01.004
Suzuki, K., Mitra, S., Iwata, O., Ishikawa, T., Kato, S., & Yamada, K. (2015). Selection and characterization of *Euglena anabaena* var . *Minor* as a new candidate *Euglena* species for industrial application. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *79*(10), 1730-1736. https://doi.org/10.1080/09168451.2015.1045828

Suzuki, K., Nakashima, A., Igarashi, M., Saito, K., Konno, M., Yamazaki, N., & Takimoto, H. (2018). Euglena gracilis Z and its carbohydrate storage substance relieve arthritis symptoms by modulating Th17 immunity. *PLOS ONE*, *13*(2), e0191462. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191462

Suzuki, M., Kaneda, K., Nakai, Y., Kitaoka, M., & Taniguchi, H. (2009). Synthesis of cellobiose from starch by the successive actions of two phosphorylases. *New Biotechnology*, *26*(3-4), 137-142. https://doi.org/10.1016/j.nbt.2009.07.004

Takeda, T., Nakano, Y., Takahashi, M., Konno, N., Sakamoto, Y., Arashida, R., Marukawa, Y., Yoshida, E., Ishikawa, T., & Suzuki, K. (2015). Identification and enzymatic characterization of an endo-1,3-β-glucanase from Euglena gracilis. *Phytochemistry*, *116*, 21-27. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.05.010

Takeyama, H., Kanamaru, A., Yoshino, Y., Kakuta, H., Kawamura, Y., & Matsunaga, T. (1997). Production of antioxidant vitamins, β-carotene, vitamin C, and vitamin E, by two-step culture of Euglena gracilis Z. *Biotechnology and Bioengineering*, 53(2), 185-190. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19970120)53:2<185::AID-BIT8>3.0.CO;2-K

Tamaki, S., Maruta, T., Sawa, Y., Shigeoka, S., & Ishikawa, T. (2014). Identification and functional analysis of peroxiredoxin isoforms in *Euglena gracilis*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 78(4), 593-601. https://doi.org/10.1080/09168451.2014.890037

Tamaki, S., Tanno, Y., Kato, S., Ozasa, K., Wakazaki, M., Sato, M., Toyooka, K., Maoka, T., Ishikawa, T., Maeda, M., & Shinomura, T. (2020). Carotenoid accumulation in the eyespot apparatus required for phototaxis is independent of chloroplast development in Euglena gracilis. *Plant Science*, *298*, 110564. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110564

Tanaka, Y., Ogawa, T., Maruta, T., Yoshida, Y., Arakawa, K., & Ishikawa, T. (2017). Glucan synthase-like 2 is indispensable for paramylon synthesis in *Euglena gracilis*. *FEBS Letters*, 591(10), 1360-1370. https://doi.org/10.1002/1873-3468.12659

Tanaka, Y., Goto, K., Luo, J., Nishino, K., Ogawa, T., Maruta, T., & Ishikawa, T. (2022a). Identification of glucanases and phosphorylases involved in hypoxic paramylon degradation in Euglena gracilis. *Algal Research*, 67, 102829. https://doi.org/10.1016/j.algal.2022.102829

Tanaka, Y., Goto, K., Luo, J., Nishino, K., Ogawa, T., Maruta, T., & Ishikawa, T. (2022b). Identification of glucanases and phosphorylases involved in hypoxic paramylon degradation in Euglena gracilis. *Algal Research*, 67, 102829. https://doi.org/10.1016/j.algal.2022.102829

Tateishi, N., Higashi, T., Shinya, S., Naruse, A., & Sakamoto, Y. (1974). Studies on the Regulation of Glutathione Level in Rat Liver. *The Journal of Biochemistry*, 75(1), 93-103. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a130387

Teerawanichpan, P., & Qiu, X. (2010). Fatty Acyl-CoA Reductase and Wax Synthase from Euglena gracilis in the Biosynthesis of Medium-Chain Wax Esters. *Lipids*, *45*(3), 263-273. https://doi.org/10.1007/s11745-010-3395-2

Teufel, F., Almagro Armenteros, J. J., Johansen, A. R., Gíslason, M. H., Pihl, S. I., Tsirigos, K. D., Winther, O., Brunak, S., von Heijne, G., & Nielsen, H. (2022). SignalP 6.0 predicts all five types of signal peptides using protein language models. *Nature Biotechnology*, 40(7), 1023-1025. https://doi.org/10.1038/s41587-021-01156-3

Thumuluri, V., Almagro Armenteros, J. J., Johansen, A. R., Nielsen, H., & Winther, O. (2022). DeepLoc 2.0: Multi-label subcellular localization prediction using protein language models. *Nucleic Acids Research*, *50*(W1), W228-W234. https://doi.org/10.1093/nar/gkac278

Tomos, A. D., & Northcote, D. H. (1978). A protein-glucan intermediate during paramylon synthesis. *Biochemical Journal*, *174*(1), 283-290. https://doi.org/10.1042/bj1740283

Trott, O., & Olson, A. J. (2009). AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, NA-NA. https://doi.org/10.1002/jcc.21334

Tucci, S., Vacula, R., Krajcovic, J., Proksch, P., & Martin, W. (2010). Variability of Wax Ester Fermentation in Natural and Bleached *Euglena gracilis* Strains in Response to Oxygen and the Elongase Inhibitor Flufenacet. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, *57*(1), 63-69. https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2009.00452.x

Tunyasuvunakool, K., Adler, J., Wu, Z., Green, T., Zielinski, M., Žídek, A., Bridgland, A., Cowie, A., Meyer, C., Laydon, A., Velankar, S., Kleywegt, G. J., Bateman, A., Evans, R., Pritzel, A., Figurnov, M., Ronneberger, O., Bates, R., Kohl, S. A. A., ... Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction for the human proteome. *Nature*, *596*(7873), 590-596. https://doi.org/10.1038/s41586-021-03828-1

Ubiparip, Z., De Doncker, M., Beerens, K., Franceus, J., & Desmet, T. (2021). β-Glucan phosphorylases in carbohydrate synthesis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *105*(10), 4073-4087. https://doi.org/10.1007/s00253-021-11320-z

Vaikuntapu, P. R., Rambabu, S., Madhuprakash, J., & Podile, A. R. (2016). A new chitinase-D from a plant growth promoting Serratia marcescens GPS5 for enzymatic conversion of chitin. *Bioresource Technology*, 220, 200-207. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.08.055

Vaitukaitis, J. L. (1981). [2] Production of antisera with small doses of immunogen: Multiple intradermal injections. En *Methods in Enzymology* (Vol. 73, pp. 46-52). Elsevier. https://doi.org/10.1016/0076-6879(81)73055-6 van Dongen, S. F. M., Elemans, J. A. A. W., Rowan, A. E., & Nolte, R. J. M. (2014). Processive Catalysis. *Angewandte Chemie International Edition*, 53(43), 11420-11428. https://doi.org/10.1002/anie.201404848

Wang, W., Archbold, T., Lam, J. S., Kimber, M. S., & Fan, M. Z. (2019). A processive endoglucanase with multi-substrate specificity is characterized from porcine gut microbiota. *Scientific Reports*, *9*(1), 13630. https://doi.org/10.1038/s41598-019-50050-1

Wang, Y., Zhao, Y., Wang, X., Zhong, L., Fan, Q., Lan, Z., Ye, X., Huang, Y., Li, Z., & Cui, Z. (2021). Functional Characterization of the Novel Laminaripentaose-Producing β-1,3-Glucanase *Mo* GluB and Its Biocontrol of *Magnaporthe oryzae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(33), 9571-9584. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c03072

Webb, B., & Sali, A. (2016). Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER. *Current Protocols in Protein Science*, 86(1). https://doi.org/10.1002/cpps.20

Woo, J.-B., Kang, H.-N., Woo, E.-J., & Lee, S.-B. (2014). Molecular cloning and functional characterization of an endo-β-1,3-glucanase from Streptomyces matensis ATCC 23935. *Food Chemistry*, *148*, 184-187. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.137

Wu, H.-M., Liu, S.-W., Hsu, M.-T., Hung, C.-L., Lai, C.-C., Cheng, W.-C., Wang, H.-J., Li, Y.-K., & Wang, W.-C. (2009). Structure, Mechanistic Action, and Essential Residues of a GH-64 Enzyme, Laminaripentaose-producing β-1,3-Glucanase. *Journal of Biological Chemistry*, 284(39), 26708-26715. https://doi.org/10.1074/jbc.M109.010983

Wu, S., & Wu, S. (2020). Processivity and the Mechanisms of Processive Endoglucanases. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 190(2), 448-463. https://doi.org/10.1007/s12010-019-03096-w

Yang, J., & Zhang, Y. (2015). I-TASSER server: New development for protein structure and function predictions. *Nucleic Acids Research*, 43(W1), W174-W181. https://doi.org/10.1093/nar/gkv342

Yang, Y., Lenherr, E. D., Gromes, R., Wang, S., Wirtz, M., Hell, R., Peskan-Berghöfer, T., Scheffzek, K., & Rausch, T. (2019). Plant glutathione biosynthesis revisited: Redox-mediated activation of glutamylcysteine ligase does not require homo-dimerization. *Biochemical Journal*, 476(7), 1191-1203. https://doi.org/10.1042/BCJ20190072

Ye, X., Zhu, Z., Zhang, C., & Zhang, Y.-H. P. (2011). Fusion of a family 9 cellulosebinding module improves catalytic potential of Clostridium thermocellum cellodextrin phosphorylase on insoluble cellulose. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *92*(3), 551-560. https://doi.org/10.1007/s00253-011-3346-8

Yennamalli, R. M., Rader, A. J., Kenny, A. J., Wolt, J. D., & Sen, T. Z. (2013). Endoglucanases: Insights into thermostability for biofuel applications. *Biotechnology for Biofuels*, 6(1), 136. https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-136 Yoshida, Y., Tomiyama, T., Maruta, T., Tomita, M., Ishikawa, T., & Arakawa, K. (2016). De novo assembly and comparative transcriptome analysis of Euglena gracilis in response to anaerobic conditions. *BMC Genomics*, *17*(1), 182. https://doi.org/10.1186/s12864-016-2540-6

Yubuki, N., & Leander, B. S. (2018). Diversity and Evolutionary History of the Symbiontida (Euglenozoa). *Frontiers in Ecology and Evolution*, *6*, 100. https://doi.org/10.3389/fevo.2018.00100

Zhang, H., & Forman, H. J. (2012). Glutathione synthesis and its role in redox signaling. Seminars in Cell & Developmental Biology, 23(7), 722-728. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2012.03.017

Zhang, R., & Edgar, K. J. (2014). Properties, Chemistry, and Applications of the Bioactive Polysaccharide Curdlan. *Biomacromolecules*, *15*(4), 1079-1096. https://doi.org/10.1021/bm500038g

Zhang, X.-Z., Sathitsuksanoh, N., & Zhang, Y.-H. P. (2010). Glycoside hydrolase family 9 processive endoglucanase from Clostridium phytofermentans: Heterologous expression, characterization, and synergy with family 48 cellobiohydrolase. *Bioresource Technology*, *101*(14), 5534-5538. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.152

Zoltner, M., & Field, M. C. (2022). Microbe Profile: Euglena gracilis: photogenic, flexible and hardy. *Microbiology*, *168*(9). https://doi.org/10.1099/mic.0.001241

Zverlov, V. V., Volkov, I. Y., Velikodvorskaya, T. V., & Schwarz, W. H. (1997). Highly thermostable endo-1,3- $\beta$  -glucanase (laminarinase) Lam A from Thermotoga neapolitana: Nucleotide sequence of the gene and characterization of the recombinant gene product. *Microbiology*, *143*(5), 1701-1708. https://doi.org/10.1099/00221287-143-5-1701