

Informe final publicable de proyecto
Generación de herramientas biotecnológicas para
análisis de glicanos biológicos, basadas en la
inmovilización de glicosidasas

Código de proyecto ANII: FMV_1_2019_1_155764

25/11/2022

Resumen del proyecto

Los glicanos presentes en glicolípidos y glicoproteínas participan en numerosos procesos fisiológicos. Por lo cual una alteración en sus patrones de glicosilación se traduce en enfermedades tales como desórdenes congénitos de la glicosilación, enfermedades autoinmunes, infecciosas o inflamatorias crónicas y cáncer. Los carbohidratos también se encuentran involucrados en procesos de infección parasitaria o viral, participando tanto en su propagación como en la evasión de la respuesta inmune del hospedero. Conociendo la estructura y función de los glicanos es posible comprender el rol que desempeñan en procesos infecciosos o en el desarrollo de algunas enfermedades, lo que permite el diseño de métodos de diagnóstico y tratamientos terapéuticos. Las glicosidasas inmovilizadas son herramientas excelentes para esta finalidad ya que hacen posible la remoción selectiva de glicanos sin alterar la estructura tridimensional de las glicoproteínas. Esto permite la evaluación de las moléculas deglicosiladas en procesos biológicos, de forma de determinar la relevancia del glicano removido en el mismo. Presentan como ventaja adicional su fácil remoción del medio de reacción y su reuso. Dado la relevancia de la manosa y la fucosa en los procesos biológicos protagonizados por los parásitos, área en la que nuestro grupo tiene experiencia, el objetivo de este proyecto fue la búsqueda de enzimas con actividad alfa-manosidasa y alfa-fucosidasa en microorganismos autóctonos de forma de aumentar la disponibilidad de enzimas aplicables en glicobiología. El desarrollo del mismo permitió la identificación y purificación de una alfa-manosidasas y una alfa fucosidasa proveniente de hongos filamentosos. Por otra parte fue posible la inmovilización de una alfa-manosidasa y una alfa-fucosidasa comercial, la validación de su funcionalidad para la remoción selectiva de glicanos y su aplicación a la elucidación del rol de la manosa y la fucosa en la activación de la respuesta inmune innata del hospedero por parte de glicoproteínas de *Trypanosoma cruzi*.

Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Bioquímica y Biología Molecular / Glicobiología

Palabras clave: Glicanos / Glicosidasas / Glicobiología /

Introducción

El glicoma celular está conformado por una serie de glicanos que se encuentran conjugados a lípidos o proteínas. Estos glicanos participan en procesos de reconocimiento biológico como la interacción célula-célula, célula-matriz extracelular, fundamentales en la modulación de la respuesta inmune, desarrollo embrionario, diferenciación, cáncer e interacción huésped patógeno. También participan en mecanismos de señalización celular, plegamiento de la estructura proteica y actividad enzimática [1-2]. Por lo cual, la existencia de patrones de glicosilación alterados se encuentra relacionada con diversas enfermedades tales como desórdenes congénitos de la glicosilación, enfermedades autoinmunes, infecciosas o inflamatorias crónicas al igual que el cáncer [1-7]. A su vez, los carbohidratos se encuentran involucrados en los procesos de infección parasitaria o viral, tanto en su propagación como en la evasión de la respuesta inmune del hospedero [6,8]. Los parásitos son capaces de modular la respuesta inmune induciendo la producción de citoquinas regulatorias o células mediante procesos de señalización que involucran carbohidratos específicos [7, 9-13]. De hecho, resultados recientes de nuestro grupo de investigación sugieren que los residuos de manosa terminal de los glicanos producidos por el helminto *Fasciola hepatica* serían importantes tanto en la inhibición de la maduración de células dendríticas (CD) como en la inducción de una respuesta inmune de tipo regulatoria en este parásito [14-16].

En este contexto resulta evidente que la elucidación de la composición estructural al igual que la función biológica de los glicanos presentes en glicoconjugados es fundamental para comprender el rol que desempeñan en procesos infecciosos, al igual que en el desarrollo de algunas enfermedades. Esto es esencial para el diseño tanto de métodos de diagnóstico como de tratamientos terapéuticos. Los avances realizados en glicobiología han permitido la implementación de una serie de terapias basadas en glicanos como por ejemplo el suplemento oral de monosacáridos específicos, el desarrollo de vacunas y anticuerpos terapéuticos [1]. Por otra parte se han desarrollado numerosas técnicas que han hecho posible la caracterización estructural de diversos glicanos biológicos [17-20]. Sin embargo, el estudio del rol de los glicanos en procesos biológicos resulta más complejo ya que es necesario desarrollar tecnologías que permita la remoción de la porción glicosídica sin alterar el esqueleto proteico en el caso de las glicoproteínas. Es en esta área que nuestro grupo de investigación se ha enfocado desde hace unos años desarrollando herramientas basadas en glicosidasas inmovilizadas [21-23]. Las glicosidasas son exoenzimas o endoenzimas que permiten la remoción selectiva de glicanos sin alterar la estructura tridimensional de las glicoproteínas. Por lo cual las moléculas deglicosiladas pueden ser evaluadas en procesos biológicos de forma de determinar la relevancia del glicano o monosacárido removido en el mismo. El uso de la

glicosidasa inmovilizada permite su fácil separación del medio de reacción evitando el uso de condiciones drásticas para detener la reacción enzimática y la interferencia de la glicosidasa en los estudios biológicos posteriores. A su vez la inmovilización de las enzimas permite su reuso, lo cual es clave dado el elevado costo de las mismas [24-25]. Nuestro grupo de investigación ha inmovilizado con éxito enzimas de interés en glicobiología (beta-galactosidasas de *A. oryzae*, alfa-manosidasa de *C. ensiformis*, PNGasa F de *E. miricola* y Neruamindiasa de *C. perfringens*) sobre agarosa y nanopartículas magnéticas [21-23]. Estas glicosidasas inmovilizadas permitieron la deglicosilación selectiva de galactosa, manosa, N-glicanos y ácido siálico de diferentes glicoproteínas modelo, al igual que de extractos parasitarios de *Fasciola hepatica*. Un aspecto a destacar es que cuando la alfa-manosidasa inmovilizada se utilizó en la deglicosilación de lisados de *F. hepatica* se detectaron incompatibilidades entre las condiciones óptimas para el funcionamiento de la enzima y las condiciones de estabilidad del lisado parasitario [21]. Esto pone de manifiesto la necesidad de buscar enzimas con diferentes condiciones óptimas (pH, temperaturas, especificidad por enlaces glicosídicos) de forma de generar una herramienta más universal. En esa misma línea es importante disponer de glicosidasas inmovilizadas selectivas para los glicanos más frecuentes en los glicoconjugados de relevancia a nivel biológico. Las glicosilaciones mayoritarias en humanos son la N-glicosilación donde la cadena de glicanos está unida a un residuo de asparagina (Asn) asociado a un motivo N-X-S/T (donde X es cualquier residuo excepto prolina) y la O-glicosilación que involucra la unión de un glicano a un residuo de Serina (Ser) o treonina (Thr). Todos los N-glicanos comparten un núcleo glicosídico común (Man3GlcNAc2) el cual puede encontrarse elongado con una variedad de monosacáridos dando lugar a estructuras bi, tri o tetra-anténarias. Estos pueden clasificarse en N-glicanos con alto contenido de manosas, híbridos o complejos. Por otra parte, en la O-glicosilación la cadena de glicanos se une al átomo de oxígeno del grupo hidroxilo de un residuo de Ser/Thr. Esta se puede subclasificar de acuerdo al azúcar unido a la proteína siendo las más frecuentes las mucinas que se encuentran unidas mediante un residuo de N-acetil galactosamina (GalNAc) [1,26-27].

Por otra parte, dentro de los cambios en los patrones de glicosilación más frecuentemente asociados al cáncer se encuentran alteraciones en la sialilación y/o fucosilación en N- y O-glicanos, generación de O-glicanos truncos y ramificación de O-glicanos [1,28]. En particular se ha reportado la presencia del antígeno S_{Lex}, Lex y ley (contienen ?1-3 fucosa) como marcador tumoral al igual un aumento en la fucosilación ?1-6 en el core de N-glicanos en líneas celulares de cáncer de mama y colon [29-31]. A su vez, se han reportado alteraciones en los niveles de N-glicanos con alto contenido de manosa en líneas tumorales de cáncer de ovario e hígado [[30,32]. En cuanto al rol de los glicanos en procesos infecciosos, existen evidencias en relación a la participación de glicoproteínas virales en la evasión de la respuesta inmune (HIV e influenza) al igual que en procesos infectivos (Hendra, SARS-CoV, SARS-CoV 2, influenza, hepatitis), en particular vinculados a los N-glicanos con alto contenido de manosa [6,33]. Por otro lado, existen evidencias de que los glicanos de los helmintos afectan las vías de señalización de las células del sistema inmune. De hecho, se ha reportado el uso de componentes parasitarios para el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas al igual que enfermedades autoinmunes [34-35]. Dado la relevancia de la alfa- fucosidasas en función del rol que cumplen los glicanos fucosilados en procesos tumorales y de infección parasitaria o viral se propuso incorporar la fucosidasa en la batería de enzimas inmovilizadas con las que ya venimos trabajando. Cabe destacar que hasta el momento, a los efectos de validar el proceso de inmovilización al igual que la funcionalidad de la enzima inmovilizada se ha trabajado con enzimas comerciales. Sin embargo, el alto costo de las mismas no hace viable la inmovilización a mayor escala.

En función de lo expresado anteriormente el objetivo de este trabajo era ampliar la gama de glicosidasas inmovilizadas disponibles para el análisis de glicanos. Dado la relevancia de la manosa y la fucosa en los procesos biológicos y en particular aquellos protagonizados por parásitos, área con la que nuestro grupo ha estado trabajando se propuso enfocar el proyecto en el trabajo con alfa-manosidasa y alfa-fucosidasa [3,9,36].

El proyecto se estructuró en tres niveles. En un primer nivel se planteó la inmovilización sobre soportes activados con grupos cianato ester de glicosidasas comerciales: i) alfa-manosidasa neutra (alfa-manosidasa de *Bacteroides thetaiotaomicron*); ii) fucosidasa neutra (alfa-(1-2,3,4,6)-L-Fucosidasa de *Homo sapiens*) con el objetivo de ampliar el repertorio de enzimas inmovilizadas. Esto permitiría validar y optimizar el proceso de inmovilización y verificar la efectividad de las glicosidasas inmovilizadas en la deglicosilación de glicoproteínas modelo. Estos procedimientos podrían luego transferirse a las enzimas identificadas y purificadas en nuestro laboratorio.

En un segundo nivel se planteó la realización de un screening de alfa- manosidasas y alfa-fucosidasas en diferentes microorganismos disponibles en la colección de la Dra. Paula Rodríguez del Laboratorio de Biocatálisis y Biotransformaciones, Facultad de Química con el objetivo de purificarlas e inmovilizarlas apuntando a un escalado de la inmovilización a futuro. Nuestro enfoque original fue el screening de estas glicosidasas en bacterias de los géneros *Pseudomona* y *Bacillus* debido a que la presencia de estas enzimas ya había sido reportada en la bibliografía, pero con la posibilidad de extenderla a otros microorganismos en caso de ser necesario.

En una tercera etapa se planteó la aplicación de las glicosidasas inmovilizadas (ya sea con enzimas comerciales o aisladas) a la demanosilación y defucosilación de extractos parasitarios. Se propuso como método para la evaluación de la efectividad de la deglicosilación i) ensayos de reconocimiento con lectinas y ii) evaluación de cambios en la modulación de células dendríticas o activación de la vía NFκB mediada por receptores de tipo TLR como consecuencia de la deglicosilación en los lisados parasitarios.

Los resultados esperados de este proyecto eran : i) la identificación de enzimas con actividad alfa-manosidasa y alfa-fucosidasa en organismos autóctonos; ii) seleccionar aquellos que presentaran una mayor actividad y desarrollar una estrategia de purificación para obtener enzimas puras pasibles de ser inmovilizadas para aplicación como herramientas en glicobiología; iii) Validar la aplicación de las glicosidasas inmovilizadas ya sea comerciales o purificadas en nuestro laboratorio a la elucidación de la fucosa/manosa en procesos de infección parasitaria.

Metodología/diseño del estudio

Se realizó un screening de actividad alfa-manosidasa y alfa-fucosidas en distintas cepas de bacterias, levaduras y hongos. Si bien originalmente se propuso el screening en bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus*, la ausencia de actividad en esas cepas y/o la dificultad en la purificación de las enzimas identificadas hizo necesario extender la búsqueda hacia otros organismos. Una vez identificadas enzimas con actividad alfa-manosidasa o alfa-fucosidasa se procedió a la purificación y caracterización de las mismas para su posterior inmovilización. En forma paralela se inmovilizó la alfa-fucosidasa de *homo sapiens* y la alfa-manosidasa de *Bacteroides thetaiotaomicron* y se verificó su funcionalidad para la deglicosilación de glicoproteínas modelo. Finalmente dichas enzimas inmovilizadas se utilizaron para la elucidación de la función de manosa y fucosa en lisados de *T. cruzi*.

A continuación se describe la metodología utilizada

Cultivo de células

Las bacterias se sembraron en placas de TSA, se realizó un precultivo en medio LB (NaCl 1%, triptona 1%, extracto de levadura 0.5%) y finalmente se crecieron en el siguiente medio líquido: NaCl 1%, triptona 0.5%, Extracto de levadura (1%) durante 24-72 hs a 150 rpm.

Las levaduras se sembraron en placas de PDA, se realizó un precultivo en medio PDB y finalmente se crecieron en medio Czapek-manosidasa (NaNO₃ 0.8%; KH₂PO₄ 0.3%; KCl 0.15%; MgSO₄ 0.15 %; bactopectona 0.5%; extracto de levadura 2%) o Czapek-fucosidasa (NaNO₃ 0.8%; KH₂PO₄ 0.3%; KCl 0.15%; MgSO₄ 0.15%; bactopectona 0.5%; extracto de levadura 0.1%; fucosa 0.25%) a 150 rpm, 30°C durante 48 horas.

Los hongos se sembraron en placas de PDA y se inoculó una pieza de 1 cm de diámetro del micelio del hongo aislado crecido en placas de PDA en medio líquido Czapek-manosidasa o Czapek-fucosidasa a 150 rpm a 30°C durante 5 días.

Se separó el sobrenadante por centrifugación 4°C, 12000 durante 20 min. El pellet de células se lavó con PBS y se resuspendió en 500µL de buffer de Lisis (1.75g NaCl en 100 mL de buffer MES pH 6.5 para manosidasa y 1.08 g NaH₂PO₄.H₂O, 0.916 g Na₂HPO₄ anhidro, 1.75 g NaCl en 100 mL de agua para fucosidasa) y se sonicó con una amplitud de 40% con pulsos de 30 segundos y 10 segundos de descanso durante 2 minutos. Se evaluó actividad enzimática en el sobrenadante de cultivo y en el extracto celular de acuerdo a la metodología que se describe a continuación.

Optimización de las condiciones de cultivo para maximizar la producción de enzimas

Para los microorganismo seleccionados se optimizó la fuente de carbono/inductor, concentración de los mismos, inóculo del microorganismo, temperatura y tiempo de incubación de forma de maximizar la producción de la enzima correspondiente. Para producción de alfa-manosidasas se estudió como inductor extracto de levadura y BioMos (preparado de mananos) y para alfa-fucosidasa fucosa y Mucina gástrica porcina (PGM). Se utilizó un sistema factorial en dos niveles con o sin punto medio utilizando el programa design expert [37-39].

Medida de actividad enzimática

Se incubaron 50 µL de extracto celular o sobrenadante de cultivo con 450 µL de 5 mM p-nitrofenil-β-D-manopiranosido (PNPM) en buffer MES 0.1 M, pH 6.5; 2.5 mM CaCl₂ o de 2 mM de p-nitrofenil-β-D-fucopiranosido (PNPF) en PBS pH 6.5 a 37°C para actividad manosidasa o fucosidasa respectivamente. Se sacaron alícuotas de 70 µL a distintos tiempos y se agregaron 130 µL de buffer borato de sodio 0.2 M, pH 9.8 para detener a reacción enzimática. Se midió absorbancia a 405 nm y se determinó la concentración de p-nitrofenol utilizando una curva de calibración. Se definió la unidad de enzima como la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar 1 µmol de PNPM o PNPF por minuto a pH 6.5 y 37°C para manosidasa o fucosidasa respectivamente.

Para alfa-fucosidasa también se evaluó la actividad enzimática utilizando como sustrato mucina gástrica porcina (PGM por sus siglas en inglés). Se incubó la enzima con PGM 10 mg/mL a 37°C y pH 6.5 y se evaluó liberación de fucosa en

función del tiempo utilizando un kit enzimático para determinación de fucosa (Megazyme) [21,40].

Purificación y caracterización de glicosidasas

Se utilizaron estrategias de fraccionamiento salino (30%, 50% y 80% de NH₄SO₄) o de precipitación fraccionada con solventes orgánicos (acetona, etanol, isopropanol 30-65%) seguida de cromatografía de exclusión molecular y/o cromatografía de intercambio iónico utilizando equipo AKTA purifier equipado con detector UV. Para la cromatografía de intercambio iónico se utilizó una columna high trap Q HP, eluyendo mediante gradiente de NaCl (0 – 1M). Para la cromatografía de exclusión molecular se utilizó una columna Superdex 200 (10/300) y buffer fosfato de sodio 50 mM pH 7.5; 0.15M NaCl como buffer de elución. La purificación se siguió mediante determinación de actividad específica y la pureza se verificó por electroforesis. Se determinó peso molecular mediante combinación de SDS-PAGE y cromatografía de exclusión molecular en columna Superdex 200 10/300 [41-43].

El pH óptimo se determinó realizando el ensayo de actividad descrito previamente en un rango de pH de 4.0-10. utilizando buffer acetato de sodio 50 mM (pH 4.0-6.0), buffer fosfato de sodio 50 mM (pH 7.0-8.0) y buffer carbonato de sodio (pH 9.0-10.0).

La temperatura óptima se determinó realizando el ensayo de actividad descrito previamente en buffer acetato de sodio 50 mM pH 4.0 en un rango de temperatura de 40-90°C.

Se determinó la especificidad de sustrato realizando la hidrólisis de distintos sustratos: 3-Fucosyllactose; 2'-Fucosyllactose; Lacto-N-fucopentaose I; 3-O-(α -D-Mannopyranosyl)-Dmannopyranose; 2-O-(α -D-Mannopyranosyl)-Dmannopyranose; 6-O-(α -D-Mannopyranosyl)-D-mannose; 4-O-(α -D-Mannopyranosyl)-D-mannose. Se incubó una solución de concentración adecuada de alfa-manosidasa o alfa-fucosidasa con una solución 10 mg/mL del sustrato correspondiente a 37°C durante 24 horas. Se detuvo la reacción enzimática calentando la mezcla a 100°C durante 5 minutos y se evaluaron los productos de hidrólisis por TLC o cuantificación de fucosa mediante kit enzimático en el caso de la alfa-fucosidasa.

En el caso de la cromatografía en capa fina se utilizó n-butanol: ácido acético:agua (2:1:1) como fase móvil y se reveló asperjando con una solución de difenilamina/anilina/fosfato (1g difenilamina, 1 mL de anilina, 5 ml de ácido fosfórico 85% en 50 mL de acetona) seguido de calentamiento a 120 °C durante 5 minutos con pistola de calor [44-45].

Inmovilización de glicosidasas

Se activó agarosa con grupos cianato éster Se incubaron 2 mL de glicosidasa (0.5-2 mg/mL) con agarosa (0.5 g) activadas durante 4 horas a temperatura ambiente con agitación suave. La enzima inmovilizada se separó por filtración o centrifugación [46].

Evaluación de la funcionalidad de las glicosidasas inmovilizadas

Se utilizaron como sustrato las glicoproteínas ribonucleasa B (contiene un N-glicano con alto contenido de manosa) y Lactoferrina bovina (contiene N-glicanos con alto contenido de manosa y N-glicanos complejos fucosilados) para evaluar la alfa-manosidasa y alfa-fucosidasa respectivamente [47-48]. Se incubó la enzima inmovilizada con la correspondiente glicoproteína en PBS a 37 °C durante 24 h. Se separó la enzima inmovilizada por filtración y al sobrenadante se le realizó una cromatografía de exclusión molecular en columnas NAP-5 (sephadex G25) para separar los glicanos liberados de la glicoproteína deglicosilada. Se analizó mediante ensayos de reconocimiento con lectinas.

Ensayo de afinidad con lectinas

Se sensibilizaron microplacas de ELISA (Nunc Maxisorp) con 50 µg/mL de las proteínas modelo deglicosiladas, se bloqueó con BSA 1% y se incubó con diferentes concentraciones de lectina Concanavalina A (reconoce manosa) y Ulex europaeus (reconoce fucosa). Se incubó con estreptavidina conjugada a peroxidasa de rábano, se reveló utilizando o-fenilendiamina y se midió absorbancia a una longitud de onda de 492 nm.

Aplicación de de las glicosidasas inmovilizadas a la elucidación de la función de los glicanos en lisados de T. cruzi.

Los lisados parasitarios se obtuvieron por disrupción mecánica y homogeneización en buffer fosfato de sodio 15 mM, pH 7.0 conteniendo 50 mM NaCl e inhibidores de proteasa. Se dializaron contra PBS durante 24 horas y se incubaron con las enzimas inmovilizadas bajo las condiciones óptimas de la enzima compatibles con la estabilidad de los lisados.

El efecto biológico de la remoción de glicanos en lisados parasitarios, se evaluó mediante la determinación de cambios en la capacidad de los lisados de T. cruzi de activar la vía NFκB mediada por la interacción con receptores de tipo TLR como

consecuencia de la remoción enzimática de manosa o fucosa.

Evaluación de la activación de la vía NFκB mediada por receptores TLR.

Se utilizaron líneas celulares humanas que expresan diferentes TLRs humanos (hTLR2 y hTLR4). Se incubaron los activadores de los distintos TLR (controles) con los lisados parasitarios y los lisados parasitarios deglicosilados con células expresando TLR en un medio de cultivo HEK-Blue durante 24 h a 37°C y 5% CO₂. Si tiene lugar la interacción del ligando con el receptor TLR, se desencadena una cascada de señalización que activa el factor de transcripción NF-κB liberando una proteína reportera (fosfatasa alcalina embrionaria) que puede ser cuantificada por un ensayo colorimétrico evaluado por A 655.

Resultados, análisis y discusión

* Las tablas y las figuras correspondientes a esta sección se encuentran en un anexo.

screening de alfa- manosidasas y alfa-fucosidasas en diferentes microorganismos disponibles

Screening en bacterias

Se identificó actividad alfa manosidasa a nivel intracelular y extracelular en 8 y 5 cepas de bacterias respectivamente, utilizando extracto de levadura como inductor y p-nitrofenil-alfa-D-manopiranosidos (PNPM) como sustrato (Tabla 1). Sin embargo, no fue posible identificar actividad alfa-fucosidasa en ninguna de las cepas bacterianas. En este caso se utilizó fucosa como inductor y p-nitrofenil-alfa-L fucopiranosido (PNPF) y mucina gástrica porcina (PGM) como sustratos.

Screening en levaduras

Se identificó actividad alfa-manosidasa extracelular en 5 levaduras y actividad alfa-fucosidasa extracelular utilizando PGM como sustrato para 4 levaduras (Tabla 2).

Screening en hongos filamentosos

Se identificó actividad alfa-manosidasa y alfa fucosidasa para cuatro y tres cepas respectivamente (Tabla 3), utilizando los mismos inductores y sustratos que para los casos anteriores.

Optimización de condiciones de crecimiento de cultivo para producción de alfa-manosidasa y alfa-fucosidasa

Se observó actividad alfa manosidasa en diversas cepas de bacterias, levaduras y hongos. Dado la mayor información bibliográfica disponible para alfa-manosidasa de bacterias, en particular del género *Bacillus* y a el hecho de que es más fácil la purificación de una enzima extracelular se seleccionaron las cepas de *Bacillus* sp 12.22 y *Bacillus* sp X para optimizar las condiciones de cultivo para la producción de alfa-manosidasa y posterior purificación. Por el otra parte para el caso de alfa-fucosidas se observó actividad extracelular en levaduras utilizando PGM como sustrato y en hongos utilizando PNPF como sustrato. Dado que se facilita el seguimiento de la actividad alfa-fucosidasa cuando se utiliza como sustrato PNPF se seleccionaron las cepas de los hongos *Fusarium* sp y DS a los efectos de optimizar las condiciones de cultivo para maximizar la producción de alfa-fucosidasa.

Optimización del crecimiento de cultivos de *Bacillus* sp 12.22 y *Bacillus* sp X

Se realizó un diseño factorial de cuatro factores en dos niveles utilizando el software design expert y evaluando la velocidad de hidrólisis de PNPM. Los factores evaluados fueron: inductor (Extracto de levadura vs BioMos), concentración del inductor (0.5%-2%) temperatura (30-37°C) y tiempo (24-72 horas). Las condiciones óptimas fueron 2% de extracto de levadura, 30°C y 24 h para el *Bacillus* sp 12.22 y 2% de extracto de levadura, 30°C y 72 h para *Bacillus* sp X. Sin embargo, en este último caso las diferencias no fueron significativas respecto al crecimiento en 2% de BioMos, 37°C y 24 h, condiciones que permiten reducir los tiempos de incubación (Figura 1)

Optimización del crecimiento de cultivo de *Fusarium* spY3 y DS

Se evaluó la producción de alfa-fucosidasa extracelular de los hongos *Fusarium* sp y DS utilizando fucosa y PGM como inductor a 5 y 7 días, 30 °C y 150 rpm. La mayor actividad alfa-fucosidasa extracelular fue la producida por el hongo DS utilizando PGM como fuente de carbono cuando se creció durante 5 días (Figura 2). Se optimizaron las condiciones de cultivo del hongo DS para la producción de alfa-fucosidasa realizando un diseño factorial de tres factores en dos niveles

con cuatro puntos intermedios. Los factores estudiados fueron la concentración de PGM (1-3%), el tiempo (5-9 días) y la temperatura (28-32°C), siendo los puntos medios 2%, 7 días y 30°C. Se evaluó la velocidad de hidrólisis de PNPf y las condiciones óptimas fueron: 3% PGM, 9 días y 30 °C (Figura 3). Sin embargo, dado que la actividad enzimática obtenida a los 9 días no ofrecía diferencias significativas con la obtenida a 7 días y teniendo cuenta que a los efectos prácticos resultaba más beneficioso trabajar con cultivos de 7 días, se continuó trabajando con 3% PGM, 7 días y 30 °C.

Purificación de alfa fucosidasa

Se realizó una precipitación fraccionada con NaSO₄ 50 y 80% que permitió la concentración de la proteína al igual que una purificación parcial ya que parte de las proteínas del sobrenadante de cultivo precipitan con NaSO₄ 50% mientras que la alfa-fucosidasa permanece en solución y precipita a una concentración de 80% (Figura 4). El precipitado con NaSO₄ 80% redisolto se dializó contra buffer fosfato de sodio 20 mM pH 7.5 y se adsorbió en batch en una columna Capto Q (intercambiador aniónico) eluyéndose en columna por aumento de fuerza iónica (NaCl 0.8M) (Figura 5). El pool del eluido del intercambio iónico se dializó contra buffer fosfato de sodio 20 mM pH 7.5 y se liofilizó, se retomó en un mínimo volumen de agua, y se continuó la purificación con una cromatografía de exclusión molecular en una columna superdex 200 10/300 utilizando como eluyente buffer fosfato de sodio 50 mM pH 7.5; NaCl 0.15 M. Se observó un único pico con actividad alfa-fucosidasa indicando una purificación de la enzima (Figura 6). Las fracciones con actividad se evaluaron mediante SDS-PAGE pudiéndose identificar un primer pool relativamente puro y un segundo pool que si bien tiene actividad enzimática se encuentra impurificado con otras proteínas (Figura 7). Se caracterizó la alfa-fucosidasa purificada de DS resultando ser una proteína homodimérica con un PM de 214 kDa que presenta un pH óptimo de 4.0 y una temperatura óptima de 70 °C. Tiene una Km de 0.27 mM y presenta inhibición por sustrato. Los estudios preliminares realizados muestran indicios de su especificidad para la hidrólisis de fucosa unida por enlace alfa 1-2.

Purificación de alfa manosidasa

Dado que la actividad alfa-manosidasa del *Bacillus* sp 12.22 era levemente superior a la del *Bacillus* sp X se seleccionó para su purificación. Como primer paso para concentrar la alfa-manosidasa se evaluó una precipitación fraccionada con sulfato de amonio pero dado que se observó pérdida de actividad, se optó por concentrar la enzima mediante una precipitación con solventes. Se estudió la precipitación con etanol 65%, isopropanol 65% y acetona 60%, obteniéndose los mejores resultados con isopropanol 65% (Figura 8). Al precipitado con isopropanol 65% se le realizó un intercambio aniónico utilizando columna highTrap QHP en buffer MES 10 mM pH 6.5 eluyendo por gradiente de fuerza iónica (Figura 9). Al observar pérdida de actividad durante estos procesos se evaluó la factibilidad de precipitar la enzima con menores concentraciones de isopropanol por lo que se procede a la realización de una precipitación fraccionada con isopropanol de 10%, 35% y 65% donde se observa precipitación de la enzima ya a una concentración de isopropanol 35 % resolviendo continuar trabajando a esa concentración. Al precipitado con isopropanol 35% se le realizó el intercambio aniónico pero eluyendo con saltos de fuerza iónica (0.7M, 0.8M y 1.0M) donde se observó que la alfa-manosidasa eluía con una concentración de NaCl 0.8M pero nuevamente con pérdida de actividad (Figura 10). Se realizó un estudio de la influencia de los iones en la actividad enzimática, observándose que la misma aumentaba en presencia de MgCl₂ 10 mM y se suplementaron los buffers del intercambio iónico con dicha sal pero sin mejorar los resultados. Dado que no tenía sentido continuar con la purificación en estas circunstancias se resolvió evaluar la purificación de una alfa-manosidasa de otra fuente. Se realizó un ensayo de actividad en los sobrenadantes de cultivo de las levaduras que habían presentado actividad manosidasa pero la misma resultó ser muy baja por lo cuál se evaluó la actividad en los sobrenadantes de cultivo de los hongos (Figura 11). En función de los resultados obtenidos se resolvió optimizar las condiciones de crecimiento de cultivo del hongo AT de forma de maximizar la producción de alfa-manosidasa utilizando un diseño factorial de tres factores en dos niveles y con cuatro puntos intermedios. Los factores evaluados fueron: Concentración de extracto de levadura (1-3%), temperatura (28-32°C) y tiempo (5-9 días). Se evaluó velocidad de hidrólisis de PNPf obteniéndose las mejores producciones de enzima con 3% de extracto de levadura a 28 °C y 9 días (Figura 12). En la primera etapa de la purificación se concentraron las proteínas del sobrenadante de cultivo mediante precipitación con NaSO₄ 80% seguido de una cromatografía de intercambio aniónico en columna High Trap QHP en buffer fosfato de sodio 20 mM pH 7.5 eluyendo por gradiente de concentración con NaCl (0-1M) (Figura 13). Se realizó un pool de las fracciones de intercambio iónico con actividad y se continuó la purificación mediante cromatografía de exclusión molecular con en columna superdex 200 10/300 utilizando como eluyente buffer fosfato de sodio 50 mM pH 7.5 suplementado con NaCl 0.15M. Como se puede observar se obtuvieron dos picos con actividad donde se observa la presencia de dos bandas de peso molecular aproximado de 97 y 45 kDa (Figura 14). Actualmente se está trabajando en el escalado de la producción de alfa-manosidasa a los efectos de poder confirmar el PM y si se trata de una enzima homomultimerica o si es necesario continuar con la purificación. Una vez que se confirme un grado de pureza adecuado se procederá a su caracterización.

inmovilización de glicosidasas comerciales

Se inmovilizaron alfa-manosidasa de *Bacteroides thetaiotaomicron* (BT) y alfa-fucosidasa de *Homo sapiens* sobre agarosa activada con bromuro de cianógeno. Se obtuvieron porcentajes de inmovilización de 39.6 % y 82% para la alfa-manosidasa y alfa-fucosidasa respectivamente (Tabla 4). El porcentaje de actividad expresada de la alfa-manosidasa fue de un 41.6 % lo que indica su inmovilización en forma activa. Sin embargo, el porcentaje de actividad expresada de la alfa-fucosidasa fue de 39 % lo que indica que solo un 47 % de la enzima inmovilizada mantuvo su actividad.

Deglicosilación de RNasa B con alfa-manosidasa inmovilizada y de lactoferrina con alfa fucosidasa inmovilizada

Se realizaron las demanosilaciones de RNasa B (0.5 mg/mL) y lactoferrina (0.5 mL/mL) con alfa-manosidasa inmovilizada y alfa fucosidasa inmovilizada respectivamente, evaluando los resultados mediante ensayos de ELLA. Para todas las concentraciones de ConA evaluadas se observa una disminución en el reconocimiento de RNasa por ConA como consecuencia de la demanosilación (Figura 15). Por otra parte es posible identificar una disminución en el reconocimiento de Ulex por la lactoferrina como consecuencia de la defucosilación (Figura 16). Estos resultados demuestran la funcionalidad de las glicosidas inmovilizada para remoción selectiva de monosacáridos

Aplicación de glicosidasas inmovilizadas a la evaluación de los glicanos biológicos en las infecciones parasitarias

Varios tipos de células de la inmunidad innata expresan receptores de tipo Toll (TLRs) que son capaces de reconocer patrones moleculares presentes en patógenos desencadenando una cascada de señalización que activan determinados mecanismos moleculares asociados a este tipo de inmunidad. Si bien se sabe que algunos TLRs son capaces de reconocer glicoconjugados, el papel de los carbohidratos en la interacción con estos receptores no se ha estudiado en profundidad. Con esta finalidad se estudió si la activación de los TLR humanos, hTLR2 y hTLR4 generada por lisados de *Trypanosoma cruzi* disminuía cuando los mismos eran demanosilados o defucosilados. Esto permitiría determinar la participación de residuos de manosa y/o fucosa en la activación de receptores TLR. Se deglicosilaron lisados parasitarios de *T. cruzi* obtenidos en condiciones nativas (epi-TC-Nativo) de dos cepas diferentes (DM28c y TcvT-1) en forma análoga a la descrita para la deglicosilación de glicoproteínas modelo y se verificó la efectividad de la deglicosilación selectiva (Figuras 17 y 18). Con los lisados parasitarios deglicosilados se procedió a realizar los ensayos de activación con hTLR2 para los lisados demanosilados y hTLR4 para los defucosilados. Fue posible apreciar una disminución en la activación del hTLR2 con los lisados demanosilados frente a su control, tanto para la cepa Dm28c como para TcvT-1. Es decir, que las manosas son en parte responsables de la activación de este receptor por el lisado epi-TC-Nativo en ambas cepas (Figura 19). Por otra parte, se apreció una disminución en la señalización del hTLR4 luego del tratamiento con α -Fucosidasa en la cepa Dm28c pero no en la cepa TcvT-1 (Figura 20). Por tanto, los resultados sugieren que las fucosas terminales parecen ser en parte responsables de la activación del TLR4 humano. Estos resultados sugieren que las manosas terminales presentes en la cepa Dm28c y TcvT-1 participan en la señalización del hTLR2, mientras que las fucosas participan en la del hTLR4.

Conclusiones y recomendaciones

El objetivo general de este proyecto consistía en la búsqueda de enzimas con actividad alfa-manosidasa y alfa-fucosidas que ampliara el espectro de glicosidasas disponibles para utilizar como herramientas en glicobiología. Para esta aplicación en particular es necesario contar con enzimas con un alto grado de pureza lo cuál era un desafío en sí mismo y por otro lado tenían que poder inmovilizarse en forma activa. En este último punto y a los efectos de realizar una prueba de concepto también era un objetivo de este proyecto trabajar en la inmovilización de glicosidasas comerciales y en su aplicación para la elucidación del rol de los glicanos en las infecciones parasitarias.

El desarrollo de este proyecto permitió identificar actividad alfa-manosidasa y alfa-fucosidasas en diferentes cepas de bacterias, levadura y hongos y seleccionar una alfa-manosidasa y una alfa-fucosidasa para su purificación. La etapa de screening llevó más tiempo del previsto ya que originalmente estaba planteada la búsqueda de actividad enzimática en bacterias. Si bien fue posible encontrar enzimas bacterianas con actividad alfa-manosidasa la seleccionada para su purificación perdía la actividad durante el proceso. Por otro lado, no fue posible encontrar enzimas bacterianas con actividad alfa-fucosidasa. Esto derivó en la implementación del screening en levaduras y hongos donde se observó que las enzimas fúngicas presentaban una mayor actividad. Se seleccionaron una alfa-manosidasa y una alfa-fucosidasa fúngica con actividad considerable ya en el sobrenadante y con buena estabilidad lo que facilitaba el trabajo con las mismas. La de alfa-fucosidasa se pudo purificar y caracterizar y el proceso de purificación de la alfa-manosidasa está muy avanzado. Las dificultades encontradas a nivel de screening y/o purificación hicieron que no fuera posible llegar a inmovilizar estas enzimas en los plazos previstos pero se preve realizarlo con posterioridad a la finalización del proyecto. A su vez dado los buenos resultados obtenidos en la purificación actualmente se está evaluando con la oficina de

propiedad intelectual de la UdelaR la posibilidad de realizar una transferencia tecnológica. Cabe resaltar que al inicio de este proyecto se contaba con el interés en nuestro proyecto de la empresa Genovis, que comercializa glicosidasa. Se está evaluando la posibilidad de retomar el contacto con ellos con el asesoramiento legal adecuado.

Sabiendo que era una posibilidad real enfrentarse con dificultades durante el screening y la purificación de las enzimas ya estaba previsto el trabajo con enzimas comerciales. En ese sentido fue posible la inmovilización exitosa de la alfa-manosidasas de *Bacteroides thetaiotaomicron* y la alfa fucosidasa de *homo sapiens* con buenos rendimientos de inmovilización y actividad expresada. Se validó su uso para la deglicosilación selectiva de alfa-manosa y alfa-fucosa respectivamente de glicoproteínas modelo al igual que de lisados parasitarios. Esto permitió aplicarlas como herramienta en la elucidación del rol de la manosa y la fucosa de glicoproteínas de *Trypanosoma cruzi* en la activación de la respuesta inmune innata del hospedero. Esto último formó parte de la tesis de maestría de la Lic Mercedes Landeira "Análisis de glicoproteínas de *Trypanosoma cruzi* como

potenciales ligandos de receptores de tipo Toll de la Inmunidad Innata" de la cual fui Co-orientadora. La misma se defendió en diciembre 2021.

Está previsto finalizar la purificación de alfa-manosidasa y realizar su inmovilización al igual que la de la alfa-fucosidasa con el objetivo de poder ser utilizadas como herramienta para la elucidación del rol de los glicanos en el proceso de angiogénesis en células tumorales promovido por el factor de crecimiento VEGF. Esto forma parte de la tesis de maestría recientemente iniciada por la Lic. María Eugenia Cedrés, integrante del equipo de investigación de este proyecto. Dicha tesis se titula

Evaluación del papel de la glicosilación en la función tumoral del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y la co-orientación con la Dra. Teresa Freire.

Por otra parte los resultados del screening y purificación de alfa-manosidasa y alfa-fucosidasa formarán parte de la tesis de maestría de la Bacterióloga Lorena Herrera que recibió una beca asociada a este proyecto. La misma está en etapa de escritura y se prevé su defensa en el correr del año 2023.

En suma el desarrollo del proyecto permitió obtener resultados prometedores que han permitido avanzar en el desarrollo de herramientas biotecnológicas, contribuyeron a la formación de recursos humanos y van a dar lugar a nuevas investigaciones. Si bien no fue posible cumplir con todos los objetivos planteados dentro del tiempo de duración del proyecto se generaron las condiciones como para concretarlos en breve.

Referencias bibliográficas

- [1] C. Reily, T.J. Stewart, M.B. Renfrow, J. Novak, Glycosylation in health and disease, *Nat. Rev. Nephrol.* 15 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41581-019-0129-4>.
- [2] R.G. Spiro, Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds, *Glycobiology.* 12 (2002) 43R-56R. <https://doi.org/10.1093/glycob/12.4.43R>.
- [3] B.C. Holdener, R.S. Haltiwanger, Protein O-fucosylation: structure and function, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 56 (2019) 78–86. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2018.12.005>.
- [4] W. van Tol, H. Wessels, D.J. Lefeber, O-glycosylation disorders pave the road for understanding the complex human O-glycosylation machinery, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 56 (2019) 107–118. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2018.12.006>.
- [5] M.M. Fuster, J.D. Esko, The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets, *Nat. Rev. Cancer.* 5 (2005) 526–542. <https://doi.org/10.1038/nrc1649>.
- [6] D.J. Vigerust, V.L. Shepherd, Virus glycosylation: role in virulence and immune interactions, *Trends Microbiol.* 15 (2007) 211–218. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.03.003>.
- [7] I. van Die, R.D. Cummings, Glycan gimmickry by parasitic helminths: A strategy for modulating the host immune response?, *Glycobiology.* 20 (2010) 2–12. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwp140>.
- [8] I. Bagdonaite, S.Y. Vakhrushev, H.J. Joshi, H.H. Wandall, Viral glycoproteomes: technologies for characterization and outlook for vaccine design, *FEBS Lett.* 592 (2018) 3898–3920. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13177>.
- [9] M.L. Mickum, N.S. Prasanphanich, X. Song, N. Dorabawila, M. Mandalasi, Y. Lasanajak, A. Luyai, W.E. Secor, P.P. Wilkins, I. Van Die, D.F. Smith, A.K. Nyame, R.D. Cummings, C.A. Rivera-Marrero, Identification of Antigenic Glycans from *Schistosoma mansoni* by Using a Shotgun Egg Glycan Microarray, *Infect. Immun.* 84 (2016) 1371–1386. <https://doi.org/10.1128/iai.01349-15>.
- [10] S. Tawill, L. Le Goff, F. Ali, M. Blaxter, J.E. Allen, Both free-living and parasitic nematodes induce a characteristic Th2 response that is dependent on the presence of intact glycans., *Infect. Immun.* 72 (2004) 398–407. <https://doi.org/10.1128/iai.72.1.398-407.2004>.
- [11] B. Everts, L. Hussaarts, N.N. Driessen, M.H.J. Meevisen, G. Schramm, A.J. van der Ham, B. van der Hoeven, T. Scholzen, S. Burgdorf, M. Mohrs, E.J. Pearce, C.H. Hokke, H. Haas, H.H. Smits, M. Yazdanbakhsh, Schistosome-derived omega-1 drives Th2 polarization by suppressing protein synthesis following internalization by the mannose receptor, *J. Exp. Med.* 209 (2012) 1753–1767. <https://doi.org/10.1084/jem.20111381>.
- [12] E. van Liempt, S.J. van Vliet, A. Engering, J.J. García Vallejo, C.M.C. Bank, M. Sanchez-Hernandez, Y. van Kooyk, I. van Die, *Schistosoma mansoni* soluble egg antigens are internalized by human dendritic cells through multiple C-type lectins and suppress TLR-induced dendritic cell activation, *Mol. Immunol.* 44 (2007) 2605–2615. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2006.12.012>.
- [13] J. Heng, T. Naderer, S.A. Ralph, M.J. McConville, Chapter 12 - Glycosylated compounds of parasitic protozoa A2 - Holst, Otto, First edit, Elsevier Inc., 2010. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374546-0.00012-2>.
- [14] V. Noya, E. Rodriguez, L. Cervi, C. Giacomini, N. Brossard, C. Chiale, C. Carmona, T. Freire, Modulation of dendritic cell maturation by *Fasciola hepatica*: Implications of glycans and mucins for vaccine development, *J. Vaccines Vaccin.* 5 (2014). <https://doi.org/10.4172/2157-7560.1000233>.
- [15] E. Rodríguez, V. Noya, L. Cervi, M.L. Chiribao, N. Brossard, C. Chiale, C. Carmona, C. Giacomini, T. Freire, Glycans from *Fasciola hepatica* Modulate the Host Immune Response and TLR-Induced Maturation of Dendritic Cells, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9 (2015). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004234>.
- [16] E. Rodríguez, H. Kalay, V. Noya, N. Brossard, C. Giacomini, Y. Van Kooyk, J.J. García-Vallejo, T. Freire, *Fasciola hepatica* glycoconjugates immunoregulate dendritic cells through the dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin inducing T cell anergy, *Sci. Rep.* 7 (2017). <https://doi.org/10.1038/srep46748>.
- [17] S.Y. Narimatsu Hisashi, Kaji Hiroyuki, Vakhrushev Sergey Y., Clausen Henrik, Zhang Hui, Noro Erika, Togayachi Akira, Nagai-Okatani Chiaki, Kuno Atsushi, Zou Xia, Cheng Li, Tao Sheng-Ce, Current Technologies for Complex Glycoproteomics and Their Applications to Biology/Disease-Driven Glycoproteomics, *J. Proteome Res.* 17 (2018) 4097–4112. <https://doi.org/doi.org/10.1021/acs.jproteome.8b00515>.
- [18] H. Xiao, F. Sun, S. Suttapitugsakul, R. Wu, Global and site-specific analysis of protein glycosylation in complex biological systems with Mass Spectrometry, *Mass Spectrom. Rev.* 38 (2019) 356–379. <https://doi.org/10.1002/mas.21586>.
- [19] Z. Chen, J. Huang, L. Li, Recent advances in mass spectrometry (MS)-based glycoproteomics in complex biological samples, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 118 (2019) 880–892. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.10.009>.

- [20] A. Shajahan, C. Heiss, M. Ishihara, P. Azadi, Glycomic and glycoproteomic analysis of glycoproteins—a tutorial, *Anal. Bioanal. Chem.* 409 (2017) 4483–4505. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0406-7>.
- [21] E. Rodríguez, K. Francia, N. Brossard, J.J. García Vallejo, H. Kalay, Y. van Kooyk, T. Freire, C. Giacomini, Immobilization of β -galactosidase and β -mannosidase onto magnetic nanoparticles: A strategy for increasing the potentiality of valuable glycomic tools for glycosylation analysis and biological role determination of glycoconjugates, *Enzyme Microb. Technol.* 117 (2018) 45–55. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2018.05.012>.
- [22] L. Bidondo, M. Landeira, F. Festari, T. Freire, C. Giacomini, A biotechnological tool for glycoprotein desialylation based on immobilized neuraminidase from *Clostridium perfringens*, *Biochem. Biophys. Reports.* 26 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2021.100940>.
- [23] L. Bidondo, F. Festari, T. Freire, C. Giacomini, Immobilized peptide-N-glycosidase F onto magnetic nanoparticles: A biotechnological tool for protein deglycosylation under native conditions, *Biotechnol. Appl. Biochem. Early on li* (2021). <https://doi.org/10.1002/bab.2099>.
- [24] E. García-Junceda, J.F. García-García, A. Bastida, A. Fernández-Mayoralas, Enzymes in the synthesis of bioactive compounds: The prodigious decades, *Bioorganic Med. Chem.* 12 (2004) 1817–1834. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2004.01.032>.
- [25] R.A. Sheldon, S. van Pelt, Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how., *Chem. Soc. Rev.* 42 (2013) 6223–35. <https://doi.org/10.1039/c3cs60075k>.
- [26] A. Bruneel, S. Cholet, N.T. Tran, T.D. Mai, F. Fenaille, CDG biochemical screening: Where do we stand?, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1864 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2020.129652>.
- [27] V. Wittmann, Glycoproteins: Occurrence and Significance, in: *Glycoscience*, Springer Berlin Heidelberg, 2008: pp. 1735–1770. https://doi.org/10.1007/978-3-540-30429-6_43.
- [28] S.S. Pinho, C.A. Reis, Glycosylation in cancer: Mechanisms and clinical implications, *Nat. Rev. Cancer.* 15 (2015) 540–555. <https://doi.org/10.1038/nrc3982>.
- [29] U.M. Abd Hamid, L. Royle, R. Saldova, C.M. Radcliffe, D.J. Harvey, S.J. Storr, M. Pardo, R. Antrobus, C.J. Chapman, N. Zitzmann, J.F. Robertson, R.A. Dwek, P.M. Rudd, A strategy to reveal potential glycan markers from serum glycoproteins associated with breast cancer progression, *Glycobiology.* 18 (2008) 1105–1118. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwn095>.
- [30] M.N. Christiansen, J. Chik, L. Lee, M. Anugraham, J.L. Abrahams, N.H. Packer, Cell surface protein glycosylation in cancer, *Proteomics.* 14 (2014) 525–546. <https://doi.org/10.1002/pmic.201300387>.
- [31] T.S. Keeley, S. Yang, E. Lau, The diverse contributions of fucose linkages in cancer, *Cancers (Basel).* 11 (2019) 1–25. <https://doi.org/10.3390/cancers11091241>.
- [32] M.L.A. de Leoz, L.J.T. Young, H.J. An, S.R. Kronewitter, J. Kim, S. Miyamoto, A.D. Borowsky, H.K. Chew, C.B. Lebrilla, High-Mannose Glycans are Elevated during Breast Cancer Progression, *Mol. Cell. Proteomics.* 10 (2011) M110.002717. <https://doi.org/10.1074/mcp.m110.002717>.
- [33] C.A. Reis, R. Tauber, V. Blanchard, Glycosylation is a key in SARS-CoV-2 infection, *J. Mol. Med.* (2021). <https://doi.org/10.1007/s00109-021-02092-0>.
- [34] D.A. Harn, J. McDonald, O. Atochina, A.A. Da'Dara, Modulation of host immune responses by helminth glycans, *Immunol. Rev.* 230 (2009) 247–257. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2009.00799.x>.
- [35] I.B.H. Wilson, K. Paschinger, Sweet secrets of a therapeutic worm: Mass-spectrometric N-glycomic analysis of *Trichuris suis*, *Anal. Bioanal. Chem.* 408 (2016) 461–471. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-9154-8>.
- [36] A. Ravidà, K. Cwiklinski, A.M. Aldridge, P. Clarke, R. Thompson, J.Q. Gerlach, M. Kilcoyne, C.H. Hokke, J.P. Dalton, S.M. O'Neill, *Fasciola hepatica* Surface Tegument: Glycoproteins at the Interface of Parasite and Host, *Mol. Cell. Proteomics.* 15 (2016) 3139–3153. <https://doi.org/10.1074/mcp.m116.059774>.
- [37] V.I. Athanasopoulos, K. Niranjana, R.A. Rastall, Regioselective synthesis of mannobiose and mannotriose by reverse hydrolysis using a novel 1,6- β -D-mannosidase from *Aspergillus phoenicis*, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 27 (2004) 215–219. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2003.12.001>.
- [38] T. Yano, K. Yamamoto, H. Kumagai, T. Tochucura, T. Yokoyama, T. Seno, H. Yamaguchi, Purification and characterization of a novel α -L-fucosidase from *Fusarium oxysporum* grown on sludge, *Agric. Biol. Chem.* 49 (1985) 3179–3187. <https://doi.org/10.1080/00021369.1985.10867252>.
- [39] Y. Tsuji, K. Yamamoto, T. Tochikura, T. Seno, Y. Ohkubo, H. Yamaguchi, Purification and characterization of β -L-fucosidase from *Bacillus circulans* grown on porcine gastric mucin, *J. Biochem.* 107 (1990) 324–330. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a123046>.
- [40] Y. Goso, K. Ishihara, S. Sugawara, K. Hotta, Purification and characterization of α -L-fucosidases from *Streptomyces* sp. OH11242, *Comp. Biochem. Physiol. Part B.* 130 (2001) 375–383.
- [41] H. Soni, H.K. Rawat, B.I. Pletschke, N. Kango, Purification and characterization of β -mannanase from *Aspergillus terreus* and its applicability in depolymerization of mannans and saccharification of lignocellulosic biomass, *3 Biotech.* 6

(2016) 1–11. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0454-2>.

[42] H.Y. Yoo, G.C. Pradeep, S.K. Lee, D.H. Park, S.S. Cho, Y.H. Choi, J.C. Yoo, S.W. Kim, Understanding α -mannanase from *Streptomyces* sp. CS147 and its potential application in lignocellulose based biorefining, *Biotechnol. J.* 10 (2015) 1894–1902. <https://doi.org/10.1002/biot.201500150>.

[43] A. Montilla, A.I. Ruiz-Matute, N. Corzo, C. Giacomini, G. Irazoqui, Enzymatic generation of chitooligosaccharides from chitosan using soluble and immobilized glycosyltransferase (Branchzyme), *J. Agric. Food Chem.* 61 (2013) 10360–10367. <https://doi.org/10.1021/jf403321r>.

[44] J. Ishii, F. Okazaki, A.C. Djohan, K.Y. Hara, N. Asai-Nakashima, H. Teramura, A. Andriani, M. Tominaga, S. Wakai, P. Kahar, Yopi, B. Prasetya, C. Ogino, A. Kondo, From mannan to bioethanol: Cell surface co-display of α -mannanase and α -mannosidase on yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Biotechnol. Biofuels.* 9 (2016) 1–15. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0600-4>.

[45] X. You, Z. Qin, Y.X. Li, Q.J. Yan, B. Li, Z.Q. Jiang, Structural and biochemical insights into the substrate-binding mechanism of a novel glycoside hydrolase family 134 α -mannanase, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1862 (2018) 1376–1388. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2018.03.016>.

[46] C. Sabater, A. Blanco-Doval, A. Margolles, N. Corzo, A. Montilla, Artichoke pectic oligosaccharide characterisation and virtual screening of prebiotic properties using in silico colonic fermentation, *Carbohydr. Polym.* 255 (2021) 117367. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117367>.

[47] M. Yen, A.M. Wu, Z. Yang, Y. Gong, E. Chang, Recognition roles of the carbohydrate glycotopes of human and bovine lactoferrins in lectin – N -glycan interactions, *BBA - Gen. Subj.* 1810 (2011) 139–149. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2010.10.007>.

[48] R. Gutiérrez Gallego, S.R. Haseley, V.F.L. van Miegem, J.F.G. Vliegthart, J.P. Kamerling, Identification of carbohydrates binding to lectins by using surface plasmon resonance in combination with HPLC profiling, *Glycobiology.* 14 (2004) 373–386. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwh052>.

Licenciamiento

Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. (CC BY-NC-ND)