



Inmovilización de Péptido N-glicosidasa F (PNGasa F) sobre agarosa y nanopartículas magnéticas: Aplicación a la deglicosilación de glicoproteínas

Tesina de Graduación
Licenciatura en Bioquímica
Lucía Bidondo Rocha

Tutora: Dra. Cecilia Giacomini
Laboratorio de Bioquímica, Facultad de Química, Udelar

Co-tutora: Dra. Teresa Freire
Laboratorio de Inmunología, Facultad de Medicina, Udelar

Agosto 2018

Índice

Agradecimientos.....	1
Abreviaturas	2
Resumen.....	3
1. Introducción.....	5
1.1 Glicanos y sus funciones.....	5
1.1.1 Estructura y modulación.....	6
1.1.2 Reconocimiento intraespecie (intrínseco).....	6
1.1.3 Reconocimiento interespecie (extrínseco).....	7
1.1.4 Mimetismo y “gimmickry” molecular.....	8
1.2 Glicoproteínas.....	9
1.2.1 Glicoproteínas modelo.....	15
1.3 Herramientas para el análisis de glicanos:.....	20
1.3.1 Estrategias químicas.....	20
1.3.2 Estrategias enzimáticas.....	21
1.3.3 Lectinas como herramientas en la evaluación de la deglicosilación de glicoproteínas.....	23
1.4 Inmovilización Enzimática.....	24
1.4.1 Matrices para la inmovilización.....	24
1.4.2 Química de inmovilización.....	26
Objetivos.....	29
Objetivo general.....	29
Objetivos específicos.....	29
2. Materiales y métodos.....	30
2.1 Materiales.....	30
2.2 Determinación de proteínas.....	30
2.3 Medida de actividad de PNGasa F.....	30
2.4 Inmovilización de PNGasa F.....	33
2.4.1 Activación del soporte Agarosa con CDAP.....	33
2.4.2 Activación del soporte Nanopartículas magnéticas con CDAP.....	34
2.4.3 Inmovilización de PNGasa F sobre CDAP-agarosa.....	34

2.4.4 Inmovilización de PNGasa F sobre CDAP-nanos.....	34
2.4.5 Evaluación de la inmovilización de PNGasa F.....	35
2.5 Deglicosilación de proteínas modelo	35
2.6 Ensayo de reconocimiento por lectinas	36
3. Resultados y discusión	38
3.1 Inmovilización de PNGasa F sobre agarosa y nanopartículas magnéticas.....	38
3.2 Deglicosilación de RNasa B en condiciones nativas:	41
3.3 Re-utilización de la PNGasa inmovilizada.....	44
3.4 Extensión de la funcionalidad de la PNGasaF-nanos a la deglicosilación de otras glicoproteínas	45
4. Conclusiones.....	54
5. Bibliografía.....	57

Agradecimientos

- En primer lugar, me gustaría agradecerle a mi tutora, Cecilia Giacomini, quien ha sido un pilar fundamental en el desarrollo de mi tesina y a quien admiro por su inmensa capacidad profesional y humana. Simplemente, gracias.
- También quiero agradecer a mi co-tutora, Teresa Freire por su ayuda y dedicación en todo este proceso.
- A Florencia Festari, por haberme guiado y acompañado en parte de la tesina.
- Agradecerle también a mis amigos y compañeros por estar siempre a mi lado para impulsarme y alentarme a no bajar los brazos.
- A Matías Fernández, por haber sido un gran apoyo y contención durante gran parte de la carrera. Sabelo.
- Finalmente, quisiera darle las gracias a mí mayor respaldo, sostén y aliento a lo largo de esta etapa: Mi Familia. Son la mejor hinchada que hubiese podido pedir.
Esta tesina es para ustedes.

Abreviaturas

Agarosa-CDAP: Agarosa activada con grupos cianato éster

ConA: Conavalina A

ECA: *Erythrina cristagalli* agglutinin

ELLA: Enzyme-linked lectin assay (Ensayo de reconocimiento por lectinas)

Fet: Fetuina de suero fetal bovino

Fuc: Fucosa

Gal: Galactosa

GalNAc: N-acetilgalactosamina

Glc: Glucosa

GlcNAc: N-acetilglucosamina

HPA: *Helix pomatia* agglutinin

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

LF: Lactorferrina bovina

Man: Manosa

Nanos-CDAP: Nanopartículas magnéticas de sílica activadas con grupos cianato éster

Neu5Ac: Acido siálico

NeuGc: Ácido N-glicolilneuramínico

ODP: O-fenilendiamina

OVA: Ovoalbúmina

PBS: Amortiguador fosfato salino pH 7.4

PNA: Peanut agglutinin

PNGasa F: Péptido N-glicosidasa F

PNGasaF-agarosa: PNGasa F inmovilizada en soporte de agarosa

PNGasaF-nanos: PNGasa F inmovilizada en soporte de nanopartículas magnéticas de sílica

SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico)

SNA: *Sambucus Nigra* Agglutinin

β-gal: β-galactosidasa

TEA: Trietilamina

WGA: Wheat Germ Agglutinin

Resumen

Los glicanos presentes en la naturaleza tienen diversos roles a nivel biológico, tanto funcionales como estructurales. Aberraciones en los motivos glucídicos de glicoproteínas y glicolípidos han sido asociadas a diferentes enfermedades como desórdenes hereditarios, problemas autoinmunes, inconvenientes cardiovasculares y cáncer. Por otro lado, ciertos patógenos han desarrollado estrategias para evadir el sistema inmune del hospedero, utilizando glicanos propios como arma a favor. La elucidación de la estructura y función de los glicanos es compleja, por lo cual el desarrollo de estrategias que contribuyan en este aspecto es de gran importancia para el progreso de la glicómica. El avance en las técnicas de análisis podrían contribuir al entendimiento a nivel molecular de enfermedades relacionadas con los glicanos y a su vez permitir el desarrollo de métodos de diagnóstico y tratamiento terapéuticos. Generalmente los estudios de estructura de los glicanos de glicoproteínas se llevan a cabo mediante la liberación de glicanos y su posterior análisis de los mismos por otros métodos como la espectrometría de masa o HPLC. El método más empleado para la liberación de glicanos es el método químico, pero la aplicación del mismo lleva a la pérdida de estructura nativa de las proteínas, no permitiendo realizar ensayos funcionales con la proteína deglicosilada. Una alternativa, es la liberación de la porción de carbohidratos mediante estrategias enzimática. La Péptido N-glicosidasa (PNGasa F) es una endoglicosidasa específica para N-glicanos de tipo GlcNAc- β -Asn, ampliamente utilizada en el análisis de carbohidratos. El inconveniente del uso de esta enzima es su dificultosa separación del medio luego de finalizado el ensayo, además de ser una enzima muy costosa por lo que una solución viable a este problema podría ser el uso de la misma inmovilizada a un soporte.

Durante el desarrollo de esta tesina se inmovilizó exitosamente la Péptido-N-glicosidasa F (PNGasa F) en agarosa y nanopartículas magnéticas activadas con CDAP. La evaluación del rendimiento de la inmovilización se llevó a cabo mediante SDS-PAGE, donde se obtuvieron porcentajes de inmovilización del 100% en agarosa y 86% en nanopartículas con un porcentaje de actividad enzimática expresada en los derivados de 11% en agarosa y 14% en nanopartículas. La funcionalidad de la PNGasa F inmovilizada en procesos de deglicosilación fue evaluada mediante el uso de RNasa B de páncreas bovino, fetuina bovina, ovoalbúmina, β -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* y lactoferrina Bovina como sustrato. El grado de deglicosilación logrado se evaluó mediante SDS-PAGE y a través de ensayos de reconocimiento por lectinas (ELLA). Se lograron obtener valores significativos en la pérdida de reconocimiento de lectinas

hacia RNasa B, fetuina, ovoalbúmina y β -galactosidasa luego del tratamiento con PNGasa F inmovilizada. Estos resultados indicarían que la Péptido N-glicosidasa F es una herramienta viable para deglicosilar glicoproteínas. Para continuar con el estudio, se ampliará su aplicación a la deglicosilación de sistemas biológicos patológicos para los cuales existen indicios de que presentan la capacidad de modular el sistema inmune mediante estructuras glicosídicas.

1. Introducción

1.1 Glicanos y sus funciones

Las glicoproteínas, proteoglicanos y glicolípidos son estructuras esenciales para toda forma de vida. Los glicoconjugados cumplen un amplio espectro de funciones biológicas; desde aquellas que son triviales hasta otras cruciales para el desarrollo, el crecimiento, la función y la supervivencia del organismo. Las funciones de los glicanos se pueden clasificar en cuatro categorías principales: estructura y modulación, reconocimiento intraespecie (intrínseco), reconocimiento interespecie (extrínseco) y mimetismo molecular con glicanos del organismo hospedero (Figura 1.1) [1].

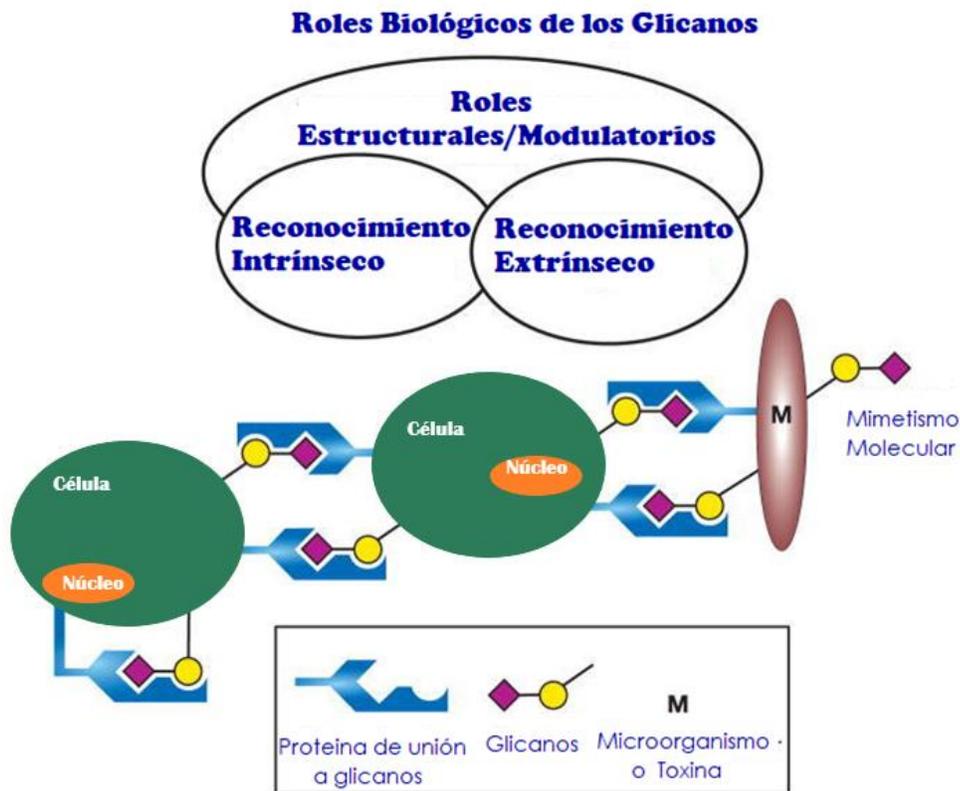


Figura 1.1: Clasificación general de los roles biológicos de los glicanos. Modificado de [1].

1.1.1 Estructura y modulación

La diversidad y complejidad de los glicanos les permite tener una vasta variedad de funciones. Estos se encuentran involucrados en la modulación de señales en receptores de membrana, en la organización de la membrana plasmática, en el desarrollo embrional normal, en la diferenciación y en el crecimiento. También actúan sobre la respuesta inmune del hospedero, en el desarrollo de enfermedades, en la metástasis, en el tráfico y localización intracelular [1–3].

A nivel de la superficie celular los glicanos actúan como moléculas señalizadoras, de reconocimiento o de adhesión [2]. Por otra parte, los glicanos tienen funciones organizacionales y de barrera. La matriz extracelular consiste en una variedad de glicoconjugados entre los que se encuentran glicoproteínas con sitios de unión para diversos tipos de cadenas de oligosacáridos como es el caso del sitio de unión para la heparina por parte de la fibronectina y el colágeno. Se ha demostrado que estos sitios tienen un rol preponderante en la organización de la matriz extracelular [3]. Los oligosacáridos presentes en proteoglicanos o en el colágeno son importantes para el mantenimiento de la estructura, integridad y porosidad tisular.

También se conoce que los oligosacáridos en muchas glicoproteínas sirven para proteger a la cadena polipeptídica del reconocimiento de proteasas y anticuerpos [3]. Otra función de la glicosilación en glicoproteínas es su participación en la iniciación del correcto plegamiento de la cadena polipeptídica en el retículo endoplasmático rugoso, al igual que en el mantenimiento de su solubilidad y conformación [1–3].

1.1.2 Reconocimiento intraespecie (intrínseco)

Dentro de los organismos, los glicanos median una enorme cantidad de procesos biológicos. Los glicanos son tan importantes como otras macromoléculas esenciales en la vida como ácidos nucleicos, proteínas y lípidos, pero son más complejos y de evolución más veloz. Los carbohidratos participan en el contacto célula-célula, célula-matriz, en la señalización intercelular y en la adhesión [1,2]. La glicosilación en proteínas además de ayudar a su correcto plegamiento también funciona como señal de degradación en el retículo endoplasmático (ERAD) o como señales de inicio para la endocitosis o fagocitosis, como por ejemplo en el caso de la secreción de mucinas con glicosilación incompleta en células de cáncer [1]. Estos mecanismos son esenciales también para mantener la homeostasis dentro de la célula, donde proteínas

reguladoras del ciclo celular, anti-apoptóticas, factores de transcripción y supresores de tumores deben ser degradados a tiempo con el fin de mantener el correcto funcionamiento celular [2].

Hay alteraciones genéticas que son responsables de otorgarles a las células malignas la capacidad de sobreexpresar factores de crecimiento y también de volverse indiferentes a los efectos inhibitorios de genes supresores de tumores. Las alteraciones genéticas también tienen consecuencias a nivel fenotípico, permitiendo a las células malignas escapar de los límites tisulares, invadir otros tejidos o escapar de la inmuno-vigilancia. Muchos de estos cambios fenotípicos se dan a nivel de los glicanos de superficie celular, donde casi todas las células tumorales pueden mostrar un patrón de glicosilación alterado a nivel de glicolípidos, glicoesfingolípidos y glicoproteínas [2]. Estudios en tumores han demostrado que una de las alteraciones en glicoproteínas más prominentes es la presencia de N-glicanos largos, fuertemente ramificados de estructura β -1,6-GlcNAc y con ácido siálico terminal. Estos patrones son típicamente encontrados en fases iniciales de la carcinogénesis inducida por virus u oncogenes. Se cree que los niveles aumentados de sialización α -1,2 en el aparato de Golgi pueden ser responsables de la metástasis [2].

1.1.3 Reconocimiento interespecie (extrínseco)

Teniendo en cuenta todas las funciones de los glicanos a nivel de reconocimiento intraespecie, no es de sorprender que algunos organismos patógenos o simbioses hayan evolucionado para reconocer a sus huéspedes mediante la detección específica de carbohidratos en la superficie celular. El reconocimiento extrínseco o interespecie, muchas veces es protagonizado por proteínas de unión a glicanos (lectinas). A modo de ejemplo, el parásito responsable de la malaria (*Plasmodium falciparum*) reconoce glicoforinas altamente sialiladas en la superficie del eritrocito a través de adhesinas dando comienzo a la infección [4]. Además, los patógenos muchas veces son capaces de producir y utilizar glicosidasas con el fin de desintegrar el glicocalix de la superficie celular y de esta forma poder invadir el organismo. Los vertebrados también están aptos para producir lectinas que reconocen patógenos a través de sus patrones de glicosilación y actúan como toxinas. Tal es el caso de la lectina antibacteriana *RegIII* que es secretada a nivel de las mucosas del intestino delgado distal y es esencial para mantener la zona bajo ciertos niveles de esterilidad [5]. Estas lectinas trabajan de forma independiente del sistema complemento y aparentemente su vía de acción es a través de disrupción de la membrana bacteriana [1]. Otras veces las lectinas del hospedero funcionan reconociendo de forma multivalente la superficie de glicanos del patógeno invasor pero no lo mata directamente, sino coordinando la acción de otros componentes del

sistema inmune como el sistema de complemento o estimulando la fagocitosis por macrófagos o células dendríticas. Algunos ejemplos de estas lectinas son las MBL (manose-binding lectin) y las ficolinas [2,6]. Los glicanos altamente conservados, como los lipopolisacáridos o el péptidoglicano de las bacterias, conforman parte de los llamados PAMPs (Pathogen-associated molecular patterns) que son antígenos reconocidos por receptores PRRs (Pattern Recognition Receptors). Este tipo de señales activan el sistema inmune innato y disparan la inflamación. En ocasiones, ciertos organismos (simbiontes o patógenos) son capaces de evadir esta respuesta primaria y modular la respuesta inmune induciendo a respuestas tipo reguladora [7].

1.1.4 Mimetismo y "gimmickry" molecular

El sistema inmune está diseñado de tal forma que en condiciones normales no reacciona contra los glicanos propios del organismo pero sí reconoce glicanos altamente conservados de agentes externos (PAMPs). A lo largo del tiempo, algunos patógenos como los parásitos han desarrollado mecanismos para evadir o modular la respuesta inmune. Una de estas estrategias consiste en la expresión, por parte del parásito, de antígenos glicosídicos que activen lectinas blanco en el hospedero a los efectos de modular el sistema inmune. Este mecanismo se ha denominado "glycan gimmickry" y es un acercamiento alternativo al mimetismo molecular previamente descrito, donde los parásitos explotan la similitud de sus glicanos con los del hospedero como forma de evadir la respuesta inmune [8]. A modo de ejemplo, una característica que tienen los parásitos helmintos es la de polarizar la respuesta inmune hacia una respuesta tipo CD4⁺ T-helper 2 y T-regulador. Mediante este mecanismo, el parásito puede generar una infección crónica a pesar de que el hospedero inicialmente desarrolle una respuesta inflamatoria. Se postula que esta respuesta del sistema inmune se encuentra modulada por el repertorio particular de glicanos desplegados sobre la superficie de los helmintos, que son muy similares a los que expresa el hospedero [8].

Por otro lado, un ejemplo donde el patógeno utiliza mimetismo molecular, es el caso de la bacteria de la familia *Campylobacter* que es capaz de imitar a la perfección glicanos de células cerebrales. De esta forma, el organismo es capaz de simular SAMPs (Self-associated molecular patterns) y evitar la activación de células del sistema inmune innato. En el extraño caso que el sistema inmune sea capaz de reconocer estas estructuras, el resultado podría derivar en daños graves a nivel de los nervios periféricos inducido por el sistema complemento mediado por anticuerpos [1].

1.2 Glicoproteínas

En el organismo, más de la mitad de las proteínas se encuentran glicosiladas formando enlaces glicopeptídicos con carbohidratos [9]. Esto tiene lugar en todo el espectro filogenético, desde las archaea y la eubacteria hasta los organismos eucariotas. De acuerdo a Spiro, hasta el 2002 se habían registrado 13 monosacáridos diferentes y hasta 8 aminoácidos involucrados en las uniones glicoproteicas. Los enlaces glicopeptídicos se pueden clasificar en cinco grupos diferentes: N-glicosilación, O-glicosilación, C-manosilación, fosfoglicosilación y enlace glipiato (Figura 1.2) [10].

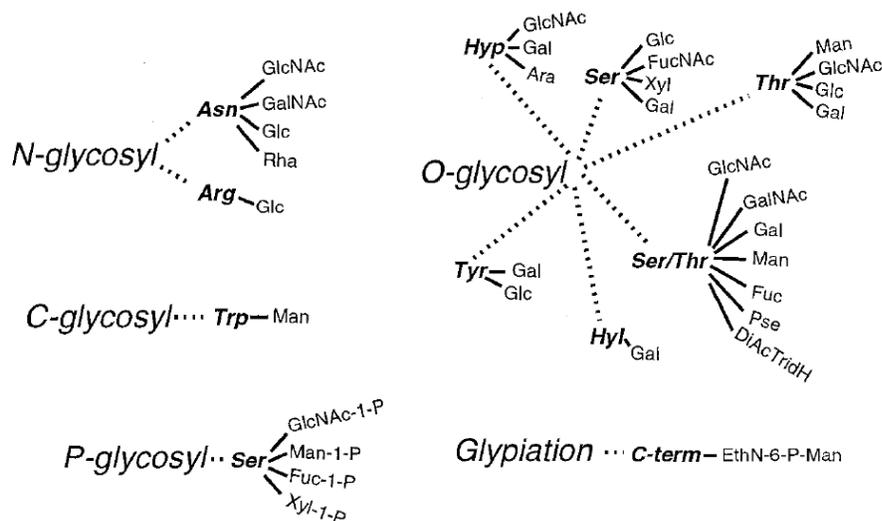


Figura 1.2: Representación esquemática de los distintos tipos de unión proteína-glicano identificados hasta el momento.
Extraído de [10].

De las glicoproteínas presentes en la naturaleza, más de tres cuartos contienen N-glicanos. La N-glicosilación involucra la unión tipo β -glucosamina entre una N-acetilglucosamina y la amina de la cadena lateral de una asparagina (Asn) [2, 9, 10]. El enlace $\text{GlcNAc-}\beta\text{-Asn}$ se observó inicialmente en la ovoalbúmina, pero tiempo después también se encontró en hormonas, enzimas, en receptores de superficie celular, en inmunoglobulinas y lectinas [10,13]. Los residuos de asparagina que pueden ser potencialmente glicosilados se encuentran dentro de una secuencia Asn-X-Ser(Thr), donde la X puede ser cualquier aminoácido excepto la prolina. Este tipo de glicosilación tiene lugar de forma co-traduccional en dos pasos. En los mamíferos, el primer paso consiste en una vía altamente conservada que tiene lugar en la membrana del retículo endoplasmático. En la misma se sintetiza un glicano de 14 carbohidratos ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$) sobre el lípido carrier Dolicol-fosfato (Dol-P). Posteriormente, dicho glicano se

transfiere a una Asn seleccionada de una futura glicoproteína de membrana o de secreción, durante la translocación de la misma al retículo endoplásmico. La segunda fase comienza con el procesamiento del N-glicano por glicosidasas y glicosiltransferasas en el lumen del retículo endoplasmático. La N-glicosilación es un requisito para el correcto plegamiento de algunas proteínas asistido por las lectinas calnexina y calreticulina. En el caso de que el plegamiento se desarrolle de forma incorrecta, la glicoproteína es degradada. Si el plegamiento se da de forma correcta, los tres residuos de glucosa son escindidos y la glicoproteína es exportada hacia el aparato de Golgi donde se termina de formar la parte central o core pentasacárido ($\text{Man}(\alpha 1-6)[\text{Man}(\alpha 1-3)]\text{Man}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}$) (Figura 1.3) [2,9,10,12].

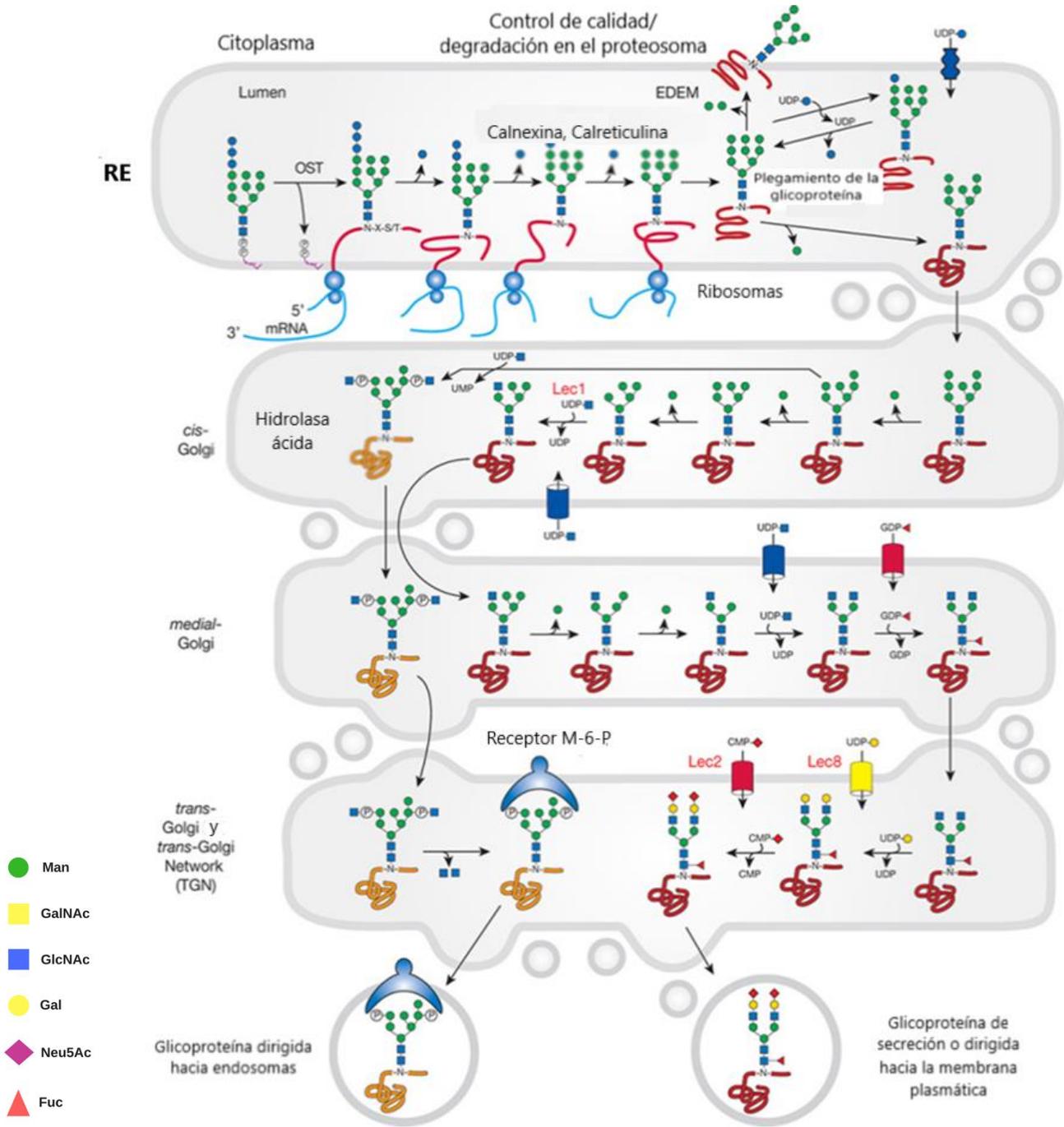


Figura 1.3: Procesamiento y maduración de N-glicanos. La N-glicosilación proteica comienza de manera co-traduccional en el lumen del retículo endoplasmático. Seguido de la transferencia de $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ a la proteína y si el proceso de plegamiento se produce de manera correcta, glicosidasas presentes en el retículo endoplasmático remueven tres residuos de glucosa y un residuo de manosa. En el caso de que el plegamiento se lleve adelante de manera incorrecta, la lectina EDEM (ER degradation-enhancing α -mannosidase) se unirá a manosas de la glicoproteína mal plegada y la dirigirá (mediante retrotraslocación) al citoplasma, donde será degradada. Por el contrario, en las glicoproteínas plegadas correctamente, se removerán residuos adicionales de manosa en el compartimento *cis* del aparato de Golgi hasta formar el core central $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$. Durante el pasaje de la glicoproteína a través del aparato de Golgi, diferentes glicosidasas y glicosiltransferasas irán modificando la estructura glucídica hasta la formación del N-glicano maduro. En el compartimento *trans*-Golgi, la glicoproteína será secretada o dirigida hacia la membrana plasmática. En ciertos casos especiales, hidrolasas lisosomales presentes en *cis*-Golgi marcan a la glicoproteína que luego es reconocida por el receptor M-6-P en el *trans*-Golgi. Como consecuencia, la glicoproteína será dirigida hacia el compartimento pre-lisosomal donde será degradada. Adaptado de [12].

En este organelo también se pueden remover manosa o agregar otros monosacáridos, dando lugar a 3 clases principales de N-Glicanos (Figura 1.4) [2,9,10,12]:

(1) Alto contenido de manosas: contiene entre 2 a 6 α -manosas típicamente unidas al core pentasacárido aunque se han observado casos de hasta 9 α -manosas [13].

(2) Complejos: No contienen más residuos de manosas que aquellos que forman el core. Las dos manosas más externas pueden llegar a tener unidos hasta 5 unidades de disacáridos de Gal (β 1-4) GlcNAc (N-acetilglucosamina). Las unidades de N-acetilglucosamina están generalmente sustituidas por ácido siálico unido por enlace α a la posición 3 o 6 de la galactosa. Se puede lograr aún más diversidad mediante la unión α 1-6 fucosa a N-acetilglucosamina del core [13].

3) Híbridos: contienen características tanto de los N-glicanos de alto contenido de manosas como de los complejos. Uno o dos residuos de manosa están vinculados a la rama Man (α 1-6) del núcleo pentasacárido y una o dos antenas como las que se encuentran en tipo complejo están β -unidos a la rama Man (α 1-3) [13].

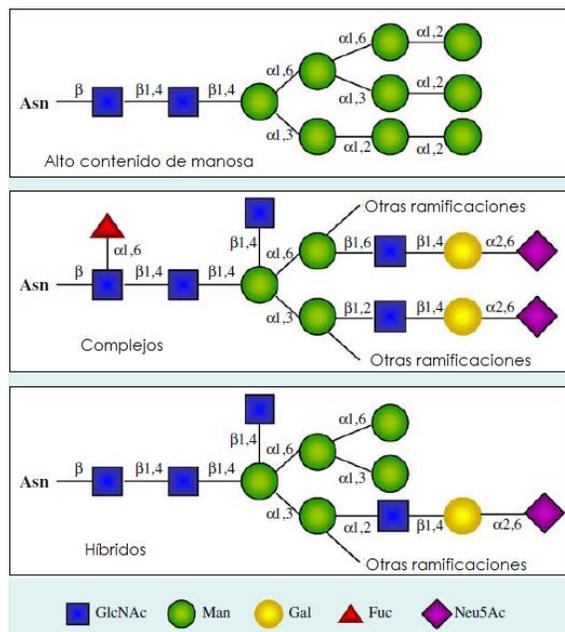


Figura 1.4: Representación esquemática de N-glicanos del tipo alto contenido en manosa, complejos e híbridos.
Extraído y modificado de [9].

La O-glicosilación es el segundo tipo de unión más encontrado en una gran variedad de proteínas e involucra la unión entre un azúcar y un aminoácido que contiene un grupo hidroxilo. Todos los aminoácidos con un grupo funcional hidroxilo han sido implicados en este tipo de unión (Ser, Thr, Tyr,

dihidroxiprolina o hidroxilisina) pero el más comúnmente hallado es el enlace GalNAc- α -Ser/Thr. Este tipo de unión se puede observar en mucinas, fetuina, en glicoforinas y glicoproteínas anticongelamiento. Otro tipo de unión que ha sido observado de forma creciente es GlcNAc- β -Ser/Thr, y es encontrado en proteínas nucleares y en proteínas del citoesqueleto [10]. La O-glicosilación sucede de manera post-traduccional y post-plegamiento, donde una familia de glicosiltransferasas catalizan la adición de N-acetilgalactosamina mediante su C-1 al hidroxilo de un aminoácido específico en la cadena polipeptídica. Las cadenas oligosacáridicas luego son generadas por la adición secuencial de carbohidratos que puede llevar a diferentes estructuras del core (Figura 1.5). Otras modificaciones como la acetilación y la sulfatación aportan a la heterogeneidad de este tipo de glicanos [2,10, 12]. Dependiendo del tipo de célula y de su estado de diferenciación, el core de carbohidratos puede seguir siendo elongado o terminado por enzimas específicas.

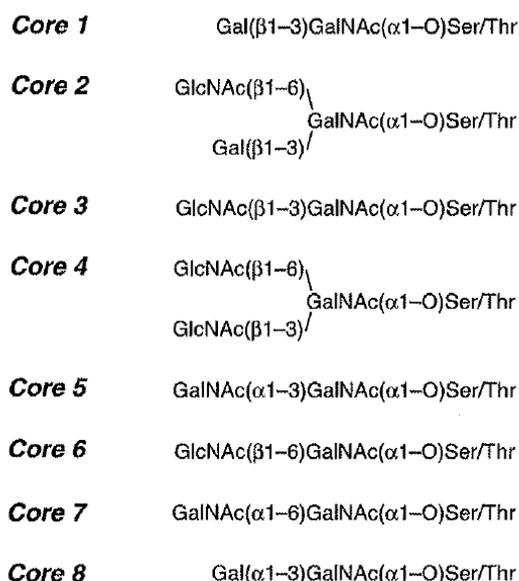


Figura 1.5: Estructura del core de O-glicanos. El core 1 también es conocido como antígeno T. Extraído y modificado de [13].

El Core 1 y 2 se encuentran generalmente en proteínas de secreción, de membranas y en mucinas (Figura 1.5). El core 1 (Antígeno T) generalmente está monosialilado o disialilado. Cabe destacar que bajo ciertas circunstancias, especialmente en células transformadas, el antígeno T puede ser modificado a antígeno sTn (Neu5Ac (α 2-6) GalNAc (α 1-O)Ser/Thr) [13].

El core 1 también puede continuar su elongación por N-acetilactosamina o puede ser transformado en el Core tipo 2 para seguir siendo elongado, ya que el Core 1 es un aceptor pobre de N-

acetilactosamina. El resto de los cores ilustrados en la figura 1.5, no son tan frecuentes y sus estructuras también pueden ser terminadas o enlongadas por otras glicosiltransferasas [13].

En general los O-glicanos terminan en GalNAc (α 1-3 y -6), GalNAc (β 1-4), GlcNAc (α 1-4), Gal (α 1-3), Gal(β 1-4), Neu5Ac (α 2-3 y -6) y Fuc (α 1-2, -3 y -4) o también pueden finalizar es estructuras sulfatadas. Tanto el ácido siálico, como sulfatos y Fuc (α 1-3 y -4) pueden encontrarse unidos dentro de carbohidratos internos.

Además del enlace GalNAc (α 1-O)Ser/Thr de los O-glicanos, también se han identificado de forma frecuente los enlaces fucosa (α 1-O) Ser/Thr, glucosa (β 1-O) Ser/Thr y N-acetilglucosamina (β 1-O) Ser/Thr [2,13].

1.2.1 Glicoproteínas modelo

En esta tesina de grado se trabajó con diferentes glicoproteínas que se encuentran ampliamente estudiadas y que se conoce que en su estructura contienen N-glicanos (algunas también poseen O-glicanos). A continuación, se realiza una descripción acerca de las glicoproteínas seleccionadas como modelo:

1.2.1.1 RNasa B de páncreas bovino

La Ribonucleasa B (RNasa B) de páncreas bovino es una glicoproteína globular monomérica de aproximadamente 17 kDa y que tiene un único sitio de glicosilación. Éste se encuentra en el sitio Asn34 y es del tipo N-glicano de alto contenido de manosa [14–16]. El glicano posee entre cinco a nueve residuos de manosas unidos al core pentasacárido (Figura 1.6) [14,17]. Esta glicoproteína es una enzima cuya función es catalizar el corte de RNA de cadena simple [14].

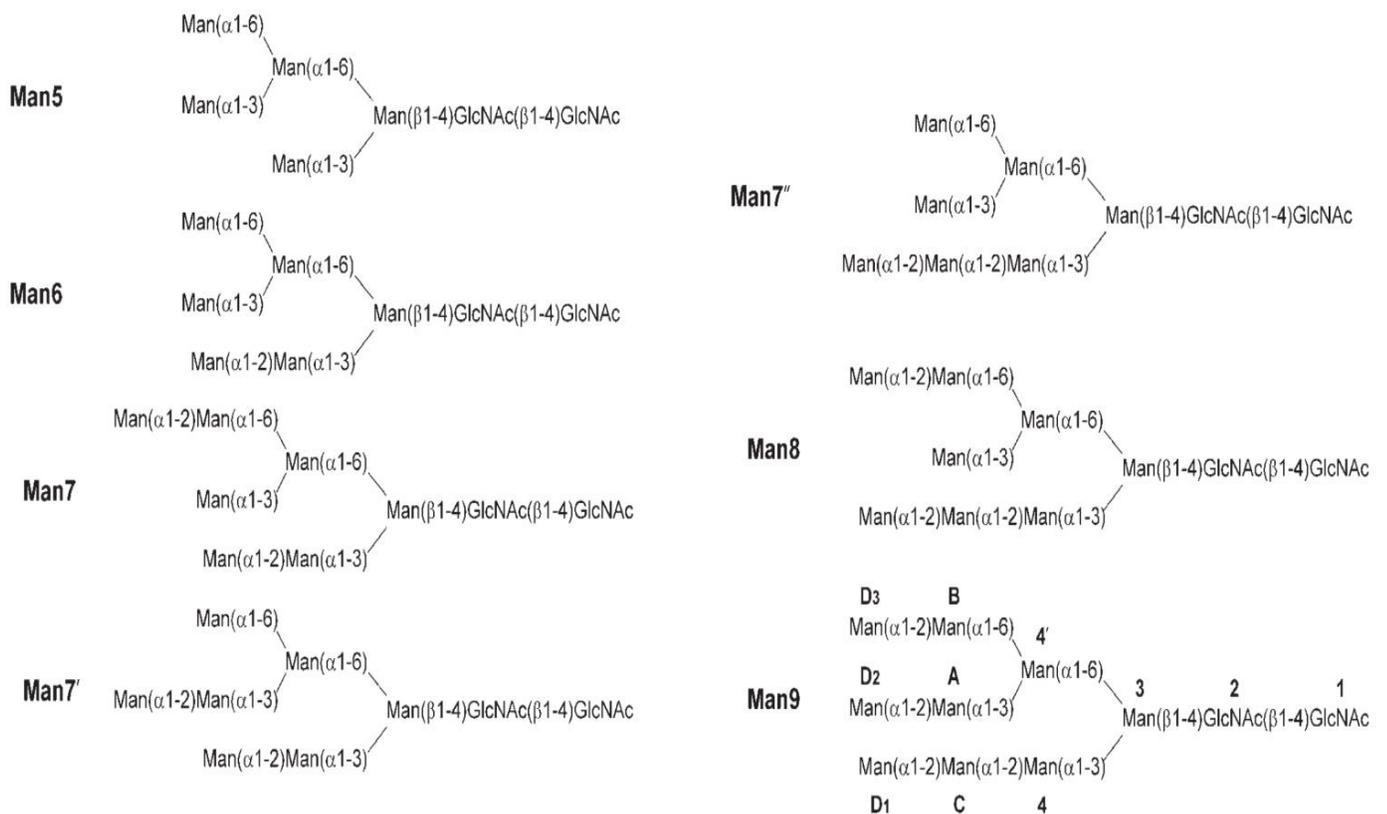


Figura 1.6: Estructura de N-glicanos de RNasa B. Adaptado de [17].

1.2.1.2 β -galactosidasa de *Aspergillus oryzae*

La enzima β -galactosidasa es una enzima capaz de catalizar la hidrólisis de enlaces β -galactosídicos (β 1-3) y (β 1-4) de oligo y disacáridos. También es capaz de catalizar reacciones de transglicosilación. Estructuralmente, es una glicoproteína monomérica de aproximadamente 110 kDa [18,19]. Maksimainen y colegas lograron obtener la estructura cristalográfica de β -galactosidasa de *A. oryzae* expresada en *K. lactis* con resolución de 2.7 Å, donde fue capaz de identificar 11 posibles sitios de N-glicosilación. De esos 11 sitios, solamente observó glicosilación en seis [19]. Los N-glicanos observados fueron de alto contenido de manosa y de bajo peso molecular (Figura 1.7).

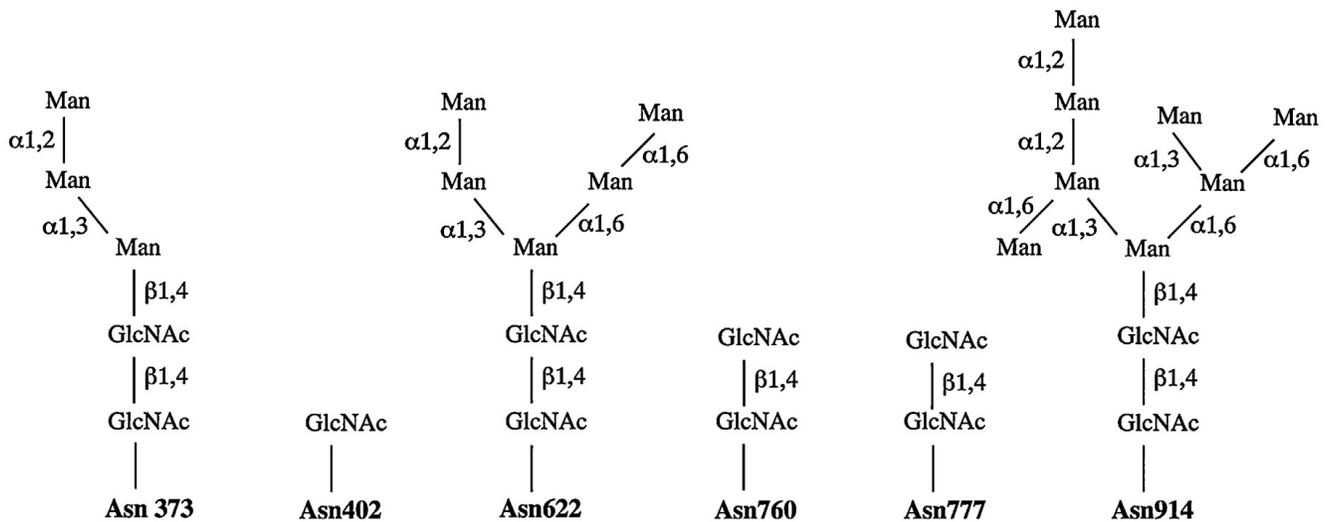


Figura 1.7: Estructura de N-glicanos de β -galactosidasa. Adaptado de [19].

1.2.1.3 Fetuina de suero fetal bovino

La fetuina es una α -globulina cuya fracción proteica tiene un peso molecular aproximado de 48 kDa y es una proteína monomérica mayoritaria en el suero fetal bovino [20]. Esta glicoproteína contiene seis sitios de glicosilación: tres sitios con O-glicanos unidos a Serina o Treonina y tres sitios que contienen N-glicanos unidos a Asparagina [20–22]. Hasta el momento se han detectado hasta 23 isoformas de N-glicanos en la fetuina bovina que pueden ser mono, di, tri o hasta tetrasialilados y pueden contener entre dos o tres ramas. Las formas de estos oligosacáridos también pueden diferir en el tipo de unión y ubicación del ácido siálico (α 2-3 versus α 2-5) y su unión y contenido de residuos de galactosa (β 1-4 versus β 1-3) (Figura 1.8) [20–22]. Los O-glicanos presentes tienen una estructura de NeuAc (α 2-3) Gal(β 1-3) GalNAc (1-O) Ser/Thr que también puede contener un residuo extra de ácido siálico unido a GalNAc (α 2-6) [23].

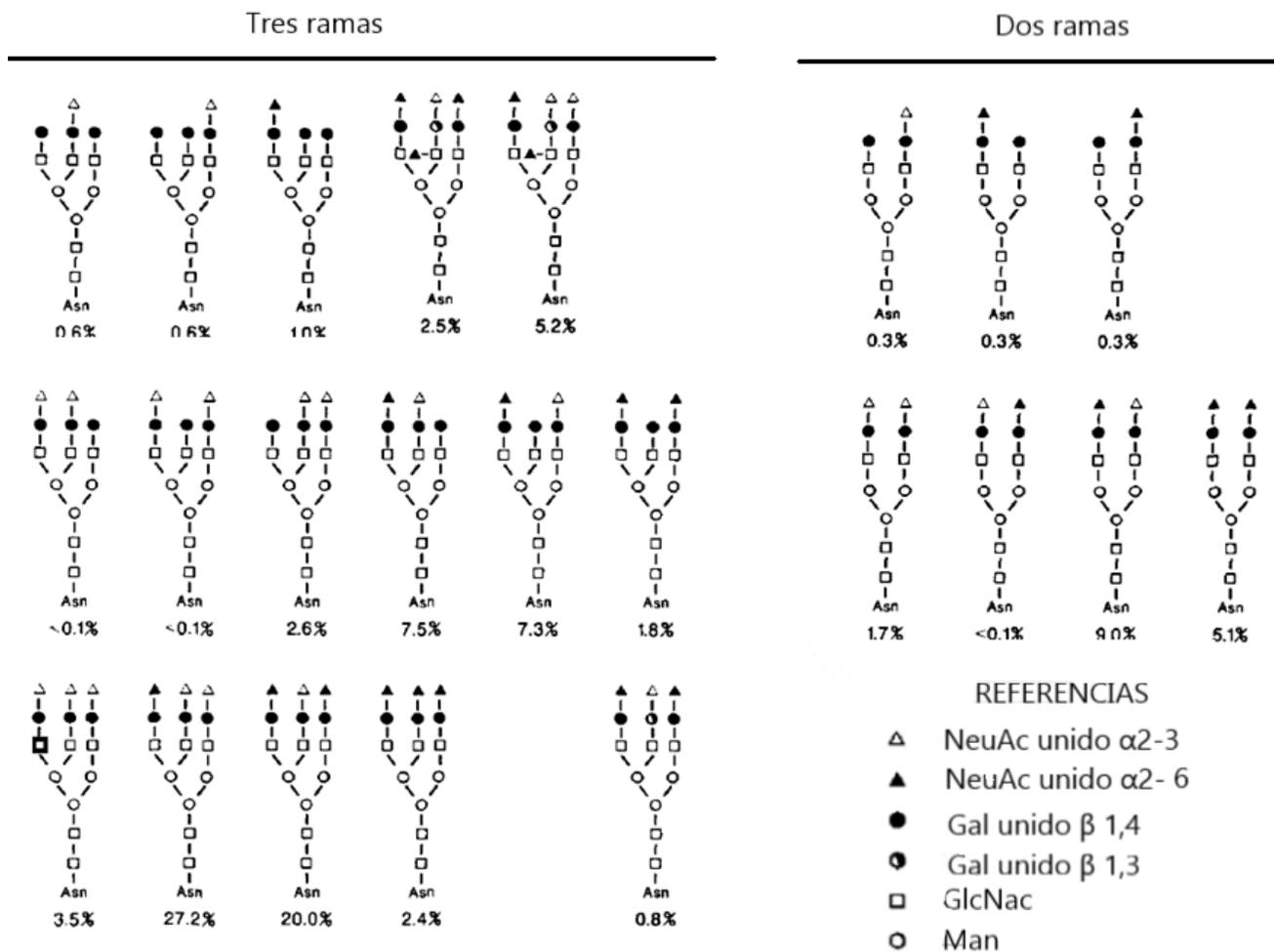


Figura 1.8: Estructura de N-glicanos de fetuina de suero bovino. Adaptado de [20].

1.2.1.4 Ovoalbúmina

La ovoalbúmina (OVA) es la proteína mayoritaria de la clara de huevo de gallina. OVA es una glicoproteína monomérica de 385 aminoácidos de aproximadamente 45 kDa, cuenta con un cadena de carbohidratos en Asn-292 del tipo N-glicano de alto contenido de manosa e híbridos (Figura 1.9) y un grupo acetilo en el extremo amino terminal [24–28]. La ovoalbúmina además puede contener uno, dos o ningún grupo fosfato en su estructura [24,26].

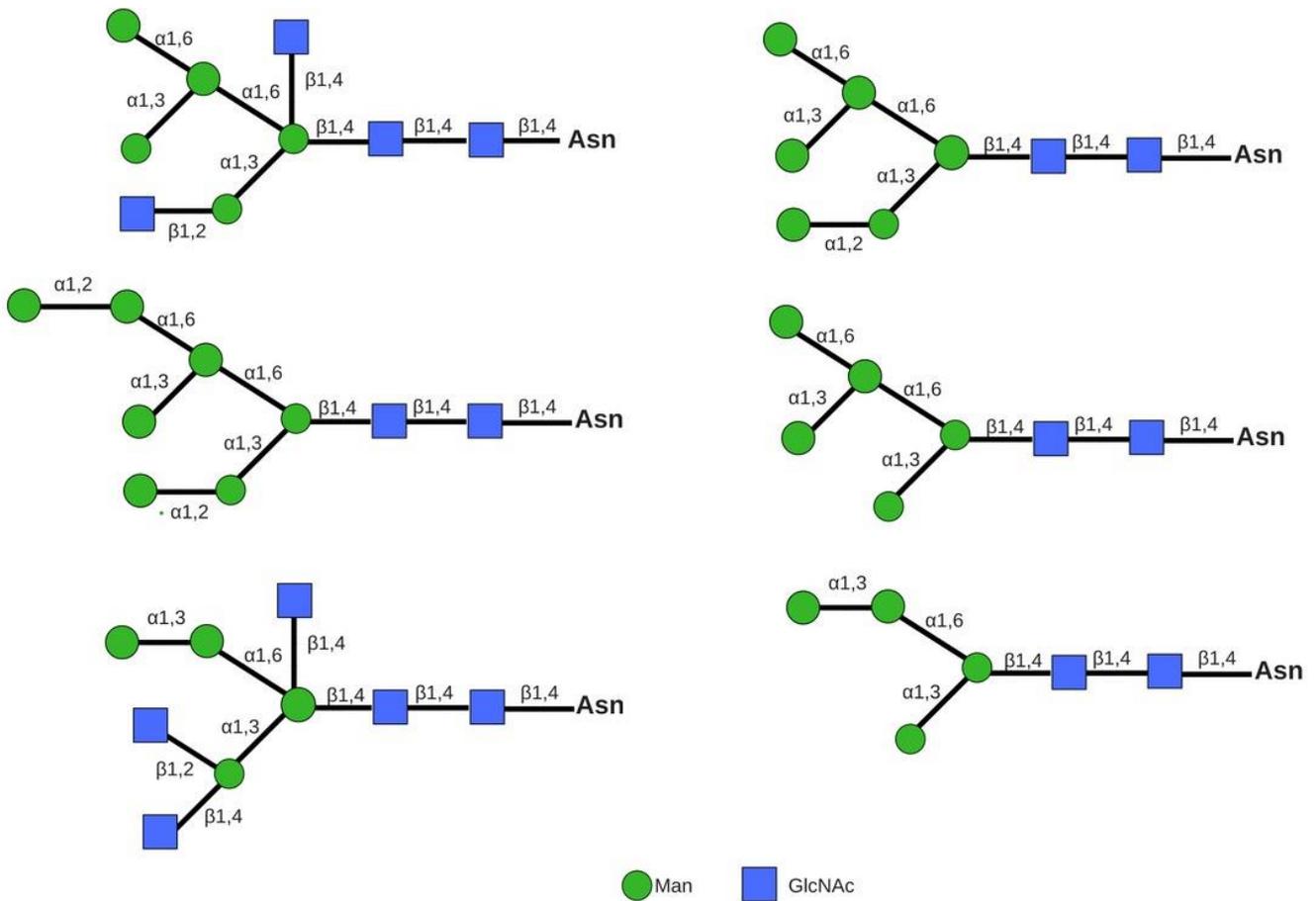


Figura 1.9: Estructura de N-glicanos de ovoalbúmina. Adaptado de [28].

1.2.1.5 Lactoferrina bovina

La lactoferrina bovina (LF) es una glicoproteína monomérica de unos 689 aminoácidos con un peso molecular aproximado de 80 kDa. Esta transferrina contiene dos sitios de unión a Fe^{+3} y se encuentra presente en gránulos de leucocitos polimorfonucleares y en varios fluidos. La lactoferrina cumple con diversas funciones como la promoción de la absorción de hierro, la inmunomodulación y la protección contra bacteria, hongos, protozoarios y virus [29]. Por otra parte, la lactoferrina contiene diversos sitios con N-glicosilación. Estos glicanos son del tipo de alto contenido de manosa, híbridos y complejos y la función de los mismos se desconoce (Figura 1.10) [30,31]. Existen dos variantes de LF: LF-b que contiene cuatro sitios de glicosilación en Asn 233, Asn 545, Asn 368 y Asn 476; y LF-a que además contiene un quinto sitio de glicosilación en Asn 281. De toda la LF presente en la leche, LF-a representa el 15% en la leche madura [32].

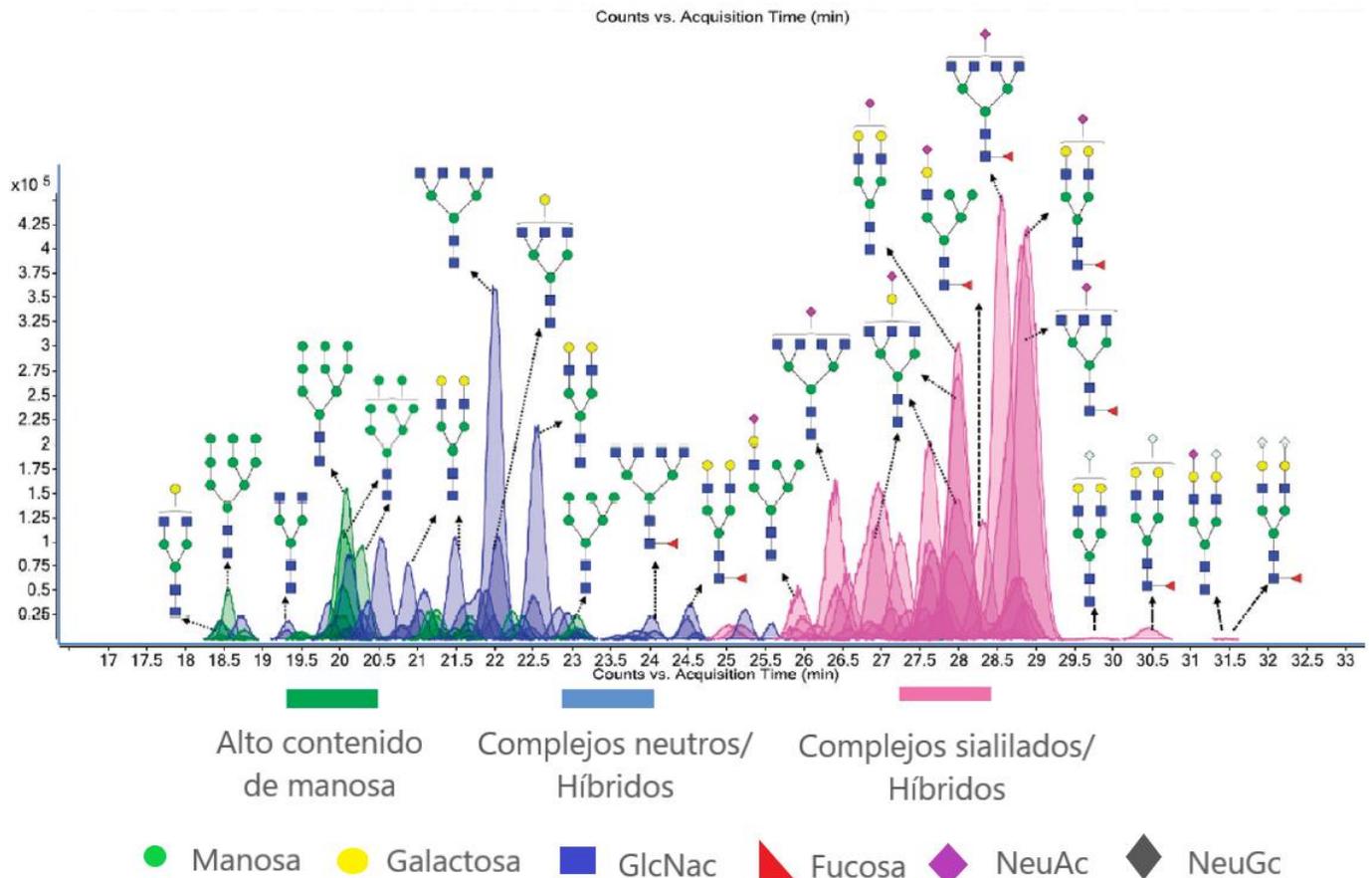


Figura 1.10: Cromatograma de compuestos extraídos (ECC) que muestra el perfil de elución de N-glicanos de leche bovina vía nano-LC-MS. Adaptado de [31].

1.3 Herramientas para el análisis de glicanos

El análisis estructural de los glicanos de glicoproteínas es bastante trabajoso debido a la falta de métodos de secuenciación de carbohidratos a diferencia de los ampliamente distribuidos métodos de secuenciación para el ADN o proteínas. Una dificultad adicional es la micro-heterogeneidad de los carbohidratos que forman parte de las proteínas. Por este motivo, es de vital importancia que los glicanos comiencen a adquirir una mayor atención y se desarrollen técnicas nuevas para su estudio con el fin de comprender su estructura y función a nivel biológico, tanto en condiciones normales como patológicas. Esto colaboraría enormemente al desarrollo de métodos diagnósticos, profilácticos o tratamientos médicos.

Generalmente, el estudio de la glicosilación en proteínas se lleva a cabo luego de la liberación del glicano de la glicoproteína entera o de glicopéptidos obtenidos después de la digestión parcial con proteasas. Hasta el momento existen dos grandes métodos para escindir glicanos: métodos químicos y métodos enzimáticos.

1.3.1 Estrategias químicas

Habitualmente, la liberación química de glicanos es el método más elegido. La hidrazinólisis es un método comúnmente utilizado para la liberación de N-glicanos y bajo condiciones suaves también es útil para escindir O-glicanos. Sin embargo, para los O-glicanos se presenta el inconveniente de que algunos monosacáridos con extremo reductor pueden ser degradados en estas condiciones. Los O-glicanos también pueden ser liberados mediante β -eliminación y luego ser reducidos con borohidruro en condiciones alcalinas. Esta técnica, sin embargo, tiene el inconveniente de que impide la marcación posterior del glicano libre mediante aminación reductiva. Otro problema que enfrentan las estrategias químicas es que tienen asociados demasiados pasos de preparación y de tratamiento, llevando a una gran pérdida de muestra [33]. Además de los inconvenientes ya mencionados, el método químico tiene el problema adicional de desnaturalizar a la proteína, por lo que este método no es útil para efectuar ensayos funcionales de forma posterior con la glicoproteína deglicosilada [13,34].

1.3.2 Estrategias enzimáticas

Una alternativa a la escisión de glicanos de glicoproteínas mediante estrategias químicas, es la liberación enzimática de carbohidratos. La Péptido-N-glicosidasa F es una enzima frecuentemente utilizada para liberar N-glicanos, ya que es capaz de clivar enlaces C-N de asparaginas glicosiladas (Figura 1.11). Los N-glicanos son liberados en forma de glicosaminas que luego son fácilmente hidrolizados en el amortiguador de reacción a la forma de amoníaco y oligoscáridos reductores y la asparagina es convertida en ácido aspártico, resultando en la pérdida de 1 Da que puede ser detectada mediante espectrometría de masa lo cual es importante para la identificación de los sitios de N-glicosilación [9, 34, 36, 37].

Otro tipo de endoglicosidasa utilizada es la Endo H, que cliva N-glicanos de alto contenido de manosa y casi todos los N-glicanos tipo híbridos. Endo H hidroliza el enlace entre dos residuos de GlcNAc dentro del core de quitobiosa, dejando a GlcNAc unida a la proteína (Figura 1.11) [12]. Otras glicosidasas utilizadas en la deglicosilación son la Endo F2 y Endo F3, que son capaces de clivar N-glicanos tipo complejos [33,36]. También se puede emplear la neuroaminidasa o la β -galactosidasa que cortan carbohidratos terminales en N-glicanos complejos o híbridos [9]. La liberación de O-glicanos es más compleja ya que la mayoría de las O-glicosidasas son altamente específicas. Sin embargo, una posible glicosidasa útil para este tipo de método es la β -N-acetilglucosaminidasa que cliva el enlace no muy común de GlcNAc- β -Ser/Thr o la endo- α -N-acetilgalactosaminidasa que permite la liberación de O-glicanos del Core 1 (Figura 1.5) [10,33].

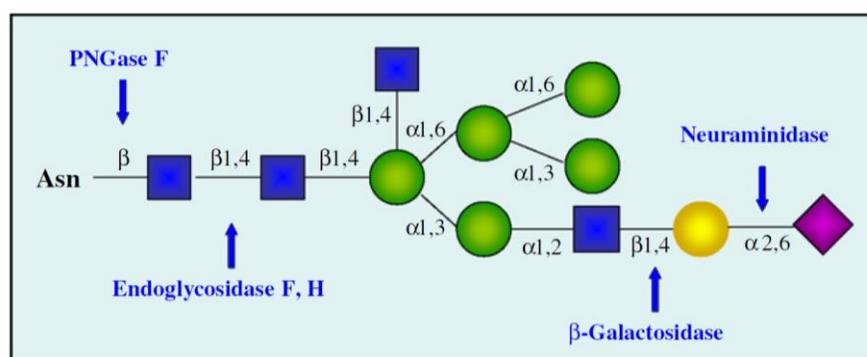


Figura 1.11: Representación esquemática de algunas de las deglicosidasas más utilizadas en el estudio de N-glicanos
Extraído de [9].

1.3.2.1 Péptido N-glicosidasa F

La péptido N-glicosidasa F, también conocida como PNGasa F (EC 3.5.1.52), es una enzima pequeña de 36 kDa. Su pH óptimo es 8.6 pero mantiene el 80% de su actividad en el rango de 7.5-9.5 y es compatible tanto con amortiguadores orgánicos como inorgánicos (0.1 M), excepto en borato de sodio [37]. El grupo de Plummer y colaboradores, fueron los primeros en purificar esta proteína a partir de un extracto de *Flavobacterium meningosepticum*. PNGasa F es capaz de clivar N-glicanos ya sea de alto contenido de manosa, híbridos o complejos de sialilación múltiple, incluyendo estructuras de tetrantena y oligosacáridos que contienen residuos sulfatados [15,37,38]. La enzima no es capaz de liberar el N-glicano si la asparagina al que está unido es el residuo amocídico del extremo amino o carboxilo-terminal o el penúltimo aminoácido de uno de los extremos [15,36]. La PNGasa F tampoco es capaz de clivar N-glicanos que contengan (α 1-3) fucosa unida al extremo reductor de GlcNAc. Este tipo de glicanos generalmente son encontrados en plantas.

Más allá de las ventajas que tienen las estrategias enzimáticas sobre las químicas para la liberación de glicanos, esta técnica no está exenta de inconvenientes. Una vez que el proceso de deglicosilación finaliza es muy difícil separar la PNGasa F del medio de reacción por lo que el producto final se encuentra contaminado con la proteína, lo cual es un inconveniente a la hora de realizar ensayos funcionales. El alto costo de las enzimas lleva a que el método enzimático sea visto como una segunda opción a la hora de efectuar estudios de glicanos. Una posible solución es el uso de la enzima inmovilizada, ya que permite separar la enzima rápidamente del medio y reutilizarla en posteriores ensayos. A pesar del gran uso de PNGasa F en el estudio de glicanos, hay muy pocos reportes en la literatura en relación a su uso en forma inmovilizada aplicada a la identificación de N-glicanos en las glicoproteínas [39,40].

1.3.3 Lectinas como herramientas en la evaluación de la deglicosilación de glicoproteínas

Las lectinas son un grupo heterogéneo de proteínas o glicoproteínas que se caracterizan por su capacidad de unirse con gran especificidad a diferentes glicoconjugados o carbohidratos [41,42]. Estas macromoléculas pueden precipitar glicoconjugados, son aglutinadoras de eritrocitos por excelencia y tienen un rol preponderante en el reconocimiento e interacción célula-célula. Las lectinas son ampliamente usadas en bioquímica debido a su capacidad de reconocer diferentes composiciones y estructuras de azúcares, por lo que son herramientas muy útiles para estudiar glicoproteínas [41].

La lectina Concavalina A (ConA) de *Canavalia ensiformis* fue la primer aglutinina en ser aislada en 1919. El responsable de este hito histórico fue James B. Sumner que observó que ConA era capaz de aglutinar glóbulos rojos de conejo y también que tenía la capacidad de unirse a almidón, mucinas y glucógeno, pero la interacción podía ser evitada por la sacarosa [43]. La ConA reconoce los monosacáridos glucosa y manosa y a N-glicanos con alto contenido de manosa como el que se muestra en la Figura 1.12 [42,43].

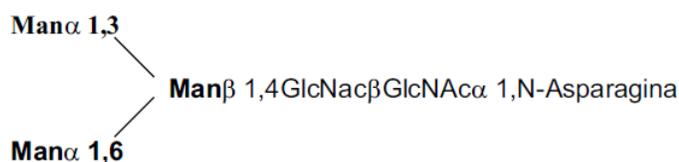


Figura 1.12: N-glicanos reconocidos por Con A. En negrita se resalta el núcleo trimanosídico reconocido por la lectina.
Adaptado de [42].

Otra lectina utilizada en el análisis de glicanos es la SNA. La SNA es una glicoproteína presente en la corteza del arbusto *Sambucus nigra* y es ampliamente utilizada en el estudio de glicoconjugados que contienen ácido siálico en su estructura, ya que se une fuertemente a NeuAc terminal unido por enlace (α 2-6) a glucosa o a GalNAc (Figura 1.13) [44-46].

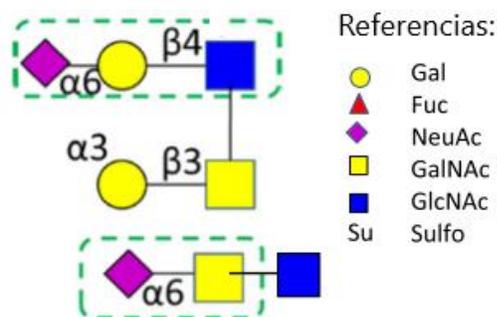


Figura 1.13: Sitio de unión específica de SNA. El recuadro en punteado verde indica los sitios comúnmente aceptados de unión para la lectina de *Sambucus nigra*. Adaptado de [46].

1.4 Inmovilización Enzimática

El término enzima inmovilizada, hace referencia a una enzima físicamente confinada o localizada en cierta región definida del espacio con retención de su actividad catalítica [47,48]. La inmovilización enzimática es una herramienta muy útil, que permite la recuperación del biocatalizador de forma simple lo que habilita su reuso, reduciendo los costos de la enzima. En general, la inmovilización de una enzima a una matriz resulta en un aumento en la estabilidad mecánica, de almacenamiento y operacional. Muchas veces también mejora las propiedades enzimáticas aumentando su capacidad catalítica, mejorando su pureza, su selectividad, su especificidad o aumentando su estabilidad frente a agentes como temperatura y pH [47–50]. Otra gran ventaja de la inmovilización enzimática es que simplifica la manipulación del catalizador y mejora el control de la reacción [49,50]. El uso de enzimas inmovilizadas se encuentra ampliamente extendido en procesos tanto industriales como de química fina [47,50].

Al inmovilizar a la enzima, pueden ocurrir algunos cambios estructurales que alteren sus propiedades y actividad enzimática. Por lo tanto, dado que las enzimas son muy sensibles, se deben seleccionar una estrategia de inmovilización y un soporte adecuados de forma de mantener o mejorar sus características como la estabilidad y de esta forma aumentar la posibilidad de su reuso.

Las enzimas pueden ligarse a la matriz por interacciones que van desde adsorción física reversible, interacciones iónicas y de afinidad hasta mediante enlaces covalentes que pueden ser del tipo éster, tioéster, amida o carbamato [48,49]. Los cambios que se darán a nivel del microambiente de la enzima debido a la introducción de la matriz pueden alterar las propiedades cinéticas, químicas, mecánicas y bioquímicas de la proteína, por lo que una clave para que la inmovilización sea exitosa es la elección correcta del soporte y el método de inmovilización [47].

1.4.1 Matrices para la inmovilización

El soporte ideal para la inmovilización cumple con los siguientes requisitos: altamente hidrófilo, inerte en relación a la enzima, biocompatible, resistente a ataques microbianos, resistente a la compresión y relativamente barato y accesible [47,48,51]. Lamentablemente, no existe un soporte universal apropiado para todas las enzimas ya que cada una tiene propiedades diferentes y en base a ello y a las condiciones en que se desarrollara la reacción, será el soporte de elección. Los diferentes soportes ofrecen variabilidad a nivel de sus propiedades físicas y químicas como tamaño del poro, balance hidrofóbico/hidrofílico y

disponibilidad de grupos funcionales en su superficie [47]. Los soportes se pueden dividir en dos grandes clases: inorgánicos y orgánicos. A su vez las matrices orgánicas e inorgánicas, pueden subdividirse en soportes naturales o polímeros sintéticos (Tabla 1.1) [48].

Tabla 1.1: Clasificación de soportes. Modificado de [48].

Soportes	Orgánicos	Inorgánicos
Naturales	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Polisacáridos:</i> celulosa, dextrano, agarosa • <i>Proteínas:</i> colágeno, albúmina • <i>Carbón</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Minerales naturales:</i> bentonita, sílica
Sintéticos	<ul style="list-style-type: none"> • Poliestireno, poliacrilamida 	<ul style="list-style-type: none"> • Vidrio, metálicos, nanopartículas magnéticas

Una de las propiedades deseables que se busca en el soporte es que tenga una gran área superficial lo que permite obtener una alta carga de enzima por unidad de masa. Por este motivo generalmente los soportes porosos son preferidos por su alta capacidad. Por otro lado, la enzima inmovilizada recibe una mayor protección del ambiente [47,50,52]. Uno de los soportes porosos más utilizados es la agarosa, ya que tienen alta porosidad, alta capacidad de carga, es muy hidrofílica, de fácil derivatización, con ausencia de grupos cargados (lo cual previene interacciones inespecíficas con el sustrato) y muy disponible en el mercado. Una de las grandes desventajas de este soporte es su alto costo [48]. Sin embargo, la agarosa puede presentar grandes problemas difusionales si el sustrato es macromolecular, entorpeciendo el acceso del mismo al sitio activo de la enzima lo que trae aparejada una reducción de la eficiencia enzimática [48,50].

Por otra parte, los soportes no porosos traen la ventaja de presentar bajas limitaciones difusionales pero se caracterizan por tener una capacidad de carga baja debido al pequeño tamaño de las partículas y la ausencia de poros [51]. Los soportes no porosos inorgánicos, como las nanopartículas magnéticas de sílica, también presentan la ventaja de tener una alta estabilidad física, química y microbiológica [47,48].

Además, en el caso de las nanopartículas magnéticas la separación de la enzima del medio, se da fácilmente mediante el uso de un campo magnético (ej. Gradilla imantada) [47,52]. Sin embargo, los nanosportes cuentan con la desventaja de no ser tan efectivos a la hora de proteger a la enzima inmovilizada, debido a su pequeño tamaño y mayor exposición de la misma hacia el medio, ya que la misma se inmoviliza únicamente sobre la superficie de la matriz [53].

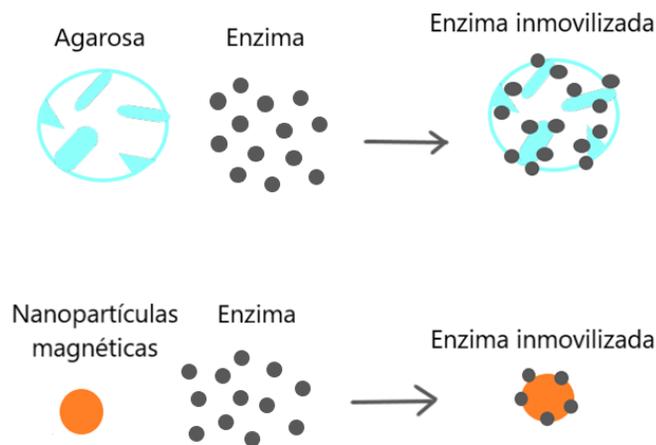


Figura 1.14: Representación de la inmovilización enzimática sobre Agarosa (soporte poroso) y nanopartículas magnéticas (soporte no-poroso).

1.4.2 Química de inmovilización

Los métodos de inmovilización se basan en el hecho de que las proteínas tienen diversos aminoácidos con distintas características, donde grupos funcionales en sus cadenas laterales pueden ser empleados para generar uniones al soporte mediante diversos tipos de interacciones o enlaces covalentes [47]. En el caso de glicoproteínas también se puede emplear su fracción glicosídica para unir la enzima al soporte [54].

Los métodos de inmovilización pueden separarse en dos grandes clases: reversibles e irreversibles. Los métodos reversibles generalmente son métodos físicos y se basan en la adsorción entre la enzima y el soporte mediante interacciones débiles (interacciones de Van der Waals, enlaces de hidrógeno o interacciones hidrofóbicas) [47]. En este método, la enzima puede ser fácilmente separada del soporte bajo condiciones suaves haciendo posible el reuso de la matriz. Si bien las fuerzas de enlace matriz-enzimas se consideran débiles, cuando tienen lugar un alto número de interacciones no covalentes es posible una unión efectiva. Por otro lado, también se puede inmovilizar de forma reversible mediante la

creación de puentes de disulfuro entre la matriz y la enzima bajo ciertas condiciones. Estos enlaces luego se pueden revertir utilizando ditioneitol (DTT) en condiciones suaves [48].

Dentro de los métodos irreversibles, los más comúnmente aplicados son la unión covalente, microencapsulación o entrecruzamiento. El método covalente es el más ampliamente usado en la inmovilización enzimática, donde grupos funcionales presentes en la superficie del soporte reaccionan con residuos aminoácidos expuestos en la proteína. Este método tiene la ventaja de que la enzima queda fuertemente ligada al soporte y muy difícilmente se libere en la solución de reacción. Un gran detalle a tener en cuenta, es que los aminoácidos esenciales para la actividad catalítica no deben estar involucrados en la unión covalente al soporte. Generalmente, la activación de la matriz se puede dar a través de la adición de grupos reactivos a la superficie o mediante modificación de la cadena de polímeros que compone al soporte [48,55]. Los aminoácidos generalmente involucrados en la inmovilización covalente son: lisinas (grupo amino), ácido aspártico y glutámico (grupo carboxilo).

El entrecruzamiento es otro método de inmovilización irreversible, pero en este caso no se precisa de soporte. Las dos técnicas más usadas son la cristalización de enzimas puras y consiguiente entrecruzamiento químico (CLEC) o la agregación enzimática para luego efectuar el paso de entrecruzamiento (CLEA). En el entrecruzamiento químico, lo que ocurre es la formación de enlaces covalentes entre moléculas de enzima o con proteínas inertes como gelatina o albúmina sérica bovina (co-entrecruzamiento) por medio de un reactivo bifuncional como el glutaraldehído. El uso de CLEAs o de CLECs tienen la gran ventaja de tener una alta actividad por unidad de volumen pero al generarse poros muy pequeños las tasas de difusión del sustrato son muy bajas, especialmente en el caso de sustratos macromoleculares lo que lleva a una disminución en la actividad enzimática observada [47,50].

Finalmente, el método de inmovilización por entrapamiento o microencapsulación se basa en la oclusión de una enzima dentro del soporte (fibras o polímeros membranosos) permitiendo la libre circulación de sustrato y producto. La enzima, a pesar de estar libre dentro del soporte, se encuentra confinada dentro de la matriz y los poros del gel se encuentran controlados de manera que no haya pérdida. El polímero más utilizado para el entrapamiento es el alginato debido a las condiciones suaves de gelificación y su no-toxicidad. Sin embargo, el uso práctico de este método se ve limitado debido a las limitaciones de transferencia de masa del sustrato al sitio activo y además, si los poros de la matriz resultan demasiado grandes se puede perder enzima [47].

1.4.2.1 Inmovilización covalente utilizando el método de ciano-4-dimetil-amino-piridinio tetrafluoro borato (CDAP-BF₄)

El método de CDAP-BF₄ consiste en la activación de la matriz mediante la generación de grupos cianato éster debido al ataque nucleofílico que establecen los grupos funcionales hidroxilo presentes en la matriz hacia el compuesto CDAP-BF₄. Los grupos cianato éster, a continuación, reaccionan con los grupos amino de las proteínas a inmovilizar, generando principalmente derivados de tipo isourea (Figura 1.15). Tradicionalmente, la activación para la generación de grupos cianato éster era efectuada con bromuro de cianógeno pero los porcentajes de inmovilización eran muy bajos. Además, el reactivo era demasiado tóxico para la salud, por lo que el agente cianilante puede reemplazarse por CDAP-BF₄ ya que es más seguro, estable y se puede almacenar por largos períodos de tiempo [56].

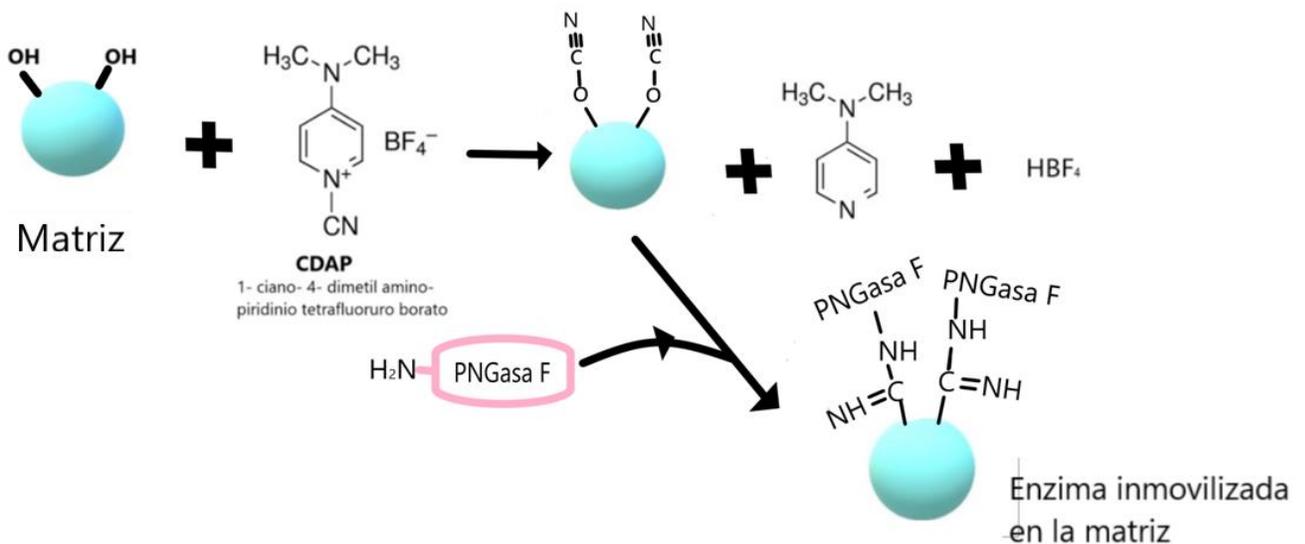


Figura 1.15: Método de activación de los soportes con CDAP-BF₄ para la inmovilización de PNGasa F. En la activación de los soportes se puede emplear el agente cianilante CDAP, que forma grupos ciano-éster con los grupos hidroxilos presentes en el soporte. Luego, se puede inmovilizar la enzima de interés incubándola junto al soporte activado, llevando a la formación de enlaces tipo isourea entre los grupos amino libres de las enzimas y los grupos ciano-éster formados en el paso anterior.

Objetivos

Objetivo general

El objetivo general de esta tesina de grado es la inmovilización de PNGasa F de *Elizabethkingia miricola* en un soporte de agarosa y en un soporte de nanopartículas de sílica magnéticas para su aplicación como herramienta biotecnológica para la deglicosilación específica de glicoproteínas que contienen N-glicanos.

Objetivos específicos

- Inmovilización de la PNGasa F de *Elizabethkingia miricola* en un soporte de agarosa y de nanopartículas magnéticas activadas con el agente cianilante CDAP-BF₄.
- Evaluar el funcionamiento de la PNGasa F en la deglicosilación de glicoproteínas modelo como RNasa B, fetuina bovina, ovoalbúmina, β -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* y lactoferrina bovina.
- Evaluar la capacidad de reuso de la enzima inmovilizada en ambos soportes.

2. Materiales y métodos

2.1 Materiales

La PNGasa F de *Elizabethkingia miricola* (3.5.1.52) fue adquirida en Promega Corporation (Madison, Wisconsin, EE.UU). La RNasa B de páncreas bovino, la β -galactosidasa de *Aspergillus oryzae*, la fetuina de suero fetal bovino, la ovoalbúmina, el Tetrafluoroborato de 1-ciano-4- (dimetilamino) piridinio (CDAP-BF₄) y la o-fenilendiamina (OPD) fueron adquiridas de Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri, EE. UU.). La lactoferrina bovina fue adquirida de Murray Goulburn Co-operative Co. LTD (Melbourne, Australia).

Las nanopartículas magnéticas funcionalizadas con grupos hidroxilo (SiMAG-Hydroxyl) se adquirieron de Chemicell (Berlin, Alemania). La agarosa (Sephacosa 4B) y las columnas NAP-5 (Sephadex G25) fueron adquiridas de GE HealthCare (Buckinghamshire, UK). La lectina biotilada *Sambucus nigra* lectin (SNA) y Concavalina A (ConA) de *Canavalia ensiformis* fueron adquiridas de Vector Laboratories (Burlingame, California, EE.UU). El reactivo BCA para la determinación de proteínas fue adquirido de Pierce (Rockford, Illinois, EE.UU).

2.2 Determinación de proteínas

Se determinó la concentración de proteínas mediante la técnica de ácido bicinonínico (BCA) según describe en Smith et al (1985) [57]. El reactivo para la determinación de proteínas se preparó mezclando 50 mL de ácido bicinonínico y 1 mL de sulfato de cobre 4%. Se incubaron 15 μ L de muestra con 300 μ L de reactivo durante 15 minutos a 60°C. Luego de enfriar a temperatura ambiente se midieron las absorbancias a 562 nm. La curva de calibración se realizó con 5 diluciones de albúmina de suero bobino (BSA) en el rango de 0.1- 0.5 mg/mL.

2.3 Medida de actividad de PNGasa F

A 240 μ L de RNasa B (4.17 mg/ml) en amortiguador 20 mM Tris-HCl pH 7.5; 50 mM NaCl; 5 mM EDTA se le agregaron 20 μ L SDS 5% y 20 μ L DTT 1 M. Se hirvió la mezcla en baño de agua durante 5 minutos y se dejó enfriar. Posteriormente se agregaron 40 μ L de Tritón X 100 (10%) y 40 μ L de amortiguador fosfato de sodio 0.5 M pH 7.5. De la mezcla de RNasa desnaturalizada se extrajo una alícuota de 36 μ L y se le adicionaron 4 μ L de agua y 20 μ L de amortiguador de muestra (2.5 mL de glicerol;

2.0 mL de 10% SDS; 0.2 mL de Azul de Bromofenol 0.5%; 1.25 mL de amortiguador 0.5 M Tris-HCl pH 6.8; 0.5 mL β -mercaptoetanol; 3.55 mL de agua destilada). Luego, se calentó durante 5 minutos en baño a 100°C (Blanco del ensayo). A los 324 μ L de RNasa B desnaturalizada restante se le adicionaron 10 mg de PNGasaF-agarosa, 36 μ L de una dilución adecuada de PNGasa F o 50 μ L de una suspensión estándar de PNGasaF-nanos en amortiguador 20 mM Tris-HCl pH 7.5; 50 mM NaCl; 5 mM EDTA. Esta mezcla se incubó bajo agitación a 37 °C y se tomaron alícuotas de 40 μ L cada 10 minutos durante una hora, se le adicionaron 20 μ L de amortiguador de muestra a cada alícuota y se calentaron 5 minutos en baño de agua a 100°C.

Las muestras de RNasa B deglicosiladas fueron analizadas por SDS-PAGE, donde la RNasa B glicosilada migra aproximadamente hacia los 17 kDa y la RNasa B completamente deglicosilada migra con un peso molecular aparente de 15 kDa [58]. Se utilizaron geles de 15% o 20% de entrecruzamiento y la tinción se llevó a cabo con Coomassie Brilliant Blue (coloidal). Los geles de electroforesis fueron escaneados mediante el programa Image J y se determinó la densidad óptica de la banda correspondiente a la RNasa B en las alícuotas tomadas a diferentes tiempos.

Se definió la unidad de enzima (UE) como cantidad de PNGasa F capaz de catalizar la deglicosilación de 1 nanomol de RNasa B desnaturalizada por minuto a 37 °C y pH= 7.5.

Para calcular la cantidad de nanomoles de RNasa B a cada tiempo, se tomó como referencia la densidad óptica de la banda correspondiente al blanco del ensayo (nanomoles de RNasa B iniciales). La cantidad de nanomoles iniciales de RNasa B se calculó según la fórmula:

$$\text{Nanomoles de RNasa iniciales} = \frac{\text{Vol RNasa } (\mu\text{L}) * [\text{RNasa}] (\mu\text{g}/\mu\text{L}) * 2 * \text{Vol siembra EF } (\mu\text{L})}{\text{PM RNasa B } (\mu\text{g}/\text{nanomol}) * \text{Vol ensayo } (\mu\text{L}) * 3}$$

Siendo:

Vol RNasa= volumen de RNasa agregado al ensayo

[RNasa]= concentración de RNasa stock en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

Vol siembra EF= Volumen de siembra del ensayo en el gel de SDS-PAGE

PM RNasa= peso molecular de RNasa B

Vol ensayo= Volumen final del ensayo

El factor 2/3 hace referencia a la dilución del ensayo con agregado de amortiguador de muestra

Tomando en cuenta el cálculo de nanomoles de RNasa B inicial, se procedió a calcular los nanomoles de RNasa B remanentes a cada tiempo según:

$$\text{Nanomoles de RNasa}(t) = \frac{D.O (t = x) * \text{nanomoles de RNasa iniciales}}{D.O (t = 0)}$$

Siendo:

D.O (t=x)= Densidad óptica de la banda correspondiente a RNasa B a cierto tiempo de comenzado el ensayo de actividad

D.O (t=0)= Densidad óptica de la banda correspondiente a RNasa B inicial (tiempo 0)

A partir de estos datos, se graficaron los nanomoles de RNasa en función del tiempo obteniéndose los nanomoles liberados por minuto. Para obtener el valor de la actividad enzimática (UE/μL o UE/μg), la pendiente de la recta fue dividida entre la cantidad de PNGasa F equivalente al volumen de mezcla reactiva sembrada en la electroforesis y multiplicada por el factor de dilución.

A continuación se describe como se realizaron los cálculos para determinar la cantidad de PNGasa F inmovilizada por ensayo:

$$\frac{\text{PNGasa F inmov (mg)}}{\text{ensayo}} = \frac{[\text{susp. std PNGasa inmov}](\text{mg/mL}) * \text{Vol susp st (ml)} * \text{Vol siembra EF}(\mu\text{L}) * 2}{\text{Vol ensayo} (\mu\text{L}) * 3}$$

Susp. Std PNGasa inmov : Suspensión estándar de PNGasa F inmovilizada

Vol. Susp st : Volumen de suspensión estándar agregada al ensayo

Vol. siembra EF: Volumen de siembra del ensayo de actividad en electroforesis

Vol. ensayo: Volumen final del ensayo de actividad

El factor 2/3 hace referencia a la dilución del ensayo con agregado de amortiguador de muestra

En el caso de trabajar con PNGasa F en condiciones solubles, los cálculos de la cantidad de PNGasa F agregada por ensayo se realizó de la siguiente forma:

$$\frac{\text{PNGasa F} (\mu\text{L})}{\text{ensayo}} = \frac{\text{Vol PNGasa F en ensayo} (\mu\text{l}) * \text{Vol siembra EF}(\mu\text{L}) * 2}{\text{Vol ensayo} (\mu\text{L}) * 3}$$

Vol PNGasa F en ensayo: Volumen de PNGasa F agregado al ensayo

Vol siembra EF: Volumen de siembra del ensayo de actividad en electroforesis

Vol. ensayo: Volumen final del ensayo de actividad

A modo de ejemplo, para calcular los UE/mg de PNGasaF-nanos se prepara la siguiente suspensión estándar: 243 mg de PNGasaF-nanos+ 1.8 mL de amortiguador 20 mM Tris-HCl pH 7.5; 50 mM NaCl; 5 mM EDTA.

La cantidad de RNasa inicial sería:

$$\text{Nanomoles de RNasa iniciales} = \frac{216 \mu\text{L} * 4.17 \mu\text{g}/\mu\text{L} * 2 * 10 \mu\text{L}}{15 \mu\text{g}/\text{nanomol} * 374 \mu\text{L} * 3} = 1.07 \text{ nanomoles}$$

La pendiente obtenida de graficar nanomoles de RNasa B vs Tiempo fue de 0.007.

La cantidad de PNGasaF-nanos agregada al ensayo, se calculó como:

$$\frac{\text{PNGasa F inmov (mg)}}{\text{ensayo}} = \frac{135 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} * 50 \times 10^{-3} \text{ml} * 10 \mu\text{L} * 2}{374 \mu\text{L} * 3} = 0.08$$

Finalmente para calcular UE/mg, se divide la pendiente por la cantidad de PNGasaF-nanos agregado por ensayo: 0.007/ 0.08=0.09 UE/mg

2.4 Inmovilización de PNGasa F

2.4.1 Activación del soporte Agarosa con CDAP

Todos los reactivos fueron preenfriados a 4 °C.

A 3 g de agarosa se le realizaron 3 lavados con 50 mL de agua destilada, 50 mL de acetona: agua (3:7) y 50 mL de acetona agua (6:4). Se trasvasó la agarosa lavada a un vaso de bohemia de 10 mL y se agregaron 3 mL de Acetona: Agua (6:4) y se enfrió a en baño con hielo. Se agregaron 75 mg de CDAP disueltos en 2 mL de Acetona: Agua (6:4) bajo agitación vigorosa en frio durante 3 minutos. A continuación se agregaron 360 µL de solución de TEA (trimetilamina) 0.2 M gota a gota durante un período de 2 minutos máximo. Se agitó durante 3 minutos más a 4 °C y se trasvasó la mezcla a un matraz conteniendo 50 mL de HCl 0.05 M a 4 °C. Pasado un máximo de 2 minutos la agarosa activada (CDAP-agarosa) se lavó rápidamente con 50 mL de agua destilada y se utilizó en forma inmediata para la inmovilización de PNGasa F.

2.4.2 Activación del soporte Nanopartículas magnéticas con CDAP

Todos los reactivos fueron previamente enfriados a 4 °C. Se tomaron 600 µL de suspensión de nanopartículas magnéticas (SIMAG-Hydroxyl, 50 mg/ml) y utilizando una gradilla imantada se separaron las nanopartículas magnéticas del sobrenadante. Luego, se lavaron las nanopartículas con 5 ml de amortiguador fosfato de sodio 0,1 M pH 7.5, 5 ml de acetona: agua (3:7) y 5 ml de acetona: agua (6:4). Se separó el sobrenadante y se agregaron 300 µL de acetona: agua (6:4) en frío. Se agregaron 37.5 mg de CDAP disueltos en 1 ml de acetona: agua (6:4) bajo constante agitación manual en baño con hielo durante 3 minutos. A continuación, se agregaron 180 µL de solución de TEA 0.2 M gota a gota durante un período de 2 minutos máximo. Se agitó durante 3 minutos más en baño con hielo. Se separó el sobrenadante y se agregó 1 mL de HCl 0.05 M a 4 °C. El ácido se separó inmediatamente y se lavaron las nanopartículas con 5 mL de amortiguador fosfato de sodio 0,1 M pH 7.5 en 5 tandas de 1 mL. Las nanopartículas activadas (CDAP-nanos) se utilizaron en forma inmediata para la inmovilización de PNGasa F.

2.4.3 Inmovilización de PNGasa F sobre CDAP-agarosa

Se incubaron 200 mg de CDAP-agarosa con 400 µL de PNGasa F (0,33 UE/µL) en amortiguador Tris-HCl 20 mM pH 7.5; 50 mM NaCl; 5 mM EDTA durante 4 horas a temperatura ambiente bajo agitación suave. Se separó el sobrenadante y se guardó para posterior evaluación de actividad enzimática. La PNGasaF-agarosa se lavó con amortiguador Tris-HCl 20 mM pH 7.5; 50 mM NaCl; 5 mM EDTA y se guardó a 4°C.

2.4.4 Inmovilización de PNGasa F sobre CDAP-nanos

Se incubaron 170 mg de CDAP-nanos con 2 mL de PNGasa F (0,065 UE/µL) en amortiguador fosfato de sodio 0.1 M pH 7.5; 50 mM NaCl; 5 mM EDTA a temperatura ambiente bajo agitación suave. Luego de 4 horas, se agregaron 200 µL de amortiguador Tris-HCl 2 M y se incubó otros 30 minutos con el fin de bloquear los grupos cianato éster remanentes. De esta forma se intentó evitar la unión multipuntual de la proteína que pudiese generar entrecruzamiento entre las nanopartículas imantadas generando la agregación de las mismas. A continuación se removió el sobrenadante utilizando la gradilla imantada y se almacenó para posteriormente evaluar su actividad enzimática. Seguidamente se lavó el derivado PNGasaF-nanos con amortiguador 20 mM Tris-HCl pH 7.5; 50 mM NaCl; 5 mM EDTA y se registró la masa

final de las nanopartículas inmovilizadas (PNGasaF-nanos). Se agregaron 1.8 mL de este último amortiguador y se almacenó la suspensión estándar en heladera a 4°C.

2.4.5 Evaluación de la inmovilización de PNGasa F

Con el fin de evaluar la eficiencia de la inmovilización, se definieron el porcentaje de inmovilización y el porcentaje de actividad enzimática expresada según:

$$\% \text{ Inmovilización} = \frac{(\text{UE aplicadas} - \text{UE sobrenadante}) * 100}{\text{UE aplicadas}}$$

Siendo UE aplicadas la cantidad de Unidades de Enzima aplicadas al soporte y UE sobrenadante, las Unidades de Enzima registradas en el sobrenadante

$$\% \text{ Actividad Enzimática Expresada} = \frac{\text{UE inmovilizado/mg} * 100}{\text{UE aplicado/mg}}$$

Siendo UE/mg aplicadas, las Unidades de Enzima aplicadas al soporte y UE/mg Inmovilizado, las Unidades de Enzima expresadas en el inmovilizado por unidad de masa del soporte.

2.5 Deglicosilación de proteínas modelo

Se prepararon soluciones de las siguientes glicoproteínas: RNasa B de páncreas bovino (0.146 mg/mL), β-galactosidasa de *Aspergillus oryzae* (0.123 mg/mL), fetuina de suero fetal bovino (0.108 mg/mL), ovoalbúmina (0.132 mg/mL) y lactoferrina bovina (0.148 mg/mL) en solución de bicarbonato de amonio 50 mM pH 7.8. Dichas soluciones fueron previamente gelfiltradas en columnas NAP5 (Sephadex G25) para remover contaminantes de bajo peso molecular.

Se incubaron 40 μL o 600 μL de cada glicoproteínas con 4 μL de PNGasa F soluble (0.9 UE/μL) u 80 mg de PNGasaF-nanos (0.11 UE/mg) respectivamente durante 24 horas a 37° C bajo agitación. A continuación se separó el sobrenadante del derivado PNGasaF-nanos con ayuda de la gradilla imantada. Se tomaron 40 μL del sobrenadante o de la mezcla de reacción con la enzima soluble, se le agregaron 20 μL de amortiguador de muestra y se calentó a 100°C durante 5 minutos. Dichas muestras fueron evaluadas por SDS-PAGE y se procedió a realizar el cálculo de porcentaje de deglicosilación.

En el caso de RNasa B, que tiene un único sitio de glicosilación, el porcentaje de deglicosilación se calculó como:

$$\% \text{ Deglicosilación} = \frac{D.O \text{ PNGasa F} * 100}{D.O \text{ blanco}}$$

Siendo:

D.O PNGasa F= Densidad óptica de la banda correspondiente a la glicoproteína deglicosilada tratada con PNGasa F (soluble o inmovilizada)

D.O blanco = Densidad óptica de la banda correspondiente a la glicoproteína glicosilada sin tratar con PNGasa F.

En el caso de evaluar glicoproteínas con más de un sitio de glicosilación, se calculó el porcentaje remanente de glicoproteína glicosilada según:

$$\% \text{ Deglicosilación total o parcial} = 100 - \left(\frac{D.O A}{D.O B} \right) * 100$$

Siendo:

D.O A: Densidad óptica de la banda correspondiente a la glicoproteína glicosilada remanente luego del tratamiento con PNGasa F (soluble o inmovilizada)

D.O B: Densidad óptica de la banda correspondiente a la glicoproteína deglicosilada sin tratar con PNGasa F.

Por otro lado se tomaron 500 µL del sobrenadante de la reacción con PNGasaF-nanos y se gel filtraron en columnas NAP5 (Sephadex G25) equilibradas en solución de bicarbonato de amonio 50 mM pH 7.8 a los efectos de separar las glicoproteínas deglicosiladas de los glicanos liberados. Se recogió la fracción correspondiente al volumen muerto (V_0), donde eluyen las glicoproteínas deglicosiladas y se almacenó para su posterior evaluación por ensayos de reconocimiento por lectinas.

Para el caso de la PNGasaF-agarosa se incubaron 150 mg de PNGasaF-agarosa (0.074 UE/mg) con 240 µL de RNasa (0.55 mg/ml) en solución bicarbonato de amonio 50 mM pH 7.8 bajo agitación a 37 °C por 24 horas. Se filtró el sobrenadante, se tomaron 150 µL, se agregaron 75 µL de amortiguador de muestra y se calentaron 5 minutos a 100 °C. Posteriormente se analizaron las muestras por SDS-PAGE como se describió anteriormente.

2.6 Ensayo de reconocimiento por lectinas

Se sensibilizaron placas de ELLA (NUNC MaxiSorp, Dinamarca) con 100 µL de solución de glicoproteínas tratadas (1 µg/mL) en amortiguador carbonato-bicarbonato 0,1 M pH 9.5 por duplicado. Seguidamente, se almacenaron las placas durante 12 horas a 4°C. Luego se realizaron

dos lavados con solución de lavado (PBS y 0.1% Tween) y se bloqueó con 200 µL de solución de bloqueo (PBS y 1% gelatina). Se incubaron las placas a 37 °C durante 1 hora. Después, se efectuaron 3 lavados con solución de lavado y se incubaron las placas con 100 µL de lectinas biotiniladas en solución PTG (PBS, gelatina 0.5% y 0.1% Tween) durante una hora a 37 °C. Las lectinas utilizadas fueron: *Sambucus nigra* agglutinin (SNA, 1 µg/µL) y Conavalina A (ConA) de *Canavalia ensiformis* (10 µg/µL). A continuación se lavaron las placas 3 veces con solución de lavado y se sembraron 100 µL de streptavidina conjugada a peroxidasa, diluido en PTG. Se incubaron las placas por una hora a 37 °C, luego se lavaron 5 veces con solución de lavado y se realizó el revelado de las placas. Para ellos se preparó la solución de revelado con 10 mg de OPD (o-fenilendiamina), 20 mL de amortiguador fosfato/ citrato 0,1 M pH5 y 80 µL de peróxido de hidrógeno (30%). Se sembraron 200 µL de solución de revelado en cada pocillo y una vez que se logró coloración en la placa, la reacción se detuvo con el agregado de 50 µL de HCl 3 N. El desarrollo de color fue cuantificado mediante lector de placas midiendo la absorbancia 492 nm. A partir de estos últimos datos, se procedió a calcular el porcentaje de reconocimiento remanente de lectinas según:

$$\% \text{ Reconocimiento Remanente lectinas} = \frac{\text{Abs}_{492 \text{ nm}} \text{ PNGasaF} - \text{nanos} * 100}{\text{Abs}_{492 \text{ nm}} \text{ blanco}}$$

Siendo:

Abs_{492 nm} PNGasaF-nanos: Absorbancia a 492 nm de la glicoproteína tratada con PNGasaF-nanos, en el ensayo con lectinas

Abs_{492 nm} blanco: Absorbancia a 492 nm de la glicoproteína incubada con nanopartículas magnéticas sin activar, en el ensayo con lectinas.

3. Resultados y discusión

3.1 Inmovilización de PNGasa F sobre agarosa y nanopartículas magnéticas

La PNGasa F es una enzima ampliamente utilizada en el área glicómica debido a su capacidad de liberar N-glicanos de glicoproteínas [59, 60]. A los efectos de poder utilizar las glicoproteínas deglicosiladas en ensayos funcionales es necesario remover la PNGasa F del medio de reacción lo que implica un paso de purificación posterior el cuál puede ser complejo. Con el fin de facilitar este procedimiento, se estudió la inmovilización de la enzima PNGasa F sobre dos soportes: agarosa y nanopartículas de sílica magnéticas activados con grupos cianato éster.

Para poder de evaluar la eficiencia del proceso de inmovilización, se puso a punto un ensayo de actividad para PNGasa F utilizando RNasa B como sustrato. La RNasa B es una glicoproteína monomérica con un único sitio de N-glicosilación. En este ensayo se midió la velocidad con la que la PNGasa F libera el glicano de la RNasa B desnaturalizada. Se desnaturalizó la RNasa B como forma de exponer los glicanos para que sean más accesibles al sitio activo de la enzima. La diferencia de peso molecular de la RNasa B glicosilada (17 kDa) y deglicosilada (15 kDa) hace que la movilidad de las mismas sea diferente en un proceso electroforético y se puede observar claramente la disminución de la densidad óptica de la banda correspondiente a la RNasa B y la aparición de la banda de la RNasa B deglicosilada (Figura 3.1 A, B y C). Dicha densidad óptica se relaciona con la cantidad de nanomoles de RNasa B a los distintos tiempos. De la pendiente del gráfico de nanomoles de RNasa en función del tiempo (Figura 3.1D) puede obtenerse la velocidad de la enzima la cual se expresa en unidades de enzima (UE) de acuerdo a la definición planteada en la Sección 3.4 de Materiales y Métodos.

A continuación, se exhibe a modo de ejemplo el proceso de la medida de actividad de PNGasaF-agarosa, junto con el sobrenadante de la inmovilización en agarosa y la actividad de la PNGasa F previa a su inmovilización (Figura 3.1). De la misma forma, se procedió a evaluar la actividad de PNGasaF-nanos, su correspondiente sobrenadante y la actividad enzimática inicial.

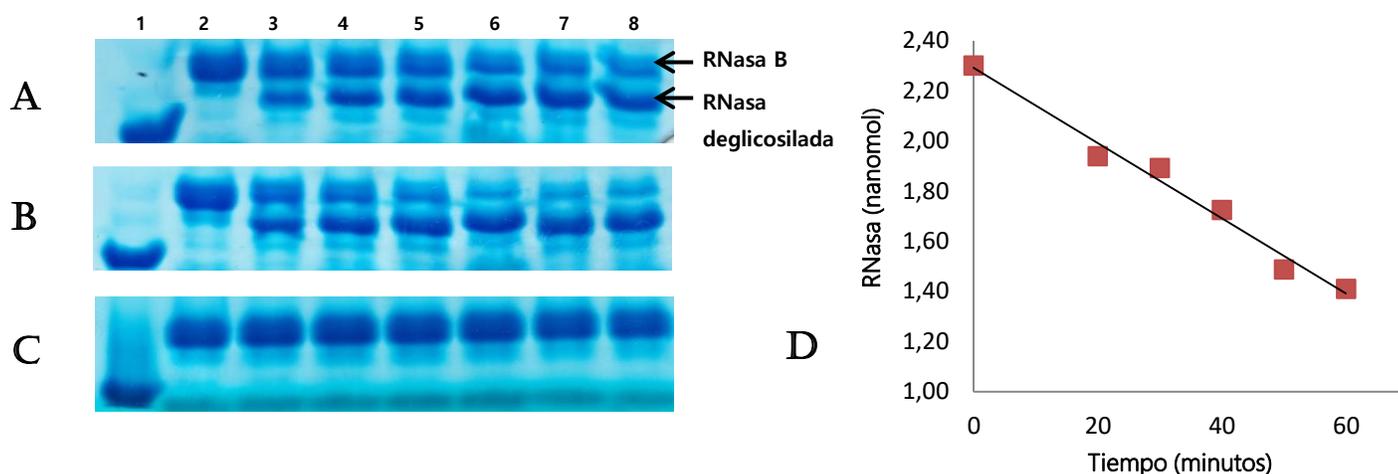


Figura 3.1: Actividad enzimática de PNGasa F sobre RNasa B. (A) Ensayo de actividad de PNGasa F inicial evaluado por SDS-PAGE en gel de 15% entrecruzamiento. (B) Ensayo de actividad de PNGasaF-agarosa evaluado por SDS-PAGE en gel de 15% entrecruzamiento (C) Ensayo de actividad del sobrenadante de la inmovilización de PNGasa F-agarosa evaluado por SDS-PAGE en gel de 15% entrecruzamiento. Carriles: 1) Lisozima (14 kDa), 2) 0 minutos de ensayo de actividad, 3) 10 minutos de ensayo de actividad, 4) 20 minutos de ensayo de actividad, 5) 30 minutos de ensayo de actividad, 6) 40 minutos de ensayo de actividad, 7) 50 minutos de ensayo de actividad, 8) 60 minutos de ensayo de actividad. La lisozima se utiliza como referencia del PM. (D) Evaluación de la velocidad de liberación de glicanos de la RNasa B tratada con PNGasa F-agarosa.

Se definió el **Porcentaje de Inmovilización** como la diferencia entre las unidades de enzima (UE) ofrecidas al soporte y a las recuperadas en el sobrenadante, expresadas como porcentaje de las unidades iniciales y el **Porcentaje de actividad enzimática expresada** que representa el porcentaje de enzima activa unida al soporte en relación a las UE ofrecidas al soporte (Sección 2.4.5 de Materiales y Métodos).

Cuando la inmovilización se realizó sobre agarosa, se le ofrecieron 130 UE A 200 mg de agarosa-CDAP y se obtuvieron porcentajes de inmovilización del 100% (Tabla 3.1) no observándose actividad en el sobrenadante (Figura 3.1C). Sin embargo, cuando se evaluó la inmovilización en función de la actividad expresada, el rendimiento de actividad fue del 11% (Tabla 3.1), por lo que no toda la enzima inmovilizada expresa su actividad. El bajo porcentaje de actividad en el soporte puede deberse a que parte de la enzima haya quedado inmovilizada en el interior de los poros de agarosa lo que podría generar problemas difusionales para el acceso del sustrato al sitio activo de la enzima, teniendo en cuenta el carácter macromolecular del mismo [34, 49, 51]. En este caso se estaría subestimando la actividad del derivado PNGasaF-agarosa. Por otra parte, también puede ocurrir que según la orientación en que se haya realizado la unión de la enzima al soporte, el sitio activo puede haber quedado parcialmente bloqueado [50,53], lo que también dificultaría el acceso del sustrato al sitio activo. Una estrategia para disminuir este posible efecto podría ser el uso de brazos espaciadores con el fin de alejar a la enzima de la superficie de la matriz, lo que dejaría el sitio activo más accesible, además de beneficiar la movilidad de la proteína en el

medio [48]. Otra explicación para este resultado, podría ser que en las condiciones de inmovilización, la PNGasa haya sufrido distorsiones en su estructura nativa que afectaran su actividad, especialmente si la unión al soporte se efectuó a través de uniones multipuntuales [51, 53]. También puede haber ocurrido que parte de las enzimas se hayan unido al soporte a través de lisinas ubicadas en su sitio activo o en otros sitios esenciales para la actividad catalítica [34, 49, 51,53].

Por otra parte, al inmovilizar PNGasa F sobre nanopartículas de sílica magnéticas se le ofrecieron 130 UE a 170 mg de nanos-CDAP. En esta ocasión, no se logró inmovilizar la enzima en su totalidad a pesar de haber variado la relación UE aplicadas/mg de soporte. Se obtuvo un porcentaje de inmovilización del 86% y un porcentaje de actividad enzimática expresada del 14% (Tabla 3.1).

Tabla 3.1: Evaluación de la inmovilización de PNGasa F en soporte de agarosa.

Inmovilizado	UE aplicadas (UE/mg de soporte)	UE inmovilizado (UE/mg de soporte)	UE sobrenadante (UE/mg de soporte)	% Inmovilización	% Actividad enzimática
Agarosa	0.650±0.010	0.074±0.001	0	100%	11%
Nanopartículas Magnéticas	0.740±0.110	0.104±0.018	0.11 ±0.002	86%	14%

Las nanopartículas son un soporte no-poroso, por lo que la enzima se inmoviliza sobre la superficie de la matriz. Esto trae aparejado que la enzima esté en mayor contacto con el medio y no existan problemas difusionales, por lo que sería de esperar que el porcentaje de actividad expresada aumente en comparación a la obtenida en la inmovilización sobre agarosa [51, 53, 54]. Sin embargo, solo se observó un leve aumento del porcentaje de actividad enzimática expresada (Tabla 3.1). Esto indicaría que la razón de la baja actividad expresada luego de la inmovilización no se puede atribuir al tipo de matriz utilizada. Como se mencionó anteriormente, estos resultados se podrían deber a que algunos de los residuos de lisina involucrados en la inmovilización a la matriz juegan un rol importante en la actividad enzimática de la PNGasa F o que se localicen cerca del sitio activo, bloqueándose parcialmente el sitio activo y dificultando el acceso del sustrato. Otro posible motivo de dichos resultados, es que la enzima se vea inactivada debido a distorsiones ocurridas a nivel de su sitio activo luego de la inmovilización [34, 49, 51, 53]. Es de destacar que ambos derivados enzimáticos mantienen el 100% de su actividad luego de 4 meses de almacenamiento a 4 °C.

3.2 Deglicosilación de RNasa B en condiciones nativas

A los efectos de poder utilizar la proteína deglicosilada en ensayos funcionales posteriores, es necesario realizar la deglicosilación en condiciones nativas a diferencia de las condiciones desnaturizantes en que se realiza el ensayo de actividad. Los ensayos de deglicosilación en condiciones nativas de RNasa B con PNGasa F inmovilizada y soluble, se realizaron a 37°C durante 24 horas. En la Figura 3.2, se puede apreciar los resultados de la deglicosilación por SDS-PAGE. Se observa la aparición de una segunda banda proteica en los carriles donde la glicoproteína fue tratada con PNGasa F (tanto soluble como inmovilizada). Esta nueva banda, corresponde a la RNasa B deglicosilada.

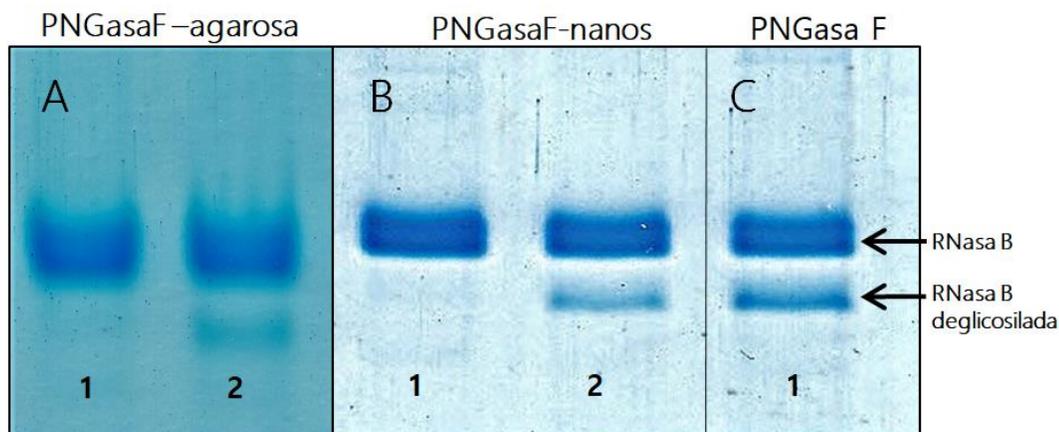


Figura 3.2: Deglicosilación de RNasa B en condiciones nativas. Ensayo de deglicosilación de RNasa B evaluado por SDS-PAGE con gel de 15% de entrecruzamiento. **A)** La deglicosilación se realizó incubando 150 mg de PNGasaF-agarosa (0.074 UE/mg) con 240 μ L de RNasa B 0.55 μ g/ μ L (0.08 UE PNGasaF-agarosa/ μ g de RNasa B) a 37°C. Carriles: 1. blanco deglicosilación 24 hs; 2. deglicosilación 24 hs. **B)** La deglicosilación se realizó incubando 80 mg de PNGasaF-nanos (0.104 UE/mg) con 600 μ L de RNasa B 0,146 mg/mL (0,09 UE PNGasaF-nanos/ μ g de RNasa B) a 37°C. Carriles: 1. Blanco deglicosilación 24 hs; 2. deglicosilación 24 hs. **C)** La deglicosilación se realizó incubando 4 μ L de PNGasa F soluble (0.9 UE / μ L) con 40 μ L de RNasa B 0,146 μ g/ μ L (0.6 UE PNGasa F soluble/ μ g de RNasa B) a 37°C. Carriles: 1. Deglicosilación 24 hs. La evaluación de la deglicosilación se llevó a cabo mediante SDS-PAGE con geles de 15% de entrecruzamiento.

A partir de los resultados obtenidos en la Figura 3.2, se procedió a calcular los porcentajes de deglicosilación (Tabla 3.2) tal como se describe en la Sección 2.5 de Materiales y Métodos. Con el derivado de PNGasaF-agarosa se alcanzó un porcentaje de deglicosilación en condiciones nativas del 7 % mientras que con el derivado PNGasaF-nanos el mismo fue de un 19% (Tabla 3.2). En ningún caso fue posible la deglicosilación total. La relación UE PNGasa/ μ g RNasa fue de 0.08 y 0.09 para las PNGasaF-agarosa y PNGasaF-nanos respectivamente. Para poder aumentar esta relación habría que utilizar más unidades de enzima y/o disminuir la cantidad total de RNasa. Aumentar las Unidades de enzima implicaría colocar más cantidad de derivado siendo necesario aumentar el volumen total del ensayo para permitir una buena

agitación lo que disminuiría la concentración final de proteína dificultando el análisis final por electroforesis. Disminuir aún más la cantidad de proteína tendría el mismo efecto. Por otro lado, este resultado era de esperar ya que normalmente la deglicosilación enzimática de glicoproteínas utilizando PNGasa soluble se hace en condiciones desnaturizantes de forma de exponer los glicanos y así facilitar su acceso al sitio activo de la enzima. Con el objetivo de comparar la funcionalidad de la enzima inmovilizada con la enzima soluble se realizó una deglicosilación de RNasa B en condiciones nativas con la enzima soluble (Figura 3.2 C). El porcentaje de deglicosilación obtenido fue de un 25% aún cuando la relación UE PNGasa F soluble/ μg de RNasa B fue de 0.6 (Tabla 3.2).

Tabla 3.2 Deglicosilación de RNasa B en condiciones nativas

	Porcentaje de deglicosilación (%)	UE PNGasa F/ μg RNasa B^a
PNGasaF-agarosa	7.0 \pm 0.7	0.08
PNGasaF-nanos	19.1 \pm 4.4	0.09
PNGasa F soluble	25.0 \pm 1.8	0.60

a: UE de enzima PNGasa F por unidad de sustrato RNasa B

Esto pone de manifiesto que aún con la enzima soluble es difícil de obtener altos porcentajes de deglicosilación en condiciones nativas. Por otro lado, parecería ser que aun aumentando la relación enzima/sustrato no se logran aumentar los porcentajes de deglicosilación. Los ciclos de deglicosilación se extendieron a 48 horas sin lograr aumentos significativos en los porcentajes de deglicosilación (datos no mostrados).

Es de destacar que existe una diferencia de casi tres veces más en los porcentajes de deglicosilación obtenidos con la PNGasaF-nanos y la PNGasaF-agarosa. Esto podría deberse a la diferencia entre las características de ambos soportes. La agarosa es un soporte poroso por lo cual la PNGasa puede inmovilizarse tanto en la superficie de la matriz como en el interior de sus poros. Esto dificultaría el acceso del sustrato al sitio activo de la enzima, sobre todo teniendo en cuenta su carácter macromolecular, lo cual también justificaría su baja actividad expresada. En el caso de las nanopartículas magnéticas la PNGasa solo puede inmovilizarse sobre su superficie eliminando los problemas difusionales. Estos resultados descartan el uso de la PNGasaF-agarosa en procesos de deglicosilación.

Si bien el desempeño del derivado PNGasaF-nanos no es equivalente al de la enzima soluble permite la deglicosilación de la PNGasa F teniendo como ventaja su fácil remoción del medio de reacción al igual que su reuso. Por lo cual se continuó trabajando con el derivado PNGasaF-nanos.

Una estrategia alternativa para evaluar la efectividad de la deglicosilación enzimática es determinar si se genera una pérdida de reconocimiento de las glicoproteínas por lectinas específicas como consecuencia de la deglicosilación. Por lo cual, se realizaron estudios de reconocimiento de la RNasa B deglicosilada por ConA, una lectina que reconoce en forma específica manosa y N-glicanos con alto contenido de manosa [42–44]. Al sobrenadante de la reacción de deglicosilación de RNasa B con PNGasaF-nanos se le realizó una cromatografía de exclusión molecular de forma de separar la RNasa B deglicosilada y la RNasa nativa remanente, de los glicanos liberados. El estudio de reconocimiento con lectinas se realizó con la fracción proteica. Como se puede apreciar en la Figura 3.3, luego de 24 horas de tratamiento con PNGasaF-nanos a 37° C, el porcentaje de reconocimiento remanente fue del 20±6% confirmando que efectivamente se produjo deglicosilación.

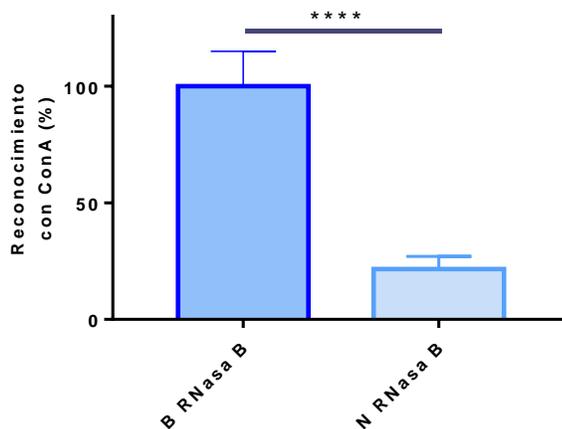


Figura 3.3: Ensayo de reconocimiento de RNasa B por ConA. Se realizó un ensayo tipo ELLA donde se sensibilizaron pocillos con RNasa B deglicosilada enzimáticamente y el blanco correspondiente y posteriormente se incubó con ConA biotinilada. A continuación, se incubó con Streptavidina conjugada a peroxidasa de rábano picante y se reveló o-fenilendiamina y peróxido de hidrógeno midiendo absorbancia a 492 nm. Para el cálculo del porcentaje de reconocimiento, se estableció como 100% el valor de absorbancia del blanco a 492 nm (%). **B RNasa B:** RNasa B incubada con nanopartículas magnéticas sin activar por 24 horas a 37°C; **N RNasa B:** RNasa B incubada con PNGasaF-nanos por 24 horas a 37 °C. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (**** $p < 0,0001$).

Sin embargo, la evaluación mediante SDS-PAGE indicaba un porcentaje de deglicosilación del orden de 20% mientras que el ensayo con lectinas indicaría que la deglicosilación sería cercana al 80%. La diferencia entre estos resultados podría deberse a que se están midiendo fenómenos diferentes. Cuando se evalúa la deglicosilación por electroforesis se está determinando una pérdida de peso molecular generada por la liberación del N-glicano. Esto permite evaluar qué porcentaje de la proteína

nativa se deglicosiló. Por otro lado, cuando se realizan ensayos de reconocimiento por ConA, lo que se evalúa es si las modificaciones realizadas a la proteína generan un cambio en el reconocimiento por ConA. Por lo cual la relación entre el porcentaje de deglicosilación y la pérdida de reconocimiento no tienen que ser necesariamente lineal. Otro posible motivo de la diferencia de resultados entre ambas técnicas, podría ser que la modificación en las glicoproteínas luego del tratamiento con PNGasaF-nanos afecte su capacidad de unión a la placa.

Hay que tener en cuenta que las glicoproteínas presentan isoformas, lo cual quiere decir que el patrón de glicosilación de cada una de las moléculas no es idéntico. De hecho la RNasa B puede contener glicanos con alto contenido de manosa de entre 5 y 9 manosas siendo mayoritarios los Man5 y Man6 [17,34-36]. Gutiérrez Gallego y colaboradores, demostró, mediante una técnica que combina resonancia plasmódica de superficie (SPR) y HPLC de fluorescencia, que ConA tiene una mayor afinidad por N-glicanos de RNasa B con alto contenido de manosa que contengan entre 7 y 9 residuos de manosa, que aquellos N-glicanos conteniendo 5 y 6 residuos de manosa [17]. A su vez dentro de los glicanos con 7 manosas la isoforma Man7 tendría más afinidad por ConA que las Man 7' y Man7'' (Figura 1.6). Este resultado podría explicar la diferencia en los resultados observados en la evaluación por SDS-PAGE y por reconocimiento con lectinas. La ConA podría estar perdiendo fuertemente el reconocimiento por RNasa B si la PNGasaF-nanos deglicosilara N-glicanos de alta afinidad para la lectina a pesar de que aún hubieran presentes en la muestra N-glicanos de menor afinidad. Esto podría dar como resultado grandes porcentajes de deglicosilación evaluados por ensayos de reconocimiento con lectinas con bajos porcentajes de deglicosilación evaluador por electroforesis.

3.3 Re-utilización de la PNGasa inmovilizada

Otros de los objetivos buscados al inmovilizar glicosidasas de interés en glicobiología, es su reutilización. Por lo cual es importante evaluar la actividad remanente de la PNGasa F en función del número de reusos en condiciones nativas. A los efectos de estudiar si los derivados mantenían su actividad enzimática luego de varios usos, se midió la actividad residual de PNGasaF-agarosa luego de 5 usos y de PNGasaF-nanos luego de 7 usos. En derivado PNGasaF-agarosa mantuvo el 100% de la actividad, mientras que el derivado PNGasaF-nanos solamente conservó el 40% de su actividad inicial (datos no mostrados). Existen reportes que indican que la PNGasa podría no ser estable a 37°C por tiempos prolongados [36]. El hecho de que ambos derivados conserven actividad en los reusos aunque

sea en forma parcial apuntaría al hecho de que la inmovilización estaría estabilizando la enzima. García-Galán y su grupo de trabajo, reportó que en el caso de soportes inertes, la unión multipuntual puede ayudar al replegamiento de proteínas que han perdido su actividad debido a pequeños cambios conformacionales generados por exposición a la temperatura [50]. Los grupos involucrados en la unión al soporte actúan como puntos de referencia durante el replegamiento, permitiendo la recuperación de la actividad enzimática perdida una vez que se vuelve a temperatura ambiente. A su vez, la alta porosidad de la agarosa permite que la enzima sea inmovilizada en el interior de los poros protegiéndola de agentes desnaturizantes como la temperatura [52]. Esto podría explicar que el derivado mantenga 100% de su actividad luego de varios reusos a diferencia del derivado PNGasaF-nanos que va perdiendo su actividad. Esta propiedad constituye una ventaja de los soportes porosos, sin embargo no es de utilidad en este caso particular porque los problemas difusionales impiden a la enzima actuar sobre el sustrato en condiciones nativas.

En contraparte, el soporte de nanopartículas de sílica magnéticas no presenta las dificultades difusionales que cuenta el soporte de agarosa pero no parece ser tan efectivo a la hora de proteger a la enzima del medio ya que luego de 7 usos, el derivado perdió el 60% de su actividad.

Dado que el derivado PNGasaF-nanos es estable cuando se almacena en frío entonces la disminución de la actividad puede deberse o bien a la exposición de la PNGasa F a 37°C o al uso de las mismas. Aunque la pérdida de actividad se debiera a su exposición a 37°C, este es un parámetro que no se podría modificar ya que la misma es muy poco activa a temperatura ambiente (datos no mostrados). A pesar de la pérdida de actividad en función del número de usos, la inmovilización sobre nanopartículas es la mejor opción ya que permite porcentajes de deglicosilación que se asemejan a las de la enzima soluble con la ventaja de poder reutilizarla y separarla del producto final.

3.4 Extensión de la funcionalidad de la PNGasaF-nanos a la deglicosilación de otras glicoproteínas

Una vez confirmada la funcionalidad de las PNGasaF-nanos con RNasa B, se continuó el estudio de su funcionalidad con otras glicoproteínas modelo como la fetuina de suero fetal bovino, la β -galactosidasa de *Aspergillus oryzae*, la ovoalbúmina y la lactoferrina bovina. Luego de la deglicosilación enzimática, las glicoproteínas tratadas fueron evaluadas mediante SDS-PAGE y ELLA. Para este último

ensayo, se evaluó el reconocimiento de las glicoproteínas por una serie de lectinas tal como WGA, PNA, HPA, ECA, ConA y SNA (datos no mostrados). De esta lista, fueron seleccionadas la lectina ConA ya que fue capaz de reconocer RNasa B, ovoalbúmina, β -galactosidasa y lactoferrina bovina; y la lectina SNA por reconocer fuertemente a la fetuina. La lectina ConA tiene gran afinidad por N-glicanos de alto contenido de manosa y la lectina SNA es capaz de reconocer ácido siálico presente en N-glicanos complejos o híbridos [42–46].

La fetuina de suero fetal bovino, a diferencia de la RNasa B tiene 3 sitios O- glicosilación y 3 sitios de N-glicosilación del tipo glicanos complejos. En relación a estos últimos, Green et al. (1988) reportó la identificación de hasta 23 isoformas diferentes [20].

En la figura 3.4 A se puede apreciar la evaluación por SDS-PAGE del ensayo de deglicosilación de fetuina bovina con PNGasaF-nanos. Se observa un cambio en el patrón de las bandas, apareciendo nuevas bandas que corresponden a la fetuina con diferentes grados de deglicosilación. Se puede visualizar también que en el carril correspondiente al tratamiento de fetuina con PNGasa soluble aparecen mayor cantidad de bandas de menor peso molecular en comparación al carril que contiene la muestra de fetuina tratada con PNGasaF-nanos.

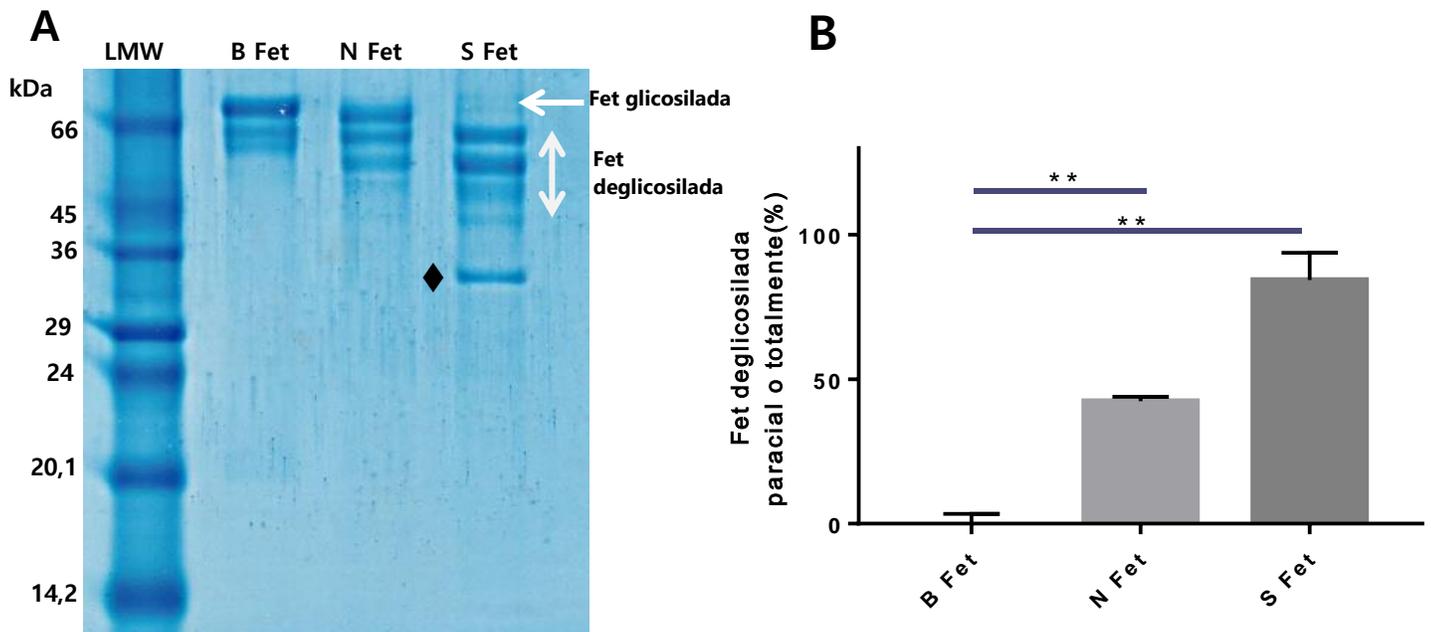


Figura 3.4: Deglicosilación de fetuina bovina con PNGasaF-nanos y PNGasa F soluble. A) Ensayo de deglicosilación de fetuina de suero bovino evaluado por SDS-PAGE con gel de 12% de entrecruzamiento. **LMW:** marcador de bajo PM, **B Fet:** Blanco del ensayo que consiste en la incubación de fetuina con nanopartículas sin activar durante 24 hs a 37 °C. **N Fet:** Fetuina bovina incubada con PNGasaF-nanos durante 24 hs a 37 °C, **S Fet:** Fetuina bovina incubada con PNGasa F soluble por 24 horas a 37 °C. En el ensayo con la PNGasa soluble se observa la banda correspondiente a la PNGasa con un PM aproximado de 36 kDa (♦). **B)** Porcentaje de fetuina deglicosilada parcial o totalmente. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (** p <0,01).

En la figura 3.4 B, se muestra el porcentaje de deglicosilación parcial o total de la fetuina, evaluada a partir del gel de SDS-PAGE. La PNGasa F soluble fue capaz de deglicosilar $84\pm 9\%$ de la fetuina bovina en al menos en un sitio de deglicosilación. Sin embargo, PNGasaF-nanos solamente logró deglicosilar parcial o totalmente el $42\pm 2\%$ de Fet. Esto implicaría que al igual que cuando se utilizó la RNasa B como sustrato, si bien la PNGasaF-nanos es capaz de deglicosilar, la enzima soluble sigue siendo mejor.

En la Figura 3.5 se puede apreciar la evaluación de la deglicosilación de fetuina bovina mediante ensayo de reconocimiento con la lectina SNA, específica para reconocimiento de ácido siálico presente en los N-glicanos complejos de esta glicoproteína. En los resultados se puede percibir un porcentaje de reconocimiento remanente de $41\pm 19\%$ luego del tratamiento con la PNGasaF-nanos, reafirmando los resultados observados en el gel de electroforesis.

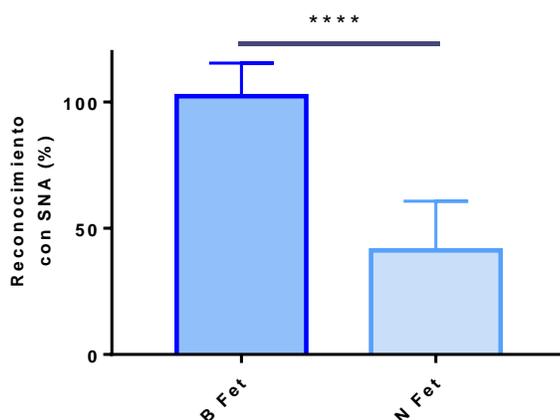


Figura 3.5: Ensayo de reconocimiento de fetuina bovina por lectina SNA (%). Se realizó un ensayo tipo ELLA donde se sensibilizaron pocillos con el blanco y la fetuina deglicosilada enzimáticamente y se incubó con SNA biotinilada. Posteriormente se incubó con Streptavidina conjugada a peroxidasa de rábano picante y se reveló con o-fenilendiamina y peróxido de hidrógeno midiendo absorbancia a 492 nm. Para el cálculo del porcentaje de reconocimiento, se estableció como 100% el valor de absorbancia del blanco a 492 nm. **B Fet:** Fetuina Bovina incubada con nanopartículas magnéticas sin activar por 24 horas a 37° C; **N Fet:** Fetuina bovina incubada con PNGasaF-nanos por 24 horas a 37 °C. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (**** p <0,0001).

Debido a que la β -galactosidasa es otra glicoproteína muy bien estudiada, se seleccionó para proceder en la evaluación de la funcionalidad del derivado. Maksimainen y colaboradores, lograron obtener la estructura cristalográfica de β -galactosidasa de *A. oryzae*, donde se identificaron seis sitios de N-glicosilación [19]. De los seis N-glicanos, tres resultaron ser de alto contenido de manosa y tres de bajo peso molecular (Figura 1.7).

En la figura 3.6 A se muestra la evaluación por SDS-PAGE del ensayo de deglicosilación llevado a cabo para la β -galactosidasa con PNGasaF-nanos y PNGasa F soluble. En este caso, se está trabajando con

un extracto enriquecido en β -galactosidasa pero que contiene otras proteínas de menor peso molecular. Como se puede apreciar en la figura, a simple vista no se observa cambio en el patrón de corrida de la β -galactosidasa sin tratar y la tratada con PNGasaF-nanos pero si se aprecia un cambio en la movilidad de la banda correspondiente a la glicoproteína tratada con PNGasa F soluble. Este resultado es corroborado en la Figura 3.6 B. En dicho gráfico, se aprecia que no se produjeron cambios significativos en la deglicosilación de la glicoproteína tratada con PNGasaF-nanos, pero si se produjo un cambio significativo en el grado de deglicosilación de β -galactosidasa cuando fue tratada con PNGasa F soluble. Este resultado señala que la enzima soluble fue más eficaz que la enzima inmovilizada en cuanto a la remoción de N-glicanos.

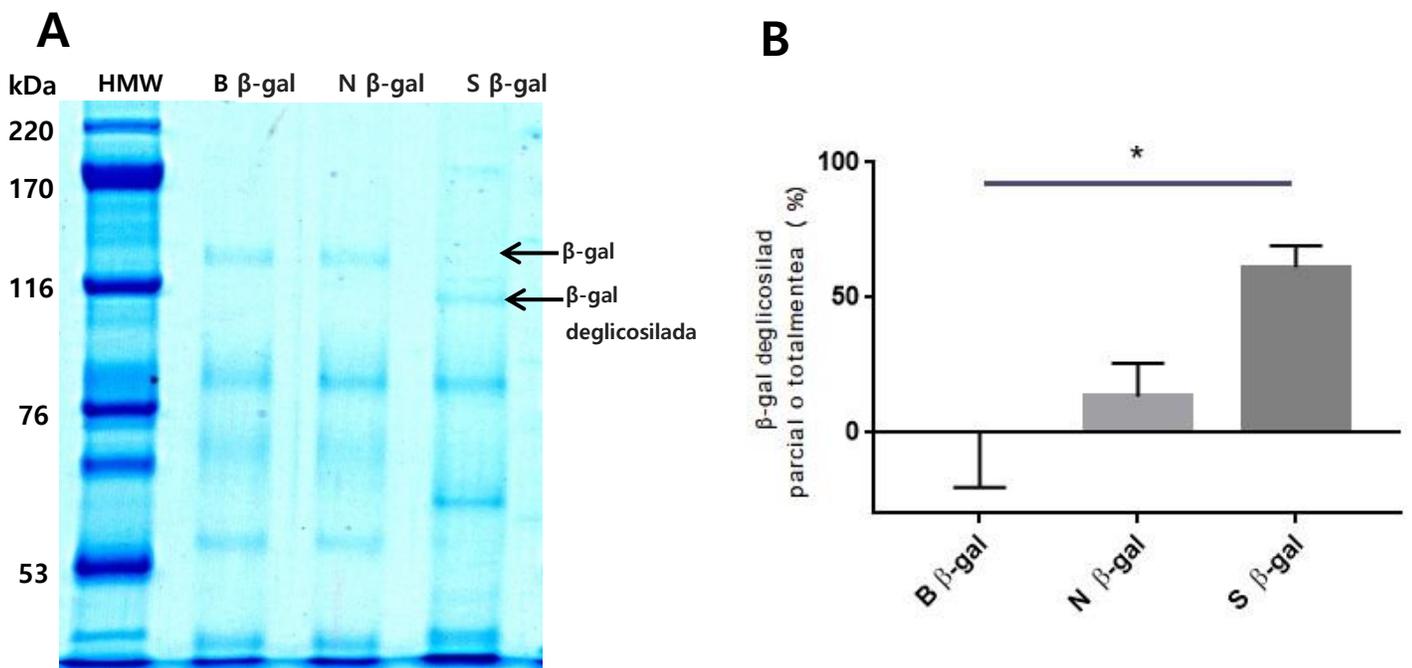


Figura 3.6: Deglicosilación de β -galactosidasa con PNGasaF-nanos y PNGasa F soluble. **A)** Ensayo de deglicosilación de β -galactosidasa evaluado por SDS-PAGE con gel de 7% de entrecruzamiento. **HMW:** Marcador de alto peso molecular, **B β -gal:** Blanco del ensayo que consiste en incubar β -galactosidasa con nanopartículas magnéticas sin activar por 24 horas a 37°C; **N β -gal:** β -galactosidasa incubada con PNGasaF-nanos por 24 horas a 37 °C; **S β -gal:** β -galactosidasa incubada con PNGasa F soluble por 24 horas a 37 °C. **B)** Porcentaje de β -galactosidasa deglicosilada parcial o totalmente. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (* $p < 0,05$).

Sin embargo, cuando la muestra de β -galactosidasa deglicosilada con PNGasaF-nanos se somete al ensayo por reconocimiento de lectinas, ConA solamente es capaz de reconocer el (49±13) % de la glicoproteína tratada (Figura 3.7).

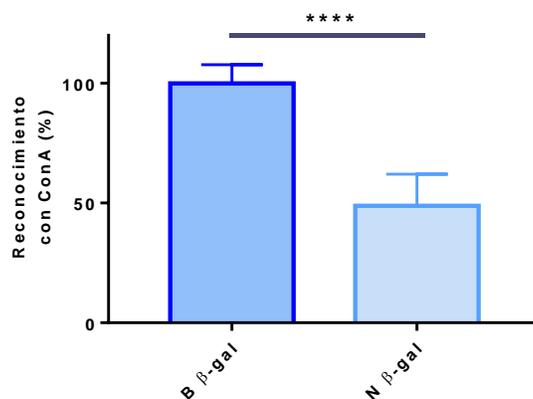


Figura 3.7: Ensayo de reconocimiento de β -galactosidasa por ConA (%). Se realizó un ensayo tipo ELLA donde se sensibilizaron pocillos con β -galactosidasa y β -galactosidasa deglicosilada enzimáticamente y se incubó con ConA biotinilada. Posteriormente se incubó con Streptavidina conjugada a peroxidasa de rábano picante y se reveló con o-fenilendiamina y peróxido de hidrógeno midiendo absorbancia a 492 nm. Para el cálculo del porcentaje de reconocimiento, se estableció como 100% el valor de absorbancia del blanco a 492 nm. **B β -gal:** β -galactosidasa incubada con nanopartículas magnéticas sin activar por 24 horas a 37° C; **N β -gal:** β -galactosidasa incubada con PNGasaF-nanos por 24 hs. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (**** $p < 0,0001$).

Debido a que la glicoproteína modelo adquirida no está en estado puro sino junto con otras proteínas, podía suceder que la pérdida de reconocimiento observado en el ensayo de reconocimiento por lectinas hubiese sido causa de la deglicosilación de otra glicoproteína contaminante. Por este motivo, se realizó una segunda corrida electroforética de las muestras pero con un gel de mayor entrecruzamiento (12%) con el fin de poder observar si existía alguna otra glicoproteína de menor peso molecular que cambiara su movilidad debido a la acción de la PNGasa (Figura 3.8).

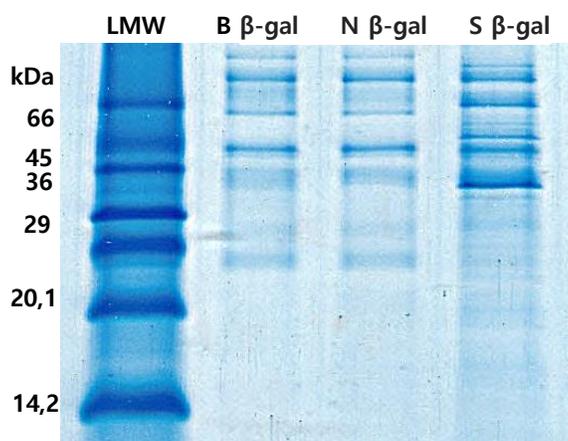


Figura 3.8: Ensayo de deglicosilación de β -galactosidasa. La evaluación se realizó a través de SDS-PAGE en geles de 12% de entrecruzamiento. **LMW)** Marcador de alto peso molecular; **B β -gal)** β -galactosidasa incubada con nanopartículas magnéticas por 24 horas a 37 °C; **N β -gal)** β -galactosidasa incubada con PNGasaF-nanos por 24 horas a 37 °C; **S β -gal)** β -galactosidasa incubada con PNGasa F soluble por 24 horas a 37 °C.

Si bien no se observaron cambios en el patrón de bandas en la SDS-PAGE para el extracto tratado con PNGasaF-nanos (Figura 3.6A y Figura 3.8), existe una pérdida significativa de reconocimiento por ConA. Este resultado podría estar indicando que la β -galactosidasa (o alguna otra glicoproteína del extracto) sufrió deglicosilación, pero la diferencia de peso molecular no pudo ser apreciada por electroforesis. Una posible explicación de que se observe una pérdida de peso molecular en la β -galactosidasa tratada con PNGasa F soluble (Figura 3.6 A), podría ser que en este ensayo se efectuó la deglicosilación total de la glicoproteína en solución. En cambio con la enzima inmovilizada, si la deglicosilación solo fue capaz de realizarse en un único sitio de glicosilación, quizá la diferencia en el peso molecular no pueda ser apreciable en la electroforesis.

La ovoalbúmina (OVA) es una glicoproteína con un peso molecular de aproximadamente 45 kDa y en su forma nativa solo contiene un único sitio de N-glicosilación en Asn 292 que puede ser de alto contenido de manosa o del tipo híbrido [24]. Por otra parte, si la Ovoalbúmina es expresada de forma recombinante en *Pichia Pastoris* se puede encontrar di-N-glicosilada en Asn 292-Asn 311 y cuenta con un peso molecular de 47 kDa aproximadamente [25–27]. En la Figura 3.9, se muestran los resultados del análisis por SDS-PAGE correspondientes a la deglicosilación de la OVA con PNGasaF-nanos.

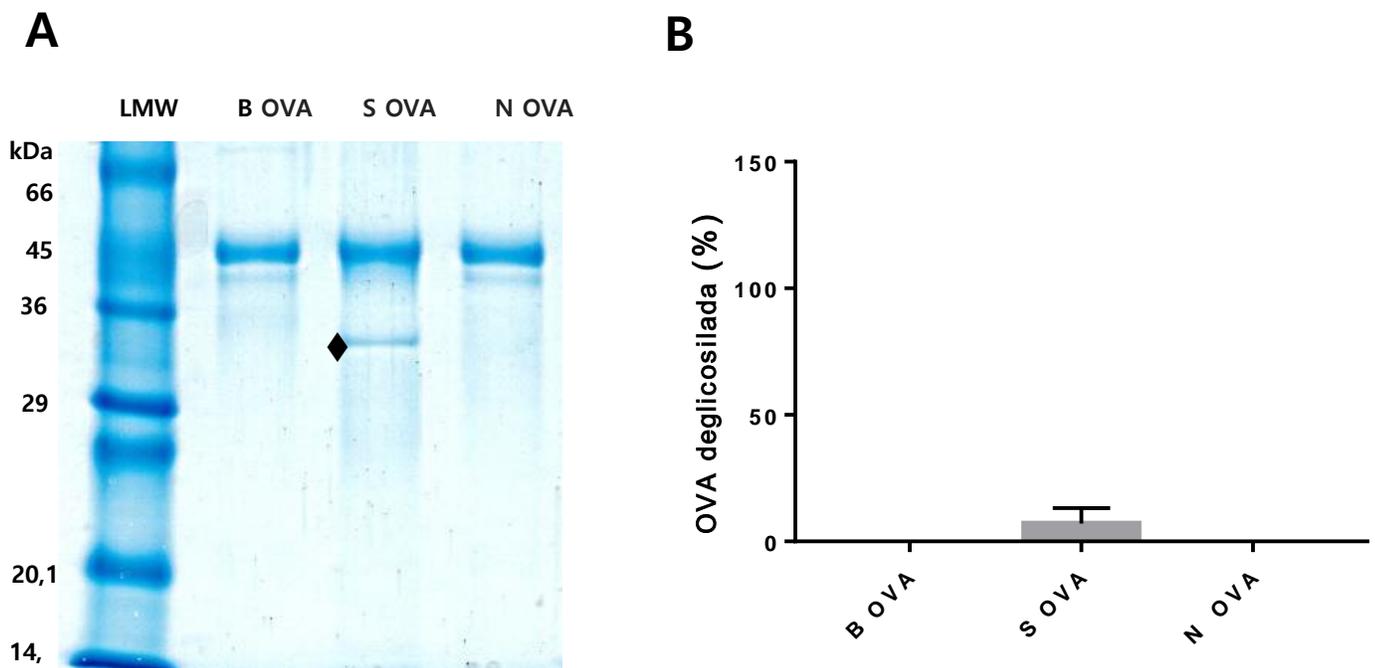


Figura 3.9: Deglicosilación de Ovoalbúmina con PNGasa F-nanos y PNGasa F soluble. **A)** Ensayo de deglicosilación de Ovoalbúmina evaluado por SDS-PAGE en gel de 12% de entrecruzamiento. **LMW** : Marcador de bajo peso molecular, **B OVA**: Ovoalbúmina incubada con nanopartículas magnéticas sin activar por 24 horas a 37 °C, **S OVA**: Ovoalbúmina incubada con PNGasa F soluble por 24 horas a 37 °C; **N OVA**: Ovoalbúmina incubada con PNGasaF-nanos por 24 horas a 37 °C. En el ensayo con la PNGasa soluble se observa la banda correspondiente a la PNGasa con un PM aproximado de 36 kDa (♦). **B)** Porcentaje de OVA deglicosilada.

La figura 3.9A no se observa un cambio en el patrón de migración de la OVA tratada con glicosidasa. Este resultado es corroborado por el resultado de la Figura 3.9B, donde no se detectan cambios significativos en el porcentaje de deglicosilación de Ovoalbúmina tanto con PNGasa F soluble como inmovilizada. A pesar de este resultado, existen reportes que indican que la movilidad de OVA deglicosilada es levemente mayor que OVA sin deglicosilar, por lo que cabía la posibilidad de que la escisión del N-glicano no fuese detectable por electroforesis [25,61].

Se procedió a analizar la muestra de OVA sin tratar y tratada con PNGasaF-nanos mediante ensayo de reconocimiento con ConA y el resultado se muestra en la Figura 3.10.

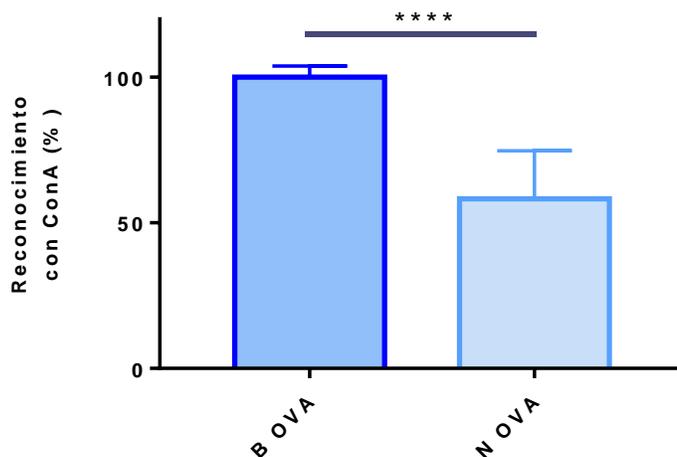


Figura 3.10: Ensayo de reconocimiento de Ovoalbúmina por ConA (%). Se realizó un ensayo tipo ELLA donde se sensibilizaron pocillos con OVA y OVA deglicosilada enzimáticamente y se incubó con ConA biotinilada. Posteriormente se incubó con Streptavidina conjugada a peroxidasa de rábano picante y se reveló con o-fenilendiamina y peróxido de hidrógeno midiendo absorbancia a 492 nm. Para el cálculo del porcentaje de reconocimiento, se estableció como 100% el valor de absorbancia del blanco a 492 nm. **B OVA:** OVA incubada con nanopartículas magnéticas sin activar por 24 horas a 37° C; **N OVA:** OVA incubada con PNGasaF-nanos por 24 horas a 37 °C. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (**** p <0,0001).

La detección de OVA por ConA luego del tratamiento de deglicosilación fue significativamente menor, resultando en porcentaje remanente de reconocimiento de $58 \pm 17\%$. Este resultado indicaría que PNGasaF-nanos logró deglicosilar la glicoproteína, a pesar de no haber sido visualizado en el gel de electroforesis.

De acuerdo a lo reportado por Suzuki y colaboradores, la Ovoalbúmina de gallina se encuentra di-N-glicosilada en Asn 292 y Asn 311, pero una vez en el oviducto una PNGasa la deglicosila en la posición Asn 311 [25]. Esta observación sugiere por lo tanto, que el N-glicano en posición Asn 292 es estable frente a la deglicosilación por PNGasa de gallina en condiciones nativas. Sin embargo, en su trabajo también enfatiza que a pesar de haber observado que el N-glicano en posición Asn 292 era resistente a la

deglicosilación por PNGasa del oviducto, por el contrario este glicano era lábil frente a la PNGasa F de bacteria. Esta observación coincidiría con los resultados obtenidos en esta tesina.

La lactoferrina bovina (LF) es una glicoproteína cuyo peso molecular es aproximadamente de 80 kDa. En su estructura puede contener 4 sitios (LF-b) o 5 sitios (LF-a) con N-glicanos de alto contenido de manosas, híbridos y complejos (Figura 1.10), aunque la presencia de LF-b en la leche bovina es predominante frente la forma LF-a. La lactoferrina-b tiene un peso molecular cercano a los 80 kDa y LF-a tiene un peso molecular de aproximadamente 84 kDa [30–32].

En la figura 3.11, se puede apreciar la evaluación por SDS-PAGE de las muestra de lactoferrina deglicosilada con PNGasaF-nanos y PNGasa F soluble. Como se puede ver, los dos primeros carriles corresponden a la lactoferrina incubada con nanopartículas sin activar y con PNGasaF-nanos. En estos carriles no se observan la bandas, mientras que en el carril correspondiente a la lactoferrina tratada con la enzima soluble se observan dos bandas de aproximadamente 77 kDa y 74 kDa que probablemente correspondan a formas deglicosiladas de lactoferrina ya que el peso molecular de la lactoferrina nativa es cercana a los 80 kDa. Estos resultados harían pensar en interacción inespecífica entre la lactoferrina y las nanopartículas.

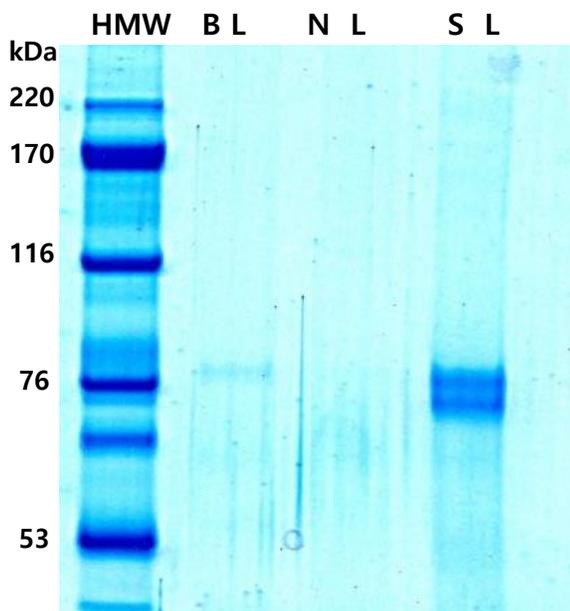


Figura 3.11: Ensayo de deglicosilación de lactoferrina con PNGasaF-nanos y PNGasa F soluble. Ensayo de deglicosilación de lactoferrina evaluado por SDS-PAGE en gel de 7% de entrecruzamiento. **HMW:** Marcador de alto peso molecular; **B L:** Lactoferrina incubada con nanopartículas magnéticas sin activar por 24 horas a 37 °C; **N L:** Lactoferrina incubada con PNGasaF-nanos por 24 horas a 37 °C, **S L:** Lactoferrina incubada con PNGasa F soluble por 24 horas a 37 °C.

La lactoferrina es una transferrina que une dos átomos de hierro con alta afinidad y se encuentra en diversos fluidos de forma semisaturada [29]. Esto haría pensar que el hierro unido a la proteína pudiera estar de alguna forma interaccionando con las nanopartículas de forma que la lactoferrina quedara unida a las mismas (tanto a las nanopartículas sin activar como a las PNGasaF-nanos), motivo por el cual no se detectaría lactoferrina en el sobrenadante.

Para verificar esta hipótesis se preparó una solución de lactoferrina y se le cuantificó concentración de proteína. Se incubó dicha solución con nanopartículas sin activar, se separó el sobrenadante con la ayuda de una gradilla imantada o mediante centrifugación y se cuantificó la concentración de proteínas en el sobrenadante. Por otro lado, como forma de ver si la lactoferrina quedaba unida al imán se colocó un tubo Eppendorff con solución de lactoferrina en la gradilla imantada, se retiró la solución de lactoferrina y se le midió concentración de proteínas. En la Tabla 3.4 se puede ver que cuando la lactoferrina se pone en contacto con las nanopartículas independientemente de si el sobrenadante se separa mediante el uso de un imán o por centrifugación, la lactoferrina queda unida a las nanopartículas ya que la concentración de proteína en el sobrenadante es menor.

Tabla 3.4: Cuantificación de lactoferrina mediante la técnica de Ácido Bicinónico (BCA)

Muestra	Concentración proteica (mg/ml)
LF	0.87±0.16
LF + gradilla imantada	0.79±0.06
LF + nanos	0.09±0.03
LF + nanos + imán	0.13±0.01

LF: Lactoferrina; **LF + gradilla imantada:** Lactoferrina expuesta a la acción de un imán; **LF+ nanos:** Lactoferrina incubada en tubo Eppendorf con nanopartículas magnéticas y luego separada de las mismas mediante centrifugación; **LF+ nanos+ imán:** Lactoferrina incubada en tubo Eppendorf con nanopartículas magnéticas y luego separadas de las mismas mediante gradilla imantada.

Por lo expuesto anteriormente no es viable el uso de PNGasaF-nanos para la deglicosilación de lactoferrina. Como se vio en la Figura 3.11 la deglicosilación con la PNGasa soluble es viable por lo cual se debería seleccionar otro tipo de soporte para la inmovilizar la PNGasa de forma de poder utilizarla para la deglicosilación de lactoferrina.

4. Conclusiones

Los glicanos tienen un rol preponderante en la biología de los organismos. Están involucrados en una inmensa cantidad de funciones estructurales, modulatorias y de señalización. Además, los carbohidratos también pueden estar involucrados en procesos patológicos como en el desarrollo de cáncer o de infecciones. Por este motivo, es de gran importancia elucidar las estructuras y funciones que tienen los glicanos en la naturaleza. Debido a la diversidad y complejidad estructural que presentan los carbohidratos el estudio de los mismos es complejo. El uso de glicosidasas inmovilizadas puede ser una excelente herramienta que posibilite desentrañar las funciones biológicas de los glicanos ya que permite la remoción de los mismos sin alterar el esqueleto proteico ni contaminar el producto final. Por lo cual las glicoproteínas deglicosiladas pueden ser utilizadas en ensayos biológicos que permitan determinar si la remoción de los glicanos altera alguna respuesta.

En esta tesina de grado se inmovilizó exitosamente PNGasa F sobre agarosa y nanopartículas magnéticas de sílica activadas con grupos cianato-éster. Se obtuvieron rendimientos de inmovilización del 100% y del 86 % para la inmovilización sobre agarosa y nanopartículas respectivamente. Sin embargo, los porcentajes de actividad enzimática expresada fueron del 11% y 14% para agarosa y nanopartículas magnéticas respectivamente. El bajo porcentaje de actividad se puede deber a distorsiones sufridas por las enzimas una vez unidas al soporte, por el bloqueo parcial de sitios activos o por problemas difusionales en el caso de la agarosa.

Por otra parte, se estudió la funcionalidad de PNGasaF-nanos y PNGasaF-agarosa como herramienta para deglicosilar glicoproteínas en condiciones nativas, utilizando RNasa B como sustrato. Con la PNGasaF-nanos se obtuvieron porcentajes de deglicosilación del 19% al cabo de 24 horas a 37°C. Estos resultados son cercanos a los obtenidos con la PNGasa soluble (25% de deglicosilación). Por el contrario, con el derivado PNGasaF-agarosa solamente alcanzaron porcentajes de deglicosilación del 7% en 24 horas. Esta diferencia en los porcentajes se puede deber a la naturaleza porosa de la agarosa, que dificulta la difusión del sustrato al sitio activo de enzima si la misma se inmoviliza dentro del soporte. En contraposición, las nanopartículas magnéticas solamente son capaces de inmovilizar enzima en su superficie, lo cual permite una mayor movilidad de la enzima en la solución reactiva y no tiene asociados problemas difusionales.

Se extendió el uso del derivado PNGasaF-nanos a otras glicoproteína como fetuina de suero bovino, β -galactosidasa de *A. oryzae*, ovoalbúmina y lactoferrina bovina. Se obtuvieron resultados exitosos con la fetuina, la β -galactosidasa y la ovoalbúmina. En el caso de la fetuina, la deglicosilación se evidenció por un cambio en el patrón de bandas en la SDS-PAGE observándose bandas de menor peso molecular. A su vez se verificó una pérdida de reconocimiento del 59% por la lectina SNA como consecuencia de la deglicosilación. Por otra parte, la deglicosilación de β -galactosidasa no se pudo corroborar mediante SDS-PAGE, pero si se observó una pérdida de reconocimiento del extracto por la lectina ConA de un 51% luego de la deglicosilación. Este resultado indicaría que en el caso de β -galactosidasa hubo deglicosilación pero si la misma fue parcial (solo se deglicosilaron algunos sitios) la diferencia en el peso molecular podría no observarse en la SDS-PAGE. Igualmente, no se puede afirmar que la pérdida de reconocimiento se debe exclusivamente a la deglicosilación de β -galactosidasa, ya que la muestra cuenta con la presencia de otras proteínas desconocidas que también pueden contar en su estructura con N-glicanos. En el caso de la ovoalbúmina, existían reportes previos que indicaban que el cambio de peso molecular luego de la deglicosilación no era notorio, por lo cual la deglicosilación se pudo evidenciar únicamente mediante ELLA y no así, mediante SDS-PAGE. Se detectó una pérdida de reconocimiento por ConA del 42% hacia OVA luego de haber sido tratada con PNGasaF-nanos. En el caso de la lactoferrina se comprobó que la misma se unía en forma inespecífica a las nanopartículas no siendo posible utilizar las PNGasaF-nanos para su deglicosilación, si bien la misma es posible con la enzima soluble. Estos resultados ponen de manifiesto que ninguna herramienta es universal y tiene sus limitaciones.

Finalmente, se estudió la capacidad de reusos de los derivados. Para PNGasaF-agarosa, la actividad remanente fue del 100% luego de 5 usos y para la PNGasaF-nanos del 40% luego de 7 usos. Nuevamente, la diferencia en estos resultados podría deberse a la estructura de los soportes. La agarosa al ser un soporte poroso, puede inmovilizar proteína en su interior, lo cual la protegería de agentes desnaturizantes como por ejemplo la temperatura. Sin embargo, al no ser eficaz deglicosilando sustratos macromoleculares, su uso para este tipo de ensayos es inviable.

Estos resultados demuestran la viabilidad del uso de las PNGasa F inmovilizada a nanopartículas magnéticas de sílica como herramienta biotecnológica en la deglicosilación de glicoproteínas nativas. Por lo cual se va a extender su aplicación a sistemas biológicos como deglicosilación de lisados del helminto *Fasciola hepatica* con el objetivo de evaluar el rol de los glicanos en la evasión de la respuesta inmune del

hospedero. Otro sistema biológico al que se va a aplicar es a la deglicosilación de la glicoproteína gp51 del virus de Leucosis Bovina a los efectos de determinar el rol de los glicanos en su antigenicidad humoral.

Aunque todavía queda mucho camino por avanzar en esta área, los resultados obtenidos son bastante esperanzadores en cuanto a la aplicación de glicosidasas inmovilizadas en la elucidación de la función biológica de los glicanos.

5. Bibliografía

- [1] A. Varki, Biological roles of glycans, *Glycobiology*. 27 (2017) 3–49. doi:10.1093/glycob/cww086.
- [2] H. Ghazarian, B. Itoni, S.B. Oppenheimer, A glycobiology review: Carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics, *Acta Histochemica*. 113 (2011) 236–247. doi:10.1016/j.acthis.2010.02.004.
- [3] A. Varki, Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct, *Glycobiology*. 3 (1993) 97–130. doi:10.1093/glycob/3.2.97.
- [4] H.J. Orlandi PA, Klotz FW, A malaria invasion receptor, the 175-kilodalton erythrocyte binding antigen of *Plasmodium falciparum* recognizes the terminal Neu5Ac(alpha 2-3)Gal-sequences of glycophorin., *A. J Cell Biol.* (1992) 901–909.
- [5] S. Vaishnava, M. Yamamoto, K. Severson, K. Ruhn, X. Yu, O. Koren, R. Ley, E. Wakeland, L. Hooper, The antibacterial lectin RegIIIgamma promotes the spatial segregation of microbiota and host in the intestine., *Science*. (2011) 255–258.
- [6] M. Matsushita, T. Fujita, Ficolins and the lectin complement pathway, *Immunological Reviews*. (2001) 78–85.
- [7] R. NoMahla, M. Reddy, D. Prasad, H. Kumar, Sweeten PAMPs: Role of sugar complexed PAMPs in innate immunity and vaccine biology. *Front Immunol.*, (2013) 248.
- [8] I. van Die, R.D. Cummings, Glycan gimmickry by parasitic helminths: A strategy for modulating the host immune response?, *Glycobiology*. 20 (2010) 2–12. doi:10.1093/glycob/cwp140.
- [9] D. Skropeta, The effect of individual N-glycans on enzyme activity, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 17 (2009) 2645–2653. doi:10.1016/j.bmc.2009.02.037.
- [10] R.G. Spiro, Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds, *Glycobiology*. 12 (2002) 43R–56R. doi:10.1093/glycob/12.4.43R.
- [11] P.E. Stein, A.G.W. Leslie, J.T. Finch, R.W. Carrell, Crystal structure of uncleaved ovalbumin at 1.95 Å resolution, *Journal of Molecular Biology*. 221 (1991) 941–959. doi:10.1016/0022-2836(91)80185-W.
- [12] P. Stanley, N. Taniguchi, M. Aebi, N-Glycans, in: A. Varki, R. Cummings, J. Esko (Eds.), *Essentials of Glycobiology*, 3rd editio, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY), (2017), Chapter 9.
- [13] V. Wittmann, Glycoproteins: occurrence and significance, in: B.O. Fraser-Reid, K. Atsuta, J. Thiem (Eds.), *Glycoscience: Chemistry and Chemical Biology*, Springer, Berlin, (2008), 1738–1770.
- [14] H.C. Joao, I.G. Scragg, R.A. Dwek, Effects of glycosylation on protein conformation and amide proton exchange rates in RNase B, *FEBS Letters*. 307 (1992) 343–346. doi:10.1016/0014-5793(92)80709-P.
- [15] T.H. Plummer, J.H. ElderII, S. AlexanderII, W. Phelant, A.L. Tarentino, Demonstration of Peptide: N-Glycosidase F Activity in Endo-P-N- acetyigiucosaminidase F Preparations *, 259 (1984) 10700–10704.

- [16] C.. Worthington, Worthington Biochemical Corp., in: Worthington Enzyme Manual, (1988), 299–308.
- [17] 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. doi:10.1093/glycob/cwh052.
- [18] Y. Nakao, Y. Kozutsumi, I. Funakoshi, T. Kawasaki, I. Yamashina, J. Mutsaers, H. Van Halbeek, J. Vliegthart, Structures of oligosaccharides on beta-galactosidase from *Aspergillus oryzae*, *Journal of Biochemistry*. 102 (1987) 171–180.
- [19] M.M. Maksimainen, A. Lampio, M. Mertanen, O. Turunen, J. Rouvinen, The crystal structure of acidic β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*, *International Journal of Biological Macromolecules*. 60 (2013) 109–115. doi:10.1016/j.ijbiomac.2013.05.003.
- [20] E.D. Green, G. Adelt, J.U. Baenziger, S. Wilson, H. Van Halbeek, The asparagine-linked oligosaccharides on bovine fetuin. Structural analysis of N-glycanase-released oligosaccharides by 500-megahertz ^1H NMR spectroscopy, *Journal of Biological Chemistry*. 263 (1988) 18253–18268.
- [21] A. Guttman, Multistructure sequencing of N-linked fetuin glycans by capillary gel electrophoresis and enzyme matrix digestion, *Electrophoresis*. 18 (1997) 1136–1141. doi:10.1002/elps.1150180719.
- [22] A. Guttman, F.T.A. Chen, R.A. Evangelista, Separation of 1-aminopyrene-3,6,8-trisulfonate-labeled asparagine-linked fetuin glycans by capillary gel electrophoresis, *Electrophoresis*. 17 (1996) 412–417. doi:10.1002/elps.1150170221.
- [23] B. Nilsson, N.. Nordén, S. Svensson, Structural studies on the carbohydrate portion of fetuin, *Journal of Biological Chemistry*. (1979) 4545–4553.
- [24] Y. Aarii, N. Takahashi, E. Tatsumi, M. Hirose, Structural Properties of Recombinant Ovalbumin and Its Transformation into a Thermostabilized Form by Alkaline Treatment, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 63 (1999) 1392–1399. doi:10.1271/bbb.63.1392.
- [25] T. Suzuki, K. Kitajima, Y. Emori, Y. Inoue, S. Inoue, Site-specific de-N-glycosylation of diglycosylated ovalbumin in hen oviduct by endogenous peptide: N-glycanase as a quality control system for newly synthesized proteins., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94 (1997) 6244–6249. doi:10.1073/pnas.94.12.6244.
- [26] K. Ito, N. Matsudomi, Structural characteristics of hen egg ovalbumin expressed in yeast *Pichia pastoris*., *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 69 (2005) 755–761. doi:10.1271/bbb.69.755.
- [27] B.T. Sheares, P.W. Robbins, Glycosylation of ovalbumin in a heterologous cell: analysis of oligosaccharide chains of the cloned glycoprotein in mouse L cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 83 (1986) 1993–1997. doi:10.1073/pnas.83.7.1993.
- [28] T. Tadashi, Y. Katsuko, K. Akira, The substrate specificities of endo- β -N-acetylglucosaminidases CII and H, *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 78 (1977) 434–441.
- [29] F. Superti, R. Siciliano, B. Rega, F. Giansanti, P. Valenti, G. Antonini, Involvement of bovine lactoferrin metal saturation, sialic acid and protein fragments in the inhibition of rotavirus infection, *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*. 1528 (2001) 107–115. doi:10.1016/S0304-4165(01)00178-7.

- [30] B. Coddevilie, G. Strecker, J. Wieruszkeski, Heterogeneity of bovine lactotransferrin glycans ., *Carbohydrate Research*. 236 (1992) 145–164.
- [31] C.C. Nwosu, D.L. Aldredge, H. Lee, L.A. Lerno, A.M. Zivkovic, J.B. German, C.B. Lebrilla, Comparison of the human and bovine milk N-glycome via high-performance microfluidic chip liquid chromatography and tandem mass spectrometry, *J Proteome Res*. 11 (2012) 2912–2924. doi:10.1021/pr300008u.
- [32] N. O’Riordan, M. Kane, L. Joshi, R.M. Hickey, Structural and functional characteristics of bovine milk protein glycosylation, *Glycobiology*. 24 (2014) 220–236. doi:10.1093/glycob/cwt162.
- [33] Y. Mechref, Analysis of glycans derived from glycoconjugates by capillary electrophoresis-mass spectrometry, *Electrophoresis*. 32 (2011) 3467–3481. doi:10.1002/elps.201100342.
- [34] S.A. Carr, M.J. Huddleston, M.F. Bean, Selective identification and differentiation of N- and O-linked oligosaccharides in glycoproteins by liquid chromatography-mass spectrometry., *Protein Science*. 2 (1993) 183–196. doi:10.1002/pro.5560020207.
- [35] Y. Mechref, M. V. Novotny, High-sensitivity analytical approaches to the analysis of N-glycans, First Edit, Elsevier Inc., (2010). doi:10.1016/B978-0-12-373600-0.00001-9.
- [36] R.A. O’Neill, Enzymatic release of oligosaccharides from glycoproteins for chromatographic and electrophoretic analysis, *Journal of Chromatography A*. 720 (1996) 201–215. doi:10.1016/0021-9673(95)00502-1.
- [37] A.L. Tarentino, T.H. Plummer, Enzymatic deglycosylation of asparagine-linked glycans: Purification, properties, and specificity of oligosaccharide-cleaving enzymes from *Flavobacterium meningosepticum*, *Methods in Enzymology*. 230 (1994) 44–57. doi:10.1016/0076-6879(94)30006-2.
- [38] A.L. Tarentino, T.H. Plummer Jr, Deglycosylation of Asparagine-linked Glycans by PNGase F., *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*. 5 (1993) 163–170. doi:10.4052/tigg.5.163.
- [39] J. Krenkova, N.. Lacher, F. Svec, Oriented immobilization of peptide-N-glycosidase F on a monolithic support for glycosylation analysis, *Journal of Chromatography A*. (2013) 54–61.
- [40] J. Krenkova, N.. Lacher, F. Svec, , et al., Multidimensional system enabling deglycosylation of proteins using a capillary reactor with peptide-N-glycosidase F immobilized on a porous polymer monolith and hydrophilic interaction liquid chromatography-mass spectrometry of glycans., *Journal of Chromatography A*. (2009) 3252–3259.
- [41] S. González León, D. Caso de Armas, A. González Chávez, Lectina: una biomolécula que promete en las ciencias biomédicas, *Rev. Ciencias Medicas*. 15 (2011) 3–12.
- [42] P. Hernández, E. Pérez, L. Martínez, G. Martínez, Las Lectinas Vegetales Como Modelo De Estudio De Las Interacciones, *Revista de Educación Química*. 24 (2005) 21–27.
- [43] H. Rüdiger, H.J. Gabius, Plant lectins: Occurrence, biochemistry, functions and applications, *Glycoconjugate Journal*. 18 (2002) 589–613. doi:10.1023/A:1020687518999.
- [44] T. Iskratsch, A. Braun, K. Paschinger, I.B.H. Wilson, Specificity analysis of lectins and antibodies using remodeled glycoproteins, *Analytical Biochemistry*. 386 (2009) 133–146. doi:10.1016/j.ab.2008.12.005.
- [45] B.S. Gnanesh Kumar, A. Surolia, Site specific N-glycan profiling of NeuAc(α 2-6)-Gal/GalNAc-binding

bark *Sambucus nigra* agglutinin using LC–MSn revealed differential glycosylation, *Glycoconjugate Journal*. 33 (2016) 907–915. doi:10.1007/s10719-016-9698-7.

- [46] E. V. Chandrasekaran, J. Xue, J. Xia, S.D. Khaja, C.F. Piskorz, R.D. Locke, S. Neelamegham, K.L. Matta, Novel interactions of complex carbohydrates with peanut (PNA), *Ricinus communis* (RCA-I), *Sambucus nigra* (SNA-I) and wheat germ (WGA) agglutinins as revealed by the binding specificities of these lectins towards mucin core-2 O-linked and N-linked glycans a, *Glycoconjugate Journal*. 33 (2016) 819–836. doi:10.1007/s10719-016-9678-y.
- [47] N.R. Mohamad, N.H.C. Marzuki, N.A. Buang, F. Huyop, R.A. Wahab, An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes, *Biotechnology and Biotechnological Equipment*. 29 (2015) 205–220. doi:10.1080/13102818.2015.1008192.
- [48] B.M. Brena, F. Batista Viera, Immobilization of Enzymes: A literature survey, *Methods and Biotechnology: Immobilization of Enzymes and Cells*. (n.d.) 15–30.
- [49] M. Bučko, D. Mislovičová, J. Nahálka, A. Vikartovská, J. Šefčovičová, J. Katrlík, J. Tkáč, P. Gemeiner, I. Lacík, V. Štefuca, M. Polakovič, M. Rosenberg, M. Rebroš, D. Šmogrovičová, J. Švitel, Immobilization in biotechnology and biorecognition: From macro- to nanoscale systems, *Chemical Papers*. 66 (2012) 983–998. doi:10.2478/s11696-012-0226-3.
- [50] C. Garcia-Galan, Á. Berenguer-Murcia, R. Fernandez-Lafuente, R.C. Rodrigues, Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance, *Advanced Synthesis and Catalysis*. 353 (2011) 2885–2904. doi:10.1002/adsc.201100534.
- [51] P. Gemeiner, F. Švec, O. Norrlöw, Natural and synthetic carriers suitable for immobilization of viable cells, active organelles, and molecules, *Immobilized Biosystems*. (1994).
- [52] C.G.C.M. Netto, H.E. Toma, L.H. Andrade, Superparamagnetic nanoparticles as versatile carriers and supporting materials for enzymes, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 85–86 (2013) 71–92. doi:10.1016/j.molcatb.2012.08.010.
- [53] E. Rodríguez, K. Francia, N. Brossard, J.J. García Vallejo, H. Kalay, Y. van Kooyk, T. Freire, C. Giacomini, Immobilization of β -galactosidase and α -mannosidase onto magnetic nanoparticles: A strategy for increasing the potentiality of valuable glycomic tools for glycosylation analysis and biological role determination of glycoconjugates, *Enzyme and Microbial Technology*. 117 (2018) 45–55. doi:10.1016/j.enzmictec.2018.05.012.
- [54] Z. Bílková, M. Slováková, D. Horák, J. Lenfeld, J. Churáek, Enzymes immobilized on magnetic carriers: Efficient and selective system for protein modification, *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 770 (2002) 177–181. doi:10.1016/S1570-0232(02)00037-5.
- [55] N.L. Stults, P. Lin, M. Hardy, Y.C. Lee, Y. Uchida, Y. Tsukada, T. Sugimori, Immobilization of proteins on partially hydrolyzed agarose beads, *Analytical Biochemistry*. 135 (1983) 392–400. doi:10.1016/0003-2697(83)90701-7.
- [56] C. Giacomini, A. Villarino, L. Franco-Fraguas, F. Batista-Viera, Immobilization of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* on silica and agarose: Comparison of different methods, *Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic*. 4 (1998) 313–327. doi:10.1016/S1381-1177(98)00071-X.

- [57] P.K. Smith, R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson, D.C. Klenk, Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Analytical Biochemistry*. 150 (1985) 76–85. doi:10.1016/0003-2697(85)90442-7.
- [58] A.C. Mann, C.H. Self, G.A. Turner, A general method for the complete deglycosylation of a wide variety of serum glycoproteins using peptide-N-glycosidase-F, *Glycosylation & Disease*. 1 (1994) 253–261. doi:10.1007/BF00919333.
- [59] M. Szigeti, J. Bondar, D. Gjerde, Z. Keresztessy, A. Szekrenyes, A. Guttman, Rapid N-glycan release from glycoproteins using immobilized PNGase F microcolumns, *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 1032 (2016) 139–143. doi:10.1016/j.jchromb.2016.02.006.
- [60] R.A. Sheldon, S. van Pelt, Enzyme immobilisation in biocatalysis: Why, what and how, *Chemical Society Reviews*. 42 (2013) 6223–6235. doi:10.1039/c3cs60075k.
- [61] P. Martínez, M. Lucía Pabón, D. Armando Gómez, S. Luz Albarracín, Purificación y determinación de carbohidratos en la vicilina de *Canavalia ensiformis*, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.* 40 (2011) 5–26.