

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Química Física I



**TESIS DOCTORAL**

**Rhamnulosa-1-fosfato aldolasa de *Thermotoga meritima*:  
caracterización y aplicabilidad de un nuevo biocatalizador  
termoestable para la formación de enlaces C-C**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Isabel Oroz Guinea**

Director

Eduardo García-Junceda Redondo

**Madrid, 2014**



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE  
DE MADRID**



**Facultad de Ciencias Químicas  
Departamento de Química Física I**

**RHAMNULOSA-1-FOSFATO ALDOLASA DE  
*THERMOTOGA MARITIMA*: CARACTERIZACIÓN Y  
APLICABILIDAD DE UN NUEVO BIOCATALIZADOR  
TERMOESTABLE PARA LA FORMACIÓN DE  
ENLACES C-C**

Memoria presentada por Dña. **Isabel Oroz Guinea** para optar al grado de  
Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

**Director de Tesis: Dr. Eduardo García-Junceda Redondo.**  
**Instituto de Química Orgánica General. CSIC**

**Madrid, 2014**  
**TESIS DOCTORAL**



<b>Lista de abreviaciones</b> .....	7
<b>Abstract</b> .....	13
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	21
<b>Aldolasas</b> .....	36
• Aldolasas dependientes de dihidroxiacetona fosfato.....	40
– El problema de la dependencia de dihidroxiacetona fosfato.....	43
<b>Enzimas de organismos hipertermófilos</b> .....	47
– Mecanismos para la estabilidad en las enzimas hipertermófilas.....	52
– Aplicación biotecnológica de las enzimas hipertermófilas.....	53
• Aldolasas dependientes de dihidroxiacetona fosfato de origen hipertermófilo.....	54
<b>OBJETIVOS</b> .....	59
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	63
<b>Materiales</b> .....	63
<b>Métodos</b> .....	65
• Obtención de la proteína rhamnulosa-1-fosfato aldolasa de <i>T. maritima</i> .....	65
– Amplificación del gen TM1072.....	65
– Clonaje del gen TM1072.....	67
– Sobreexpresión de la rhamnulosa-1-fosfato aldolasa de <i>T. maritima</i> .....	69
– Purificación de la rhamnulosa-1-fosfato aldolasa de <i>T. maritima</i> .....	69
– Quelación de los metales divalentes del centro catalítico.....	70
– Saturación del centro catalítico con Co <sup>2+</sup> .....	71
• Análisis de la proteína.....	71
– Análisis de aminoácidos.....	71
– Cuantificación de la rhamnulosa-1-fosfato aldolasa de <i>T. maritima</i> .....	71

## ÍNDICE

---

– Determinación de la huella peptídica. . . . .	72
• Obtención de los sustratos naturales. . . . .	72
– Síntesis de L-lactaldehído. . . . .	72
– Síntesis de dihidroxiacetona fosfato. . . . .	73
– Síntesis de L-rhamnulosa-1-fosfato y L-fuculosa-1-fosfato. . . . .	74
• Análisis de la actividad enzimática. . . . .	75
– Valoración de la actividad aldolasa. . . . .	75
– Valoración de la actividad quinasa. . . . .	76
– Valoración de la actividad triosa fosfato isomerasa. . . . .	76
• Caracterización bioquímica de la rhamnulosa-1-fosfato-aldolasa de <i>T. maritima</i> . . . . .	77
– Determinación de la temperatura óptima de la rhamnulosa-1-fosfato aldolasa de <i>T. maritima</i> . . . . .	77
Estudio de la actividad en función de la temperatura. . . . .	77
Estudio de la degradación de la DHAP en función de la temperatura. . . . .	77
Estudio de la concentración de aldol a lo largo del tiempo. . . . .	78
– Determinación del pH óptimo de la rhamnulosa-1-fosfato aldolasa de <i>T. maritima</i> . . . . .	78
– Estudio de la estabilidad de la rhamnulosa-1-fosfato aldolasa de <i>T. maritima</i> . . . . .	78
Determinación de la termoestabilidad. . . . .	78
Determinación de la estabilidad frente a cosolventes orgánicos. . . . .	79
– Determinación del mecanismo catalítico de la rhamnulosa-1-fosfato-aldolasa de <i>T. maritima</i> . . . . .	79
– Estudio de la estructura cuaternaria de la rhamnulosa-1-fosfato-aldolasa de <i>T. maritima</i> . . . . .	80
– Determinación de los parámetros cinéticos de la rhamnulosa-1-fosfato aldolasa de <i>T. maritima</i> . . . . .	81
– Dicroísmo Circular. . . . .	81

## ÍNDICE

---

• Estudio de la aplicabilidad sintética de la rhamnulosa-1-fosfato aldolasa de <i>T. maritima</i> . . . . .	82
– Optimización de las reacciones para la formación de enlaces C-C en el contexto de un sistema multienzimático. . . . .	82
– Síntesis utilizando nitroaldehídos como sustratos aceptores. . . . .	84
– Síntesis de iminociclitoles. . . . .	86
Reacciones con <i>N</i> -Cbz-aminoaldehídos. . . . .	86
Reacciones para la obtención de iminociclitoles. . . . .	86
– Reacciones con DHA como sustrato donador. . . . .	88
– Estudio del control estereoquímico de la rhamnulosa-1-fosfato de <i>T. maritima</i> . . . . .	89
• Métodos para el seguimiento de las reacciones enzimáticas. . . . .	89
– Ensayos de valoración enzimática de sustratos y productos. . . . .	89
Valoración DHAP/aldol. . . . .	89
Valoración DHA/DHAP. . . . .	90
– Ensayos de valoración de sustratos y productos por cromatografía. . . . .	91
Valoración por HPLC. . . . .	91
Seguimiento de las reacciones mediante TLC. . . . .	91
• Purificación de los productos. . . . .	92
– Precipitación mediante sales de Ba <sup>2+</sup> . . . . .	92
– Purificación mediante HPLC. . . . .	93
– Cromatografía en columna de intercambio iónico. . . . .	95
– Cromatografía en columna de sílice. . . . .	95
• Caracterización de los productos purificados. . . . .	95
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN. . . . .</b>	<b>99</b>
<b>Obtención de la rhamnulosa-1-fosfato aldolasa de <i>T. maritima</i>. . . . .</b>	<b>99</b>
• Amplificación y clonaje del gen TM1072. . . . .	99

## ÍNDICE

---

• Sobreexpresión y purificación. . . . .	101
– Estudio de la contaminación por triosa fosfato isomerasa. . . . .	105
• Identificación de la rhamnulosa-1-fosfato aldolasa recombinante de <i>T. maritima</i> . . . . .	107
– Análisis de aminoácidos. . . . .	107
– Determinación de la huella peptídica. . . . .	109
<b>Caracterización bioquímica de la rhamnulosa-1-fosfato aldolasa de <i>T. maritima</i>. . . . .</b>	<b>111</b>
• ¿Es la rhamnulosa-1-fosfato aldolasa de <i>T. maritima</i> una aldolasa de Tipo II? . . . . .	111
• Determinación de los parámetros cinéticos de la Rha-1PA de <i>T. maritima</i> . . . . .	117
• Estudio de la estructura de la Rha-1PA de <i>T. maritima</i> . . . . .	120
– Estructura primaria. . . . .	120
– Estructura secundaria. . . . .	122
– Estructura cuaternaria. . . . .	126
• Estudio del efecto de la temperatura en la actividad enzimática de la rhamnulosa-1-fosfato aldolasa de <i>T. maritima</i> . . . . .	129
• Efecto de la temperatura en las condiciones de reacción. . . . .	133
– Medida de la degradación de DHAP. . . . .	133
– Comprobación de la concentración de aldol. . . . .	134
• Determinación del pH óptimo de la rhamnulosa-1-fosfato aldolasa de <i>T. maritima</i> . . . . .	135
• Estudio de la estabilidad de la rhamnulosa-1-fosfato aldolasa de <i>T. maritima</i> . . . . .	136
– Estudio de la estabilidad térmica. . . . .	137
– Determinación de la temperatura de desnaturalización. . . . .	139
– Determinación de la estabilidad en presencia de cosolventes orgánicos en el medio de reacción. . . . .	141

• Estudio de la influencia de la cola de histidinas y del $\text{Co}^{2+}$ en la rhamnulosa-1-fosfato aldolasa de <i>T. maritima</i> . . . . .	144
– Efecto estructural. . . . .	144
Estudio del efecto de la introducción de colas de histidinas en el extremo N-terminal en función de la temperatura. . . . .	144
Estudio del efecto del cofactor en la estructura secundaria. . . . .	147
– Efecto en la temperatura de desnaturalización. . . . .	149
Estudio de la capacidad de renaturalización de la Rha-1PA de <i>T. maritima</i> . . . . .	151
<b>Estudio de la aplicabilidad sintética de la rhamnulosa-1-fosfato aldolasa de <i>T. maritima</i></b> . . . . .	153
• Optimización de las reacciones para la formación de enlaces C-C en el contexto de un sistema multienzimático. . . . .	153
• ¿Es la DHA sustrato de la Rha-1PA? . . . . .	161
• Estudio del control estereoquímico de la rhamnulosa-1-fosfato de <i>T. maritima</i> . . . . .	164
• Síntesis de análogos nitrogenados de azúcares. . . . .	166
– Síntesis de nitrociclitoles. . . . .	168
– Síntesis de iminociclitoles. . . . .	176
Reacciones con <i>N</i> -Cbz-aminoaldehídos. . . . .	177
Escalado de las reacciones para la obtención de iminociclitoles. . . . .	180
<b>CONCLUSIONES</b> . . . . .	189
<b>SUMMARY FOR THE EUROPEAN MENTION</b> . . . . .	195
<b>Introduction</b> . . . . .	195
<b>Objectives</b> . . . . .	198
<b>Results and Discussion</b> . . . . .	199
<b>Conclusions</b> . . . . .	214
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> . . . . .	219



## ABREVIACIONES

---

$\alpha$ -GDH	$\alpha$ -Glicerofosfato deshidrogenasa
AcN	Acetonitrilo
ACP	Proteína transportadora del grupo acilo
ADH	Aldehído deshidrogenasa
AK	Acetato quinasa
AnaPT	Preniltransferasa de <i>Neosartorya fischeri</i>
AT	Aciltransferasa
BAL	Benzaldehído liasa
BBE	Enzima del puente de berberina
C.s.p.	Cantidad suficiente para
CdpNPT	Preniltransferasa de <i>Aspergillus fumigatus</i>
CFE	Extracto crudo de proteína soluble
CouO	Metiltransferasa de <i>Streptomyces rishiriensis</i>
DC	Dicroísmo Circular
DERA	2-Desoxi-D-ribosa-5-fosfato aldolasa
DH	Deshidratasa
DHA	Dihidroxiacetona
DHAK	Dihidroxiacetona quinasa
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
DLF	Enzima bifuncional quinasa/aldolasa
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
ER	Enoilreductasa
F1P-K	D-Fructosa-1-fosfato quinasa
FBP	Fructosa-1,6-bifosfato
FBPA	Fructosa-1,6-bifosfato aldolasa
FBPA	Fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa
FSA	Fructosa 6-fosfato aldolasa
Fuc-1P	L-fuculosa-1-fosfato
Fuc-1PA	L-fuculosa-1-fosfato aldolasa
Fuc-1PA	L-Fuculosa-1-fosfato aldolasa
Fuc-IM	L-Fucosa isomerasa
Fuc-K	L-Fuculosa quinasa
G3P	Glicerol-3-fosfato
GA	Glicolaldehído

## ABREVIACIONES

---

GA3P	Gliceraldehído-3-fosfato
Gal1P-DH	D-Glicidol-1-fosfato deshidrogenasa
GDH	Glucosa deshidrogenasa
GK	Glicerol quinasa
GK	Glucoquinasa
Glu-IM	D-Glucosa-6-fosfato isomerasa
GPO	Glicerol fosfato oxidasa
HA	Hidroxiacetona
HB	Hidroxibutanona
HHDH	Halohidrina deshalogenasa
HNL	Hidroxinitrilo liasas
IBX	Ácido 2-iodoxibenzóico
IMAC	Cromatografía de afinidad por iones metálicos
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido
KR	Cetoreductasa
KRED	Cetoreductasa
KS	Cetosintasa
LB	Luria Bertani
LMW:	Marcadores de peso molecular
NeuAc	Ácido <i>N</i> -acetilneuramínico
NovO	Metiltransferasa de <i>Streptomyces spheroids</i>
O/N	Durante toda la noche
PEP	Fosfoenol piruvato
PFK	Fosfofructoquinasa
PhoN-Sf	Fosfatasa ácida de <i>Shigella flexneri</i>
PigD	Descarboxilasa de <i>Serratia marcescens</i>
PK	Piruvato quinasa
PLP	Piridoxal-5-fosfato
PPL	Lipasa pancreática porcina
PT	Preniltransferasa
R/T	Temperatura ambiente
RAMA	Fructosa-1,6-bifosfato aldolasa de músculo de conejo
RC	Random coil
Rha-1P	L-Rhamnulosa-1-fosfato
Rha-1PA	L-Rhamnulosa-1-fosfato aldolasa

## ABREVIACIONES

---

Rha-1PA Ec	L-Rhamnulosa-1-fosfato aldolasa de <i>E. coli</i>
Rha-1PA Tm	L-Rhamnulosa-1-fosfato aldolasa de <i>T. maritima</i> con colas de histidina
Rha-1PA Tm SHT	L-Rhamnulosa-1-fosfato aldolasa de <i>T. maritima</i> sin colas de histidina
Rha-1PA Tm01	L-Rhamnulosa-1-fosfato aldolasa de <i>T. maritima</i> con colas de histidina sin tratar con EDTA
Rha-1PA Tm01 SHT	L-Rhamnulosa-1-fosfato aldolasa de <i>T. maritima</i> sin colas de histidina sin tratar con EDTA
Rha-1PA Tm02	L-Rhamnulosa-1-fosfato aldolasa de <i>T. maritima</i> con colas de histidina tratada con EDTA
Rha-1PA Tm02 SHT	L-Rhamnulosa-1-fosfato aldolasa de <i>T. maritima</i> sin colas de histidina tratada con EDTA
Rha-IM	L-Rhamnosa isomerasa
Rha-K	L-Rhamnulosa quinasa
SASA	Área de superficie accesible al disolvente
SHMT	Hidroximetil transferasa
T1P-K	D-Tagatosa-1-fosfato quinasa
TalB	Transaldolasa B
TBPA	Tagatosa-1,6-bisfosfato aldolasa
TE	Dominio C-terminal
TFL	Tirosina fenol liasa
ThDP	Tiamina difosfato
THF	Tetrahidrofurano
TIM	Triosa fosfato isomerasa
TK	Transketolasas
Tk-MGMT	O <sup>6</sup> -Metilguanina-ADN metiltransferasa de <i>Thermococcus kodakaraensis</i>
TLC	Cromatografía en capa fina
T <sub>M</sub>	Temperatura de desnaturalización
TS	Terpenoide sintasas
X-Gal	5-Bromo-4-cloro-3-indolil β-D-galactopiranosido
YerE	Descarboxilasa de <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>



# **ABSTRACT**



**RHAMNULOSE-1-PHOSPHATE ALDOLASE FROM *THERMOTOGA MARITIMA*: CHARACTERIZATION AND APPLICABILITY OF A NEW THERMOSTABLE BIOCATALYST FOR C-C BOND FORMATION**

## **Introduction**

Carbon-Carbon bond formation reactions can be considered the essence of organic synthesis (Corey and Cheng, 1989). The aldol addition reaction has long been recognized as one of the most useful tools that has the synthetic chemist for the construction of new C–C bonds (Palomo *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2005) since, concomitant with the bond forming process, is the formation of one or two new stereocenters, allowing to approach a broad range of both, natural and novel compounds.

Nature builds up carbohydrate, amino acids, hydroxy acids and other molecules by the use of aldol reactions catalysed by aldolase enzymes. This class of enzymes, which are part of the lyases family, catalyse reversibly and stereoselectively an aldol addition reaction between a donor compound (nucleophile) and an acceptor compound (electrophile), with a high degree of stereochemical control. Usually, these enzymes show high specificity towards the donor substrate but tolerate a broad range of acceptor substrates; therefore, aldolases have been extensively used in chemo-enzymatic syntheses to produce carbohydrate, carbohydrate-like structures, or non-carbohydrate compounds (Clapés *et al.*, 2010; Fessner and Jennewein, 2007; Dean *et al.*, 2007).

Aldolases can be classified according to their donor specificity, including pyruvate/oxaloacetate/2-oxobutyrate-dependent, dihydroxyacetone phosphate (DHAP)-dependent, dihydroxyacetone and other unphosphorylated analogues-dependent, threonine-dependent and acetaldehyde-dependent aldolases. Dihydroxyacetone phosphate (DHAP)-dependent aldolases constitute the main group utilized in organic synthesis

and numerous examples for the application of DHAP-dependent aldolases have been reported (Samland and Sprenger, 2006; Dean *et al.*, 2007; Iturrate and García-Junceda, 2008; Clapés *et al.*, 2010; Clapés and Fessner, 2011; Brovotto *et al.*, 2011; Müller, 2012; Oroz-Guinea *et al.*, 2012; Clapés *et al.*, 2013; Fesko *et al.*, 2013). Their major synthetic advantage is that the stereochemistry of the two newly formed stereogenic centers is controlled by the enzymes and, moreover, they are stereocomplementary: they can synthesize the four possible diastereoisomers of vicinal diols from an achiral aldehyde acceptors and DHAP. Despite this well proven synthetic utility of aldolases, still there are few processes that have been developed at industrial scale and none of them—in the best of our knowledge—used DHAP-dependent aldolases. Therefore, the search for new enzymes with improved properties from the biocatalysis point of view it is still necessary.

In this way, thermophiles (optimal growth temperature between 50 and 80 °C) and hyperthermophiles (optimal growth temperature between 80 and 110 °C) have attracted the attention from a biocatalytical point of view since these microorganisms are source of thermostable enzymes (thermozymes) that have developed molecular mechanisms of adaptation to extreme physicochemical conditions and represent unique biocatalysts that function under harsh reaction conditions, in which their mesophilic enzymes counterparts are often no well suited.

In this Thesis, we describe the heterologous expression of rhamnulose-1-phosphate aldolase from *Thermotoga maritima*,—a hyperthermophilic bacterium with an optimum growth temperature of 80 °C— the biochemical characterization of the recombinant enzyme and the study of its applicability as biocatalyst.

## Objectives

The main goal of this PhD Thesis was the integral study of rhamnulose-1-phosphate aldolase from *Thermotoga maritima* as a new biocatalyst for C-C bond formation. This study includes:

- Cloning, over-expression and purification of two different constructions of the Rha-1PA from *T. maritima*, with or without His-tag.
- Biochemical characterization of the two recombinant enzyme versions:
  - Catalytic mechanism determination.
  - Basic kinetic parameters obtaining.
  - Study of the structure.
  - Optimum reaction conditions determination.
  - Enzyme stability study.
  - His-tag and cofactor effect on the secondary structure and the thermostability analysis.
- Study of the synthetic applicability
  - Applicability in the context of a multi-enzyme synthesis.
  - Chemo-enzymatic synthesis of nitrogenated sugar analogues.

## Conclusions

Conclusions obtained in this Thesis can be grouped around the two general subjects studied the biochemical characterization synthetic applicability of the rhamnulose-1-phosphate aldolase from *Thermotoga maritima*.

The biochemical characterization allowed us to conclude that:

- Rhamnulose-1-phosphate aldolase from *T. maritima* is a class II DHAP-dependent aldolase, which catalyse aldol addition using  $\text{Co}^{2+}$ .
- Rha-1PA from *T. maritima* is a hyperthermophile enzyme with an optimum activity measured at 95 °C. Furthermore, in contrast with other hyperthermophilic enzymes, it maintains a significant percentage of activity at R/T.

- This enzyme can be used in a wide range of reaction conditions, including different temperatures (between 20 and 95 °C), pH values (at least 50% of activity between pH 5.7 and 9.0) and presence of organic co-solvents (90% of the initial activity in H<sub>2</sub>O/AcN 60:40, 100% in H<sub>2</sub>O/DMSO 80:20, 50% in H<sub>2</sub>O/DMF 75:25 and 40% in 90:10 H<sub>2</sub>O/isopropanol and H<sub>2</sub>O/THF).
- It is been showed the great stability of the aldolase at high temperatures, displaying a T<sub>M</sub> of 102 °C and showing a half-life of 44, 33 and 3,5 h at 80, 95 and 115 °C, respectively.
- His-tag and cofactor affect not only to secondary structure of the protein, but also to thermostability. This influence can be summarized in:
  - $\alpha$ -helix/ $\beta$ -sheet shift is incremented at temperatures above 80 °C by His-tag presence, favouring protein denaturalization.
  - Co<sup>2+</sup> is involve in the native structure retention. Cofactor absence of the enzyme without His-tag entails an  $\alpha$ -helix loss of ~10%, resulting in protein aggregation at 110 °C. On the other hand, Co<sup>2+</sup> absence of the enzyme without His-tag leads into a ~10% increase of  $\alpha$ -helix at 20 °C. Thus, this result confirms not only the structural role Co<sup>2+</sup> plays, but also that his-tag can have influence in the secondary structure of the protein.
  - Regarding aldolase T<sub>M</sub>, changes can only be observed with the His-tagged enzyme at high concentrations of Co<sup>2+</sup>. (15 °C T<sub>M</sub> decrease at [Co<sup>2+</sup>]= 750  $\mu$ M).

Finally, synthetic applicability studies allowed us to conclude that:

- Rha-1PA from *T. maritima* is a useful biocatalyst compatible with multi-enzyme systems for C-C bond formation, involving mesophilic enzymes.
- Furthermore, this aldolase can be applied to the synthesis of several organic compounds like, aldols, nitrocyclitols and iminocyclitols, obtaining similar or higher yields than Rha-1Pa from *E. coli*.

- Unfortunately, DHA is not accepted as substrate instead of DHAP, the aldolase do not show activity in presence of borate buffer.
- Stereoselectivity of the enzyme is similar to Rha-1Pa from *E. coli*. In both cases stereoselectivity control is not total since mixtures of L-*threo* (R,S) and D-*erythro* (R,R) diastereoisomers are obtained.
- Study of the stereochemistry showed that in all the cases the major diastereoisomer formed is the coincident with the natural stereopreference of the enzyme (L-*threo* (R,S)) except when aldehyde **11** was used as acceptor.
- When iminocyclitol **41** was synthesized a diastereoisomeric mixture was obtained (*threo:erythro* 42:58). Considering that Rha-1PA Ec achieve a 100% of D-*erythro* (R,R) diastereoisomer, L-*threo* (R,S) can only be synthesized, although in a minority way, using Rha-1PA from *T. maritima*.
- Reaction control of the enzyme was studied, being the formation of L-*threo* isomer kinetically controlled and D-*erythro* isomer under thermodynamic control.



# **INTRODUCCIÓN**



Uno de los retos más importantes de la química orgánica es la formación estereoselectiva de enlaces C-C. El uso de las enzimas como catalizadores es una buena alternativa a la síntesis orgánica clásica, ya que lleva aparejada una serie de ventajas como son su capacidad para llevar a cabo las reacciones en condiciones moderadas de temperatura, pH y presión, disminuyendo el consumo de energía necesario, y su alta regio, quimio y estereoselectividad, lo que produce una disminución de la formación de productos secundarios y suprime la necesidad de las etapas de activación y protección/desprotección, disminuyendo la cantidad de desechos generados. Además, representan una opción medioambientalmente más atractiva dado que las enzimas catalizan las reacciones en H<sub>2</sub>O (aunque algunas enzimas son capaces de mantener su actividad en presencia de disolventes orgánicos permitiendo la transformación de sustratos hidrofóbicos) y son macromoléculas biodegradables que pueden ser sobreexpresadas haciendo los procesos biotecnológicos más eficientes (Anastas y Warner, 1998; Sheldon, 2004; Alcalde, 2006; Anastas y Eghbali, 2010).

Dada su amplia aplicabilidad sintética, las enzimas involucradas en la formación de enlaces C-C han sido objeto de múltiples revisiones (Breuer y Hauer, 2003; García-Junceda *et al.*, 2004; Sukumaran y Hanefeld, 2005; Faber y Kroutil, 2005; Resch *et al.*, 2011a; Müller, 2012; Fesko y Gruber-Khadjawi, 2013; Nestl *et al.*, 2014). En función del tipo de enzima utilizada se pueden

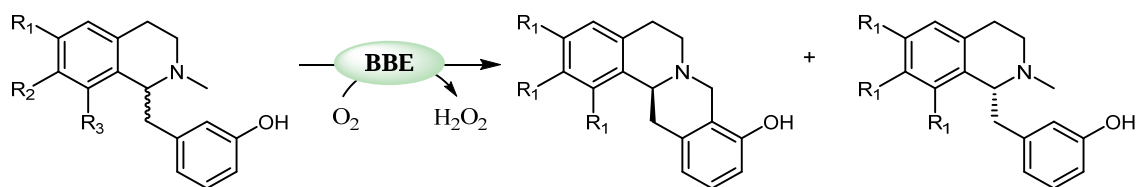
clasificar en cuatro grupos diferentes: (i) oxidoreductasas (EC 1.), (ii) transferasas (EC 2.), (iii) liasas (EC 4.) y (iv) enzimas con actividad promiscua.

### ***Oxidorreductasas***

Las enzimas de esta familia son las menos empleadas en la formación de enlaces C-C. Una explicación a este hecho es que la reacción se realiza mediante la creación de las especies reactivas por lo que no existe control sobre los sustratos entre los que se produce la formación del enlace, sobre el número de veces que se realiza la reacción, ni sobre la estereoquímica resultante (Resch *et al.*, 2011a). A pesar de este hecho, distintas oxidorreductasas han sido utilizadas con propósitos sintéticos.

### **Enzima del puente de berberina**

La enzima del puente de berberina (BBE) cataliza la biosíntesis de alcaloides de benzofenantridina (berberinas) en plantas. Para ello es necesaria una reacción intramolecular oxidativa entre el fenol y el grupo *N*-metilo, formándose el enlace C-C. Actualmente, la BBE más estudiada es la perteneciente a *Eschscholzia californica* (Winkler *et al.*, 2008), que ha sido empleada para la preparación de (*R*)-bencilisoquinolinas y derivados de (*S*)-berberina a partir de una mezcla racémica (Fig 1) (Winkler *et al.*, 2009; Schrittwieser *et al.*, 2011a; Schrittwieser *et al.*, 2011b; Resch *et al.*, 2011b).

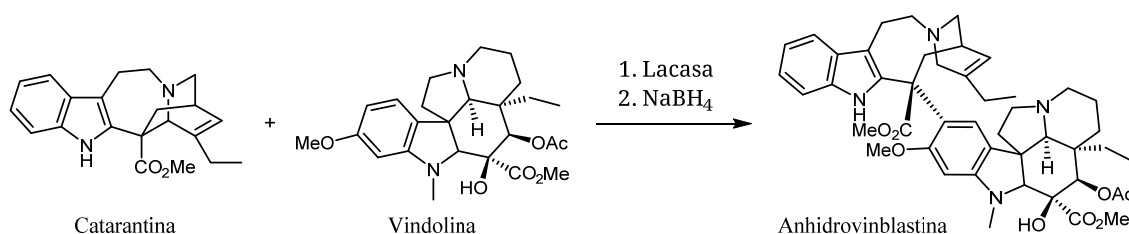


**Figura 1.** Síntesis de derivados de (*S*)-berberina catalizada por la BBE de *E. californica* mediante resolución cinética de mezclas racémicas de bencilisoquinolinas.

### **Lacasas**

Otra alternativa es el uso de lacasas. Estas enzimas contienen varios átomos de cobre y catalizan la oxidación de hidrocarburos aromáticos a expensas de oxígeno molecular (Witayakran y Ragauskas, 2009). Aunque han

sido usadas frecuentemente en síntesis orgánica para la polimerización, oligomerización y, en menor medida, para la dimerización de arenos *O*- y *N*-sustituidos (Gazak *et al.*, 2008), la obtención de mezclas complejas de productos complica su aplicación (Navarra *et al.*, 2010). Un ejemplo paradigmático es la oxidación de fenoles al correspondiente radical fenoxi, que es altamente reactivo, lo que conlleva la formación sucesiva de varios enlaces C-C (Hajdok *et al.*, 2009; Leutbecher *et al.*, 2009; Witayakran *et al.*, 2009). Empero, el grupo del Doctor Danieli consiguió sintetizar el alcaloide bisindólico anhidrovinblastina con un buen rendimiento por acoplamiento oxidativo de los derivados indólicos catarantina y vindolina seguido de la reducción con NaBH<sub>4</sub> (Fig 2) (Sagui *et al.*, 2009).



**Figura 2.** Síntesis de la anhidrovinblastina catalizada por lacasa.

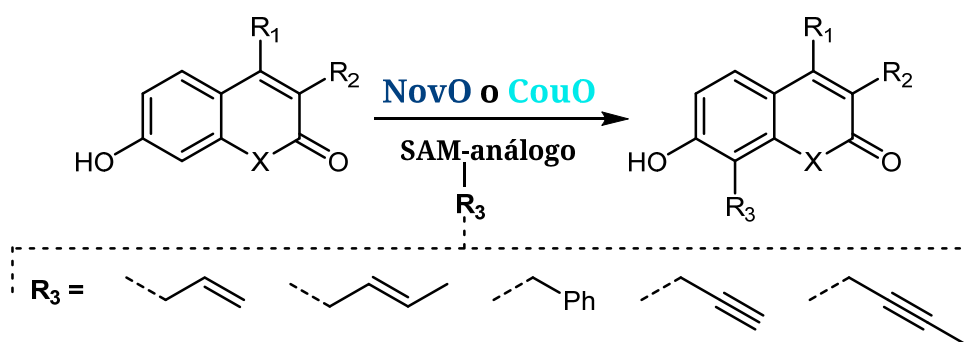
## Transferasas

Las transferasas son enzimas que catalizan la transferencia de un grupo funcional de una molécula donadora a otra aceptora. Esta familia está subdividida en diez categorías en función del grupo transferido, de las cuales realizan la formación de enlaces C-C las pertenecientes a las subfamilias catalogadas como metiltransferasas (EC 2.1.), aldehído y cetona transferasas (EC 2.2.), aciltransferasas (EC 2.3.) y las aril y alquil transferasas (EC 2.5.).

### Metiltransferasas

Las metiltransferasas llevan a cabo el equivalente enzimático de la reacción de alquilación de Friedel-Crafts, es decir la metilación de un compuesto nucleófilo mediante la formación de un grupo metilo electrofílico ("CH<sub>3</sub><sup>+</sup>"), utilizando *S*-adenosil-L-metionina como cofactor y donador del grupo metilo (Sofia *et al.*, 2001; Mahlert *et al.*, 2007; Braun *et al.*, 2010; Marsh

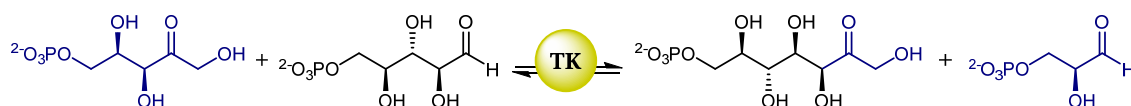
*et al.*, 2010; Buckel y Thauer, 2011). Además, se ha evidenciado que las metiltransferasas de *Streptomyces spheroids* y de *Streptomyces rishiriensis* son capaces de servirse de análogos del cofactor natural, portando grupos alilo, propargilo, but-2-en-1-ilo, but-2-in-1-ilo o bencilo, extendiendo el uso de estas enzimas más allá de la reacción de metilación (Stecher *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2014) y ampliando su utilización como catalizadores (Fig 3). Aun así, es necesario tener en cuenta su sensibilidad al oxígeno obstaculiza su aplicación en biocatálisis (Müller, 2012).



**Figura 3.** Alquilación de derivados de cumarina empleando metiltransferasas con análogos de SAM. **NovO**: metiltransferasa de *Streptomyces spheroids*; **CouO** metiltransferasa de *Streptomyces rishiriensis*.

## Transketolasas

Las transketolasas (TK), pertenecientes al grupo de las aldehído y cetona transferasas, forman parte de las enzimas dependientes de tiamina difosfato (ThDP) y  $Mg^{2+}$  (Hailes *et al.*, 2013). *In vivo* catalizan la transferencia de un grupo hidroxiacetilo desde la D-xilulosa 5-fosfato a la D-ribosa 5-fosfato o a la D-eritrosa-4-fosfato, generando D-sedoheptulosa-7-fosfato y gliceraldehído-3-fosfato (G3P). En este proceso se crea un nuevo estereocentro (C3) con configuración (S) (Fig 4) (Racker, 1961).



**Fig 4.** Reacción catalizada *in vivo* por las transketolasas.

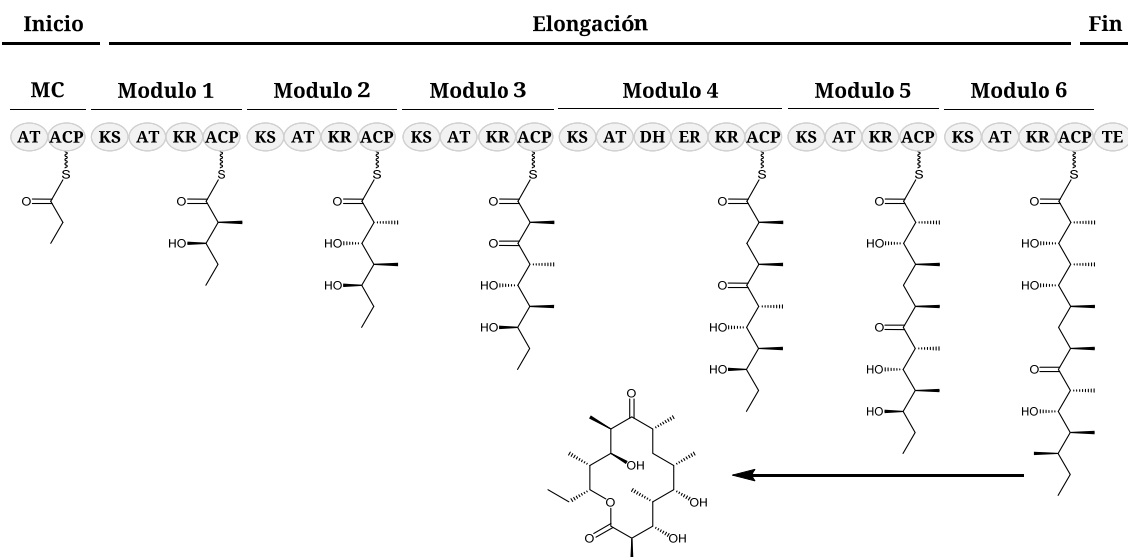
Estas enzimas toleran un amplio abanico de hidroxialdehídos como sustratos aceptores, tanto fosforilados como no fosforilados (Demuyneck *et al.*, 1991; Hobbs *et al.*, 1993; Aucamp *et al.*, 2008). Así mismo, muestran una estricta especificidad hacia la configuración (*R*) del centro quiral del sustrato aceptor y, por lo tanto, la configuración del producto final obtenido es *D-treo* (3*S*,4*R*) (Zhao y Zhong, 2009; Hailes *et al.*, 2013). En cuanto al sustrato donador son capaces de utilizar xilulosa-5-fosfato, sedoheptulosa-7-fosfato, fructosa 6-fosfato e hidroxipiruvato. Cuando este último es usado, de manera concomitante con la transferencia del grupo hidroxiacetilo, se produce la formación de dióxido de carbono, lo que transforma la reacción en irreversible (Srere *et al.*, 1958; Villafranca *et al.*, 1971; Bolte *et al.*, 1987; Myles *et al.*, 1991; Kobori *et al.*, 1992; Hecquet *et al.*, 1994).

Al utilizar como biocatalizador transketolasas, se obtienen productos similares a los formados con la fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa, siendo la mayor ventaja sobre ésta que la TK acepta sustratos desfosforilados lo que evita el posible paso de desfosforilación posterior. Consecuentemente, diversos análogos de fructosa y de azazúcares han sido sintetizados mediante la elongación estereoespecífica de la cadena en C2 catalizada por estas enzimas (Kobori *et al.*, 1992; André *et al.*, 1998; Zimmermann *et al.*, 1999; González-García *et al.*, 2003; Crestia *et al.*, 2004; Shaeri *et al.*, 2008; Charmantray *et al.*, 2009; Wohlgemuth, 2009; Wang *et al.*, 2010).

### **Policétido sintasas**

Las policétido sintasas son grandes complejos enzimáticos multifuncionales y modulares, que pertenecen a la subfamilia de las aciltransferasas. Cada módulo contiene como mínimo las tres subunidades requeridas para la elongación de la cadena carbonada: (i) la proteína transportadora del grupo acilo (ACP), (ii) la aciltransferasa y (iii) la cetosintasa. Adicionalmente cada módulo puede poseer diferentes subunidades para la modificación del C $\beta$ , incluyendo subunidades con actividad cetoreductasa, deshidratasa y enoilreductasa. La acción sucesiva de estas subunidades produce la reducción a alcohol del grupo ceto, la formación de un doble enlace por deshidratación y la reducción del doble enlace, respectivamente (Fig 5).

## INTRODUCCIÓN

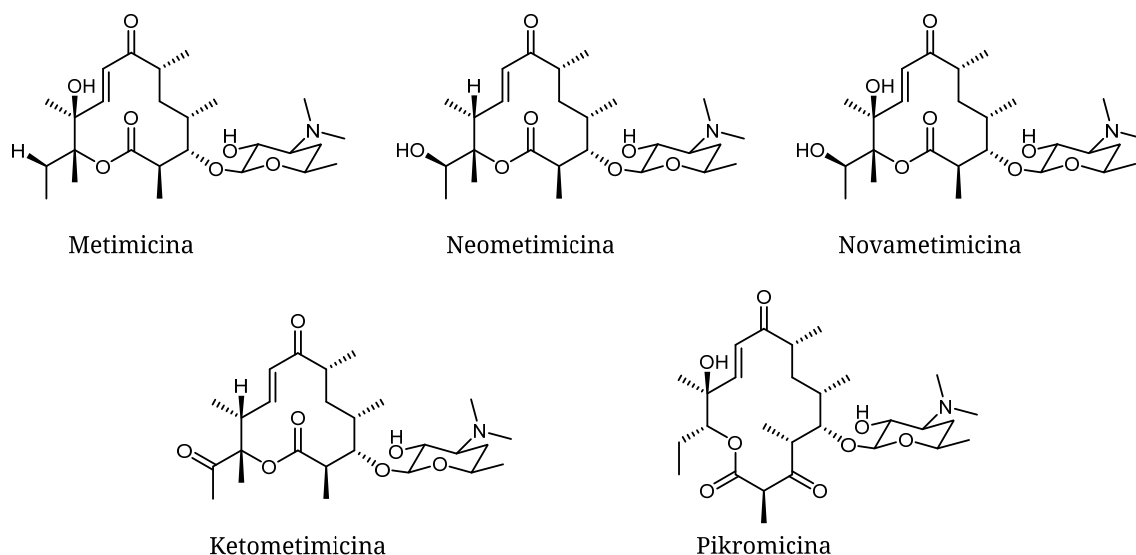


**Figura 5.** Ejemplo de la organización modular de una policétido sintasa (6-desoxieritronolido B sintasa). **AT**, aciltransferasa; **ACP**, proteína transportadora del grupo acilo; **KS**, cetosintasa; **KR**, cetoreductasa; **DH**, deshidratasa; **ER**, enoilreductasa; **TE**, dominio C-terminal.

En consecuencia, la estructura y complejidad de los policétidos formados depende de la cantidad de módulos que conforman el complejo multienzimático, la presencia de las subunidades modificadoras del C $\beta$ , la molécula inicial que se somete a la reacción y de la molécula utilizada para la elongación (normalmente malonil-, metilmalonil- y etilmalonil- coenzima A) (Aldrich *et al.*, 2005; Giralde *et al.*, 2006; Akey *et al.*, 2006; Fischbach y Walsh, 2006; Bonnet *et al.*, 2013; Busch *et al.*, 2013; Piasecki *et al.*, 2014; Khosla *et al.*, 2014).

Su labor *in vivo* consiste en la biosíntesis de una amplia gama de metabolitos secundarios llamados policétidos mediante condensaciones de Claisen descarboxilativas recurrentes (Khosla *et al.*, 2007; Hertweck, 2009). Estos compuestos son moléculas complejas que despiertan un gran interés debido a la actividad insecticida, antibiótica, anticolesterolémica o anticancerígena que presentan algunas de ellas (Rivkin *et al.*, 2005; Trost y Dong, 2008; Brady *et al.*, 2009; Montaser y Luesch, 2011; DeChristopher *et al.*, 2012; Mahajan y Balachandran, 2012; Djinni *et al.*, 2013; Pidot *et al.*, 2014). Dado el gran potencial terapéutico de lo policétidos, se han realizado numerosos esfuerzos para su obtención utilizando policétido sintasas (Morita *et al.*, 2011; Wakimoto *et al.*, 2011; Abe, 2012;). En este sentido, el grupo de

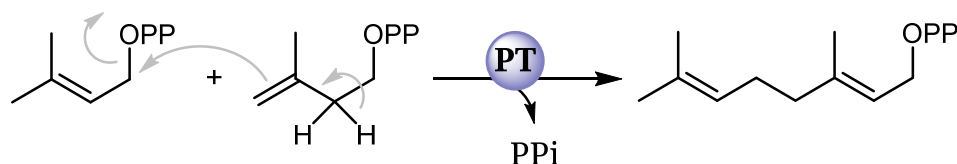
Sherman ha realizado la síntesis biocatalítica de varios macrólidos con actividad antibiótica utilizando la policétido sintasa de *Streptomyces venezuelae*, obteniendo heterociclos de 12 y 14 átomos (pikromicina, metimicina, neomicina, novametimicina y ketometimicina) partiendo del isómero (R) del éster de Roche (metil 3-hidroxi-2-metilpropionato) (Fig 6) (Hansen *et al.*, 2013).



**Figura 6.** Macrólidos sintetizados utilizando la policétido sintasa de *Streptomyces venezuelae*.

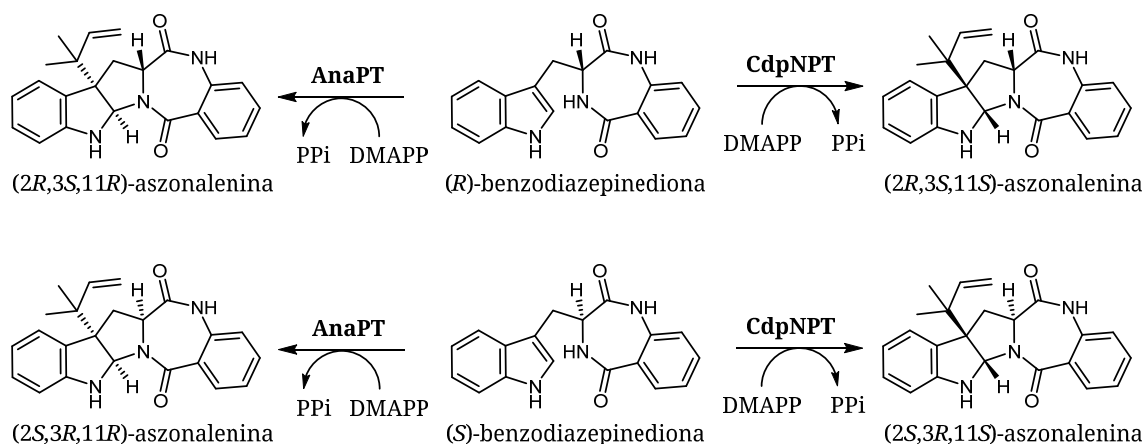
### Preniltransferasas

En último lugar se encuentran las preniltransferasas (PT), que se incluyen en la subclase de las aril y alquil transferasas y catalizan la formación de un doble enlace entre dos moléculas de prenilo difosfato (Ogura y Koyama, 1998; Heide, 2009; Liang, 2009) (Fig. 7). El producto de esta reacción puede volver a sufrir un nuevo paso de condensación con otra molécula de prenilo difosfato de forma reiterada. La longitud de cadena y la estereoquímica de la molécula sintetizada dependen de la especificidad de la preniltransferasa involucrada.



**Figura 7.** Ejemplo de la síntesis de geranyl difosfato mediante la condensación de moléculas de isoprenilo catalizada por preniltransferasas.

Aunque por el momento su aplicación en biocatálisis es limitada, se han descrito diversas preniltransferasas que aceptan un amplio abanico de sustratos (Saleh *et al.*, 2009; Brandt *et al.*, 2009; Zou *et al.*, 2011). Por ejemplo, las preniltransferasas pertenecientes a *Neosartorya fischeri* (AnaPT) y a *Aspergillus fumigatus* (CdpNPT) catalizan la prenilación en C3 del anillo de indolina perteneciente a la benzodiazepinediona, obteniendo como resultado cuatro isómeros diferentes de la aszonalenina (Yin *et al.*, 2009) (Fig 8).



**Figura 8.** Síntesis estereoespecífica de cuatro isómeros diferentes de la aszonalenina catalizada por las preniltransferasas de *Neosartorya fischeri* (AnaPT) y a *Aspergillus fumigatus* (CdpNPT).

## Liasas

Las liasas son enzimas que catalizan la formación y ruptura de enlaces por otros medios distintos a la hidrólisis o la oxidación. Se diferencian de otras enzimas en que requieren de la participación de un solo sustrato para efectuar la reacción en el sentido de la ruptura y de dos para realizar la reacción en sentido contrario.

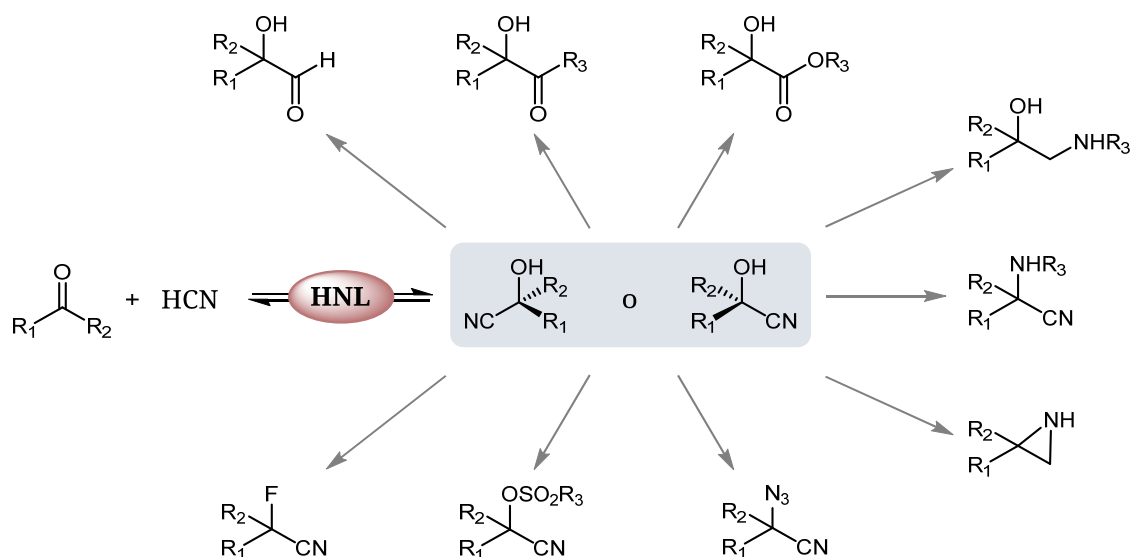
Esta familia se compone de siete subfamilias dependiendo del tipo de átomos entre los que se produce la unión. De entre ellas, la subfamilia de las liasas C-C (EC 4.1.) es la más extensa e importante, dividiéndose a su vez en cuatro subcategorías: carboxi-liasas (EC 4.1.1.), aldehído-liasas (EC 4.1.2), oxoácido-liasas (EC 4.1.3) y otras liasas C-C (EC 4.1.99) (Brovetto *et al.*, 2011). No obstante, éstas no son las únicas enzimas que pueden catalizar este tipo de enlaces (Resch *et al.*, 2011; Müller *et al.*, 2012; Fesko y Gruber-Kadjawl, 2013).

### **Aldolasas**

Dentro de esta familia, las aldolasas son las enzimas más utilizadas en síntesis orgánica, por lo que han sido objeto de múltiples revisiones (Gijssen *et al.*, 1996; Fessner, 1998; Machajewski y Wong, 2000; Seoane, 2000; Sukumaran y Hanefeld, 2005; Samland y Sprenger, 2006; Dean *et al.*, 2007; Clapés *et al.*, 2010; Clapés y Garrabou, 2011; Brovetto *et al.*, 2011; Fesko y Gruber-Kadjawl, 2013). Puesto que el objeto de esta Tesis es una aldolasa, este tema se desarrollará con más profundidad más adelante.

### **Hidroxinitrilo liasas**

En segundo lugar desde un punto de vista sintético se encuentran las hidroxinitrilo liasas (HNL u oxinitrilasas), que *in vivo* catalizan la ruptura de cianohidrininas. La reversibilidad de esta reacción *in vitro* permite la condensación enantioselectiva del ácido cianhídrico con aldehídos o cetonas dando lugar a (*R*)- o (*S*)- $\alpha$ -hidroxinitrilos (Dadashipour y Asano, 2011). Estos compuestos a su vez pueden ser eficientemente derivatizados sin perder su pureza óptica, convirtiéndose en sintones polifuncionales muy versátiles como  $\alpha$ -hidroxicetonas (Brussee *et al.*, 1988),  $\beta$ -hidroxiaminas (Zandbergen *et al.*, 1992; Effenberger *et al.*, 1997; Monterde *et al.*, 1999),  $\alpha$ -aminonitrilos (Effenberger *et al.*, 1991; Gaucher *et al.*, 1991), ácidos  $\alpha$ -hidroxicarboxílicos (Kriebel y Wieland, 1921; Gröger, 2001),  $\alpha$ -sulfonitrilos (Brunel y Holmes, 2004),  $\alpha$ -fluoronitrilos (Stelzer y Effenberger, 1993),  $\alpha$ -hidroxiésteres (Brunel y Holmes, 2004), aziridinas (Effenberger y Stelzer, 1995),  $\alpha$ -azidonitrilos (Effenberger *et al.*, 1996), entre otros (Roberge *et al.*, 2007; Purkarthofer *et al.*, 2007) (Fig9).

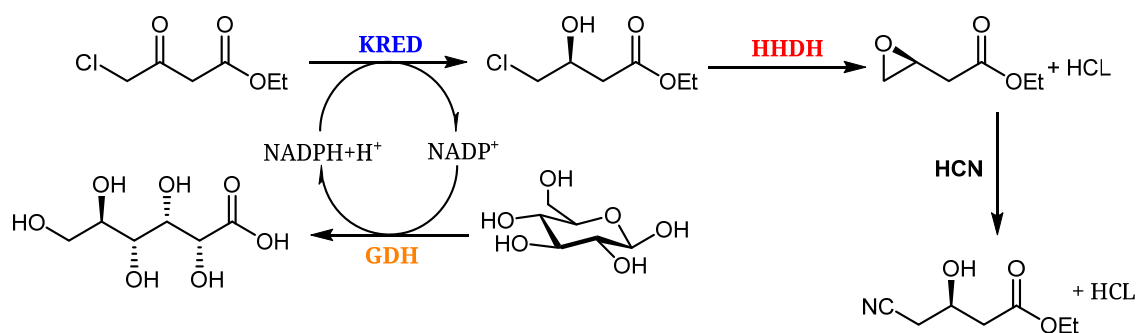


**Figura 9.** Síntesis de cianohidrinas usando HNLs y sus posibles derivatizaciones posteriores.

Así, la obtención de cianohidrinas catalizada por las HNLs es el primer paso sintético para la obtención de moléculas de gran interés como los antibióticos tianfenicol y florfenicol (Lu *et al.*, 2008), análogos de morfolina (Ritzen *et al.*, 2010) y derivados de ácido tetrónico, como la vitamina C o el ácido penicilínico (Bühler *et al.*, 2000).

### Halohidrina deshalogenasas

El grupo ciano puede ser también sustrato de las halohidrina deshalogenasas, las cuales, además de llevar a cabo la formación de epóxidos partiendo de las correspondientes halohidrinas, pueden catalizar la apertura nucleofílica de los mismos (Hasnaoui-Dijoux *et al.*, 2008). Al usar el ácido cianhídrico como sustrato esta reacción da lugar a un nuevo enlace C-C. Ésta aproximación ha sido utilizada para el diseño de la síntesis multienzimática de un intermedio clave para la elaboración del antiolesterolémico atorvastativa (Lipitor<sup>®</sup>) (Fig 10) (Fox *et al.*, 2007; Ma *et al.*, 2010).

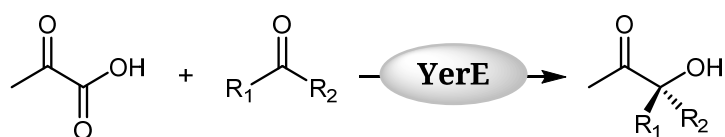


**Figura 10.** Síntesis multienzimática del (*R*)-etil-4-ciano-3-hidroxitirato. **KRED**, cetoreductasa; **HHDH**, halohidrina deshalogenasa; **GDH**, glucosa deshidrogenasa.

## Descarboxilasas

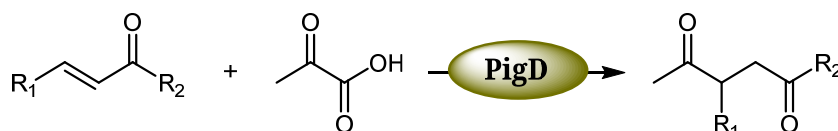
Otro grupo de enzimas perteneciente a las liasas con un gran potencial son las descarboxilasas. Todas ellas necesitan como cofactor ThDP para llevar a cabo la formación del nuevo enlace y llevan a cabo la condensación aciloínica entre un aldehído y un donador, generando  $\alpha$ -hidroxicetonas a través de una descarboxilación (Demir *et al.*, 2007; Gocke *et al.*, 2009; Müller *et al.*, 2009; Hoyos *et al.*, 2010). Las descarboxilasas mejor caracterizadas sintéticamente hasta el momento son la piruvato descarboxilasa (Rosche *et al.*, 2002; Cosp *et al.*, 2008), la benzoilformato descarboxilasa (Lingen *et al.*, 2005; Siegert *et al.*, 2005), la fenilpiruvato descarboxilasa (Guo *et al.*, 1999; Guo *et al.*, 2001) y la indol-3-piruvato descarboxilasa (Schütz *et al.*, 2005; Fedorov *et al.*, 2010).

Recientemente, Lehwald *et al.* (2010) han detallado la primera reacción asimétrica intermolecular cruzada entre un aldehído y una cetona utilizando la descarboxilasa ThDP-dependiente YerE de *Yersinia pseudotuberculosis*. Otra ventaja es el amplio rango de sustratos aceptados por la enzima, incluyendo cetonas lineares y cíclicas, dicetonas y  $\alpha$ - y  $\beta$ -ésteres, lo que permite la obtención de alcoholes terciarios asimétricos (Fig 11).



**Figura 11.** Preparación de alcoholes asimétricos por reacción de acoplamiento cruzada catalizada por la YerE de *Yersinia pseudotuberculosis*.

Una extraordinaria excepción a la formación de productos de adición 1,2 catalizada por las descarboxilasas es la obtención de productos de adición 1,4 al utilizar cetonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas por parte de la enzima dependiente de ThDP proveniente de *Serratia marcescens*, PigD (Dresen *et al.*, 2010) (Fig 12). No obstante, en el caso de utilizar aldehídos como sustrato aceptor ambas enzimas catalizan la reacción de adición 1,2.



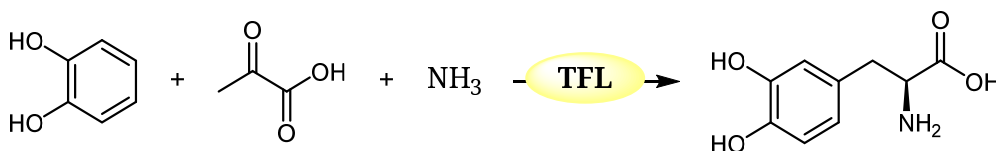
**Figura 12.** Acetilación 1,4 de una cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada catalizada por PigD.

### Benzaldehído liasa

La benzaldehído liasa (BAL) es también una enzima dependiente de ThDP que, además, requiere la presencia de cationes divalentes en el medio. Esta enzima es homóloga a la benzoilformato liasa, siendo ambas estereocomplementarias. En cuanto a la tolerancia hacia diferentes sustratos, la BAL acepta un mayor número y diversidad de los donadores (Dünkelmann *et al.*, 2000; Dünwald *et al.*, 2002; Demir *et al.*, 2002).

### Tirosina fenol liasa

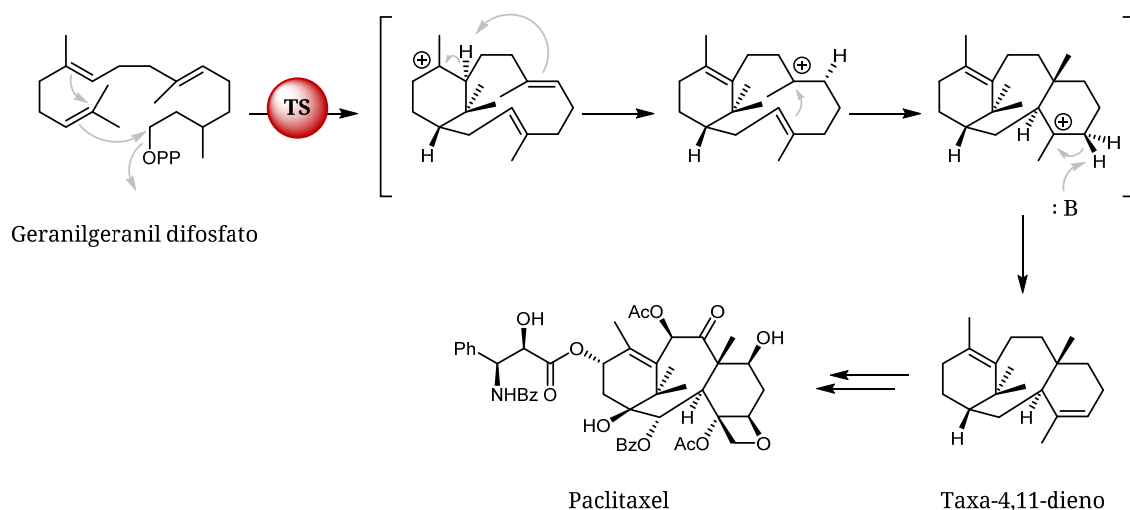
La tirosina fenol liasa es una enzima que utiliza piridoxal-5-fosfato (PLP) como cofactor para producir la ruptura del enlace C-C de la tirosina dando lugar a fenol piruvato y amoniaco. Afortunadamente, esta enzima es capaz de catalizar la reacción inversa para la creación de derivados de tirosina (Fig 13) (Seisser *et al.*, 2010).



**Figura 13.** Síntesis de derivados de tirosina 3' sustituidos catalizada por la tirosina fenol liasa (TFL).

## Terpenoide sintasas

En la ruta biosintética de terpenos, tras la reacción catalizada por las preniltransferasas actúan las terpenoide sintasas TS o terpenoide ciclasas) para la obtención de terpenoides. Estas enzimas catalizan la ciclación en cascada del sustrato terpénico mediante la formación de un carbocatión altamente reactivo, convirtiendo así simples cadenas lineales de hidrocarburos en esqueletos carbocíclicos complejos. Un ejemplo clave en la literatura es la ciclación del geranilgeranil difosfato por la taxadieno sintasa, que es el primer paso en la biosíntesis del paclitaxel (Taxol®), fármaco utilizado para el tratamiento de determinados tipos de cáncer (Fig 14) (Siemer *et al.*, 2010).

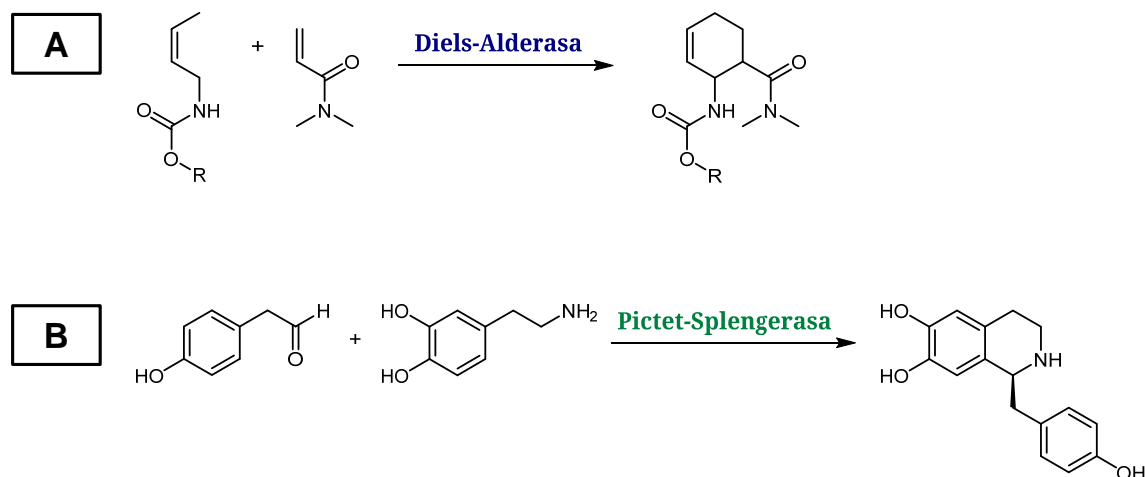


**Figura 14.** Mecanismo catalítico propuesto para la taxadieno sintasa (Köksal *et al.*, 2011).

## Diels-Alderasas y Pictet-Splegerasas

Asimismo, las Diels-Alderasas y las Pictet-Splegerasas son enzimas pertenecientes a la familia de las liasas con actividad ciclasa. Cada uno de estos tipos de enzimas lleva a cabo la reacción que les da nombre. Por lo tanto, mientras que las Diels-Alderasas catalizan la reacción intermolecular de Diels-Alder entre el 4-carboxibencil *trans*-1,3-butadieno-1-carbamato y varios derivados de acrilamida (Pohnert, 2001; Oikawa y Tokiwano, 2004; Siegel *et al.*, 2010; Townsend, 2011), las Pictet-Splengerasas catalizan la

reacción de Pictet-Splenger, es decir la condensación entre una ariletilamina y un aldehído para formar un *N*-heterociclo (Bonamore *et al.*, 2010; Bernhardt *et al.*, 2010) (Fig 15).



**Figura 15.** Síntesis biocatalítica de compuestos cíclicos mediante la formación de enlaces C-C catalizada por una Diels-Alderasa (A) y una Pictet-Splengerasa (B).

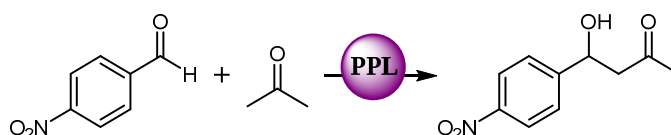
### ***Enzimas con actividad promiscua***

La promiscuidad enzimática es una propiedad que poseen la mayoría de las enzimas, siendo esencial para la evolución de nuevas actividades. Esta característica consiste en la capacidad de catalizar una reacción diferente a la principal. Normalmente esta actividad, denominada actividad promiscua, es fisiológicamente irrelevante y no está sometida a la selección natural. Sin embargo, bajo nuevas condiciones de selección esa actividad promiscua puede conferir una ventaja evolutiva que promueva el desarrollo de la misma, pudiendo convertirse en la nueva actividad principal (Khersonsky y Tawfik, 2010). Este mecanismo permitiría explicar la aparición de nuevas actividades sin necesidad de duplicación génica previa.

### **Hidrolasas**

En este sentido, se han descrito en la bibliografía numerosas reacciones de formación de enlaces C-C mediadas por hidrolasas, tanto lipasas como proteasas. Recientemente se ha relatado la capacidad de catalizar la condensación aldólica asimétrica entre aldehídos aromáticos y heterocíclicos

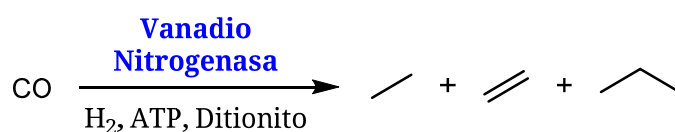
con cetonas cíclicas por parte de diferentes enzimas como la nucleasa p1, la proteasa alcalina BLAP, la proteasa ácida AUAP o la quimopapaína (López-Iglesias, *et al.*, 2011; He *et al.*, 2012; Guan *et al.*, 2012; Zandvoort *et al.*, 2012a; Zandvoort *et al.*, 2012b). Sin embargo, estos procesos se caracterizan por la necesidad de una gran cantidad de biocatalizador, largos tiempos de reacción, bajos rendimientos y por su falta de estereoselectividad (Müller, 2012). Una excepción es la reacción aldólica catalizada por la lipasa porcina pancreática (PPL), que es capaz de catalizar la condensación enantioselectiva (*e.e.* 50%) entre el 4-nitrobenzaldehído y la acetona con altos rendimientos (Fig 16) (Li *et al.*, 2010).



**Figura 16.** Condensación aldólica catalizada mediante la actividad promiscua de la PPL.

## Nitrogenasas

Las nitrogenasas catalizan *in vivo* la reducción de nitrógeno molecular ( $N_2$ ) a amoníaco ( $NH_3$ ). Recientemente el grupo de Ribbe ha caracterizado una enzima vanadio nitrogenasa en *Azotobacter vinelandii* capaz de reducir el monóxido de carbono dando lugar a la formación de una mezcla de etileno, etano, propano y butano en presencia de hidrógeno molecular ( $H_2$ ), ATP y una fuente de electrones (Fig 17) (Lee *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2011). De forma similar, esta transformación puede realizarse también mediante una nitrogenasa dependiente de molibdeno (Hu *et al.*, 2011). No obstante, es necesario tener en cuenta que la obtención de esos mismos hidrocarburos puede ser catalizada únicamente mediante el cofactor de la nitrogenasa, si bien de forma menos eficiente (Lee *et al.*, 2012).



**Figura 17.** Síntesis de hidrocarburos a partir de monóxido de carbono catalizada por la vanadio nitrogenasa de *Azotobacter vinelandii*.

### ALDOLASAS

La reacción aldólica es una de las herramientas más utilizadas para la formación de enlaces C-C ya que la obtención de uno o dos nuevos estereocentros permite diseñar un amplio abanico de compuestos, tanto naturales como no naturales.

En la síntesis química tradicional la selectividad de estas reacciones, en términos de condensación cruzada frente a la autocondensación, y la enantioselectividad son difíciles de conseguir. En general, el control de la estereoquímica se ha llevado a cabo diastereoméricamente, bien partiendo de aldehídos quirales o bien utilizando cantidades estequiométricas de auxiliares quirales unidos al enolato (Mukaiyama, 1982; Evans y Bartroli, 1982; Masamune *et al.*, 1985; Ocejo *et al.*, 2011). Ambas estrategias tienen sus inconvenientes. Mientras que el uso de aldehídos quirales da lugar a adiciones aldólicas de estereoquímica predecible (Lodge y Heathcock, 1987; Kitanosono y Kobayashi, 2014), no es posible la formación de todos los posibles estereoisómeros a partir de un determinado aldehído quiral. Los auxiliares quirales han permitido solucionar este inconveniente, ya que, dependiendo del auxiliar utilizado, es posible obtener todos los estereoisómeros posibles (Evans *et al.*, 1981). Sin embargo, a pesar de los éxitos demostrados por esta aproximación, su principal inconveniente es el aumento de pasos de reacción para introducir y eliminar dicho auxiliar quiral. Otra posibilidad para controlar la estereoquímica es la utilización de catalizadores como ácidos de Lewis quirales (Abraham *et al.*, 2008; Shiina *et al.*, 2014), organocatalizadores (Mlynarski y Paradowska, 2008; Yang *et al.*, 2009; Mahrwald, 2013) o la utilización de anticuerpos catalíticos (Tanaka *et al.*, 2004; Goswami *et al.*, 2009).

Como ya hemos mencionado, una buena alternativa a la síntesis orgánica clásica es la utilización de aldolasas como catalizadores en condensaciones asimétricas, dado su alto control de la estereoquímica. Las aldolasas están presentes en prácticamente cualquier organismo conocido –existen más de 40 identificadas hasta la fecha– y desarrollan su función *in vivo* principalmente en el metabolismo de carbohidratos, pero existen también aldolasas implicadas en rutas metabólicas de aminoácidos e hidroxiaácidos.

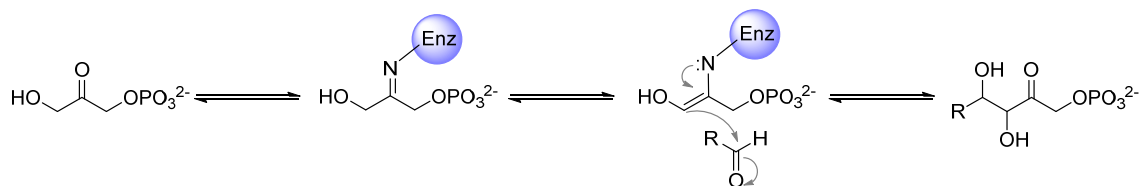
Su función es catalizar, de forma reversible y estereoselectiva, la condensación aldólica entre un sustrato donador (nucleófilo) y un sustrato aceptor (electrófilo), creando uno o dos nuevos estereocentros de manera estereoespecífica. Normalmente estas enzimas presentan una estricta especificidad por el sustrato donador mientras que la especificidad por el sustrato aceptor es menor, permitiendo la formación de diversos carbohidratos, análogos de carbohidratos y otros productos (Fessner y Jennewein, 2007; Dean *et al.*, 2007; Clapés *et al.*, 2010).

Podemos clasificar las aldolasas de dos maneras diferentes según lo hagamos en función de su mecanismo de acción o en función del sustrato donador y del tipo de producto al que dan lugar (Clapés y Fessner, 2011).

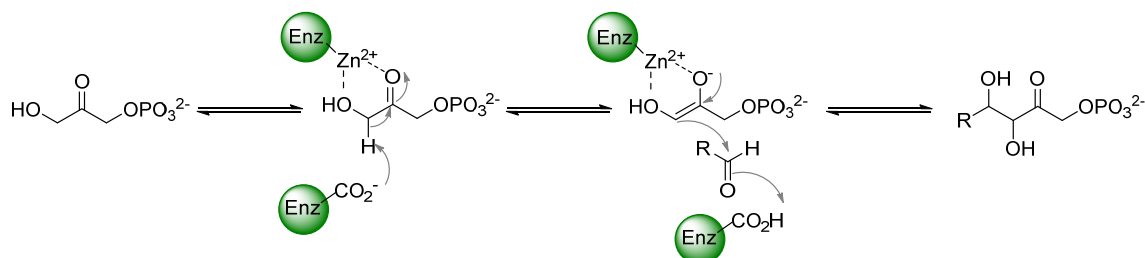
Según el mecanismo catalítico que utilicen las aldolasas pueden dividirse en dos grupos (Fig. 18):

- Aldolasas de tipo I: están presentes en todos los organismos desde procariotas a eucariotas y se caracterizan por la formación de una base Schiff entre el grupo  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> de un residuo de lisina del centro catalítico y el carbono carbonílico de la cetona donadora (Kluger, 1990). Así pues, se inhiben de forma irreversible en presencia de agentes reductores, como el NaBH<sub>4</sub>, lo que produce el paso de imina a amina e impide el movimiento electrónico necesario para que se produzca el ataque al carbono carbonílico del aldehído.
- Aldolasas de tipo II: se encuentran solamente en procariotas y levaduras, algas y hongos. Estas enzimas requieren un metal divalente como cofactor, generalmente Zn<sup>2+</sup>, que actúa como ácido de Lewis activando al nucleófilo (Fessner *et al.*, 1996). Por lo tanto, cuando se las somete a la presencia de agentes quelantes, como el EDTA, se inactivan de forma reversible.

**Aldolasas Tipo I**



**Aldolasas Tipo II**



**Figura 18.** Mecanismo de reacción de las aldolasas tipo I y tipo II.

Al clasificar las aldolasas en función de su especificidad por el sustrato donador se pueden distinguir cinco grupos diferentes (Tabla 1):

- Las aldolasas dependientes de piruvato, fosfoenol piruvato (PEP), oxalacetato u oxobutirato, que catalizan la adición de su sustrato donador a una gran variedad de aldehídos polihidroxilados dando lugar a 3-deoxi-2-cetoácidos y generando en el proceso un nuevo centro quiral en C4. Normalmente son aldolasas de tipo I, pero existen también de tipo II, utilizando generalmente  $\text{Mg}^{2+}$  o  $\text{Mn}^{2+}$  como cofactor (Wang y Sean, 2005). De entre todas las aldolasas pertenecientes a este grupo la más estudiadas son las ácido *N*-acetilneuramínico aldolasas (NeuAc aldolasas) y sus mutantes, que catalizan formación de ácido siálico a partir del piruvato y la manosa (Kragl *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 2009).
- Las aldolasas dependientes de dihidroxiacetona fosfato (DHAP) que catalizan la condensación entre la DHAP y un aldehído aceptor, dando lugar a la formación de cetosas-1-fosfato con dos nuevos estereocentros. Dado que los cuatro tipos de aldolasas dependientes de DHAP que existen son estereocomplementarias, *a priori* la configuración de los centros formados puede ser controlada mediante la elección de la enzima adecuada (Sánchez-Moreno *et al.*, 2009; Oroz-Guinea *et al.*, 2012).

**Tabla 1.** Sustratos aceptores de las aldolasas.

Tipo de enzima	Donador	Aceptor	Product
PEP-Aldolasas			
DHAP-Aldolasas			
DHA-Aldolasas			
Glicina-Aldolasas			
Acetaldehído-Aldolasas			

- Las aldolasas dependientes de dihidroxiacetona (DHA) y otros análogos desfosforilados. Esta nueva clase de aldolasas, cuyo único representante hasta el momento es la fructosa 6-fosfato aldolasa (FSA), son capaces formar iminociclitolos y azúcares monofosfato con estereoisomería (3*S*,4*R*) utilizando la DHA, el glicolaldehído (GA), la hidroxiacetona (HA) o la hidroxibutanona (HB) como sustrato donador y el gliceraldehído-3-fosfato (Schürmann y Sprenger, 2001; Garrabou *et al.*, 2009; Sánchez-Moreno *et al.*, 2012).

- Las aldolasas dependientes de glicina, que dan lugar a la formación de β-hidroxi-α-aminoácidos, requieren PLP como cofactor y se pueden distinguir dos miembros diferentes: la serina hidroximetil transferasa (SHMT) (Chiba *et al.*, 2012) y la treonina aldolasa (Liu *et al.*, 2000; Franz y Stewart, 2014). A su vez, las treonina aldolasas se pueden dividir en L/D-treonina aldolasas y en L/D-*allo*-treonina aldolasas en función de su especificidad (Fesko *et al.*, 2008). *In vivo* las primeras catalizan la condensación del formaldehído con la glicina, mientras que las segundas degradan la treonina de forma reversible. Ambos tipos de enzimas dependientes de glicina toleran una amplia variedad de aldehídos como aceptores, necesitando un exceso de glicina en el medio para favorecer el desplazamiento de la reacción en el sentido de la síntesis

(Steinreiber *et al.*, 2007a; Steinreiber *et al.*, 2007b; Steinreiber *et al.*, 2007c; Dückers *et al.*, 2010).

▪ Las aldolasas dependientes de acetaldehído dan lugar a 3-hidroxi-aldehídos y su único miembro conocido hasta el momento es la 2-desoxi-D-ribosa-5-fosfato aldolasa, también conocida como DERA. Aunque *in vivo* su función es la adición aldólica reversible del acetaldehído al gliceraldehído-3-fosfato, *in vitro* puede aceptar diversos aldehídos como sustratos donadores e, incluso, aceptar donadores distintos al natural como propanal, acetona o fluoroacetona (Chen *et al.*, 1992). Además, DERA es la única aldolasa capaz de llevar a cabo la reacción de condensación empleando dos aldehídos y, por lo tanto, formando un nuevo aldehído como producto. Esta característica es muy interesante desde un punto de vista sintético, ya que el producto formado puede ser utilizado como sustrato en una segunda adición aldólica mediada bien por DERA o por cualquier otra aldolasa (Gijzen *et al.*, 1995a; Gijzen *et al.*, 1995b; García-Junceda *et al.*, 1995).

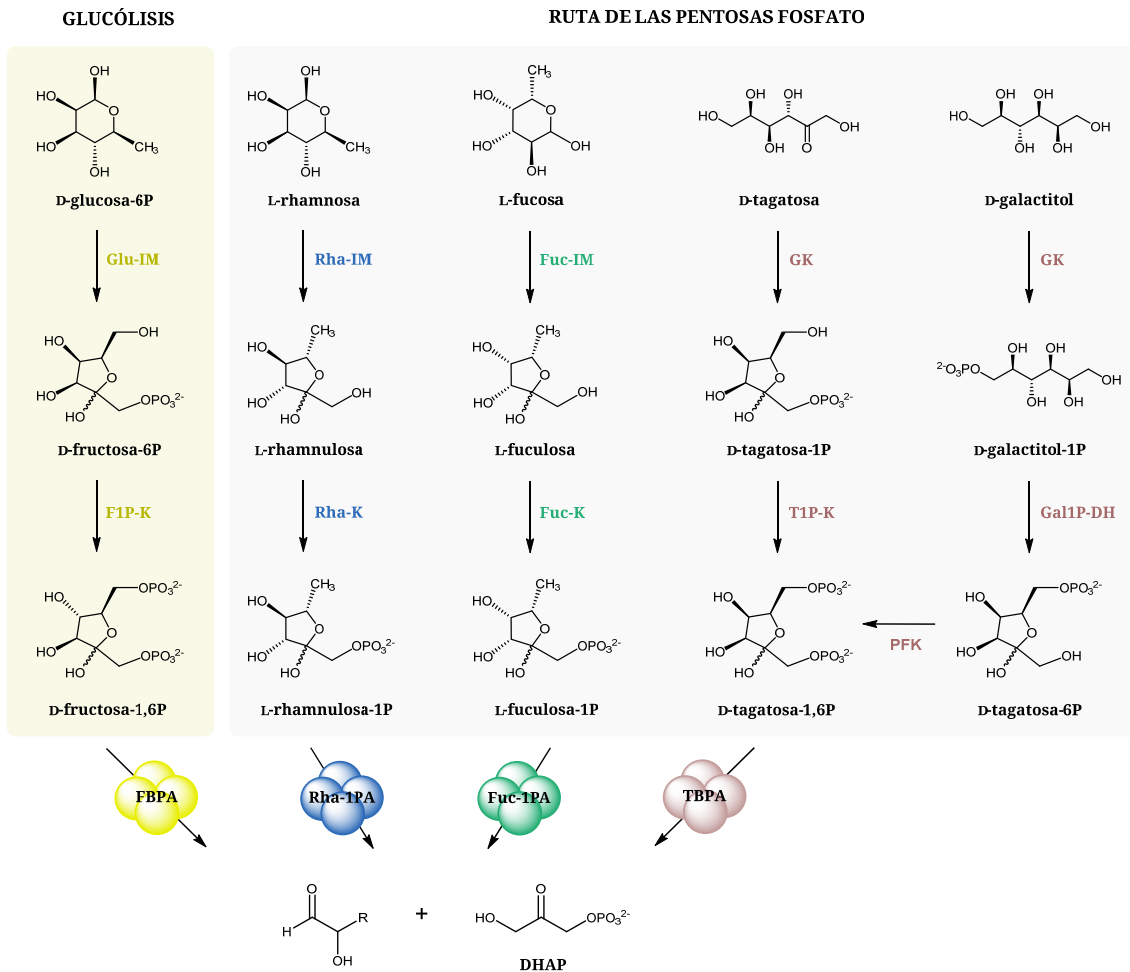
De entre estos cinco grupos, las aldolasas sin duda más utilizadas en síntesis orgánica son las aldolasas dependientes de dihidroxiacetona fosfato.

### **Aldolasas dependientes de dihidroxiacetona fosfato**

Las aldolasas dependientes de dihidroxiacetona fosfato *in vivo* forman parte de la glucólisis, la gluconeogénesis y del catabolismo de los carbohidratos L-fucosa, L-rhamnosa y galactitol (Fig 19) (Yurimoto *et al.*, 2005).

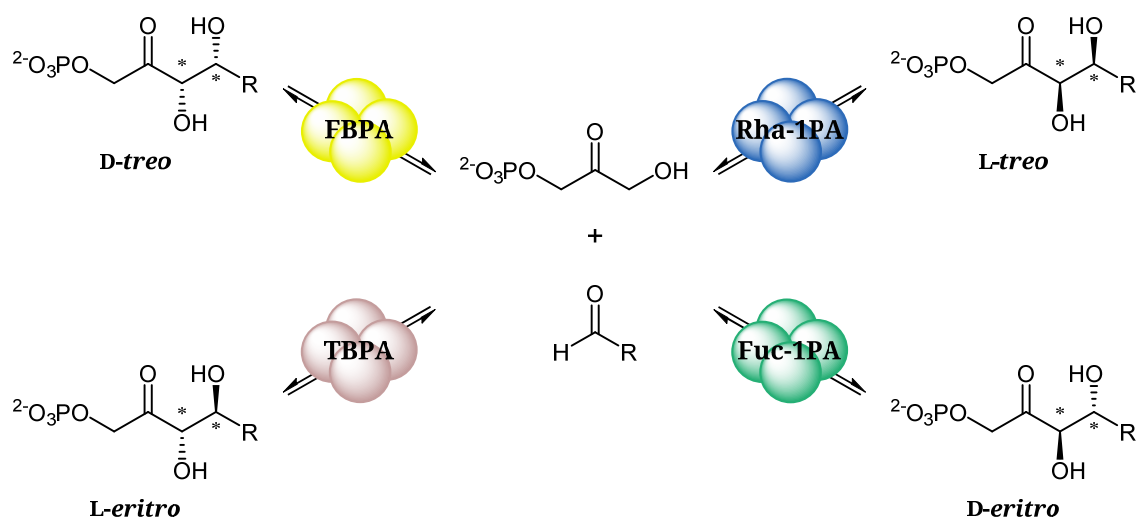
Como ya se ha mencionado, esta familia de aldolasas cataliza la adición aldólica entre una cetona donadora (DHAP) y un aldehído aceptor formando cetosas-1-fosfato y está compuesta por cuatro enzimas: fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa (FBPA), tagatosa-1,6-bisfosfato aldolasa (TBPA), L-fuculosa-1-fosfato aldolasa (Fuc-1PA) y L-ramnulosa-1-fosfato aldolasa (Rha-1PA). El L-lactaldehído es el sustrato aceptor natural de Fuc-1PA y Rha-1PA, y el D-gliceraldehído-3-fosfato el de FBPA y TBPA. Su mayor interés sintético reside

## INTRODUCCIÓN



**Figura 19.** Catabolismo de D-glucosa-6P, L-rhamnosa, L-fucosa, L-tagatosa y galactitol. La L-rhamnosa isomerasa (Rha-IM) cataliza la isomerización de la L-rhamnosa a L-rhamnulosa, que posteriormente es fosforilada por la L-rhamnulosa quinasa (Rha-K) para obtener L-rhamnulosa-1-fosfato. La L-rhamnulosa-1-fosfato aldolasa (Rha-1PA) cataliza el paso final para obtener DHAP y D-GA3P. El catabolismo de L-fucosa es muy similar al de L-rhamnosa: participan los enzimas L-fucosa isomerasa (Fuc-IM), L-fuculosa quinasa (Fuc-K) y finalmente la L-fuculosa-1-fosfato aldolasa (Fuc-1PA). El catabolismo de la D-tagatosa comienza con una fosforilación catalizada por una glucoquinasa (GK) para obtener D-tagatosa-1-fosfato, que es nuevamente fosforilada por la D-tagatosa-1-fosfato quinasa (T1P-K), obteniéndose la D-tagatosa-1,6-bisfosfato. Finalmente se obtienen DHAP y D-GA3P por mediación de la D-tagatosa-1,6-bisfosfato aldolasa (TBPA). El D-galactitol puede ser directamente fosforilado para obtener D-glicidol-1-fosfato, a partir de la cual se forma D-tagatosa-6-bisfosfato mediante el enzima D-glicidol-1-fosfato deshidrogenasa (Gal1P-DH). La D-tagatosa-6-bisfosfato es nuevamente fosforilada con mediación de una fosfofructoquinasa (PFK) para obtener D-tagatosa-1,6-bisfosfato. El catabolismo del D-galactitol y D-tagatosa convergen en su parte final catalizada por TBPA. En la glucólisis se produce la isomerización de la D-glucosa-6-fosfato por una D-glucosa-6-fosfato isomerasa (Glu-IM), la D-fructosa-6-fosfato obtenida se fosforila gracias a una D-fructosa-1-fosfato quinasa (F1P-K), seguida de la obtención de DHAP y D-GA3P catalizada por la D-fructosa-1,6-fosfato aldolasa (FBPA).

en que, en la cetosa-1-fosfato resultante, se forman dos nuevos estereocentros cuya estereoquímica está controlada, salvo excepciones, por la enzima y no por los sustratos (Fessner *et al.*, 1991; Espelt *et al.*, 2003). Además, las aldolasas de esta familia son estereocomplementarias, es decir, su uso permite sintetizar los cuatro diastereoisómeros posibles a partir de un par de sustratos dado (García-Junceda *et al.*, 1995) (Fig. 20). Aunque esta afirmación es de uso generalizado, no es completamente cierta ya que la tagatosa-1,6-bisfosfato aldolasa no presenta control de la estereoquímica sobre la reacción de adición aldólica cuando se emplean aldehídos distintos al natural (Fessner *et al.*, 1992). Esta falta de estereoselectividad dificulta la utilización de la tagatosa-1,6-bisfosfato aldolasa en síntesis orgánica, pero esta desventaja podría ser superada mediante el empleo de técnicas de ingeniería de proteínas (Williams *et al.*, 2003).



**Figura 20.** Aldolasas dependientes de dihidroxiacetona fosfato: fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa (FBPA), tagatosa-1,6-bisfosfato aldolasa (TBPA), rhamnulosa-1-fosfato aldolasa (Rha-1PA) y fuculosa-1-fosfato aldolasa (Fuc-1PA). Los nuevos centros estereogénicos formados en la reacción aldólica se señalan con asteriscos.

Las aldolasas dependientes de DHAP presentan una gran especificidad por la cetona donadora, aunque toleran un amplio rango de aceptores (Clapés y Fessner, 2011), incluyendo aldehídos alifáticos poco impedidos, aldehídos con heteroátomos  $\alpha$ -sustituidos (Bednarski *et al.*, 1989), monosacáridos y sus derivados (Bednarski *et al.*, 1986). En general se considera que los aldehídos con impedimentos estéricos, los aromáticos y los  $\alpha,\beta$ -insaturados no pueden

ser sustrato de estas enzimas, aunque existen algunos ejemplos en la bibliografía en los cuales este tipo de sustratos son utilizados en la condensación aldólica (Espelt *et al.*, 2005; Calveras *et al.*, 2009; Sánchez-Moreno *et al.*, 2009a; Clapés y Fessner, 2011).

Una de las principales aplicaciones de las aldolasas dependientes de DHAP es la síntesis de inminociclitoles y aminociclitoles, que pueden actuar como inhibidores de glicosidasas y glicosiltransferasas por lo que presentan una potencial aplicación como antibióticos, antimetastásicos, antihiper glucémicos o inmunoestimuladores. Además, también pueden actuar como chaperonas químicas, asistiendo al plegamiento y estabilización de proteínas cuya inactivación es la causa de diversos desórdenes metabólicos (Okumiya *et al.*, 2007; Suzuki, 2008; Gómez *et al.*, 2012; Concia *et al.*, 2013).

La aplicación de aldolasas dependientes de DHAP a la síntesis de productos naturales distintos de carbohidratos es menos habitual. Moléculas complejas como el elicitor microbiano siringólido 2 (Chênevert y Dasser, 2000) o diversos análogos de la pancratistatina (Phung *et al.*, 2003) son ejemplos de esta aplicación. Otros productos naturales que se obtienen incluyendo el uso de una aldolasa dependiente de DHAP en su ruta sintética son la brevicomina (Schultz *et al.*, 1990), el fragmento C3-C9 de la aspilina (Chênevert *et al.*, 1997), el fragmento C11-C16 de la pentamicina (Shimagaki *et al.*, 1993) o el fragmento C12-C20 de la anfotericina (Malleron y David, 1996).

### **El problema de la dependencia de dihidroxiacetona fosfato**

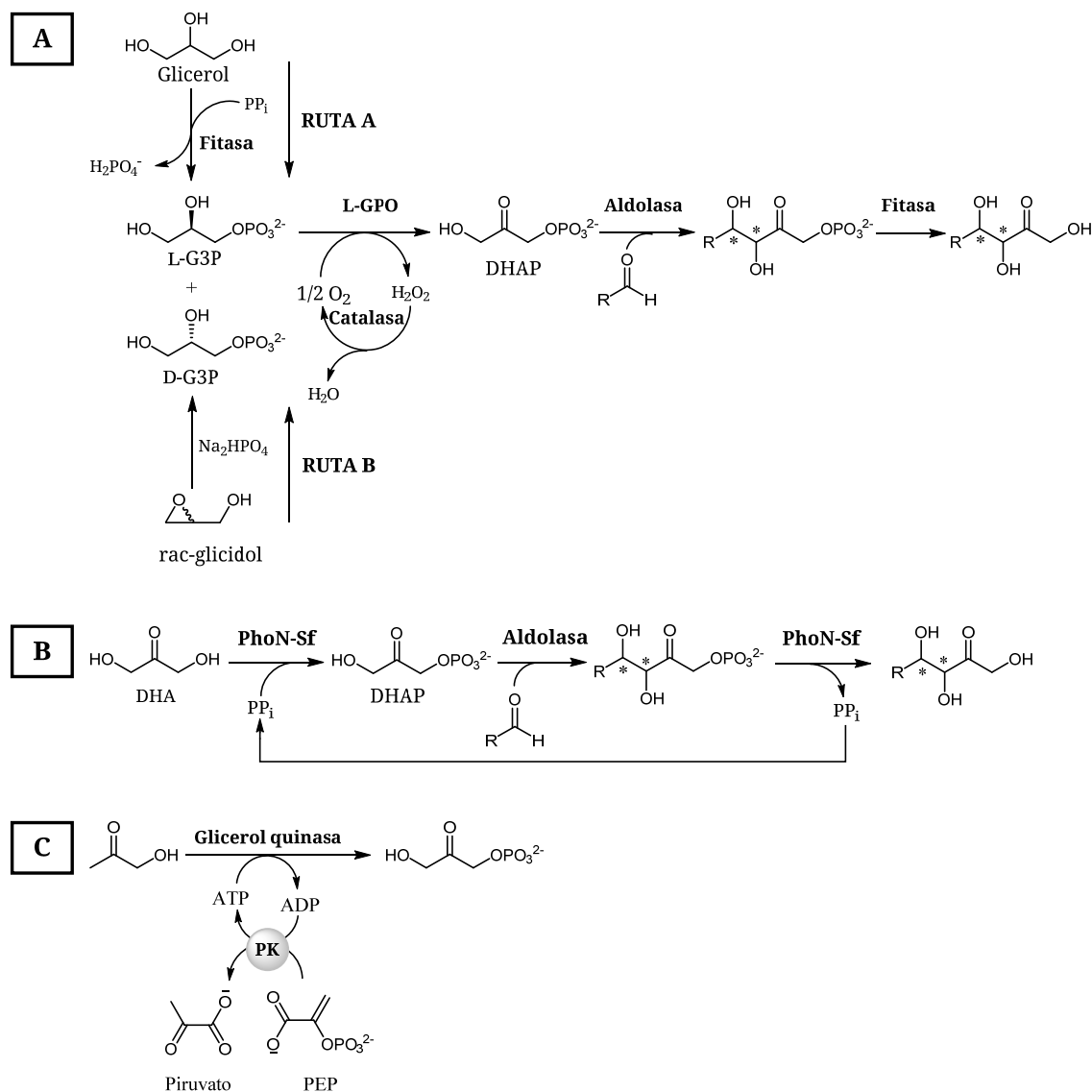
El principal inconveniente que presenta el uso de estas enzimas es su estricta especificidad por la DHAP. Este compuesto es un sustrato caro desde el punto de vista comercial, lo que impide su uso estequiométrico a gran escala, es lábil a pHs neutros y básicos, que es el intervalo óptimo para las aldolasas, produciéndose una disminución de la concentración efectiva de DHAP en el medio de reacción, y, además, limita las moléculas que se pueden obtener, ya que sólo es posible variar la mitad de la molécula correspondiente al aldehído. Algunos de los esfuerzos para superar la

dependencia de DHAP de las aldolasas son: (i) la formación *in situ* de ésteres de vanadato, arsenato o borato que actúan como miméticos del ester fosfato (Drueckhammer *et al.*, 1989; Crans *et al.*, 1992; Schoevaart *et al.*, 2001; Sugiyama *et al.*, 2006; Garrabou *et al.*, 2011), (ii) el uso de estrategias de evolución dirigida para modificar la especificidad de las aldolasas por el sustrato donador (Sugiyama *et al.*, 2007; Garrabou *et al.*, 2010; Garrabou *et al.*, 2011), (iii) el desarrollo de anticuerpos catalíticos y pequeños péptidos con actividad aldolasa (Goswani *et al.*, 2009; Wagner *et al.*, 1995), (iv) el diseño *de novo* de enzimas retroaldólicas (Jiang *et al.*, 2008) y (v) el uso de nuevas enzimas (Schürmann, y Sprenger, 2001; Garrabou *et al.*, 2009; Sánchez-Moreno *et al.*, 2012).

A pesar de estos esfuerzos para evitar la dependencia por la DHAP, todavía es necesario el desarrollo de un método eficiente para su preparación. Numerosos métodos químicos y enzimáticos han sido descritos en la literatura. En la síntesis química destacan aquellos procesos que comienzan a partir del dímero de DHA (Jung *et al.*, 1994; Charmantray *et al.*, 2004), o de la 1,3-dibromoacetona (Gefflaut *et al.*, 1997) ya que dan lugar a precursores estables de la DHAP. No obstante, estos métodos incluyen diversos pasos de protección/desprotección por lo que son rutas sintéticas largas, con distintos pasos de purificación, suelen tener elevados costes, bajos rendimientos y, en muchos casos, utilizan reactivos tóxicos.

Por otra parte la formación enzimática de la DHAP está normalmente acoplada a la reacción aldólica catalizada por una aldolasa. La DHAP puede ser preparada por oxidación del L-glicerol-3-fosfato (L-G3P) catalizada por una glicerofosfato oxidasa acoplada a una catalasa para la descomposición del peróxido de hidrógeno formado (Fessner y Sinerius, 1994). Este sistema multienzimático ha sido acoplado con la preparación *in situ* del D,L-G3P tanto a partir de la fosforilación enzimática del glicerol catalizada por la fosfatasa fitasa, como a partir de la apertura regioselectiva con fosfato del epóxido del *rac*-glicidol (Charmantray *et al.*, 2006). La generación *in situ* de la DHAP también puede llevarse a cabo mediante una reacción en cascada utilizando la fosfatasa ácida de *Shigella flexneri* y pirofosfato como fosfato donador (van Herk *et al.*, 2006). La fosforilación de DHA, usando ATP como donador del

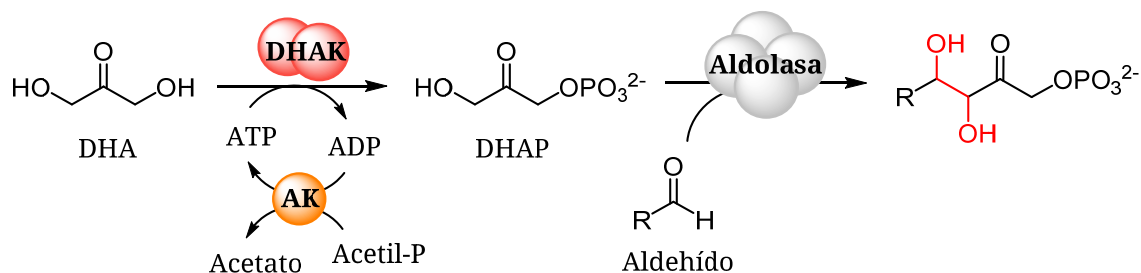
grupo fosfato, catalizada por una quinasa es otra estrategia para la obtención de DHAP. Esta aproximación fue descrita por primera vez en 1983 por Wong y Whitesides usando la enzima glicerol quinasa con regeneración del cofactor por una piruvato quinasa (Fig. 21).



**Figura 21.** Rutas enzimáticas de síntesis de DHAP basadas en el empleo de: (A) la glicerol fosfato oxidasa (GPO), (B) la fosfatasa ácida de *Shigella flexneri* (PhoN-Sf), (C) la glicerol quinasa (GK).

Nuestro grupo de investigación ha diseñado en los últimos años un sistema multienzimático que permite la formación “one-pot” de enlaces C-C utilizando DHA como donador inicial (Sánchez-Moreno *et al.*, 2004). Este sistema está basado en el uso de la DHAK dependiente de ATP de *Citrobacter*

*freundii* CECT 4626 para la fosforilación de la DHA (Sánchez-Moreno *et al.*, 2009b). La ruta descrita por nuestro grupo integra tres elementos en un único paso de reacción (Fig. 22): (i) la fosforilación de la DHA catalizada por la dihidroxiacetona quinasa (DHAK) de *C. freundii*; (ii) la reacción aldólica catalizada por la aldolasa y (iii) la regeneración de ATP catalizada por la acetato quinasa (AK) de *E. coli* usando acetilfosfato como donador de fosfato.

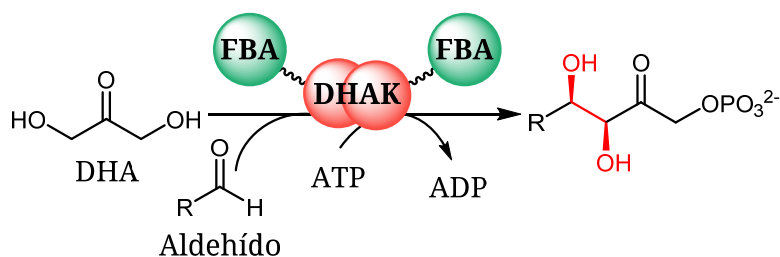


**Figura 22.** Sistema multienzimático para la síntesis de aldoles basado en la fosforilación de la DHA por la DHAK de *Citrobacter freundii*.

Este sistema permite la síntesis de DHAP en un único paso a partir de DHA comercialmente accesible, la utilización de cantidades catalíticas de ATP, que es un sustrato caro, empleando acetilfosfato como donador de fosfato en la regeneración, que es un sustrato fácilmente accesible (Crans y Whitesides, 1983), obteniendo de esta manera el aldol fosforilado. La utilidad de este sistema multienzimático ha sido probada con 3 aldolasas dependientes de DHAP y con una gran variedad de aldehídos comerciales (Sánchez-Moreno *et al.*, 2009a).

Con el fin de reducir el número de enzimas utilizadas y simplificar el sistema multienzimático, se diseñó una enzima bifuncional (DLF) que presenta las actividades quinasa y aldolasa en la misma cadena polipeptídica (Iturrate *et al.*, 2009; Iturrate *et al.*, 2010). Desde el punto de vista biotecnológico, esta enzima bifuncional presenta dos ventajas fundamentales frente a la utilización de las enzimas independientes: por un lado, supone un abaratamiento de la purificación ya que las dos actividades se encuentran en una única cadena polipeptídica; por otro lado, la proximidad que impone la fusión entre los centros activos que catalizan reacciones secuenciales supone un aumento en la velocidad de la reacción global que se puede interpretar en términos de *canalización del sustrato*. En la enzima DLF, la actividad quinasa

es aportada por la DHAK de *C. freundii* y, hasta ahora, esta enzima bifuncional se ha desarrollado con una única aldolasa, la fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa (FBPA) de *Staphylococcus carnosus* (Fig 23).



**Figura 23.** Síntesis de aldoles empleando una enzima de fusión bifuncional con actividad quinasa y aldolasa en la misma cadena polipeptídica.

No obstante, a pesar de la eficiencia de las nuevas metodologías desarrolladas para la formación de DHAP expuestas, que facilitan la aplicabilidad de las aldolasas dependientes de DHAP, y de la probada utilidad sintética de estas enzimas, todavía existen pocos procesos a escala industrial en los que estén involucradas las aldolasas y, hasta donde llega nuestro conocimiento, ninguno de ellos implica aldolasas dependientes de DHAP (Greenberg *et al.*, 2004; Castillo *et al.*, 2006; Wolberg *et al.*, 2008; Patel *et al.*, 2009).

## ENZIMAS DE ORGANISMOS HIPERTERMÓFILOS

A pesar de las importantes ventajas que ofrecen las enzimas como catalizadores y de la gran variedad de compuestos orgánicos que son capaces de sintetizar, su uso se ve muchas veces limitado —especialmente a nivel industrial— por la inestabilidad intrínseca que presentan en determinadas condiciones de reacción. Fundamentalmente esto es debido a que las enzimas han evolucionado para trabajar en medios acuosos y en un estrecho margen de pH y temperatura.

Una alternativa para superar este inconveniente puede ser el uso de enzimas de microorganismos extremófilos. Los microorganismos son capaces de adaptarse a las más variadas condiciones medioambientales y, así,

colonizar cualquier hábitat terrestre o marino. Aquellos capaces de sobrevivir bajo condiciones extremas de salinidad (halófilos), pH (acidófilos y alcalófilos), presión (barófilos, también llamados piezófilos) y temperatura (desde los psicrofílos hasta hipertermófilos) se denominan extremófilos (Tabla 2) (Niehaus *et al.*, 1999; van den Burg, 2003; Champdoré *et al.*, 2007; Canganella y Wiegel, 2011).

**Tabla 2.** Tipos de extremófilos, condiciones óptimas de crecimiento y generos más conocidos.

Tipo de extremófilo	Condiciones	Géneros más conocidos
Termófilos	$T_{opt}$ 50-80 °C	<i>Methanobacterium</i> , <i>Thermoplasma</i> , <i>Thermus</i> *, <i>Bacillus</i>
Hipertermófilos	$T_{opt}$ > 80 °C	<i>Aquifex</i> *, <i>Archaeoglobus</i> , <i>Hydrogenobacter</i> *, <i>Methanothermus</i> , <i>Pyrococcus</i> , <i>Pyrodictium</i> , <i>Pyrolobus</i> , <i>Sulfolobus</i> , <i>Thermococcus</i> , <i>Thermoproteus</i> , <i>Thermotoga</i> *
Psicrofílos	$T_{opt}$ < 20 °C	<i>Alteromonas</i> , <i>Psychrobacter</i> *
Acidófilos	$pH_{opt}$ < 3	<i>Acidianus</i> , <i>Desulfurolobus</i> , <i>Sulfolobus</i> , <i>Thiobacillus</i> *
Alcalófilos	$pH_{opt}$ > 8,5	<i>Natronobacterium</i> , <i>Natronococcus</i> , <i>Bacillus</i> *
Halófilos	3-25% de sales	<i>Haloarcula</i> , <i>Halobacterium</i> , <i>Haloferax</i> , <i>Halorubrum</i>
Piezófilos	$P > 1,3$ atm	<i>Chloroflexus</i> *, <i>Deinococcus</i> *, <i>Pyrococcus</i> , <i>Pyrolobus</i> , <i>Spirochaeta</i> *, <i>Thermus</i> *

\* Género del dominio *Bacteria*, el resto pertenece al dominio *Archaea*.

Consecuentemente, todas las macromoléculas de estos microorganismos, incluyendo proteínas, ácidos nucleicos y lípidos, están adaptadas para un correcto funcionamiento en esos ecosistemas. La aplicación de las enzimas de estos microorganismos en biocatálisis permite el uso de condiciones consideradas anteriormente como incompatibles con la utilización biocatalizadores (Tabla 3). Además, es muy probable que algunos extremófilos, especialmente aquellos pertenecientes al dominio *Archaea*,

pueden poseer rutas metabólicas desconocidas hasta el momento y, por lo tanto, ser el origen de enzimas con nuevas actividades y aplicaciones (Hough y Danson, 1999; Demirjian *et al.*, 2001; Champdoré *et al.*, 2007).

**Tabla 3.** Aplicaciones biotecnológicas según el tipo de extremófilo.

<b>Tipo de extremófilo</b>	<b>Enzimas</b>	<b>Aplicaciones</b>
Termófilos e hipertermófilos	Amilasas	Degradación del almidón
	Xilanasas	Blanqueamiento de papel
	Proteasas	Detergentes, alimentación
	ADN polimerasas	Biología molecular
Psicrófilos	Proteasas neutras	Industria láctea
	Proteasas	Detergentes
	Amilasas	Detergentes
	Lipasas	Detergentes
	Deshidrogenasas	Biosensores
Acidófilos	Oxidoreductasas	Desulfuración del carbón
Alcalófilos	Celulasas	Detergentes
	Proteasas	Detergentes
	Amilasas	Detergentes
	Lipasas	Detergentes
Halófilos	Bacteria entera	Bioremediación
	Hidrolasas	Alimentación, industria textil
Piezófilos	Bacteria entera	Industria alimentaria y farmacéutica

Las adaptaciones llevadas a cabo por los organismos termófilos son especialmente interesantes desde un punto de vista biocatalítico, ya que se requiere que las propias proteínas del microorganismo sean termoestables, mientras que la adaptación de los microorganismos sometidos a otros tipos de estrés —como el debido al pH o a la osmolaridad— no implica necesariamente la adaptación de sus proteínas debido a que el factor de estrés puede evitarse por el uso de mecanismos compensatorios (regulación del pH o síntesis de osmoprotectores) (Razvi y Scholtz, 2006).

Los microorganismos hipertermófilos son aquellos capaces de crecer a temperaturas superiores a 80 °C (Stetter, 2006). El origen de estos microorganismos ha sido muy debatido. Basándose en el análisis de la secuencia de las subunidades 16S y 18S de ARNr, se evidencia que los microorganismos hipertermófilos pertenecen exclusivamente a los dominios *Archaea* y *Bacteria*, ocupando las ramas más cercanas a la raíz del árbol filogenético (Fig. 24) (Woese *et al.*, 1990). Por consiguiente, la teoría actualmente más extendida en base a las evidencias circunstanciales, sugiere que estos microorganismos son los predecesores de los microorganismos mesófilos actuales (Woese *et al.*, 1998). Intuitivamente, esta teoría concuerda con las condiciones medioambientales terrestres presupuestas en el momento del origen de la vida. Por otra parte, otra teoría sugiere que los organismos termófilos evolucionaron a partir de los mesófilos para adaptarse a nuevos ambientes. Esta hipótesis se basa en la suposición de que el ARN ancestral no podría ser estable a tan elevadas temperaturas (Miller y Lazcano, 1995; Forterre, 1996).

Desde que en 1972 se descubriese el primer hipertermófilo de la especie *Sulfolobus* en Yellowstone (Brock *et al.*, 1972), se han identificado más de 80 de estos microorganismos a temperaturas cercanas o superiores a los 100 °C, tanto en zonas terrestres (solfataras volcánicas, géiseres), como en zonas marinas (fumarolas hidrotermales) e, incluso, en zonas industriales creadas por el hombre (Unsworth *et al.*, 2007). Entre los miembros de los microorganismos hipertermófilos con las temperaturas óptimas de crecimiento más altas se encuentran los géneros *Pyrobaculum*, *Pyrodictium*, *Pyrococcus*, *Pyrolobus* y *Methanopyrus*, en el dominio las *Archaea* (103-110 °C), mientras que en el dominio *Bacteria*, los representantes que exhiben mayor temperatura óptima son *Thermotoga maritima* y *Aquifex pyrophilus*, siendo 80 y 85 °C respectivamente.



Fig. 24. Árbol filogenético universal basado en la subunidad pequeña del ARNr. Las líneas rojas representan los organismos hipertermófilos (Stetter, 2006).

Como todos los seres vivos, los hipertermófilos se han adaptado a las condiciones en las que tiene que sobrevivir y reproducirse. Así, las membranas celulares de estos microorganismos contienen una gran cantidad de ácidos grasos saturados lo que aumenta su rigidez (Herbert y Sharp, 1992). En el caso de las arqueas, además, los ácidos grasos de la membrana están unidos entre sí, favoreciendo la resistencia térmica (de Rosa *et al.*, 1994). Con la misma intención, el ADN de los organismos hipertermófilos sufre un superenrollamiento positivo provocado por una ADN girasa reversa, lo que aumenta la temperatura de desnaturalización del material genético (López,

1999). Las proteínas sintetizadas por los microorganismos hipertermófilos, denominadas termozimas, no representan una excepción. Estas enzimas son termoestables, resistentes a la desnaturalización a altas temperaturas, y termófilas, es decir, su temperatura de actividad óptima está entre los 70 y los 125 °C. Además, se ha comprobado que las enzimas de organismos hipertermófilos presentan mayor resistencia a la desnaturalización que sus homólogas mesófilas (mesoenzimas) frente a otro tipo de condiciones desnaturalizantes como pHs extremos, presencia de disolventes orgánicos, osmolaridad y frente a la acción de proteasas (Vieille y Zeikus, 2001).

### **Mecanismos para la estabilidad en las enzimas hipertermófilas**

Durante los últimos años, se ha recabado suficientes evidencias experimentales como para concluir que no hay un único mecanismo para la gran termoestabilidad de las proteínas hipertermófilas. Además, no se han hallado aminoácidos, modificaciones covalentes ni motivos estructurales nuevos (Fields, 2001). Por lo tanto, el aumento de estabilidad se debe a la combinación de numerosas pequeñas modificaciones alcanzadas mediante el intercambio de unos aminoácidos por otros (de Vendittis *et al.*, 2008). Estas modificaciones están enfocadas principalmente en dos direcciones, el aumento de las interacciones intramoleculares y el incremento de la rigidez y compactación de la configuración estructural (Sternier y Libl, 2001; Vieille y Zeikus, 2001; Li *et al.*, 2005; Unsworth *et al.*, 2007; Littlechild *et al.*, 2007; Reed *et al.*, 2013). De entre las interacciones adicionales que contribuyen a la estabilidad cabe destacar los puentes de hidrógeno, las interacciones electroestáticas, las interacciones hidrofóbicas, las interacciones aromáticas, los puentes disulfuro y la unión a metales. En cuanto a la rigidificación y compactación de la estructura conformacional se lleva a cabo mediante el aumento en el porcentaje de la estructura en  $\alpha$ -hélice; estabilización de las  $\alpha$ -hélices con carácter dipolar gracias a la presencia de residuos cargados negativamente en el extremo N-terminal de las mismas; la disminución de zonas sin estructura en la proteína, tanto random coil (RC) como giros entre estructuras  $\alpha$ -hélice o  $\beta$ -lámina; relajación de la tensión conformacional; el

incremento de las interacciones entre subunidades en el caso de las proteínas oligoméricas; y una menor superficie expuesta al medio.

Aparte de los factores intrínsecos de cada proteína, existen factores extrínsecos que influyen en la estabilidad de la proteína dentro del contexto biológico de la célula. En el interior de los microorganismos hipertermófilos existe una amplia gama de pequeñas moléculas, normalmente derivados de azúcar como trehalosa, manosilglicerato y dimioinositolfosfato, cuya función es la estabilización de las proteínas. Además, las chaperoninas son proteínas especialmente sintetizadas por los microorganismos termófilos para ayudar en el repliegamiento en caso de desnaturalización proteica, restaurando la estructura nativa de la enzima y su funcionalidad (Everly y Alberto, 2000). Es necesario tener en cuenta también la alta concentración de macromoléculas y metabolitos existente en el interior de la célula, lo que ejerce un efecto estabilizador.

### **Aplicación biotecnológica de las enzimas hipertermófilas**

Gracias a la gran estabilidad exhibida por las enzimas hipertermófilas, éstas ofrecen la oportunidad de ampliar las condiciones de reacción en las que puede realizarse la biocatálisis ofreciendo, además, una serie de ventajas respecto a las enzimas de organismos mesófilos. Estas ventajas incluyen (i) una purificación más sencilla, ya que puede llevarse a cabo mediante un choque térmico; (ii) la estabilidad frente a disolventes orgánicos permite el uso de codisolventes para la solubilización de sustratos apolares, ampliándose por tanto el espectro de aplicabilidad sintética; (iii) el aumento de la temperatura de la reacción ayuda a la solubilización de compuestos poco solubles a bajas temperaturas y favorece los parámetros termodinámicos de las reacciones endotérmicas; (iv) disminuye la viscosidad de las reacciones; (v) evita la contaminación microbiana; (vi) en general este tipo de enzimas aguanta mayores concentraciones de sustrato y (vii) pueden ser almacenadas a temperatura ambiente (Haki y Rakshit, 2003; Li *et al.*, 2005; Unsworth *et al.*, 2007).

A pesar de estas y otras ventajas, a día de hoy sólo unos pocos procesos industriales utilizan termoenzimas, entre los que destacan (i) el uso de  $\alpha$ -amilasas, normalmente de *Bacillus licheniformis* o *Bacillus stearothermophilus*, en la etapa de licuefacción en la hidrólisis del almidón para la obtención de biofuel; (ii) la producción del edulcorante aspartamo (L-aspartil-L-fenilalanina metil ester) gracias a la termolisina de *Bacillus thermoproteolyticus*; (iii) el blanqueo de papel por xilanasas; (iv) la recuperación de metales valiosos mediante biooxidación por hipertermoacidófilos; (v) la bioremediación de la contaminación por productos fenólicos gracias a la cepa 98/2 de *S. solfataricus* y, por supuesto, (vi) el uso de las polimerasas y ADN ligasas en biología molecular. (Vieille y Zeikus, 2001; Atomi, 2005; Blumer-Schette *et al.*, 2008; Yeoman *et al.*, 2010; Atomi *et al.*, 2011; Frock y Kelly, 2012; Elleuche *et al.*, 2014).

El descubrimiento de nuevos microorganismos hipertermófilos y la caracterización de nuevas enzimas hipertermófilas permitirá en un futuro próximo ampliar la aplicación de estas enzimas tanto a nivel de laboratorio como en procesos los industriales.

### **Aldolasas dependientes de dihidroxiacetona fosfato de origen hipertermófilo**

A pesar de la gran utilidad sintética de las aldolasas dependientes de DHAP y de las ventajas asociadas a las proteínas termófilas, hasta la fecha solo han sido descritas una pequeña cantidad de estas enzimas (Falcicchio *et al.*, 2014).

Las aldolasas dependientes de DHAP pertenecientes a hipertermófilos más estudiadas hasta el momento han sido las FBPA debido al papel que desempeñan en la glucólisis y en la gluconeogénesis. Sin embargo, aunque las primeras FBPA termoestables de tipo II fueron caracterizadas justo después del descubrimiento de los microorganismos termófilos (Freeze y Brock, 1970), la identificación de las FBPA termoestables de tipo I en arqueas es relativamente reciente. Este hecho fue debido a la falta de reconocimiento de las secuencias genéticas codificantes para las proteínas de arqueas con

respecto a las bases de datos de las secuencias nucleotídicas recopiladas a partir de organismos eucariotas y bacterias (Verhees *et al.*, 2003). Únicamente después de la descripción de una inusual FBPA de tipo I de *E. coli* (Thomson *et al.*, 1998) fue posible la identificación *in silico* de las FBPA en arqueas (Galperin *et al.*, 2000). Posteriormente se han identificado y caracterizado otras FBPA de tipo I, como por ejemplo las provenientes de *Thermoproteus tenax* (Siebers *et al.*, 2001), *Pyrococcus furiosus* (Siebers *et al.*, 2001) y *Thermococcus kodakaraensis* (Imanaka *et al.*, 2002). De la misma manera se han descrito diversas FBPA de tipo II, incluyendo las de *Haloferax volcanii* (Pickl *et al.*, 2012), *Thermus caldophilus* (Lee *et al.*, 2006) y *Aquifex aeolicus* (La *et al.*, 2009). Un caso particular es la existencia de una enzima bifuncional FBPA/fosfatasa en los fila *Aquificae*, *Chloroflexi*, *Firmicutes*, *Deinococcus-Thermus*. Esta extraordinaria enzima produce la formación de la termolábil FBP e inmediatamente la desfosforila a fructosa-6-fosfato, que es más estable en esas condiciones (Say y Fuchs, 2011).

Hasta ahora, no se ha identificado ninguna TBPA hipertermófila, si bien debe tenerse en cuenta que la base molecular para la discriminación por el sustrato no es del todo clara (Zgiby *et al.*, 2000; Galkin *et al.*, 2009). Cuando se probó la estereoselectividad en la reacción aldólica utilizando la FPBA de *T. caldophilus* se llegó a una mezcla de FBP y tagatosa-1,6-bisfosfato (TBP) (Lee *et al.*, 2006). Esta enzimas presenta, además, una mayor homología de secuencia aminoacídica con la TBPA (43%) de *E. coli* que con la FBPA (22%) del mismo microorganismo.

En cuanto a las Fuc-1PA han sido descritas tres, aisladas de *Thermus thermophilus* (Jeyakanthan *et al.*, 2005), *Thermoanaerobacter ethanolicus* (Babic *et al.*, 2011) y *Methanocaldococcus jannaschii* (Choi *et al.*, 1998). Todas ellas han sido utilizadas para la formación de diversos compuestos polihidroxilados en cascadas multienzimáticas (Li *et al.*, 2011; Babich *et al.*, 2011).

Por último, únicamente se ha descrito un gen (TM1072) que codifique para una rhamnulosa-1-fosfato aldolasa de origen hipertermófilo. Este enzima pertenece a *T. maritima* (Osipiuk *et al.*, 2003), una bacteria hipertermófila con una temperatura óptima de crecimiento de 80 °C (Hubert *et al.*, 1986).

Como se ha mostrado a lo largo de la presente introducción, la formación enzimática de enlaces C-C, en concreto empleando aldolasas dependientes de DHAP para la obtención de derivados polihidroxiados quirales, es muy interesante desde el punto de vista de la síntesis orgánica. A pesar de ello, todavía existen pocos procesos a escala industrial en los que estén involucradas estas enzimas y, por lo tanto, la búsqueda de nuevas enzimas con mejores características desde el punto de vista biocatalítico es aun necesaria. Por todo lo anteriormente mencionado, la presente Tesis Doctoral trata sobre la caracterización funcional y el estudio de la aplicabilidad como biocatalizador de la rhamnulosa-1-fosfato aldolasa de *T. maritima*.

# **OBJETIVOS**



Puesto que una de las mayores limitaciones que presenta el uso de aldolasas en síntesis orgánica —sobre todo desde el punto de vista de su aplicación industrial— es su inestabilidad intrínseca en función de la temperatura, del pH o de la presencia de cosolventes orgánicos, el objetivo que nos planteamos al iniciar esta Tesis Doctoral fue el de obtener y caracterizar un nuevo biocatalizador que permitiera la formación de enlaces C-C en un amplio rango de condiciones de reacción. Nos centramos en la obtención y en el estudio integral como biocatalizador de una enzima termófila, en concreto la rhamnulosa-1-fosfato aldolasa de *Thermotoga maritima*.

Teniendo en cuenta este objetivo general, los objetivos concretos planteados fueron los siguientes:

- Clonaje, sobreexpresión heteróloga y posterior purificación de dos construcciones diferentes de la Rha-1PA de *T. maritima* incorporando o no una cola de histidinas.
- Caracterización bioquímica de las dos versiones de la enzima recombinante:
  - Determinación del mecanismo catalítico.
  - Cálculo de los parámetros cinéticos.

## OBJETIVOS

---

- Análisis de la estructura.
- Determinación de las condiciones óptimas de reacción.
- Estudio de la estabilidad frente a la temperatura y la presencia de disolventes en el medio.
- Análisis del efecto de la presencia de la cola de histidinas y del cofactor en la estructura secundaria y la termoestabilidad de la proteína.
- Estudio de su aplicabilidad sintética:
  - Análisis de su compatibilidad con un sistema multienzimático aldolasa/quinasa para la formación de enlaces C-C.
  - Aplicación en reacciones quimioenzimáticas para la síntesis de análogos nitrogenados de azúcares.

# **MATERIALES Y MÉTODOS**



### MATERIALES

Las cepas bacterianas utilizadas para la realización de este trabajo han sido: DH5 $\alpha$  y BL21 (DE3) de *Escherichia coli* (Promega) y MSB8 de *Thermotoga maritima* (DMSZ).

El plásmido pGEM-T easy se adquirió en Promega y el plásmido pET-28b(+) fue suministrado por Novagen.

Los oligonucleótidos utilizados como cebadores de PCR se obtuvieron en Isogen. La EcoTaq ADN polimerasa fue adquirida en Ecogen y tanto el patrón de tamaño molecular de 1 kb *DNA Ladder* como las endonucleasas de restricción *NdeI*, *NcoI* y *HindIII* y la T4-ADN ligasa se adquirieron en MBI Fermentas.

La purificación de fragmentos de ADN a partir de bandas de gel de agarosa se realizó con el kit *Perfectprep*<sup>®</sup> *Gel Cleanup* de Eppendorf. El kit *GenElute*<sup>™</sup> *Plasmid Miniprep* de Sigma se usó para la obtención de plásmidos a partir de cultivos bacterianos.

La solución de acrilamida/bisacrilamida 30% (29:1), así como el reactivo de Bradford, fueron adquiridos en Bio-Rad. El patrón de pesos moleculares *Low Molecular Weight Calibration Kit* fue adquirido en GE Healthcare. Los geles de proteína fueron teñidos con Coomassie brilliant blue R-250.

Las enzimas acetato quinasa (AK), aldehído deshidrogenasa (ADH), proteinasa K de *Tritirachium album*, ARNasa,  $\alpha$ -glicerofosfato deshidrogenasa ( $\alpha$ -GDH) y  $\alpha$ -glicerofosfato deshidrogenasa con triosa fosfato isomerasa ( $\alpha$ -GDH/TIM) se obtuvieron en Sigma-Aldrich. La lisozima fue adquirida a USB Corporation y la ADNasa I a Roche. El isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido (IPTG) y el imidazol fueron suministrados por Acros Organics. Los antibióticos sulfato de estreptomicina, sulfato de kanamicina y ampicilina, además del ATP, el acetilfosfato, el NADH, los distintos aldehídos comerciales utilizados (benciloxiacetaldehído (**1b**), fenilacetaldehído (**1c**) y etil-3-metil-4-oxocrotonato (**1d**)) y el resto de reactivos de rutina fueron adquiridos en Sigma-Aldrich.

La dihidroxiacetona quinasa (DHAK) de *Citrobacter freundii* ha sido clonada en nuestro laboratorio (Sánchez-Moreno *et al.*, 2004; Sánchez-Moreno *et al.*, 2009a), así como las enzimas fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa (FBPA) de *Staphylococcus carnosus* y rhamnulosa-1-fosfato aldolasa (Rha-1PA) de *E. coli* (Iturrate *et al.*, 2009).

Las diálisis se llevaron a cabo con membranas *Spectra/Por*<sup>®</sup> (Spectrum) con un *cut-off* de 12.000-14.000 Da.

Los componentes del medio de cultivo LB (extracto de levadura, triptona y agar) y la agarosa D-1 Medium EEO fueron suministrados por Pronadisa.

La amplificación del ADN se realizó en un *Mastercycler Personal* de Eppendorf. Los geles de agarosa para la electroforesis de ADN se resolvieron en una cubeta *RunOne*<sup>™</sup> *Electrophoresis Cell* de Embitec. Los geles de acrilamida/bisacrilamida para SDS-PAGE de proteínas se resolvieron en una cubeta *MiniProtean*<sup>®</sup> 3 de Bio-Rad. Para el análisis densitométrico de geles de los agarosa y de acrilamida/bisacrilamida se empleó un fotodocumentador *Gene Flash Bio Imaging* de Syngene LTD con el programa GeneTools 3.07.

Los cultivos celulares fueron incubados en un agitador orbital termostatzado *Lab-Shaker* de Adolf Kühner AG.

Agarose Bead Technologies (ABT) suministró la resina de Ni<sup>2+</sup>-IDA-Agarosa de alta capacidad (30-40  $\mu\text{mol Ni}^{2+} \text{ ml}^{-1}$  de resina; IDA: ácido iminoacético) y Bio-Rad las columnas cromatográficas *Glass Econo-Column*<sup>®</sup> ( $\varnothing=2,5 \text{ cm}$ ). Para

la purificación de las proteínas Rha-1PA de *T. maritima*, Rha-1PA de *E. coli* y DHAK de *C. freundii* se utilizó una columna de exclusión molecular HiLoad 26/60 Superdex™ 200 PG controlada por un sistema AKTA-FPLC de GE Healthcare Life Science. La purificación por choque térmico de la Rha-1PA de *T. maritima* se realizó en un Multi-Block Heater. Todas las muestras de proteína pura se liofilizaron en un liofilizador *Lioalfa 6* de Telstar.

Por último, para los ensayos espectrofotométricos se empleó en un espectrofotómetro UV-Visible *SPECTRAMax-384 PLUS* de Molecular Devices.

## MÉTODOS

Las técnicas básicas de manipulación de ADN (PCR, clonaje, ligamiento, transformación, etc.) se realizaron según se describe en Sambrook *et al.*, 1989.

Los diferentes fragmentos de ADN se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 0,8% en Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM (TAE) a pH 8 con bromuro de etidio ( $0,4 \mu\text{g ml}^{-1}$ ).

La secuenciación del gen TM1072 de *T. maritima* se realizó en el Centro de Secuenciación de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid.

### **Obtención de la proteína rhamnulosa-1-fosfato aldolasa de *T. maritima***

#### **Amplificación del gen TM1072**

El gen TM1072, de 711 pb, que codifica putativamente para la proteína L-rhamnulosa-1-fosfato aldolasa de *T. maritima* fue amplificado mediante PCR.

Para la obtención del ADN genómico se utilizó sedimento seco procedente de una sola colonia de la cepa MSB8 de *T. maritima* (DMSZ 3109). Una pequeña cantidad del sedimento fue sometida a lisis en 40 µl de buffer específico conteniendo tampón Tris-HCl (50 mM, EDTA 50 mM, pH 8), Tween 20 (0,5%), Tritón X-100 (0,5%), lisozima (40 µg), ARNasa (32 µg) y proteinasa K de *T. album* (32,3 U). La mezcla se incubó con agitación orbital (150 rpm) a 37 °C durante una hora (Kim *et al.*, 1993).

Las secuencias de los cebadores diseñados para la amplificación del gen se detallan en la Tabla 1MM. Dependiendo de la necesidad de la presencia (secuencia de restricción *NdeI*), o ausencia (secuencia de restricción *NcoI*) de colas de histidina en la proteína, dos oligonucleótidos portando diferentes secuencias de restricción fueron usados como oligonucleótidos cebadores del extremo N-terminal.

**Tabla 1 MM.** Secuencia de los cebadores diseñados para la amplificación del gen TM1072.

Extremo	Diana	Oligonucleótido <sup>[a]</sup>
<i>Fr1patm</i> (N-t)	<i>NdeI</i>	5' TATAACATATGATGAGAGAGACGATA 3'
<i>Fr1patmsht</i> (N-t)	<i>NcoI</i>	5' TATAAACCATGGGCATGAGAGAGACGATA 3'
<i>Rr1patm</i> (C-t)	<i>HindIII</i>	5' TATAAAAGCTTTCACAGCCATCCCTC 3'

<sup>[a]</sup> Las bases subrayadas se corresponden con las secuencias diana de la correspondiente enzima de restricción.

La amplificación del gen TM1072 con colas de histidina (*r1patm*) y sin colas de histidina (*r1patmsht*) se llevó a cabo por separado en reacciones de 10 µl que contenían como molde 0,1 µl de dilución 1:3 de lisado celular/H<sub>2</sub>O. Se realizaron 30 ciclos de reacción. La composición de las reacciones y los ciclos de temperatura utilizados se detallan en la Tabla 2MM.

**Tabla 2MM.** Condiciones de reacción para la amplificación por PCR del gen TM1072.

Condiciones de reacción (10 $\mu$ l)	Tampón 10x	1 $\mu$ l
	MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	0,8 $\mu$ l
	dNTPs (10 mM)	1 $\mu$ l
	Template	0,1 $\mu$ l
	H <sub>2</sub> O mili-Q	6,8 $\mu$ l
	Cebador N-t	0,1 $\mu$ l
	Cebador C-t	0,1 $\mu$ l
	EcoTaq (5 U $\mu$ l <sup>-1</sup> )	0,1 $\mu$ l
Ciclo de T <sup>a</sup>	Desnaturalización	94 °C-1 min
	Anillamiento	50 °C-1,5 min
	Elongación	72 °C-2 min

## Clonaje del gen TM1072

Ambos productos de la reacción de amplificación fueron purificados a partir del gel de agarosa (0,8%) y ligados en primer lugar con el vector pGEM-T easy (3015 pb) según el protocolo del fabricante. Este es un plásmido contiene un gen que proporciona resistencia al antibiótico ampicilina.

Las construcciones pGEM-*r1patm* y pGEM-*r1patmsht* se utilizaron para transformar células competentes DH5 $\alpha$  de *E. coli* que se incubaron sobre sendas placas de LB-agar que contenían 250  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> de ampicilina, IPTG (0,5 mM) y X-Gal (5-Bromo-4-cloro-3-indolil  $\beta$ -D-galactopiranosido; 80  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>) para realizar un chequeo de colonias blancas y azules. Se seleccionaron 10 colonias blancas al azar de cada plásmido en las que se examinó por PCR la presencia del gen requerido. Aquellas que dieron positivo se crecieron en 10 ml de LB con 250  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> de ampicilina a 37 °C O/N.

Como vector de expresión se eligió el plásmido pET-28b(+). Este plásmido, de 5369 pb proporciona resistencia al antibiótico kanamicina, tiene un promotor que da altos niveles de expresión de la proteína recombinante y, además, puede expresar la proteína fusionada a un pequeño péptido en el extremo N-terminal que contiene 6 histidinas en función de las secuencias de restricción elegidas en los oligonucleótidos cebadores. La cola de histidinas (His-tag) presenta una gran afinidad a metales divalentes lo que posibilita la purificación de la proteína a partir del extracto crudo soluble total (CFE) mediante cromatografía de afinidad a iones metálicos inmovilizados (IMAC).

El gen *r1patm* se subclonó en el vector pET-28b(+) entre las dianas específicas de las enzimas de restricción de *NdeI* y *HindIII*, dando lugar al plásmido pET-28b(+)-*r1patm*, mientras que el gen *r1patmsht* se subclonó en el mismo tipo de vector entre las dianas específicas de las enzimas de restricción de *NcoI* y *HindIII*, obteniéndose plásmido pET-28b(+)-*r1patmsht*. Cada una de las construcciones en los plásmidos pGEM, así como el pET-28b(+), se digirieron en reacciones de 100  $\mu$ l que contenían 200 U de cada una de las enzimas de restricción antes mencionadas siguiendo las instrucciones del proveedor. Tras la purificación de los plásmidos pET-28b(+) linealizados y de los genes *r1patm* y *r1patmsht* a partir de los geles de agarosa, se procedió a la ligación por separado de cada uno de los insertos en el vector correspondiente utilizando una relación vector/inserto 1:7, T4-ADN ligasa y 10x ADN ligasa buffer.

Los vectores de expresión pET-28b(+)-*r1patm* y pET-28b(+)-*r1patmsht* así contruidos se utilizaron para transformar células competentes BL21 (DE3) de *E. coli* que después se cultivaron sobre placas de LB-agar que contenían 26,3  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> de kanamicina. De las colonias que crecieron en estas condiciones se seleccionaron 10 de las transformadas con cada tipo de construcción al azar y se chequearon por PCR para asegurar la presencia del gen esperado. Todos los plásmidos obtenidos se secuenciaron usando el cebador de secuenciación del promotor de la T7-ADN polimerasa, verificando así la secuencia completa del gen TM1072.

## **Sobreexpresión de la rhamnulosa-1-fosfato aldolasa de *T. maritima***

La sobreexpresión de la proteína L-rhamnulosa-1-fosfato aldolasa de *T. maritima*, con (Rha-1PA Tm) o sin (Rha-1PA Tm SHT) colas de histidinas, se realizó seleccionando una de las cepas que contenían el plásmido con el gen correspondiente y se creció en medio LB con kanamicina ( $26,3 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) a  $37^\circ\text{C}$  con agitación orbitálica (130 rpm) hasta que el cultivo llegó a una  $\text{O.D}_{600\text{nm}} \sim 0,5$ . En ese momento la expresión de la proteína se indujo con IPTG ( $0,4 \text{ mM}$ ) y el cultivo se mantuvo a  $30^\circ\text{C}$  durante toda la noche. Para la extracción de proteínas, los cultivos se centrifugaron a  $1.900 \text{ g}$  durante  $30 \text{ min}$  a  $4^\circ\text{C}$  y las células se sometieron a tratamiento con lisozima. Posteriormente se desechó el sobrenadante y las células se resuspendieron en tampón Tris-HCl ( $50 \text{ mM}$ ;  $\text{pH } 8,0$ ;  $8 \text{ ml g}^{-1}$  de células) y se añadió lisozima ( $2 \text{ mg ml}^{-1}$ ) en una disolución de EDTA ( $50 \text{ mM}$ ;  $\text{pH } 8,2$ ) (Bastida *et al.*, 2001). Esta suspensión se sometió a agitación magnética fuerte a temperatura ambiente durante una hora y después se mantuvo en agitación a  $4^\circ\text{C}$  durante toda la noche. A la solución viscosa obtenida se le añadieron  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  de ADNasa y  $0,95 \mu\text{g ml}^{-1}$  de  $\text{MgCl}_2$  y se agitó a  $4^\circ\text{C}$  durante  $20 \text{ min}$ . Posteriormente, se centrifugó durante  $30 \text{ min}$  a  $15.600 \text{ g}$  y a  $4^\circ\text{C}$ . Al sobrenadante resultante se le añadió un 1% de sulfato de estreptomicina para precipitar los ácidos nucleicos, se mantuvo con agitación magnética fuerte durante  $20 \text{ min}$  a  $4^\circ\text{C}$  y después se centrifugó durante  $30 \text{ min}$  a  $15.600 \text{ g}$  y a  $4^\circ\text{C}$  para obtener el extracto crudo celular (CFE).

La expresión de la proteína recombinante se analizó mediante SDS-PAGE en geles al 13% en la zona de separación.

## **Purificación de la rhamnulosa-1-fosfato aldolasa de *T. maritima***

La proteína Rha-1PA de *T. maritima* con colas de histidina se purificó en dos pasos a partir de extracto de proteína soluble. En primer lugar se sometió el CFE a choque térmico a  $60^\circ\text{C}$  durante  $20 \text{ min}$  y se centrifugó a  $4^\circ\text{C}$  durante

30 min a 16.000 g. Posteriormente, se recogió el sobrenadante y se realizó una segunda purificación por IMAC para lo cual fue necesario empaquetar, en minicolumnas cromatográficas ( $\varnothing=0,7$  cm de Bio-Rad), 5 ml de resina de Ni<sup>2+</sup>-IDA-Agarosa de alta densidad que se lavó con 5 volúmenes de H<sub>2</sub>O por volumen de resina y se equilibró con 10 volúmenes de tampón fosfato sódico (20 mM; pH 7,5). A continuación se cargó con 1 volumen de CFE y se lavó con 10 volúmenes del tampón anteriormente citado con el fin de eliminar todas aquellas proteínas que se hubieran quedado retenidas de forma inespecífica. Para eluir la Rha-1PA Tm se usó tampón fosfato sódico (20 mM; pH 7,5), que contenía imidazol (0,5 M). Todas las fracciones se analizaron mediante SDS-PAGE en geles al 13%.

Las fracciones que contenían proteína fueron dializadas frente a H<sub>2</sub>O mili-Q a pH 7,0-7,5 eliminando de esta manera las sales y el imidazol. La diálisis se dejó O/N a 4 °C con agitación suave. El dializado se dividió en alícuotas de aproximadamente 5 ml y se congeló con nitrógeno líquido para su posterior liofilización. Éste liofilizado se conservó a 4 °C hasta su utilización.

Para la purificación de la proteína recombinante sin colas de histidina se utilizó la cromatografía de exclusión molecular precedida de un choque térmico como el previamente descrito. Se usó una columna cromatográfica HiLoad 26/60 Superdex<sup>TM</sup> 200 PG. La fase móvil empleada fue tampón fosfato (50 mM; pH 7,2) que contenía NaCl (0,5 M), con flujo constante de 1 ml min<sup>-1</sup>. Todas las fracciones se analizaron mediante SDS-PAGE en geles al 13%. Las fracciones conteniendo Rha-1PA Tm recogidas fueron sometidas a diálisis y posterior liofilizado como se ha descrito previamente.

### **Quelación de los metales divalentes del centro catalítico**

Cuando fue necesario, la Rha-1PA de *T. maritima* purificada se incubó con EDTA (100 mM) durante una hora a 80 °C para retirar completamente los metales divalentes presentes en el centro catalítico. Para eliminar las posibles enzimas precipitadas por desnaturalización tras este tratamiento se centrifugó durante 30 min a 15.600 g y a 4 °C. Este tratamiento se realizó de forma previa a la diálisis y a la posterior liofilización.

## **Saturación del centro catalítico con $\text{Co}^{2+}$**

De forma análoga a la quelación con EDTA de los metales divalentes, para cambiar los iones presentes en el centro catalítico por  $\text{Co}^{2+}$  la enzima purificada fue tratada con  $\text{Co}^{2+}$  (0,2 mM) durante una hora a 80 °C. Para eliminar las posibles enzimas precipitadas por desnaturalización tras este tratamiento se centrifugó durante 30 min a 15.600 g y a 4 °C. Este tratamiento se realizó de forma previa a la diálisis y a la posterior liofilización.

## **Análisis de la proteína**

### **Análisis de aminoácidos**

El análisis de aminoácidos se realizó por triplicado en el Servicio de Química de Proteínas del Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), en un analizador *Biochrom 20* (Pharmacia). Tras la hidrólisis ácida de la proteína, los aminoácidos se separaron mediante cromatografía de intercambio catiónico y su identificación fue mediante derivatización postcolumna con ninhidrina. La cuantificación exacta de la concentración de proteína en la muestra analizada permitió calcular el coeficiente de extinción molar experimental para la Rha-1PA Tm y la Rha-1PA Tm SHT a 280 nm, valorando la absorbancia a esta longitud de onda a concentraciones crecientes de proteína, siendo  $\epsilon^{280}=32.161 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  y  $\epsilon^{280}= 32.306 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , respectivamente.

### **Cuantificación de la rhamnulosa-1-fosfato aldolasa de *T. maritima***

La valoración de la cantidad de proteína en el caso de existir mezcla de diferentes proteínas como el CFE, se realizó con el reactivo de Bradford con detección a 595 nm (Bradford, 1976).

En muestras de proteína pura la concentración de la enzima fue calculada por la ecuación de Lambert-Beer ( $\text{Abs} = C \epsilon L$ ), que relaciona la absorbancia con la concentración. Los espectros de absorbancia se realizaron a

temperatura ambiente entre 200 y 400 nm en cubetas de cuarzo con un paso óptico de 1 cm.

### **Determinación de la huella peptídica**

El análisis de la huella peptídica se realizó usando proteína purificada en la Unidad de Proteómica del Centro Nacional de Biotecnología (CSIC). La muestra fue digerida con tripsina a 37 °C durante una noche y, posteriormente, la huella peptídica se generó por análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF-TOF. Las masas de los péptidos resultantes, se combinaron y enfrentaron a una base de datos de proteínas (NCBIInr) que contiene todas las proteínas secuenciadas de disponibilidad pública. Mediante el motor de búsqueda Mascot (Perkins *et al.*, 1999) se compararon las masas trípticas teóricas de todas las proteínas contenidas en la base de datos con las masas experimentales obtenidas a partir de la muestra.

### **Obtención de los sustratos naturales**

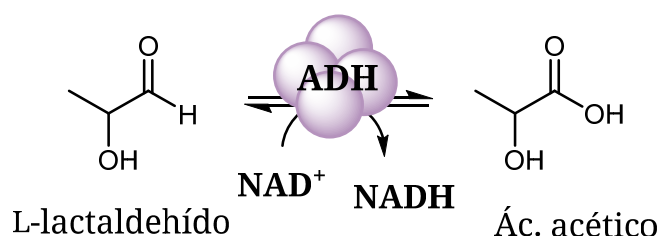
Los sustratos naturales de la Rha-1PA de *T. maritima* (L-lactaldehído, dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y rhamnulosa-1-fosfato (Rha-1P)) fueron sintetizados para medir la actividad, tanto aldólica como retroaldólica, de la enzima.

### **Síntesis de L-lactaldehído**

El L-lactaldehído se preparó siguiendo un protocolo previamente descrito (Zagalak *et al.*, 1966). Una mezcla de 600 ml de tampón citrato sódico (50 mM; pH 5,4) conteniendo ninhidrina (9,1 g; 51 mmoles) y D-treonina (3 g; 25 mmoles) se llevó a ebullición con agitación magnética fuerte y a reflujo durante 15 min. La solución obtenida se dejó enfriar, se filtró y se lavó el sólido con H<sub>2</sub>O mili-Q. El filtrado (color rojo-violeta) fue sometido a sucesivos pasos de intercambio iónico: (i) primero se trató con Dowex 1x8 en su forma activada HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> hasta subir el pH a 6,5 y se mantuvo en agitación durante 2-3

horas, (ii) después se filtró y el filtrado se trató con Dowex 50x4 en su forma activa  $H^+$  hasta bajar el pH a 4 (iii) se filtró de nuevo y el filtrado se concentró por evaporación a vacío hasta un volumen de 100 ml aproximadamente. Estos pasos de intercambio iónico y evaporación se repitieron hasta que la disolución quedó incolora y en presencia de la resina de intercambio aniónico a pH 7,5 ésta no cambio de color, llegando a un volumen final de 20-30 ml.

La valoración de la concentración de L-lactaldehído en la disolución final se realizó mediante un ensayo enzimático (Fig. 1MM). El L-lactaldehído es oxidado a ácido acético por acción de la enzima aldehído deshidrogenasa en presencia de  $NAD^+$ . Esta reacción se puede seguir espectrofotométricamente midiendo el aumento de la absorbancia a 340 nm debido a la formación de NADH, que es directamente proporcional a la concentración de L-lactaldehído. La valoración se realizó a temperatura ambiente en ensayos de 7,5 min en un volumen final de 1 ml, conteniendo Tris-HCl (50 mM; pH 8,0),  $NAD^+$  (0,4  $\mu$ moles) y ADH (1,5 U). El volumen de muestra añadido varió entre 0,5 y 2  $\mu$ l en función de la concentración del L-lactaldehído.

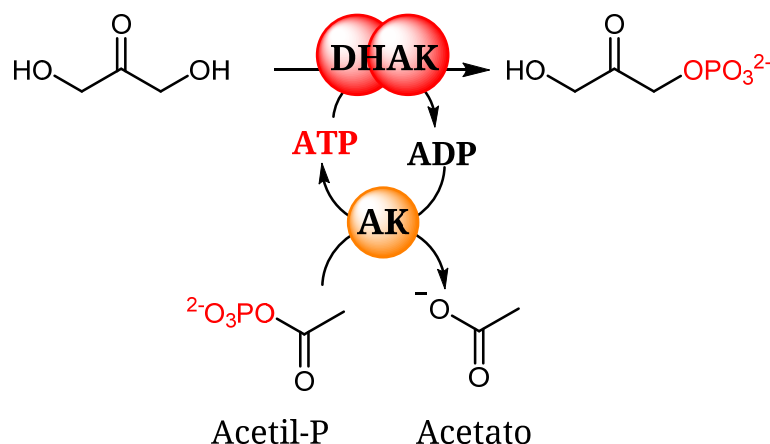


**Figura 1MM.** Ensayo enzimático para la valoración de la concentración de L-lactaldehído.

## Síntesis de dihidroxiacetona fosfato

La fosforilación de dihidroxiacetona (DHA) a escala de 1 mM se realizó según se describe en Sánchez-Moreno *et al.*, (2009a) (Fig. 2MM). A 20 ml de tampón HEPES (20 mM; pH 7,5), se añadieron DHA (1 mmol),  $MgSO_4$  (0,25 mmoles), acetilfosfato (2 mmoles), dihidroxiacetona quinasa (DHAK) de *Citrobacter freundii* (60 U) y AK (60 U). La reacción se inició con la adición de ATP (35  $\mu$ moles). Cuando la acumulación de DHAP superó el 95%, el pH de la

mezcla se ajustó a 5,0 para minimizar la degradación de la DHAP y posibilitar su almacenamiento y posterior utilización. Para reacciones a mayor escala de sustrato se mantuvieron las relaciones indicadas de volumen y concentración de los reactivos.



**Figura 2MM.** Sistema de fosforilación de DHA catalizada por la DHAK de *C. freundii* CECT 4626 con regeneración de ATP mediante la AK de *E. coli*.

## Síntesis de L-rhamnulosa-1-fosfato y L-fuculosa-1-fosfato

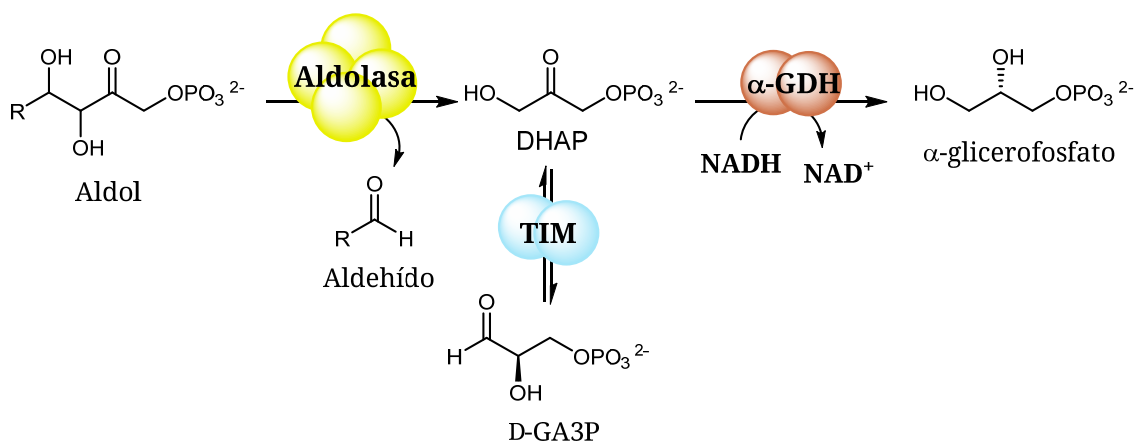
La Rha-1P y la Fuc-1P se sintetizaron utilizando el sistema multienzimático previamente descrito en nuestro laboratorio (Sánchez-Moreno *et al.*, 2004), a escala de 1 mmol de DHA. La reacción se llevó a cabo en 30 ml de tampón HEPES (20 mM; pH 7,5) que contenía DHA (1 mmol), L-lactaldehído (1,5 mmoles), acetilfosfato (2 mmoles), ATP (68  $\mu$ moles), MgSO<sub>4</sub> (250  $\mu$ moles), ZnCl<sub>2</sub> (0,3  $\mu$ moles), DHAK (15 U), AK (30 U) y aldolasa (Rha-1PA o Fuc-1PA de *E. coli*) purificada. La actividad de esta aldolasa se valoró *a posteriori*, comprobándose que correspondía a 10 U. Durante toda la reacción fue necesario ajustar el pH a 7,5 de forma continua.

Tanto la Rha-1P como la Fuc-1P fueron purificadas por precipitación con BaCl<sub>2</sub> y posterior cromatografía de intercambio aniónico (Sims y Reed 2005).

## Análisis de la actividad enzimática

### Valoración de la actividad aldolasa

La actividad aldolasa se evaluó mediante valoración espectrofotométrica de la DHAP formada durante la catálisis de la reacción retroaldólica según se ilustra en la Figura 3MM.



**Figura 3MM.** Ensayo enzimático de actividad aldolasa mediante valoración de la DHAP formada en la reacción retroaldólica con α-GDH/TIM.

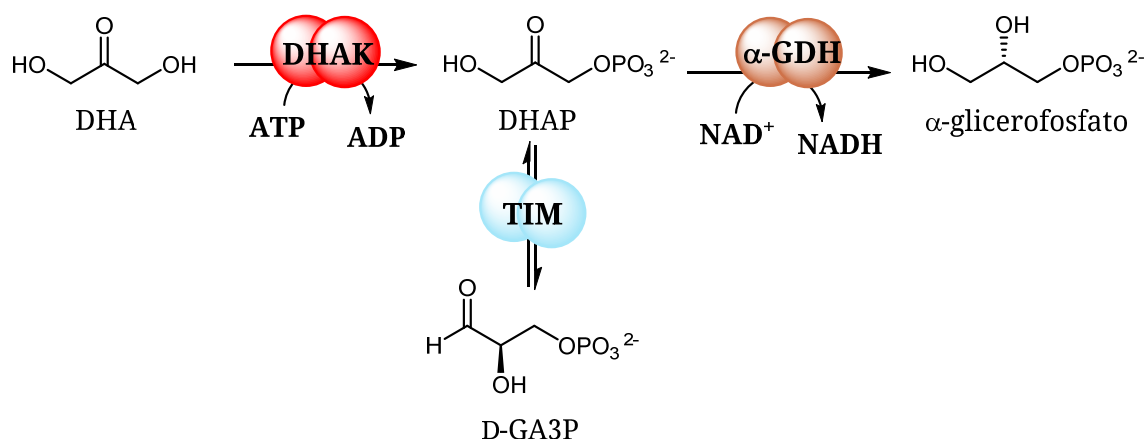
Los ensayos se llevaron a cabo durante 7,5 min a temperatura ambiente o a 45 °C. La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 1 ml, una cantidad conocida de aldolasa en tampón Tris-HCl (40 mM; pH 8,0), NADH (0,2 μmoles), α-GDH/TIM (2 U) y Rha-1P (1 μmol cuando se utilizó la Rha-1PA de *E. coli* y 10 μmol cuando se utilizó la Rha-1PA *Thermotoga maritima*). En el caso de la valoración de la actividad de la Rha-1PA de *E. coli* fue necesario añadir ZnCl<sub>2</sub> (0,015 μmoles).

Se define 1 unidad de actividad aldolasa como la cantidad de enzima que convierte 1 μmol de su aldol sustrato natural en DHAP y el aldehído correspondiente por minuto en las condiciones antes mencionadas.

## Valoración de la actividad quinasa

La actividad DHAK se cuantificó valorando espectrofotométricamente la DHAP formada en ensayos de 7,5 min a temperatura ambiente en un volumen total de 1 ml (Fig. 4MM). La mezcla de reacción contenía una cantidad conocida de DHAK en Tris-HCl (40 mM; pH 8,0), NADH (0,2  $\mu$ moles), DHA (2,5  $\mu$ moles), ATP (3,75  $\mu$ moles),  $MgSO_4$  (5  $\mu$ moles) y  $\alpha$ -GDH/TIM (2 U).

Se define 1 unidad de actividad quinasa como la cantidad de enzima que es capaz de producir 1  $\mu$ mol de DHAP por minuto, en las condiciones especificadas.



**Figura 4MM** Ensayo enzimático de actividad quinasa basado en la mezcla  $\alpha$ -GDH/TIM.

## Valoración de la actividad triosa fosfato isomerasa

Los ensayos de actividad de la triosafosfato isomerasa (TIM) se utilizaron para comprobar si había contaminación por esta enzima en las preparaciones de Rha-1PA Tm purificada. Esta reacción se realizó en 1 ml de tampón HEPES (60 mM; pH 6,8) conteniendo aldolasa de músculo de conejo (RAMA; 0,46 mg), DHAP (16 mg),  $MgSO_4$  (8  $\mu$ moles) y la muestra (Fig. 5MM). Se recogieron dos alícuotas, una a  $t_0$  y la otra a las 12 horas de reacción, en las que se valoraron la presencia de aldol.

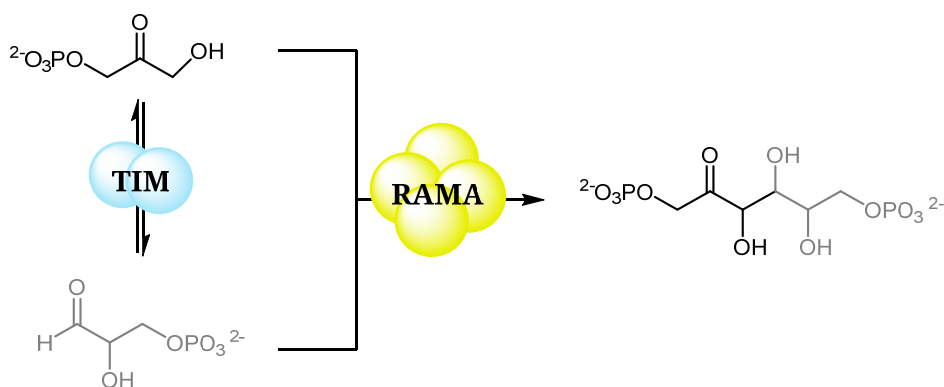


Figura 5MM. Ensayo enzimático de actividad TIM.

## Caracterización bioquímica de la rhamnulosa-1-fosfato-aldolasa de *T. maritima*

### Determinación de la temperatura óptima de la rhamnulosa-1-fosfato aldolasa de *T. maritima*

#### Estudio de la actividad en función de la temperatura

La actividad de la enzima Rha-1PA de *T. maritima* fue medida utilizando para ello ensayos en tampón fosfato (20 mM; pH 7,5) conteniendo Rha-1PA Tm (0,08 mg) y DHAP y L-lactaldehído (30  $\mu$ moles en las reacciones a 25 y 45  $^{\circ}$ C y 150  $\mu$ moles en el resto de reacciones). Las temperaturas estuvieron comprendidas entre los 25  $^{\circ}$ C y los 95  $^{\circ}$ C y se consiguieron por incubación en baño de arena. El volumen de reacción fue de 2 ml para las reacciones a 25  $^{\circ}$ C y a 45  $^{\circ}$ C y de 10 ml para las restantes. La producción de aldol en el tiempo se siguió por valoración DHAP/aldol.

#### Estudio de la degradación de la DHAP en función de la temperatura

La DHAP es lábil a altas temperaturas por lo que su concentración en el medio de reacción no es constante a lo largo del tiempo. Es por ello que se realizó el estudio de la degradación de la DHAP en función de la temperatura entre los 25 y los 95  $^{\circ}$ C. El ensayo se realizó añadiendo DHAP (20  $\mu$ moles) en 600  $\mu$ l de tampón fosfato (20 mM; pH 7,5) con agitación y calentado en baño

de arena. La cantidad de DHAP se midió a lo largo del tiempo con el ensayo de valoración DHA/DHAP descrito anteriormente.

### Estudio de la concentración de aldol a lo largo del tiempo

Este ensayo se realizó para determinar si la utilización de altas temperaturas afecta a la concentración de aldol presente en el medio por la posible evaporación del disolvente de la reacción. En 10 ml de tampón fosfato (20 mM; pH 7,5) se añadió fructosa-1,6-bisfosfato (FBP; 150  $\mu$ moles) y la mezcla se incubó a 95 °C en baño de arena con agitación. La presencia de aldol se valoró a lo largo del tiempo con el ensayo de valoración de DHAP/aldol.

### **Determinación del pH óptimo de la rhamnulosa-1-fosfato aldolasa de *T. maritima***

La actividad de la Rha-1PA Tm se midió a diferentes valores de pH en el medio de reacción. Los pHs se ajustaron utilizando los siguientes tampones: Bis/Tris (pH 5,5; pH 6,0; pH 6,5; pH 7,0), fosfato sódico (pH 7,0; pH 7,5; pH 8,0) y Tris/HCl (pH 8,0; pH 8,5; pH 9,0). La fuerza iónica de todos los tampones fue llevada a 0,1 utilizando NaCl. Las reacciones se realizaron en un volumen de 1 ml, a 45 °C, conteniendo L-lactaldehído (8,3  $\mu$ M), DHAP (16,7  $\mu$ M) y Rha-1PA Tm (18,2  $\mu$ g; 0,01 U medidas a 45 °C con el ensayo de actividad estándar). La formación de aldol se valoró a lo largo del tiempo con el ensayo de valoración retroaldólica descrito previamente.

### **Estudio de la estabilidad de la rhamnulosa-1-fosfato aldolasa de *T. maritima***

#### Determinación de la termoestabilidad

La estabilidad frente a altas temperaturas de la Rha-1PA Tm se evaluó midiendo la actividad residual de la enzima a 45 °C, después de haber sido incubada a distintas temperaturas en un baño de arena. Las temperaturas

empleadas fueron 80 °C, 95 °C and 115 °C. La concentración de la enzima varió entre los 4,3 y los 7,19 mg ml<sup>-1</sup> y la actividad residual se midió utilizando el ensayo de actividad retroaldólica descrito anteriormente. El mismo experimento se llevó a cabo incubando la enzima a 4 °C y a R/T para establecer la estabilidad durante el almacenamiento.

### Determinación de la estabilidad frente a cosolventes orgánicos

La estabilidad de la Rha-1PA Tm frente a disolventes orgánicos en el medio de reacción se analizó midiendo la actividad de la aldolasa en distintas mezclas de cosolvente orgánico en tampón. Las reacciones se realizaron en un volumen de 1 ml a 45 °C, conteniendo tampón fosfato (20 mM; pH 7,5), L-lactaldehído (8.3 µM), DHAP (16,7 µM) y Rha-1PA Tm (18,2 µg; 0,01 U medidas a 45 °C con el ensayo de actividad estándar). Los cosolventes usados fueron acetonitrilo (AcN), isopropanol, tetrahidrofurano (THF), dimetilformamida (DMF) y dimetilsulfóxido (DMSO) en concentraciones comprendidas entre el 0 y el 40% del volumen total de reacción. La formación de aldol se valoró espectrofotométricamente a lo largo del tiempo con el ensayo de valoración retroaldólica descrito con anterioridad.

### **Determinación del mecanismo catalítico de la rhamnulosa-1-fosfato-aldolasa de *T. maritima***

En una primera aproximación el estudio de la actividad de la Rha-1PA de *T. maritima* en presencia de EDTA se realizó midiendo la actividad aldolasa según el método previamente descrito, añadiendo al medio de reacción diferentes concentraciones de EDTA (0, 1 y 10 mM).

El estudio del efecto del Zn<sup>2+</sup> en la actividad de la Rha-1PA Tm y de la Rha-1PA de *E. coli* (Rha-1PA Ec) se realizó en placas de 96 pocillos de fondo plano, con un volumen final de 0,2 ml y a temperatura ambiente. El ensayo de actividad aldolasa utilizado se basó en el descrito previamente escalando los volúmenes y las concentraciones al volumen final del ensayo. La medida de la actividad retroaldólica con respecto a la Rha-1P se realizó con una concentración de proteína de 7 µg ml<sup>-1</sup>. Previamente el enzima se incubó con

EDTA 0,1 M durante dos horas en baño de hielo para quelar todo el  $Zn^{2+}$  presente. A continuación, la enzima fue dializada O/N a 4 °C para eliminar el EDTA. Las reacciones se realizaron por triplicado a 11 concentraciones diferentes de  $ZnCl_2$  comprendidas entre 0 y 37,5  $\mu M$ .

Posteriormente la actividad de la Rha-1PA Tm se midió con diversos metales divalentes ( $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ). Para ello la Ra-1PA Tm fue anteriormente incubada durante una hora a R/T o a 80 °C, dializada O/N y liofilizada. Las reacciones retroaldólicas se llevaron a cabo de la misma manera que en el ensayo de la actividad aldolasa en función de la concentración de  $Zn^{2+}$ . La concentración de metal divalente presente en el medio de reacción estuvo comprendida entre 0 y 675  $\mu M$ .

### **Estudio de la estructura cuaternaria de la rhamnulosa-1-fosfato-aldolasa de *T. maritima***

Los ensayos de ultracentrifugación se realizaron mediante equilibrio de sedimentación en el Departamento de Química-Física de Macromoléculas Biológicas del Instituto de Química-Física Rocasolano del CSIC. Las muestras de proteína se prepararon en agua a pH 7,5, con una absorbancia final a 280 nm de entre 0,1 y 1 uA. Los análisis se hicieron por triplicado en una centrífuga analítica con detección UV-Vis a 20 °C.

Por otra parte se utilizó la cromatografía de exclusión molecular para determinar la estructura secundaria de la Rha-1PA de *T. maritima*. La muestra purificada se cargó en una columna cromatográfica HiLoad 26/60 Superdex™ 200 PG en las condiciones no desnaturizantes previamente descritas para la purificación de la enzima sin colas de histidina. Para poder averiguar el peso molecular en función del volumen de retención de la muestra se realizó una curva de calibrado, usando para ello proteínas con pesos moleculares conocidos entre los 100 y 190 kDa. Las enzimas utilizadas fueron la fuculosa-1-fosfato aldolasa de *E. coli* (104,8 kDa), la DHAK de *Citrobacter freundii* (127,2 kDa), la Rha-1PA de *E. coli* (137,2 kDa), la fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa de *Oryctolagus cuniculus* (RAMA) (160 kDa) y la proteína de fusión DLF (186,8 kDa).

## **Determinación de los parámetros cinéticos de la rhamnulosa-1-fosfato aldolasa de *T. maritima***

Los ensayos cinéticos de la actividad retroaldólica de la Rha-1PA Tm se midieron en placas de 96 pocillos a temperatura ambiente. Las reacciones se llevaron a cabo en tampón Tris/HCl (40 mM; pH 8,0),  $\text{Co}^{2+}$  (187,5  $\mu\text{M}$ ),  $\alpha$ -GDH/TIM (0,4 U), NADH (0,04  $\mu\text{mol}$ ), Rha-1PA Tm y L-rhamnulosa-1-fosfato (R1P) a diferentes concentraciones en un intervalo comprendido entre 0,005 to 18,75 mM.

Los parámetros cinéticos de dos preparaciones diferentes de enzima fueron calculados. En primer lugar se usó proteína purificada por una combinación de choque térmico y posterior columna de IMAC según ha sido descrito previamente (Rha-1PA Tm01). La segunda preparación de proteína fue sometida además a tratamiento con EDTA (0,1 M) a 80 °C durante una hora para eliminar completamente los metales divalentes presentes en su centro catalítico (Rha-1PA Tm02). Así pues, la cantidad de enzima añadida en las reacciones dependió del protocolo de purificación seguido, usándose 10  $\mu\text{g}$  de Rha-1PA Tm01 y 4  $\mu\text{g}$  de Rha-1PA Tm02.

Las velocidades iniciales ( $V_i$ ) obtenidas se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten y las constantes cinéticas fueron calculadas utilizando el programa informático *SigmaPlot 12.0* y su módulo de tratamiento de cinéticas *Enzyme Kinetics (Module 1.1.)*.

## **Dicroísmo Circular**

Los estudios de dicroísmo circular se realizaron en un espectropolarímetro *JASCO J-815 CD* controlado por el software *Spectra Manager™* para Windows, equipado con un Peltier *Jasco CDF-426S/15* y un baño de recircularización *Jasco MCB-100*.

Los espectros de dicroísmo circular en el UV-lejano (190-240 nm) se realizaron con un paso óptico de 0,1 nm a distintas temperaturas comprendidas entre 20 y 110 °C. Para cada espectro se tomaron 4 acumulaciones que se promediaron automáticamente. Cada espectro se

realizó con una velocidad de barrido de  $20 \text{ nm min}^{-1}$  y un ancho de banda de  $0,2 \text{ nm}$ . Estos experimentos se llevaron a cabo utilizando la enzima purificada, con y sin colas de histidina. Además, se determinó la estructura secundaria para ambas enzimas una vez quelados los metales divalentes de su centro catalítico de forma análoga a la descrita en el caso de la determinación de los parámetros cinéticos.

El análisis de los espectros de dicroísmo circular se realizó con el paquete informático CDPro compuesto por tres programas de cálculo: Continll, SELCON3 y CDSSTR (Sreerama and Woody, 2000).

La temperatura de desnaturalización de la enzima, con y sin colas de histidina, fue evaluada mediante estudios de DC a temperatura variable a  $\lambda=222 \text{ nm}$ , con un paso óptico de  $0,1 \text{ nm}$ , en un rango de temperatura entre  $20\text{-}110 \text{ }^\circ\text{C}$  y en presencia de diferentes concentraciones de  $\text{Co}^{2+}$  (de  $0$  a  $841,25 \text{ } \mu\text{M}$ ) en el medio. La toma de datos se hizo cada  $0,2 \text{ }^\circ\text{C}$  y con un gradiente de temperatura de  $30 \text{ }^\circ\text{C h}^{-1}$ .

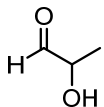
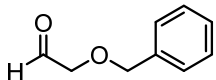
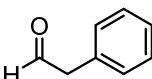
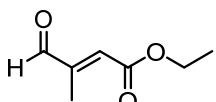
Las muestras de enzima empleadas para ambos tipos de experimento tenían una concentración de  $0,4 \text{ mg ml}^{-1}$  ( $15 \text{ } \mu\text{M}$ ).

### **Estudio de la aplicabilidad sintética de la rhamnulosa-1-fosfato aldolasa de *T. maritima***

#### **Optimización de las reacciones para la formación de enlaces C-C en el contexto de un sistema multienzimático**

La optimización de las condiciones de reacción se llevó a cabo utilizando una estrategia “one-pot/two-steps” para la formación de enlaces C-C (Sánchez-Moreno *et al.*, 2009a; Oroz-Guinea *et al.*, 2012). Los nombres comerciales y las estructuras de los aldehídos utilizados para las reacciones aldólicas se encuentran recogidos en la Tabla 3MM.

**Tabla 3MM.** Aldehídos utilizados como sustratos para la optimización de las condiciones de las reacciones aldólicas en el contexto de un sistema multienzimático.

<b>Aldehído</b>		
<b>Estructura</b>	<b>Nombre</b>	
<b>1a</b>		L-lactaldehído
<b>1b</b>		Benciloxiacetaldehído
<b>1c</b>		Fenilacetaldehído
<b>1d</b>		Etil-3-metil-4-oxocrotonato

El primer paso de reacción fue la síntesis de DHAP a temperatura ambiente en tampón HEPES (90 ml; 60 mM; pH 7,5), conteniendo DHA (5 mmol), acetil fosfato (7,15 mmol), MgSO<sub>4</sub> (1,25 mmol), DHAK (431 U) and AK (225 U). La reacción se inició con la adición de ATP (163 μmol). Cuando la acumulación de DHAP en el medio de reacción era mayor del 95%, el pH se ajustó a 5,0 para evitar la degradación del producto durante el almacenamiento y la mezcla de reacción fue alicuoteada y congelada.

Para el segundo paso de reacción, se probaron diferentes ratios de DHAP/aldehído (1/2; 1/5; 2/1) a dos temperaturas distintas (45 y 80 °C). Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 6 ml, incluyendo la DHAP (100-400 μmol; pH 6,9), el aldehído (100-500 μmol) correspondiente y la Rha-1PA Tm (0,37 U medidas a 45 °C con el ensayo de actividad estándar). Cuatro aldehídos fueron utilizados, el L-lacteldehído (**1a**), que es el sustrato natural de la Rha-1PA de *T. maritima*, y tres aldehídos comerciales: benciloxiacetaldehído (**1b**), fenilaceltaldeo (**1c**) y etil-3-metil-4-oxocrotonato (**1d**). Los aldehídos **1b** y **1c** requirieron la adición, en el segundo paso, de DMSO en un 10% del volumen total de reacción. Los

productos finales de la reacción se analizaron en los crudos de reacción, previamente filtrados y liofilizados, mediante RMN y espectroscopia de masas. En todos los casos tanto las masas como los espectros de resonancia fueron coincidentes con los previamente descritos para estos compuestos (Sánchez-Moreno, 2009)

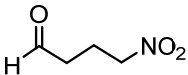
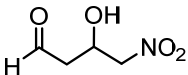
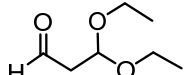
El progreso de ambos pasos de reacción fue seguido espectrofotométricamente.

La reacción con el aldehído **1d** se repitió a mayor escala (0,5 mmol de aldehído), manteniéndose las relaciones indicadas de volumen y concentración de reactivos. El producto de dicha reacción, el aldol **2d**, se purificó siguiendo el protocolo de sales de bario y se caracterizó por RMN como se indica posteriormente.

### Síntesis utilizando nitroaldehídos como sustratos aceptores

Los sustratos se sintetizaron como se describe en la literatura por El Blidi *et al.* (2004 y 2006). Los nombres comerciales y las estructuras de los nitroaldehídos utilizados se encuentran recogidos en la Tabla 4MM.

**Tabla 4MM.** Aldehídos utilizados como sustratos para la síntesis de nitrociclitoles empleando la Rha-1PA Tm.

Aldehído		
	Estructura	Nombre
<b>1e</b>		4-nitrobutanal
<b>1f</b>		3-hidroxi-4-nitrobutanal
<b>1g</b>		3,3-dietoxi-propanal

Las dos reacciones a 45 °C se llevaron a cabo añadiendo a una disolución de DHAP (0,2 mmol; pH 6,9) preparada como se ha descrito anteriormente la Rha-1PA Tm (1 U medida a 45 °C con el ensayo de actividad estándar) y DMSO en un 10% del volumen total de reacción. El aldehído **1e** se añadió sólo en una de las reacciones, dejando la otra como blanco. El volumen se ajustó a 6 ml con agua destilada. Después de mantener las reacciones bajo agitación se cogieron alícuotas para la valoración espectrofotométrica de la DHAP y para el seguimiento por la cromatografía en capa fina.

Las reacciones a temperatura ambiente se llevaron a cabo añadiendo el aldehído (0,5 mmol) y la Rha-1PA Tm (3 U medidas a 45 °C con el ensayo de actividad estándar) a una disolución de DHAP (1 mmol; pH 6,9) preparada como se ha descrito anteriormente. El volumen se ajustó a 30 ml con agua destilada. En el caso de la reacción con el aldehído **1e** se añadió DMSO en un 10% del volumen total de reacción para mejorar la solubilidad del aldehído. Después de mantener la reacción bajo agitación O/N el pH se ajustó a 4,7 con HCl (1 M) y se eliminó la Rha-1PA Tm precipitada por centrifugación durante 30 min a 15.600 g. Posteriormente, se adicionó fosfatasa ácida de patata (200 U) y la mezcla se agitó a R/T durante 24 h, al cabo de las cuales se eliminó la fosfatasa por centrifugación durante 30 min a 15.600 g. El pH de la disolución resultante se ajustó a 9,0 y la mezcla se agitó durante 3 h. Después la reacción se evaporó a vacío y el sólido se purificó por cromatografía en columna de sílice.

Para seguir la formación de los productos de las reacciones aldólicas, además de la valoración de la DHAP restante en el medio, se utilizó la cromatografía en capa fina (TLC). Esta técnica también fue usada para comprobar la hidrólisis del grupo fosfato de los aldoles sintetizados.

Los productos obtenidos se caracterizaron mediante RMN y espectroscopía de masas. En todos los casos tanto las masas como los espectros de resonancia fueron coincidentes con los previamente descritos para estos compuestos (Camps-Bres, 2010; Wong *et al.*, 1995).

## Síntesis de iminociclitoles

### Reacciones con N-Cbz-aminoaldehídos

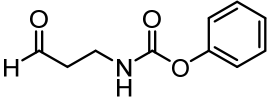
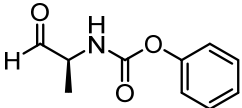
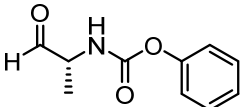
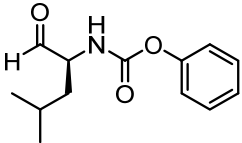
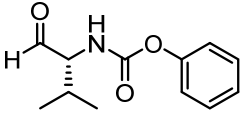
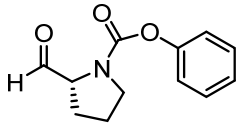
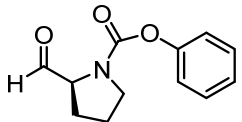
En primer lugar se llevaron a cabo reacciones a escala analítica con un volumen final de 1 ml utilizando para ello los aldehídos mostrados en la Tabla 5MM. Las reacciones se realizaron en tubos de ensayo de 2 ml con incubación orbitálica a 45 °C. Cada aldehído (15 μmol) se disolvió en DMF (300 μl) y se añadió a una disolución de DHAP (25 μmol; pH 6,9) previamente sintetizada enzimáticamente. Las reacciones se iniciaron con la adición de la Rha-1PA Tm (0,75 y 1,6 U medidas a 45 °C con el ensayo de actividad estándar).

La formación de producto y su cuantificación se siguió mediante HPLC.

### Reacciones para la obtención de iminociclitoles

Las reacciones para la obtención de iminociclitoles a mayor escala de sustrato se realizaron de manera similar a las previamente descritas, pero con ligeras modificaciones en la estequiometría: se partió del correspondiente aldehído (**1h-1n**; 1,2 mmol) disuelto en DMF (24 ml, 35% del volumen total de reacción) donde se añadió H<sub>2</sub>O destilada (c.s.p. 70 ml volumen final), DHAP (2 mmol; pH 6,9) y, por último, la Rha-1PA Tm (10 U medidas a 45 °C con el ensayo de actividad estándar) para empezar la reacción. El progreso de las reacciones fue seguido espectrofotométricamente y por HPLC.

**Tabla 5MM.** Aldehídos utilizados como sustratos para la síntesis de nitrociclitoles empleando la Rha-1PA Tm.

Aldehído		
	Estructura	Nombre
<b>1h</b>		<i>N</i> -Cbz-3-aminopropanal
<b>1i</b>		( <i>S</i> )- <i>N</i> -Cbz-alaninal
<b>1j</b>		( <i>R</i> )- <i>N</i> -Cbz-alaninal
<b>1k</b>		( <i>S</i> )- <i>N</i> -Cbz-leucinal
<b>1l</b>		( <i>R</i> )- <i>N</i> -Cbz-valinal
<b>1m</b>		( <i>R</i> )- <i>N</i> -Cbz-prolinal
<b>1n</b>		( <i>S</i> )- <i>N</i> -Cbz-prolinal

Una vez las reacciones llegaron a su máximo rendimiento se pararon añadiendo dos volúmenes de MeOH, con la consecuente precipitación de la enzima. La mezcla se pasó por un filtro de celulosa de 0,45  $\mu\text{m}$  y el MeOH fue evaporado a vacío. El filtrado resultante se lavó con un volumen de AcOEt por triplicado para eliminar el *N*-Cbz-aminoaldehído que no hubiera reaccionado. Antes de añadir fosfatasa ácida de patata (5,3 U por mmol de

producto fosforilado) la fase acuosa se acidificó (pH 4,7). Del mismo modo que anteriormente, el progreso de la reacción se siguió mediante HPLC.

Cuando la reacción de desfosforilación hubo terminado se paró añadiendo dos volúmenes de MeOH. Después de haber eliminado la enzima precipitada por filtración con filtros de celulosa de 0,45  $\mu\text{m}$  y haber evaporado el MeOH a vacío, el filtrado se ajustó a pH 3,0 y se cargó para su purificación en un HPLC semi-preparativo.

El producto purificado obtenido se disolvió en  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$  1:1 y se trató con  $\text{H}_2$  (50 psi) en presencia de C/Pd (2 eq. w/w) a temperatura ambiente durante 24 h. Al cabo de este tiempo el producto hidrogenado fue filtrado a través de una membrana de nylon de 0,45  $\mu\text{m}$  para quitar el catalizador. Antes de liofilizar el filtrado se llevó a pH 6,4 con ácido fórmico.

Cuando se obtuvieron varios isómeros de un mismo producto fue necesaria su separación mediante columna de intercambio iónico. Los productos obtenidos se caracterizaron mediante RMN y espectroscopia de masas. En todos los casos tanto las masas como los espectros de resonancia fueron coincidentes con los previamente descritos para estos compuestos (Espelt *et al.*, 2003; Calveras *et al.*, 2005; Calveras *et al.*, 2009).

### **Reacciones con DHA como sustrato donador**

Las reacciones utilizando DHA como sustrato donador se llevaron a cabo en tampón borato al que se adicionó DHA, (S)-Cbz-alaninal (**1i**) diluido en DMF y, para desencadenar la reacción, la Rha-1PA Tm. En estas reacciones se probaron diferentes cantidades tanto de los sustratos (DHA: 25, 50, 100, 200  $\mu\text{mol}$ ; aldehído: 15, 50 y 100  $\mu\text{mol}$ ), como del biocatalizador (1-3 U medidas a 45 °C con el ensayo de actividad estándar). También se ensayaron distintas concentraciones de tampón borato (0,2 and 0,4 M) y de cosolvente (20% and 30%) en el medio, así como diferentes condiciones de reacción, incluyendo variaciones en el pH (pH 7,0 y pH 8,0) y en la temperatura (45 y 80 °C). Además, se llevaron a cabo de forma paralela reacciones blanco en las que no se añadió la aldolasa para descartar la adición aldólica no catalizada por la enzima. La aparición de producto se monitorizó por HPLC.

## **Estudio del control estereoquímico de la rhamnulosa-1-fosfato de *T. maritima***

La estereoquímica de la L-rhamnulosa-1-fosfato de *Thermotoga maritima* se evaluó midiendo la relación de los diferentes diastereoisómeros formados en función del tiempo y de la temperatura de reacción.

Para este estudio se usó el benciloxiacetaldehído (**1b**) (100  $\mu\text{mol}$ ) como sustrato aceptor, disolviéndose para ello en DMSO (600  $\mu\text{l}$ , 10% del volumen final de la reacción) y se añadió a una disolución de DHAP (200  $\mu\text{mol}$ ; pH 6,9), previamente sintetizada. Por último se añadió la Rha-1PA Tm (0,4 U medidas a 45 °C con el ensayo de actividad estándar) para comenzar la reacción. Esta reacción se repitió a cuatro temperaturas diferentes (4 °C, R/T, 45 °C y 80 °C), tomándose alícuotas para comprobar la formación de los isómeros mediante HPLC.

## **Métodos para el seguimiento de las reacciones enzimáticas**

### **Ensayos de valoración enzimática de sustratos y productos**

La valoración de DHAP/aldol y DHAP/DHA en el medio de reacción nos permitió seguir el transcurso de la misma con el tiempo, mediante la cuantificación de sustrato y producto. Para ello, se tomaron alícuotas de 50  $\mu\text{l}$  en las que se detuvo la reacción añadiendo  $\text{HClO}_4$  al 7% (10  $\mu\text{l}$ ) y posteriormente se neutralizaron con NaOH (10  $\mu\text{l}$ , 1M).

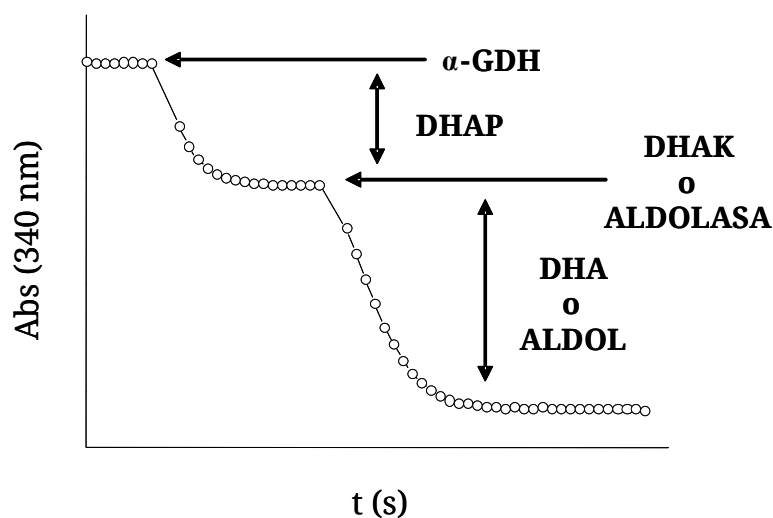
#### *Valoración DHAP/aldol*

Esta valoración se realizó a temperatura ambiente, en tiempos comprendidos entre 5 y 20 min. La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 1 ml, Tris-HCl (40 mM; pH 8,0), NADH (0,2  $\mu\text{moles}$ ) y la muestra a valorar. Fue necesario añadir  $\text{ZnCl}_2$  (0,015  $\mu\text{moles}$ ) cuando la aldolasa utilizada para la valoración del aldol fue de tipo II. Para la

valoración de la DHAP se añadió  $\alpha$ -GDH/TIM (2 U). La disminución de la absorbancia es proporcional al contenido de DHAP. A continuación se añadió la aldolasa (0,5 U). La disminución de la absorbancia observada en este caso se corresponde a la cantidad de aldol presente en la mezcla de reacción (Fig.6MM).

Valoración DHA/DHAP

Este procedimiento es esencialmente el mismo que el descrito en el apartado anterior. En primer lugar se valora la DHAP como se ha descrito anteriormente. A continuación la DHA se valora mediante adición de DHAK. Esta valoración se realizó a temperatura ambiente, en ensayos de 7,5 min en un volumen final de 1 ml, conteniendo Tris-HCl (40 mM; pH 8,0), NADH (0,2  $\mu$ moles), ATP (3,75  $\mu$ moles),  $MgSO_4$  (5  $\mu$ moles) y la muestra a valorar. La bajada de la absorbancia al añadir  $\alpha$ -GDH/TIM (2 U) es proporcional al contenido de DHAP y la disminución de la absorbancia al añadir la quinasa (3,75 U) es proporcional a la cantidad de DHA (Fig. 6MM).



**Figura 6MM.** Ensayos de valoración de sustratos y productos en las alícuotas de reacción.

## Ensayos de valoración de sustratos y productos por cromatografía

### Valoración por HPLC

Las reacciones aldólicas en las cuales se utilizaron aldehídos que poseen cromóforos pudieron ser monitorizadas mediante HPLC con detección UV-Vis. Esta técnica se utilizó para seguir el progreso de las reacciones aldólicas con los *N*-Cbz-aminoaldehídos (**1h-1n**) y en las reacciones de desfosforilación de los correspondientes aldoles, pues tanto los aldehídos como los productos resultantes presentan absorbancia a 215 nm.

Para el análisis por HPLC de las reacciones aldólicas con *N*-Cbz-aminoaldehídos se cogieron alícuotas (30  $\mu$ l) de la reacción a valorar y se añadió MeOH (c.s.p. 1 ml). Los análisis se realizaron en un HPLC RP-HPLC XBridge<sup>®</sup>, con una columna C<sub>18</sub> (25 cm x 0,46 cm,  $\phi$ =5  $\mu$ m; Waters). Para el método de HPLC se utilizaron dos fases móviles diferentes: H<sub>2</sub>O + TFA 0,1% (Fase A) y CH<sub>3</sub>CN/ H<sub>2</sub>O (80:20) + TFA 0,095% (Fase B), con flujo isocrático a 1 ml min<sup>-1</sup> y detección a 215 nm. En función de la polaridad del aldehído utilizado como sustrato se diseñaron dos métodos diferentes: para monitorizar las reacciones de los aldehídos **1h**, **1i** y **1j** se utilizó un gradiente de elución desde 10 a 70% de Fase B, mientras que para identificar las reacciones de los aldehídos **1k**, **1l**, **1m** y **1n** se utilizó un gradiente de elución desde 30 a 100% de Fase B. En ambos métodos la duración fue de 30 min.

### Seguimiento de las reacciones mediante TLC

Cuando las reacciones aldólicas se llevaron a cabo con los aldehídos **1e**, **1f** y **1g** las reacciones de adición aldólica y de hidrólisis del grupo fosfato se siguieron por cromatografía en capa fina utilizando placas de gel de sílica Merck 60 F254. Las fases móviles empleadas fueron ciclohexano/AcOEt en el primer paso (6:4 para las reacciones con **1e**; 4:6 para las reacciones con **1f** y 7:3 para las reacciones con **1g**) y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH en el segundo (85:15 para las reacciones de desfosforilación de los aldoles **3e** y **3f** y 95:5 para la reacción de desfosforilación del aldol **3g**). En todas las ocasiones se usó vainillina o KMnO<sub>4</sub> como agente revelador.

## Purificación de los productos

### Precipitación mediante sales de Ba<sup>2+</sup>

Para la purificación de los productos fosforilados mediante precipitación por sales de Ba<sup>2+</sup> se centrifugó el crudo de reacción para eliminar la proteína precipitada y cualquier componente insoluble (9.000 rpm, 10.000 x g). El crudo de reacción centrifugado se pasó a través de carbón activo (empaquetado en una jeringuilla de 10 ml). Para la purificación de aldoles, durante todo el proceso se valoró la cantidad de aldol (antes y después de pasar por carbón activo) pues si el compuesto es suficientemente apolar puede quedarse parcialmente retenido en el carbón, sobre todo si tiene anillos aromáticos. Aquellos aldoles que resultaron parcialmente retenidos se recuperaron añadiendo agua/isopropanol al 5% (v/v).

El filtrado resultante del carbón activo se evaporó hasta la mitad de su volumen utilizando un rotavapor. Se ajustó el pH a 8,0 y se añadieron dos equivalentes de BaCl<sub>2</sub> con respecto a la cantidad total calculada de producto fosforilado en el crudo y un volumen de etanol 100% frío similar al volumen de fase acuosa que queda tras evaporar. La mezcla se dejó un mínimo de 5 horas precipitando a 4 °C.

Transcurrido ese tiempo, se obtuvo un precipitado blanco muy insoluble en agua. Se centrifugó para separarlo del sobrenadante (9.000 rpm, 10.000 x g). El precipitado se resuspendió (con mucha dificultad) en un volumen de agua similar al que tenía la fase acuosa antes de precipitarla y se añadió al resuspendido blanquecino resina Dowex 1x8 (activada en forma Cl<sup>-</sup>). La mezcla se mantuvo en agitación orbitálica hasta solubilizar el precipitado blanco. Finalmente la resina Dowex se eliminó mediante centrifugación y posterior filtrado en columna. El sobrenadante filtrado se liofilizó en tubos Falcon (50 ml) para su posterior análisis mediante RMN.

## Purificación mediante HPLC

Los productos fosforilados obtenidos de las reacciones aldólicas con el aldehído sustrato natural de la enzima (**2a**) y los aldehídos comerciales (**2b**, **2c** y **2d**) se purificaron mediante HPLC.

Para la purificación mediante HPLC se utilizó una columna semi-preparativa *Mediterranea sea*<sub>18</sub> (25 cm x 1,0 cm;  $\phi=5\ \mu\text{m}$ ; Tecknokroma). Esta columna permitió volúmenes de inyección de crudo de reacción de 0,5 ml. Antes de la inyección, el crudo de reacción fue acidificado con HCl (1M) para la precipitación de la proteína, que se retiró mediante centrifugación (9.000 rpm, 10.000 x g). El centrifugado resultante fue filtrado con carbón activo y con filtros de 0,45  $\mu\text{m}$ . Para el método de HPLC se utilizaron dos fases móviles diferentes: H<sub>2</sub>O + TFA 0,1% (Fase A) y CH<sub>3</sub>CN (Fase B), con detección a 250 nm. La distribución de porcentajes y flujos de cada fase a lo largo del ensayo se muestra en la Tabla 6MM.

**Tabla 6MM.** Distribución del flujo y proporción de fase A (H<sub>2</sub>O + TFA 0,1 %) y fase B (CH<sub>3</sub>CN) con el tiempo en el método de HPLC para la purificación de productos fosforilados **2a** (Rha-1P), **2b**, **2c** y **2d**.

Tiempo (min)	Fase A (%)	Fase B (%)	Flujo (ml min <sup>-1</sup> )
0	83	17	2,3
8	83	17	2,3
10	5	95	3,0
14	5	95	3,0
16	83	17	3,0
19	83	17	3,0
25	83	17	2,3
26	83	17	2,3

Por otra parte, los correspondientes aldeos desfosforilados sintetizados a partir de los *N*-Cbz-aminoaldehídos **1h-1n** fueron purificados utilizando un HPLC semi-preparativo PrepLC 4000 System de Waters provisto de una columna X-Terra® PrepMS C<sub>18</sub> (19 cm x 25 cm;  $\phi$ =10  $\mu$ m; OBM™). Esta columna permitió volúmenes de inyección de entre 50-70 ml de disolución previamente filtrada para eliminar la fosfatasa. Los productos fueron eluidos con un flujo constante de 10 ml min<sup>-1</sup> en gradiente escalonado utilizando dos fases móviles diferentes: H<sub>2</sub>O (Fase A) y CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (80:20) (Fase B), con detección a 215 nm.

En función de la polaridad del aldehído utilizado como sustrato los porcentajes de Fase A y Fase B necesarios para la elución del producto variaron (Tabla 7MM).

**Tabla 7MM.** Proporción de Fase A (H<sub>2</sub>O) y Fase B (CH<sub>3</sub>CN/ H<sub>2</sub>O, 80:20) y flujo para la elución de productos desfosforilados **3h**, **3i**, **3j**, **3k**, **3l**, **3m** y **3n**.

Producto	Fase A (%)	Fase B (%)
<b>3h</b>	85	15
<b>3i</b>	85	15
<b>3j</b>	80	20
<b>3k</b>	0	100
<b>3l</b>	50	50
<b>3m</b>	60	40
<b>3n</b>	60	40

Después se analizaron en el HPLC analítico las fracciones recogidas siguiendo el procedimiento ya descrito para los aldehídos **1h-1n**. Las que contenían el producto puro se unificaron y liofilizaron.

## **Cromatografía en columna de intercambio iónico**

Para la separación y purificación de los distintos isómeros de los iminociclitoles **4j**, **4l** y **4m** se utilizó un sistema FPLC con una columna de cristal (45 x 25 cm) en la que fue empaquetada la fase estacionaria CM-Sepharose CL-6B (Amersham Pharmacia).

La columna de intercambio iónico se lavó con 4 volúmenes (1V~220 ml) de una disolución de NH<sub>3</sub> (100 mM) y, posteriormente se equilibró con otros 4 volúmenes de H<sub>2</sub>O destilada (pH~7,0). Antes de la inyección el iminociclitol liofilizado fue disuelto en H<sub>2</sub>O y el pH de la disolución ajustado (10 ml; pH 6,0) con ácido fórmico. Una vez inyectado el producto, se lavó con 3 volúmenes de H<sub>2</sub>O destilada (pH~7,0). A continuación los isómeros de eluyeron a 1 ml min<sup>-1</sup> con una disolución de NH<sub>3</sub> (10 mM) y las fracciones recogidas con un colector se analizaron mediante RMN.

## **Cromatografía en columna de sílice**

La purificación y separación de los nitrociclitoles **4e**, **4f** y **4g** se consiguió mediante cromatografía en columna de sílice utilizando como fase estacionaria gel de sílice de tipo 60, con un tamaño de partícula de 230-400 de malla (*Merck*). Como eluyente se empleó una mezcla de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH. En el caso de los productos **4e** y **4f** fue necesario realizar un gradiente de elución (desde 9:1 hasta 8:2), mientras que para el producto **4g**, las proporciones de los disolventes que constituían la fase móvil fueron constantes (95:5) durante toda la purificación.

## **Caracterización de los productos purificados**

Todos los productos obtenidos se caracterizaron mediante RMN y espectroscopía de masas. Como disolvente deuterado para los análisis de RMN se utilizó D<sub>2</sub>O, CD<sub>2</sub>OD o CDCl<sub>3</sub>, dependiendo de la solubilidad del producto.

### *Espectroscopía de $^1\text{H}$ -RMN.*

Todos los espectros de resonancia magnética nuclear de protón ( $^1\text{H}$ -RMN) se realizaron en espectrómetros de los modelos Varian-500 (500 MHz), Mercury-400 (400 MHz), Varian-400 (400 Hz) y Bruker Avance 400 (400 MHz).

### *Espectroscopía de $^{13}\text{C}$ -RMN.*

Todos los espectros de resonancia magnética nuclear de carbono 13 ( $^{13}\text{C}$ -RMN) se realizaron en espectrómetros de los modelos Varian-500 (125 MHz), Varian-400 (400 Hz) y Bruker Avance 400 (400 MHz).

### *Espectroscopía de RMN bidimensional.*

Los experimentos COSY, HSQC, HMQC, HMBC y NOESY se realizaron en espectrómetros Varian del modelo SYSTEM-500 y SYSTEM-400, utilizando la frecuencia de pulsos estándar.

### *Espectrometría de masas (EM).*

El equipo utilizado fue un espectrómetro de masas de baja resolución VG 12-1250 mediante inyección directa de la muestra, usando la técnica de impacto electrónico (IE) con una energía de 70 eV y mediante Ionización por Electrospray (IES-EM) en un equipo Hewlett Packard – 110 MSD). Los datos obtenidos están expresados en unidades de masa/carga (m/z).

En todos los casos tanto los espectros de resonancia como las masas fueron coincidentes con los previamente descritos en la literatura para cada uno de esos productos (Sánchez-Moreno, 2009; Camps-Bres, 2010; Wong *et al.*, 1995; Espelt *et al.*, 2003; Calveras *et al.*, 2005; Calveras *et al.*, 2009).

# **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



## OBTENCIÓN DE LA RHAMNULOSA-1-FOSFATO ALDOLASA DE *THERMOTOGA MARITIMA*

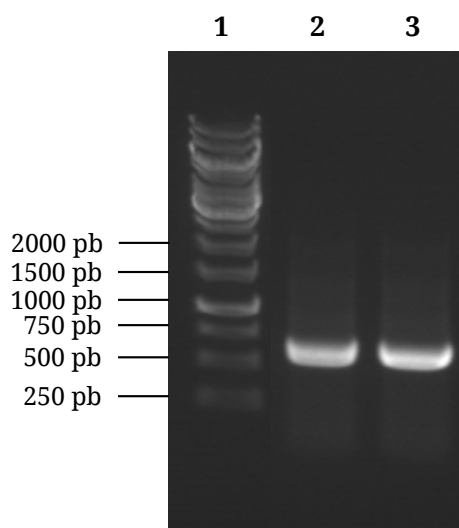
### Amplificación y clonaje del gen TM1072

El gen TM1072 se obtuvo mediante PCR a partir de un lisado celular de *T. maritima*. Los cebadores específicos se diseñaron a partir de la secuencia de nucleótidos (Genbank AE000512) de la cepa MSB8 de *T. maritima*.

Con el fin de realizar dos versiones diferentes de la misma enzima cuya única diferencia fuese la presencia de una cola de histidinas en el extremo N-terminal de una de ellas se crearon tres oligonucleótidos cebadores distintos con diferentes dianas de restricción. De esta manera, para la obtención del gen codificante de la proteína con cola de histidinas se utilizaron las dianas de restricción para las enzimas *NdeI* en el oligonucleótido cebador correspondiente al extremo N-terminal y *HindIII* en el oligonucleótido cebador correspondiente al extremo C-terminal. En el caso del gen codificante de la proteína sin cola de histidinas se utilizaron las dianas de restricción para las enzimas *NcoI* en el oligonucleótido cebador correspondiente al extremo N-terminal y *HindIII* en el oligonucleótido cebador correspondiente al extremo C-terminal. La elección de estas secuencias de restricción se vio motivada, además, porque permitieron

excluir el máximo número de aminoácidos no necesarios en las futuras proteínas recombinantes.

Tanto el fragmento que incorporaba la cola de histidina (*r1patmsht*) como el que no (*r1patm*) fueron amplificados. Su tamaño aproximado fue de 700 pb, lo que se corresponde con el tamaño esperado para el gen TM1072. (Fig. 1RD).



**Figura 1RD.** Gel de agarosa en el que se muestra la amplificación por PCR del gen TM1072. (1) Marcador de número de pares de bases de 1 kb; (2) gen *r1patm*; (3) gen *r1patmsht*.

Una vez purificados los genes *r1patm* y *r1patmsht* se clonaron por separado en el vector pGEM-T easy, obteniéndose las construcciones pGEM-*r1patm* y pGEM-*r1patmsht* con las que se transformaron células DH5 $\alpha$  de *E. coli* (Fig. 2RD). Además, se clonaron los dos genes en el plásmido pET28-b(+), obteniéndose los plásmidos de expresión pET-28b(+)-*r1patm* y pET-28b(+)-*r1patmsht* para, a continuación, transformar células BL21 (DE3) de *E. coli* con sendos plásmidos de expresión.

Las construcciones obtenidas se secuenciaron para verificar que el fragmento incorporado correspondía realmente a los genes *r1patm* y *r1ptmsht*. En ambos casos la secuencia nucleotídica coincidió con la del gen TM1072 de *T. maritima*, no existiendo ninguna mutación.

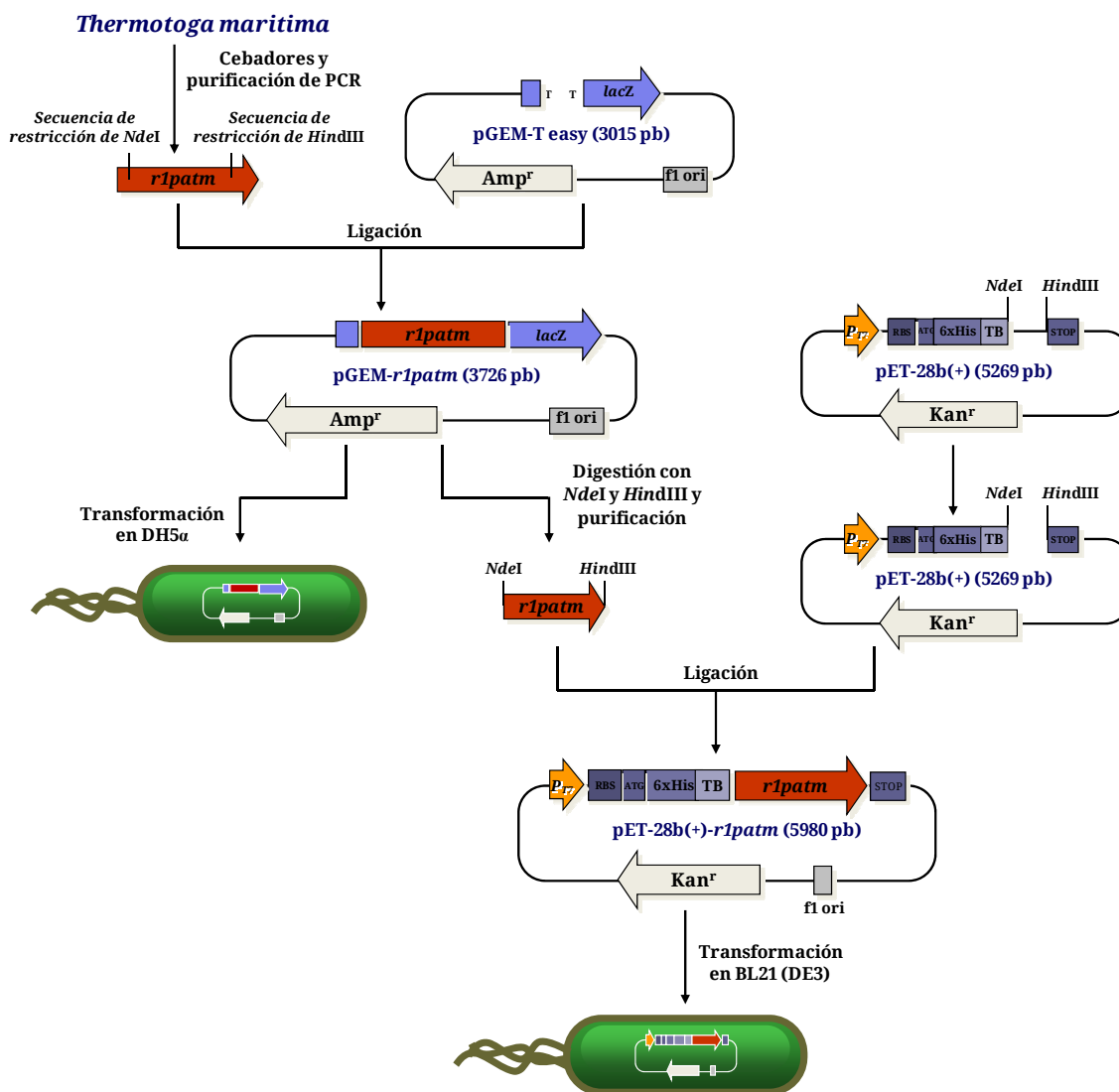


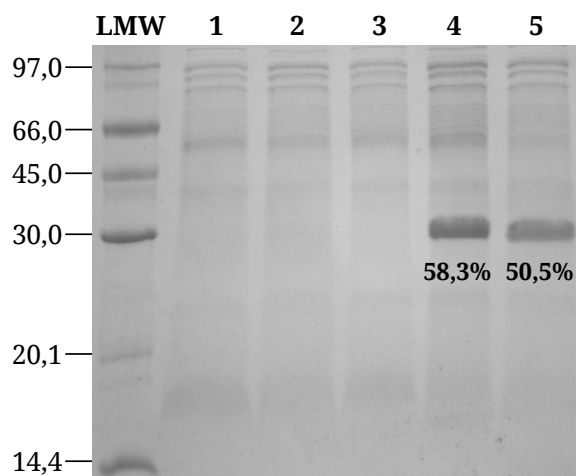
Figura 2RD. Esquema del clonaje del gen *r1patm* en las células DH5α y BL21 (DE3) de *E. coli*.

## Sobreexpresión y purificación

Las células BL21 (DE3) de *E. coli* transformadas tanto con el plásmido pET-28(+)-*r1patm*, como con el plásmido pET-28(+)-*r1patmsht*, se utilizaron para la expresión de las dos versiones de la proteína L-rhamnulosa-1-fosfato aldolasa de *T. maritima*. Estas versiones se denominaron Rha-1PA Tm y Rha-1PA Tm SHT, respectivamente.

El análisis de la sobreexpresión de las dos formas de la enzima se llevó a cabo en geles de acrilamida/bisacrilamida. La masa molecular fue de aproximadamente de 28 kDa, lo cual es consistente con el peso esperado para

ambas versiones proteicas. Como se puede observar en la Figura 3RD, la proteína se encuentra en la fracción soluble del extracto y tiene un elevado nivel de sobreexpresión. Concretamente, con respecto al total de proteína soluble, el porcentaje de sobreexpresión fue del 58,3% y el 50,5% para la Rha-1PA Tm SHT y Rha-1PA Tm, respectivamente.

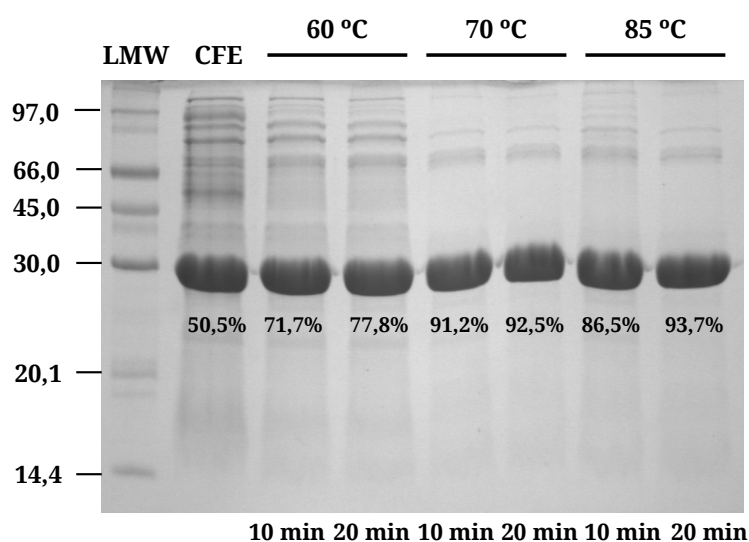


**Figura 3RD.** Análisis por SDS-PAGE de la sobreexpresión de Rha-1PA en las células transformadas respecto a células BL21 sin transformar. **LMW:** marcadores de peso molecular; (1): blanco de expresión de células BL21 (DE3) transformadas con pET-28(+); (2): CFE células BL21 (DE3) transformadas con pET-28(+)-*r1patmsht* antes de inducir las expresión de proteínas; (3): CFE células BL21 (DE3) transformadas con pET-28(+)-*r1patm* antes de inducir las expresión de proteínas; (4) CFE células BL21 (DE3) transformadas con pET-28(+)-*r1patmsht* después de la sobreexpresión; (5): CFE células BL21 (DE3) transformadas con pET-28(+)-*r1patm* después de la sobreexpresión.

*A priori*, la purificación de la Rha-1PA de *T. maritima* debería verse facilitada debido a que proviene de una bacteria hipertermófila cuya temperatura óptima de crecimiento es de 80 °C y, por lo tanto, sus proteínas han de ser resistentes a altas temperaturas. Adicionalmente, en el caso de la enzima codificada en la construcción del plásmido pET28-b(+)-*r1patm* se introduce un cola de 6 histidinas en el extremo N-terminal de la proteína, permitiendo su purificación por cromatografía de afinidad a metales divalentes.

Con el objetivo de aprovechar el origen hipertermófilo de la proteína en su proceso de purificación, se llevó a cabo un análisis del grado de pureza de la enzima con respecto al resto de proteínas solubles presentes en el CFE tras

someter éste a un choque térmico. Como se puede apreciar en la Figura 4RD, el grado de purificación del enzima varía en función de la temperatura y duración del choque térmico. Cuanto mayor fue la temperatura y el tiempo de exposición mayor fue el porcentaje de pureza alcanzado, llegándose a obtener una pureza del 93,7% tras 20 minutos de incubación a 85 °C a partir de un CFE con una sobreexpresión de la proteína del 50,5%. La purificación por este método se logra gracias a la desnaturalización del resto de proteínas que precipitan durante este paso de purificación siendo fácilmente eliminadas por centrifugación. Las ventajas de este método de purificación son su rapidez, que es fácilmente escalable a grandes volúmenes de extracto y el elevado grado de pureza que proporciona.

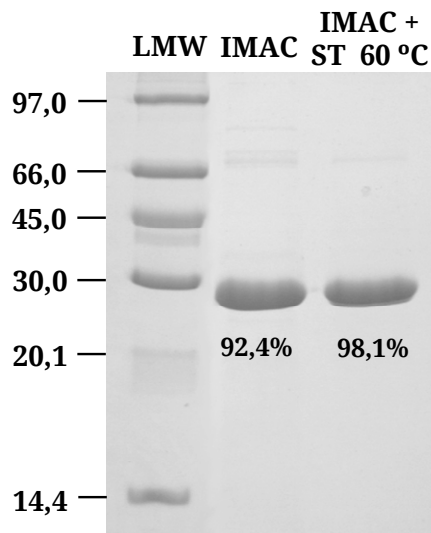


**Figura 4RD.** Purificación por choque térmico a diferentes temperaturas durante 10 y 20 min.

Otro posible método de purificación de la proteína que presenta cola de histidinas es la utilización de cromatografía de afinidad a metales divalentes utilizando para ello una resina de agarosa con alta densidad de  $\text{Ni}^{2+}$ . Utilizando este método se consiguieron niveles de pureza superiores al 92% (Fig. 5RD).

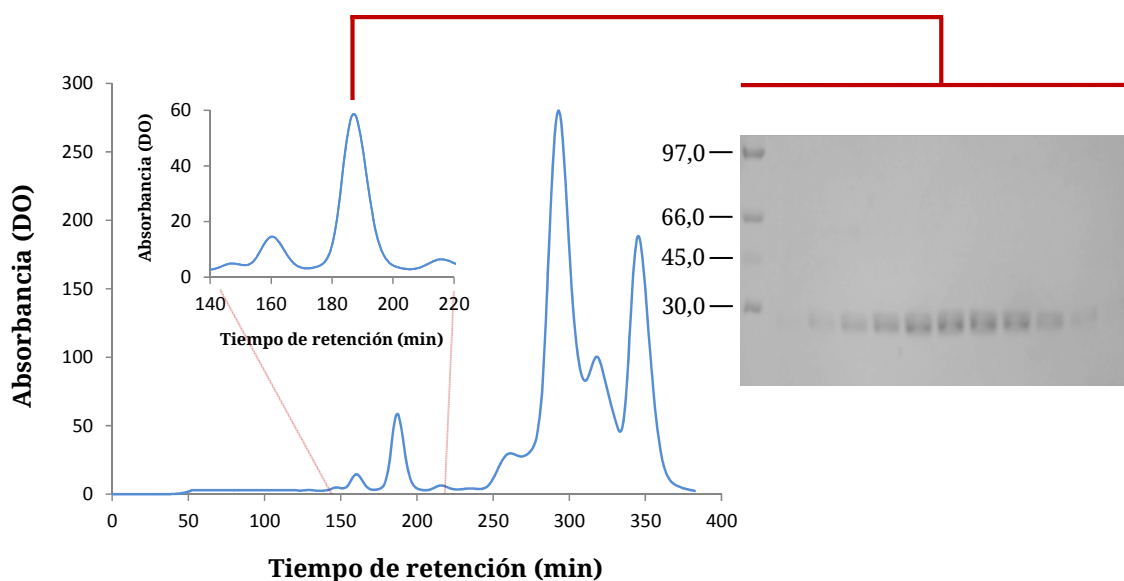
Aunque el grado de pureza conseguido al utilizar de forma aislada este método es muy alto, se estudió, además, su combinación con un paso previo de incubación a 60 °C durante 20 min por dos motivos: (i) alcanzar un nivel de pureza proteica superior, necesario para los análisis de identificación de

la proteína, y (ii) evitar una posible contaminación por triosafosfato isomerasa. Así, al combinar ambos pasos de purificación se logró alcanzar un 98,1% de pureza (Fig 5RD).



**Figura 5RD.** Comparación de la pureza de la Rha-1PA de *T. maritima* utilizando IMAC y choque térmico a 60 °C durante 20 min e IMAC.

En el caso de la aldolasa sin cola de histidinas (Rha-1PA Tm SHT) el aumento del porcentaje pureza de la proteína se consiguió mediante un segundo paso de purificación utilizado fue la cromatografía de exclusión molecular. El tiempo de retención de la proteína recombinante fue de 187 min en una columna HiLoad 26/60 Superdex™ 200 PG, con un flujo de 1 ml min<sup>-1</sup>. El grado de pureza obtenido al combinar el choque térmico a 60 °C durante 20 min con la cromatografía de exclusión molecular fue superior al 99%, no siendo capaces de distinguir otras bandas de proteína en el gel de acrilamida/bisacrilamida (Fig 6RD).

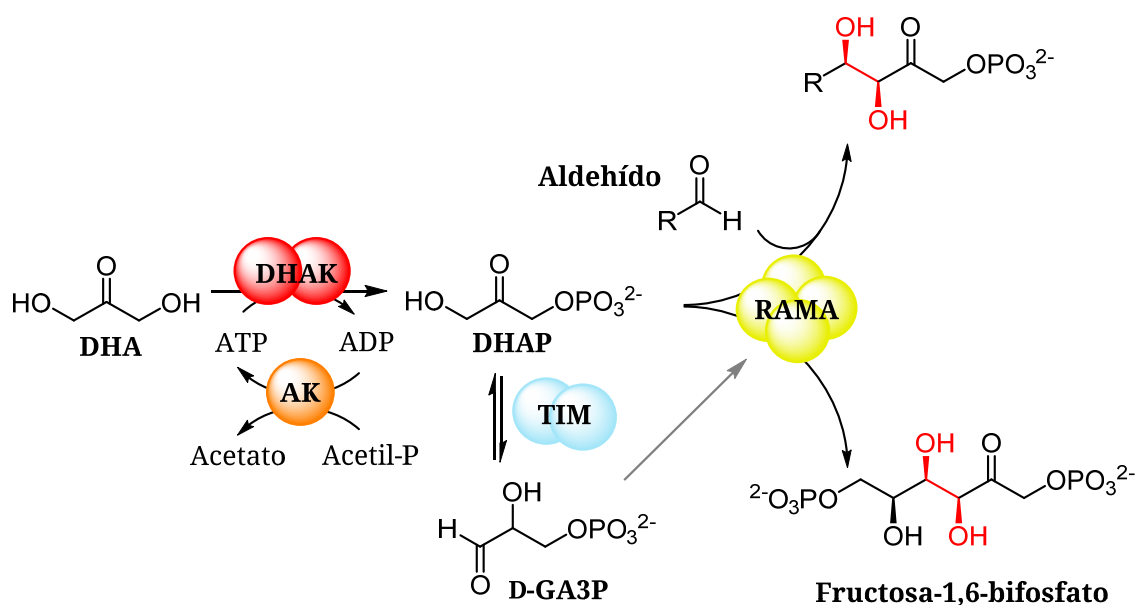


**Figura 6RD.** Perfil de elución de la Rha-1PA Tm SHT tras choque térmico a 60 °C en una cromatografía de exclusión molecular. En el inserto se muestra la ampliación del pico correspondiente a la proteína y su análisis mediante SDS-PAGE.

### ***Estudio de la contaminación por triosa fosfato isomerasa***

Como paso previo al análisis, caracterización y aplicación de la enzima, se llevaron a cabo controles para determinar la posible presencia de triosa fosfato isomerasa como contaminante de las proteínas purificadas. Está descrito en la bibliografía que la aplicación de las aldolasas dependientes de DHAP es muy sensible a la presencia de contaminación por TIM ya que esta enzima cataliza la isomerización de la DHAP a D-GA3P (Dinkelbach *et al.*, 2001) (Fig. 7RD). Este aldehído puede ser sustrato de la aldolasa y dar lugar a la formación de un aldol no deseado.

Es importante destacar que, a pesar de que después de la purificación de la aldolasa no se detectaba una banda en los geles de SDS-PAGE correspondiente al peso del monómero de TIM de *E. coli* (Riley *et al.*, 2006), fue necesario realizar los experimentos. Esto es debido a que TIM es uno de las enzimas más eficientes que existen e incluso una cantidad inapreciable de esta proteína puede interferir seriamente en el proceso sintético catalizado por las aldolasas.



**Figura 7RD.** Reacción enzimática de formación de fructosa-1,6-bisfosfato en presencia de TIM.

Estos ensayos se realizaron incubando DHAP, previamente sintetizada, y utilizando como aldolasa la Rha-1PA de *T. maritima*, pero en ausencia de aldehído, de tal forma que la aparición de aldol a lo largo del tiempo indica claramente la presencia de contaminación por TIM (ver Materiales y Métodos). Adicionalmente, se añadió RAMA, pues el D-GA3P es su sustrato aceptor natural y, en caso de existir contaminación por TIM, catalizaría la reacción aldólica entre la DHAP y el D-GA3P, dando lugar a la formación de fructosa-1,6-bisfosfato.

La contaminación por la enzima TIM, fue eliminada en los pasos de purificación por choque térmico y cromatografía de exclusión molecular, pero no al someterla únicamente a purificación por IMAC. Por lo tanto, siempre fue necesario realizar al menos uno de estos dos pasos de purificación para asegurar la completa eliminación de la isomerasa. La no detección de aldol durante el tiempo de incubación descarta una posible contaminación por TIM en la aldolasa doblemente purificada

## Identificación de la rhamnulosa-1-fosfato aldolasa recombinante de *T. maritima*

### *Análisis de aminoácidos*

En primer lugar se realizó el análisis de aminoácidos de la proteína purificada, tanto para determinar el coeficiente de extinción molar experimental a 280 nm, como para aplicarlo como primera herramienta de identificación de la proteína.

La muestra de proteína pura que se analizó se preparó utilizando el coeficiente de extinción molar teórico ( $\epsilon^{280}=27.370 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) para determinar, de forma aproximada, la concentración de la enzima. Estas muestras fueron analizadas por triplicado por el Servicio de Química de Proteínas del Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), donde hidrolizaron las proteínas y la separación de los distintos aminoácidos se realizó mediante cromatografía de intercambio catiónico y con derivatización postcolumna con ninhidrina.

En la Tabla 1RD se muestra el número de aminoácidos teóricos en función de la secuencia esperada y el número de aminoácidos obtenido experimentalmente para la Rha-1PA Tm y la Rha-1PA Tm SHT. Se puede observar una buena correlación de los datos experimentales y teóricos, lo que confirma la identidad de la proteína en ambos casos. Para el cálculo del coeficiente de extinción molar sólo se consideraron aquellos aminoácidos cuyo número, determinado experimentalmente, se desvía menos de 3 unidades respecto al valor teórico.

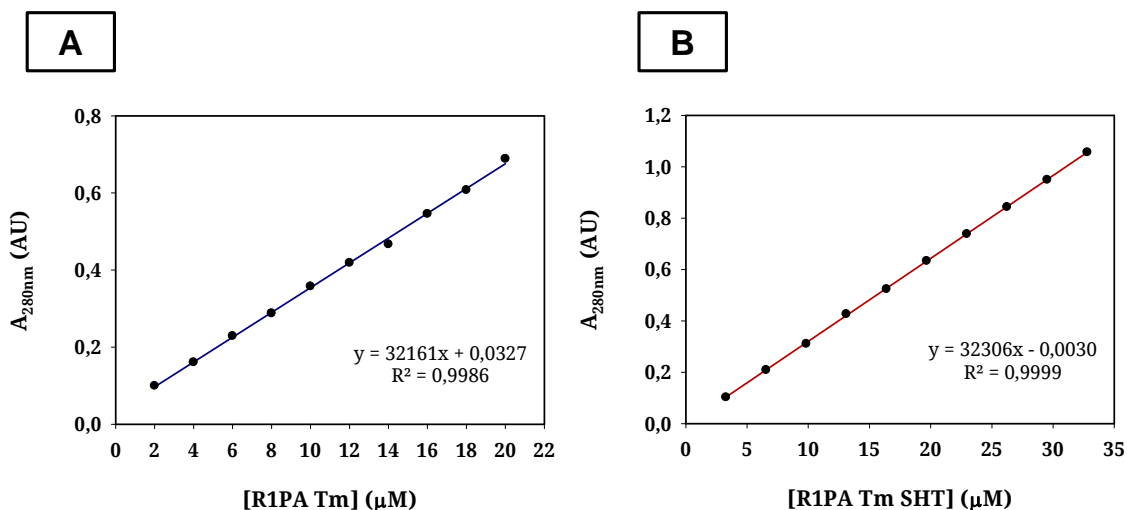
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Tabla 1RD.** Análisis de aminoácidos de la Rha-1PA Tm y Rha-1PA Tm SHT.

Aminoácido	Rha-1PA Tm			Rha-1PA Tm SHT		
	Nº aa teóricos	Nº aa experiment	$\Delta$	Nº aa teóricos	Nº aa experiment	$\Delta$
Asp (D) + Asn (N)	17	16,45	0,55	17	18,73	-1,73
Thr (T)	9	8,74	0,26	9	9,94	-0,94
Ser (S)	15	15,85	-0,85	10	11,04	-1,04
Glu (E) + Gln (Q)	31	31,45	-0,45	31	32,14	-1,15
Pro (P)	14	13,31	0,21	13	13,57	-0,57
Gly (G)	21	20,79	0,21	18	20,63	-2,63
Ala (A)	13	12,91	0,09	13	14,24	-1,24
Cys (C)	1	0,37	0,63	1	0,32	0,68
Val (V)	20	16,4	3,6	19	17,24	1,76
Met (M)	9	8,65	0,35	8	8,55	-0,55
Ile (I)	14	11,6	2,4	14	11,83	2,17
Leu (L)	28	25,79	2,21	27	25,9	1,1
Try (Y)	8	7,31	0,69	8	8,05	-0,05
Phe (F)	8	7,06	0,94	8	8,56	-0,56
His (H)	16	14,62	1,38	9	8,72	0,28
Lys (K)	19	18,59	0,41	19	19,77	-0,77
Arg (R)	10	8,97	1,03	9	9,13	-0,13
TRP (W)	3	0	3	3	0	3
Total de aa	256	238,86	17,14	236	238,37	-2,37

Con las mismas muestras que se utilizaron para el análisis de aminoácidos se realizaron rectas de calibrado para absorbancias comprendidas entre 0,1 y 1 unidades de absorbancia a 280 nm, añadiendo diferentes concentraciones

de aldolasa. De esta manera, conociendo la concentración real de la muestra gracias a los resultados del análisis de aminoácidos, se pudo determinar el coeficiente de extinción molar experimental como la pendiente de dicha recta de calibrado (Fig. 8RD).



**Figura 8RD.** Recta de calibrado para calcular el coeficiente de extinción molar experimental de la Rha-1PA Tm (A) y de la Rha-1PA Tm SHT (B).

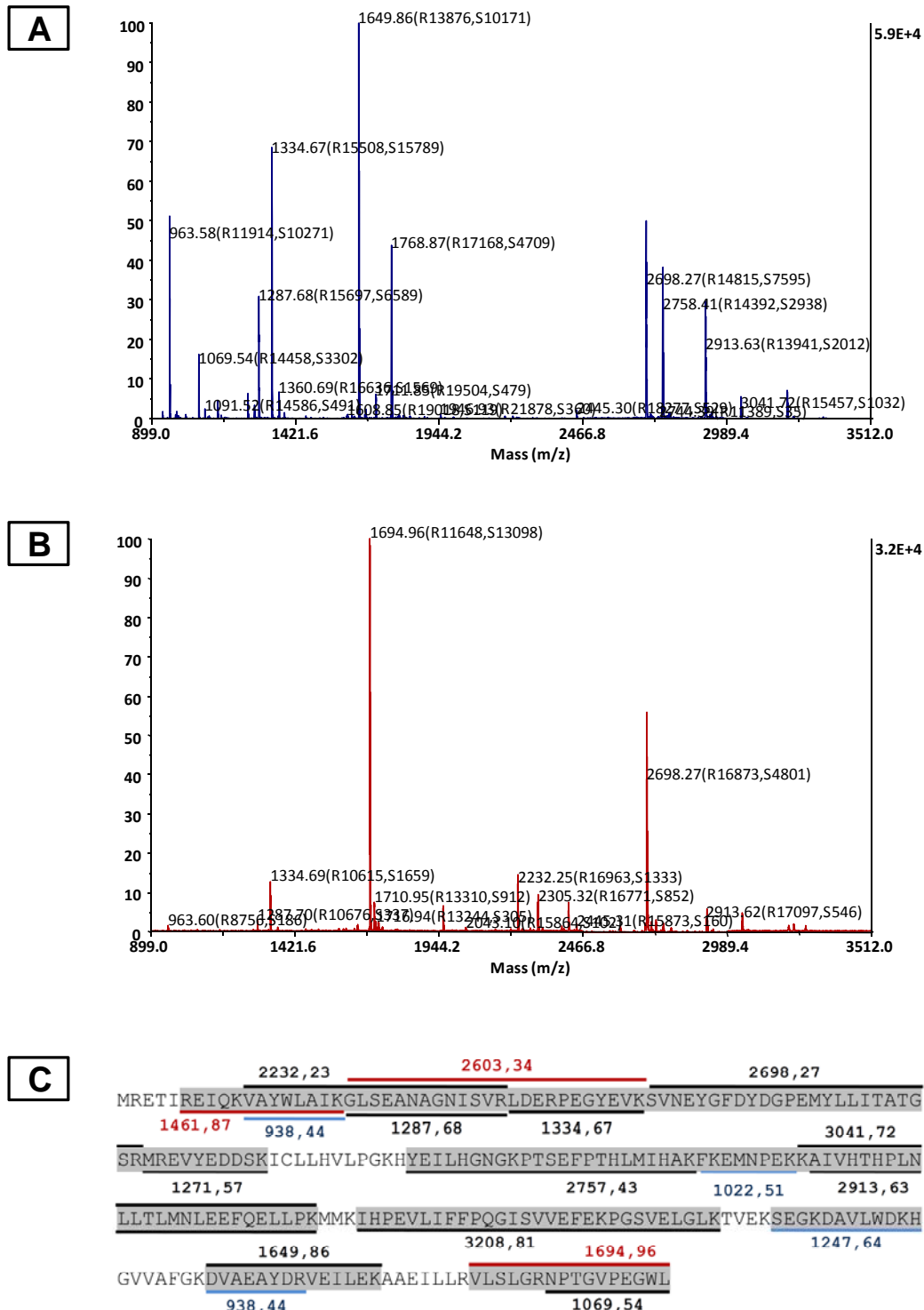
El valor del coeficiente de extinción molar calculado experimentalmente para la Rha-1PA Tm y la Rha-1PA Tm SHT fue de  $\epsilon^{280}=32.161 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  y de  $\epsilon^{280}=32.306 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , respectivamente. A la vista de estos resultados se puede comprobar que la tendencia habitual de utilizar los coeficientes de extinción molar teóricos para los cálculos de concentración de proteína lleva a un resultado erróneo que, en nuestro caso, supondría una sobrestimación en la concentración del 17,5% para la Rha-1PA Tm y del 18,03% para Rha-1PA Tm SHT.

### *Determinación de la huella peptídica*

Como segunda herramienta para la identificación de la proteína se realizó un análisis de la huella peptídica. Este análisis permitió la identificación de 15 péptidos en la Rha-1PA Tm y 14 en la Rha-1PA Tm SHT. De este modo, por comparación de las secuencias de péptidos, que cubren la mayor parte de la

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

secuencia de aminoácidos de la Rha-1PA de *T. maritima*, fue posible identificar la proteína (Fig.9RD).



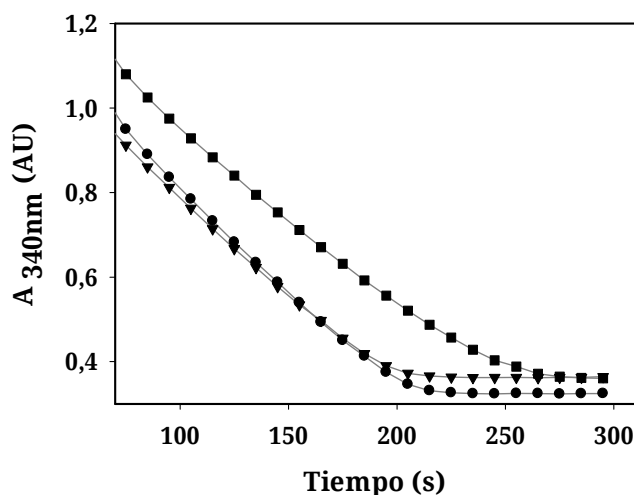
**Figura 9RD.** Cromatograma de la huella peptídica de la Rha-1PA Tm (A) y de la Rha-1PA Tm SHT (B). Los péptidos identificados están sombreados en la secuencia de la proteína (C). Los péptidos subrayados en **negro** se han obtenido en la huella peptídica de ambas versiones de la proteína, en **azul** aquellos obtenidos con la Rha-1PA Tm y en **rojo** los obtenidos únicamente con la Rha-1PA Tm SHT.

## CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA RHAMNULOSA-1-FOSFATO ALDOLASA DE *THERMOTOGA MARITIMA*

### ¿Es la rhamnulosa-1-fosfato aldolasa de *T. maritima* una aldolasa de Tipo II?

Como se ha descrito previamente en la Introducción de este trabajo, según el mecanismo de reacción las aldolasas pueden dividirse en dos grupos: aldolasas de tipo I y aldolasas de tipo II. Las primeras se caracterizan por la formación de una base de Schiff entre una lisina del centro activo y el carbono carbonílico de la cetona donadora. Y las segundas requieren un metal divalente como cofactor, generalmente  $Zn^{2+}$ , que actúa como un ácido de Lewis activando al nucleófilo (Fig. 18, Introducción). La Rha-1PA de *T. maritima* ha sido asignada putativamente a las aldolasas de tipo II por homología de secuencia con la Rha-1PA de *E. coli*.

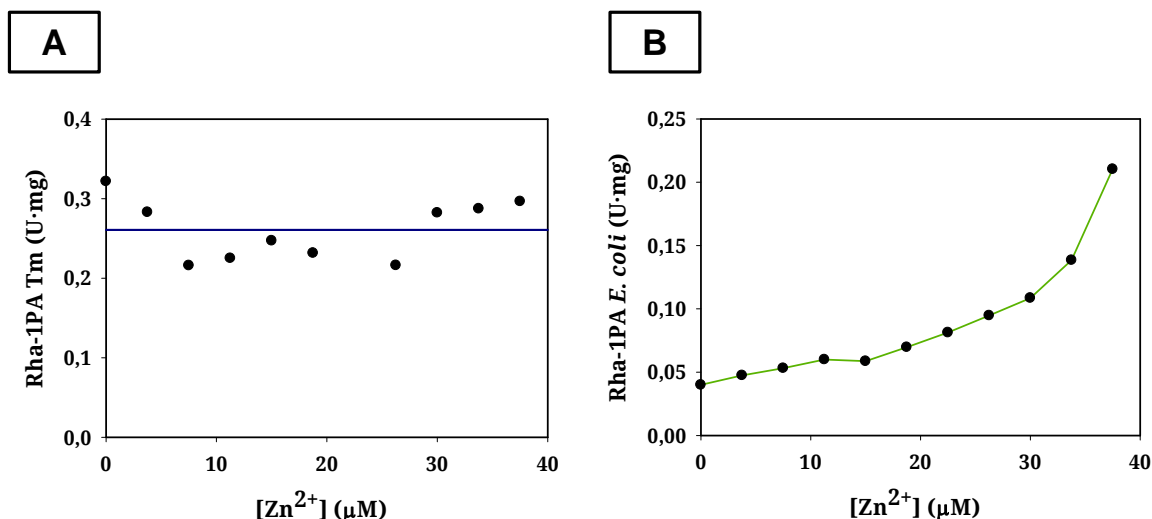
Al ser la actividad enzimática de las aldolasas de tipo II dependiente de un metal divalente como cofactor, éstas pueden ser inhibidas de forma reversible en presencia de agentes quelantes que secuestran el catión divalente del centro activo de la enzima. Con el fin de comprobar si esta asignación era correcta, se llevó a cabo la medida de la actividad retroaldólica de la aldolasa de *T. maritima* en presencia de 3 concentraciones de EDTA. Como se muestra en la Figura 10RD, la actividad de la enzima no se vio significativamente afectada por la presencia de EDTA en el medio.



**Figura 10RD.** Actividad de la Rha-1PA de *T. maritima* en presencia de las siguientes concentraciones de EDTA: (●) ausencia de EDTA, (▼) 1 mM, (■) 10 mM. La pendiente de la caída de la absorbancia a 340 nm es proporcional al nivel de reacción retroaldólica catalizada por la aldolasa a las distintas concentraciones de EDTA.

La falta de inhibición de la Rha-1PA de *T. maritima* durante este experimento pudo ser debida a la retención de cationes divalentes en el centro catalítico, es decir, que el agente quelante no hubiera atrapado todo el  $\text{Me}^{2+}$  unido a la enzima en el tiempo de duración de la reacción como consecuencia de la rigidez estructural de la enzima o de la fuerte unión a la misma. Para comprobar esta posible explicación se realizó un ensayo de la actividad retroaldólica con concentraciones crecientes de  $\text{Zn}^{2+}$ . La enzima fue previamente incubada con EDTA 0,1 M durante una hora en baño de hielo para eliminar cualquier posible ion divalente que hubiese en la preparación enzimática. Además, se utilizó como control la Rha-1PA de *E. coli* ya que su pertenencia a las aldolasas de tipo II está claramente establecida (Schwartz y Feingold, 1972; Chiu *et al.*, 1975).

Como se muestra en la Figura 11RD, los datos de actividad obtenidos indican claramente que la actividad de Rha-1PA de *E. coli* es dependiente de la concentración de  $\text{Zn}^{2+}$ , mientras que la actividad de Rha-1PA de *T. maritima* mantiene valores de actividad similares a las diferentes concentraciones de  $\text{Zn}^{2+}$ , no viéndose afectada por la presencia o ausencia de dicho ion metálico.



**Figura 11RD.** Actividad específica en función de la concentración de  $Zn^{2+}$  de la Rha-1PA de *T. maritima*. (A) y de la Rha-1PA de *E. coli* (B).

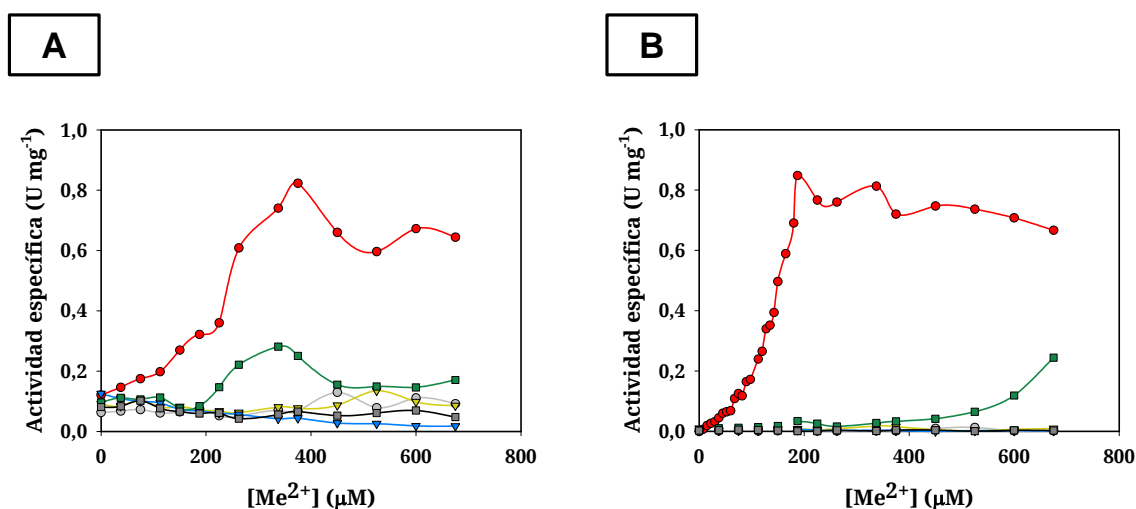
Este comportamiento de la enzima frente al  $Zn^{2+}$  puede deberse a tres motivos:

- En primer lugar, la dificultad de la eliminación de metales unidos a las enzimas hipertermófilas, que puede ser debida bien a una mayor rigidez estructural de la enzima a temperaturas inferiores a su temperatura óptima, o bien a un aumento en las fuerzas de unión establecidas entre el cofactor y la apoenzima como parte de un mecanismo de estabilización enzimática (Vieille y Zeikus, 2001). Un ejemplo característico descrito en la literatura es la  $\alpha$ -amilasa de *Pyrococcus furiosus*, que fue inicialmente descrita como una enzima  $Ca^{2+}$  independiente ya que los tratamientos con EDTA a temperatura ambiente no afectaban a su actividad (Dong *et al.*, 1997). Posteriormente, una caracterización más detallada reveló que esta enzima contenía al menos dos átomos de  $Ca^{2+}$  que no podían ser separados por tratamiento con EDTA a temperaturas inferiores a 70 °C (Savchenko *et al.*, 2001). De esta forma, a pesar del tratamiento con EDTA 0,1 M en las condiciones anteriormente descritas, es posible que el metal divalente presente en el centro catalítico de la enzima no haya sido eliminado, siendo responsable de la actividad residual remanente. En ese caso, el  $Zn^{2+}$  tendría su entrada en el

centro catalítico impedida y, por lo tanto, la actividad de la enzima se vería inhibida.

- Otra posible explicación a la falta de variación de la Rha-1PA de *T. maritima* podría ser que, aunque está ampliamente aceptado que el cofactor natural empleado por las aldolasas de tipo II es el  $Zn^{2+}$ , se han observado diferencias con respecto a la preferencia por el metal divalente utilizado como ácido de Lewis entre las aldolasas de tipo II de origen mesófilo ( $Zn^{2+}$ ) y aquellas de origen termófilo ( $Co^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ) (Samland y Sprenger, 2006). Así pues, el  $Zn^{2+}$  podría no ser el cofactor de la Rha-1PA de *T. maritima*, por lo que necesitaría otro metal divalente como activador.
- Por último, en contra de lo esperado por la gran similitud con su equivalente mesófila de *E. coli*, la Rha-1PA de *T. maritima* podría ser una aldolasa de tipo I. En este caso, la actividad de la enzima no dependería de la presencia de ningún metal divalente y, por lo tanto, esta sería la razón de que la actividad permaneciese estable frente a la adición de  $Zn^{2+}$  en el medio.

Por lo tanto, antes de descartar la pertenencia de la Rha-1PA de *T. maritima* a las aldolasas de tipo II, se comprobó la actividad catalítica de la enzima en presencia diversos metales divalentes ( $Co^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  y  $Mg^{2+}$ ). Además, en lugar de a 4 °C, la incubación previa con EDTA 0,1 M se realizó tanto a R/T como a 80 °C durante una hora para asegurar la completa eliminación del metal divalente del centro catalítico. Los ensayos de actividad se realizaron a concentraciones crecientes de metal divalente presente en el medio comprendidas entre 0 y 675  $\mu$ M (Fig.12RD).



**Figura 12RD.** Actividad específica de la Rha-1PA de *T. maritima* tratada con EDTA 0,1 M durante una hora, en función de la concentración de metal divalente ( $\text{Me}^{2+}$ ) presente en el medio a R/T (A) y a 80 °C (B). Los cationes utilizados fueron:  $\text{Co}^{2+}$  (●),  $\text{Zn}^{2+}$  (○),  $\text{Fe}^{2+}$  (▼),  $\text{Cu}^{2+}$  (▽),  $\text{Ni}^{2+}$  (■) y  $\text{Mg}^{2+}$  (◻).

La completa inactivación de la enzima sólo se consiguió cuando ésta se trató con EDTA a 80 °C, mientras que, cuando se trató a temperatura ambiente no se logró ninguna disminución en la actividad residual de la enzima en comparación con la obtenida en el tratamiento con EDTA a 4 °C. Por lo tanto, la actividad residual es debida a la retención de metales divalentes en el centro catalítico, necesitándose un aumento de la temperatura para disminuir la rigidez de la enzima y eliminar completamente el cofactor.

De todos los cationes empleados, el  $\text{Co}^{2+}$  fue el activador más potente, obteniendo una actividad retroaldólica máxima a una concentración de  $\text{Co}^{2+}$  de 187,5  $\mu\text{M}$  o de 375  $\mu\text{M}$ , dependiendo de si el metal divalente había sido eliminado del centro catalítico completamente o no. Así mismo, el perfil de actividad obtenido muestra que, cuando se alcanzan determinadas concentraciones de  $\text{Co}^{2+}$ , se produce inhibición de la aldolasa, manifestada por un descenso en su actividad.

Además del  $\text{Co}^{2+}$ , el único metal que mostró la capacidad de actuar como cofactor fue el  $\text{Ni}^{2+}$ , siendo el máximo de actividad lograda con este metal aproximadamente 3 veces inferior al  $\text{Co}^{2+}$  con a una concentración de catión 3,6 veces mayor ( $[\text{Ni}^{2+}] = 675 \mu\text{M}$ ). Ninguno de los otros metales divalentes

utilizados en estas reacciones ( $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ , o  $\text{Mg}^{2+}$ ) mostró ninguna capacidad de activación de la enzima.

Lo que más llama la atención de estos resultados es la falta absoluta de regeneración de la actividad por parte del  $\text{Zn}^{2+}$  dado el papel que se le ha otorgado como cofactor paradigma de las aldolasas de tipo II (Samland y Sprenger, 2006; Dean *et al.*, 2007; Clapés y Garrabou, 2011). Sin embargo, aunque la mayoría de aldolasas hipertermófilas que tienen preferencia del  $\text{Co}^{2+}$  sobre el  $\text{Zn}^{2+}$  como activador son capaces de aceptar ambos metales como cofactor, también han sido descritas aldolasas que presentan el mismo comportamiento que la Rha-1PA de *T. maritima*. Así, dentro del primer grupo se puede incluir las FBPA de *Pseudomonas aeruginosa* (Labbé *et al.*, 2011), *Bacillus cereus* (Labbé *et al.*, 2011) y *Aquifex aeolicus* (La *et al.*, 2009). En el segundo grupo se encuentran las FBPA de *Clostridium thermosaccharolyticum* (Barnes *et al.*, 1971) y *Thermus aquaticus* (Freeze y Brock, 1970; de Montiny y Sygusch, 1996; Sauvé y Sygusch, 2001; Izard y Sygusch, 2004). Con la aldolasa de *T. aquaticus* comparte, además, ser las únicas aldolasa descritas hasta el momento que pueden utilizar  $\text{Ni}^{2+}$  como cofactor.

De entre los metales que con los que no se produjo un aumento en la actividad catalítica del enzima, cabe destacar la pérdida progresiva de actividad basal al someter a la aldolasa a concentraciones crecientes de  $\text{Cu}^{2+}$  (Fig. 12(A)RD). Aunque todavía no se conoce su mecanismo, el carácter inhibitor de este metal ha sido descrito para otras aldolasas dependientes de DHAP como es el caso de las ya mencionadas de FBPA de *T. aquaticus* y de *Aquifex aeolicus*, así como de la FBPA de *Anoxybacillus gonensis* (Ertunga *et al.*, 2007).

A la vista de los datos de actividad obtenidos, se puede afirmar sin lugar a dudas que la Rha-1PA de *T. maritima* es una aldolasa de tipo II, como había sido asignada de forma putativa, requiriendo  $\text{Co}^{2+}$  en lugar de  $\text{Zn}^{2+}$ , ya que para llevar a cabo la reacción retroaldólica necesita un ion divalente como cofactor. Esta predilección por el  $\text{Co}^{2+}$ , a pesar de que ambos cationes forman estructuras de coordinación tetraédricas, podría ser debida al menor

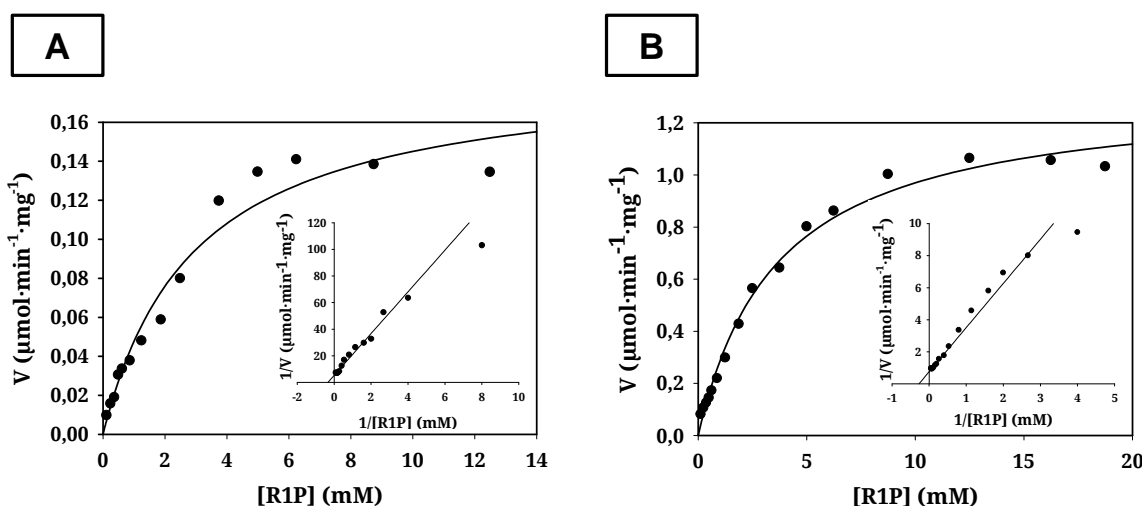
volumen que ocupa el  $\text{Co}^{2+}$ , encajando mejor en un sitio activo más pequeño (Cheryl *et al.*, 2002; Izard y Sygusch, 2004).

### **Determinación de los parámetros cinéticos de la Rha-1PA de *T. maritima***

El siguiente paso en el estudio de la Rha-1PA de *T. maritima* fue su caracterización cinética. Los parámetros cinéticos se determinaron con respecto a la reacción retroaldólica, utilizando como sustrato concentraciones crecientes de rhamnulosa-1-fosfato en un intervalo comprendido entre 0,005 a 18,75 mM. Para la determinación de las constantes cinéticas se utilizó la Ecuación de Michaelis-Menten (Ec. 1RD) y sus derivaciones para la representación lineal de los datos de velocidad.

$$V_i = \frac{V_{m\acute{a}x} \times [S]}{K_M + [S]} \quad \text{Ec. 1RD}$$

Con el propósito de conocer cómo afectaba a la aldolasa la presencia en el centro catalítico de cationes divalentes diferentes al  $\text{Co}^{2+}$  al ser sobreexpresada en *E. coli*, se analizó el comportamiento cinético de dos preparaciones distintas de enzima recombinante. En primer lugar (Rha-1PA Tm01), la proteína fue purificada por choque térmico seguido de purificación por IMAC (ver Materiales y Métodos). En el segundo caso (Rha-1PA Tm02), la enzima fue, además, posteriormente incubada con EDTA (0,1 M) a 80 °C durante 1 h para eliminar los metales divalentes que pudieran estar presentes en su centro catalítico. En ambos casos se añadió  $\text{Co}^{2+}$  en el medio hasta una concentración de 187,5  $\mu\text{M}$  (Fig. 13RD).



**Figura 13RD.** Estudios cinéticos con respecto a su sustrato natural, la Rha-1P, de la Rha-1PA de *T. maritima*. Los ensayos se realizaron utilizando la enzima con colas de histidinas sin tratar (A: Rha-1PA Tm01) y tratándola con EDTA (0,1 M) durante 1 h a 80 °C (B: Rha-1PA Tm02). El inserto muestra la representación de Lineweaver-Burk utilizada para la determinación de las constantes cinéticas.

Según muestran las gráficas sendas preparaciones de proteína muestran un comportamiento de Michaelis-Menten. Los parámetros cinéticos se resumen en la Tabla 2RD, donde se puede observar que no hay una modificación substancial de la  $K_M$ , mientras que la  $k_{cat}$  fue 7 veces mayor al utilizar la enzima Rha-1PA Tm02. Es decir, que la ocupación de parte de los centros catalíticos por iones diferentes al  $Co^{2+}$  no afectan a la interacción con el sustrato, pero sí a la capacidad catalítica de la enzima.

**Tabla 2RD.** Comparación de los valores cinéticos obtenidos para la Rha-1PA de *T. maritima* y los descritos en la literatura para la Rha-1PA de *E. coli*.

Enzima	$K_M$ (M)	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$k_{cat}/K_M$ (s <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> )
Rha-1PA Tm01 <sup>[a]</sup>	$2,96 \times 10^{-3}$	0,36	$0,12 \times 10^3$
Rha-1PA Tm02 <sup>[a]</sup>	$3,6 \times 10^{-3}$	2,52	$0,7 \times 10^3$
Rha-1PA <i>E. coli</i> <sup>[b]</sup>	$0,2 \times 10^{-3}$	38,3	$1,9 \times 10^5$

[a] Parámetros cinéticos obtenidos a 25 °C.

[b] Datos descritos en la bibliografía por Chiu *et al.* (1975).

Estos datos son coherentes con el comportamiento previo observado del centro activo para la unión al catión divalente. En experimentos anteriores se demostró que para la eliminación del ion metálico del centro catalítico es necesario la incubación a altas temperaturas y un agente quelante fuerte como el EDTA a alta concentración. Solo después de añadir  $\text{Co}^{2+}$  tras este tratamiento se restaura completamente la actividad de la proteína, dado que la totalidad de los centros catalíticos poseen cofactor, incrementando el número de centros efectivos. Es por esta razón que se aprecia una  $k_{\text{cat}}$  7 veces superior al comparar la enzima sin tratar con la enzima tratada. Este comportamiento, además de ser el esperado, señala la importancia de que todos los centros catalíticos sean ocupados por el cofactor natural ( $\text{Co}^{2+}$ ).

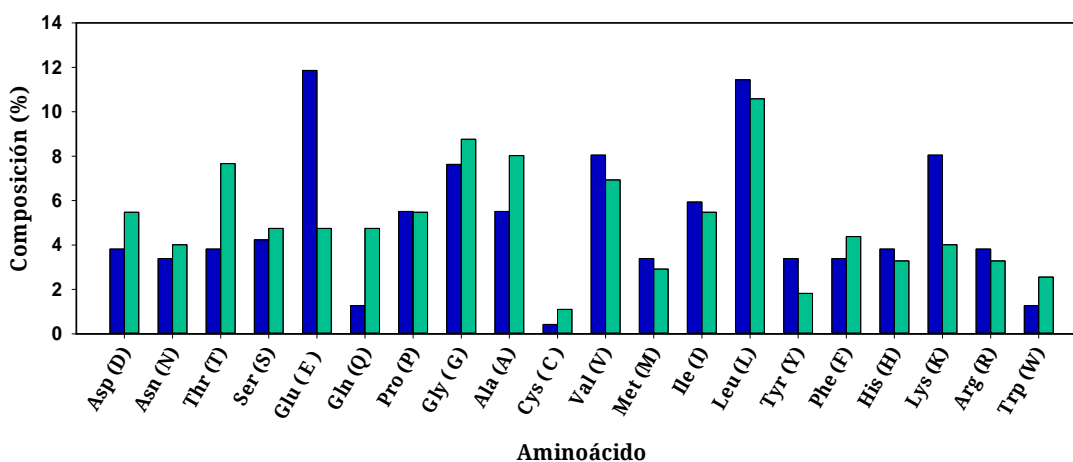
Los valores cinéticos calculados para la Rha-1PA de *T. maritima* difieren significativamente de los referidos previamente en la literatura para su homóloga mesófila de *E. coli* (Chiu *et al.*, 1975). Esta diferencia es especialmente significativa en los valores obtenidos para la  $k_{\text{cat}}$ , que es más de un orden de magnitud mayor en el caso de la enzima de *E. coli*. Sin embargo, ha de tenerse en consideración que los parámetros cinéticos calculados para la aldolasa de *T. maritima* fueron adquiridos en reacciones a 25 °C. Esta temperatura está muy por debajo de su temperatura catalítica óptima, siendo la actividad específica de la enzima más de 20 veces inferior que a 95 °C, como se demostrará posteriormente. Si tenemos en cuenta que los valores de  $Q_{10}$  —definido como el incremento medio de la velocidad de reacción por cada aumento de 10 °C en la temperatura— de la amplia mayoría de las enzimas hipertermófilas son los mismos que los de sus homólogas mesófilas ( $Q_{10}=2$ ), es de esperar que, a temperaturas más cercanas a su temperatura óptima la Rha-1PA de *T. maritima* muestre un considerable aumento de número de recambio catalítico ( $k_{\text{cat}}$ ) (Elias *et al.*, 2014).

## Estudio de la estructura de la Rha-1PA de *T. maritima*

### *Estructura primaria*

En la búsqueda de una explicación para la estabilidad térmica de las enzimas de microorganismos hipertermófilos no se han encontrado aminoácidos, modificaciones covalentes o motivos estructurales nuevos. La termoestabilidad de una proteína parece ser adquirida a través de una combinación de pequeñas modificaciones estructurales mediante el cambio de determinados aminoácidos (Fields, 2001; Li *et al.*, 2005).

Al comparar el contenido de aminoácidos de la Rha-1PA de *T. maritima* con la de su homóloga mesófila de *E. coli*, se comprueba que el porcentaje de residuos aminoacídicos es similar a la hallada en otras enzimas de microorganismos hipertermófilos (Fig 14RD).



**Figura 14RD.** Composición de aminoácidos de las Rha-1PA de *T. maritima* (azul) y *E. coli* (verde).

Como se puede apreciar en la Figura 14RD, la variación más significativa es el incremento de ácido glutámico de la Rha-1PA de *T. maritima*, conteniendo aproximadamente tres veces más que la Rha-1PA de *E. coli*. El aumento de este aminoácido en las enzimas termófilas es común debido a su larga cadena lateral, que es capaz de establecer interacciones electrostáticas con residuos distantes incrementando simultáneamente la hidrofobicidad de la superficie (Argos *et al.*, 1979; Sauvé y Sygusch, 2001).

La sustitución de parte de las lisinas por argininas es frecuente en las enzimas de microorganismos termófilos. De esta manera se preserva la carga positiva, al mismo tiempo que se alarga la cadena lateral, facilitando la interacción con aminoácidos alejados, y se disminuye la reactividad química debido a su alto  $pK_a$  (Argos *et al.*, 1979; Merkler *et al.*, 1981; Mrabet *et al.*, 1992; Sauvé y Sygusch, 2001). Sin embargo, en el caso de nuestra proteína no sólo no se ha producido dicho intercambio, si no que el porcentaje de lisinas es más del doble que en la proteína de *E. coli*, contribuyendo así al aumento global de aminoácidos cargados como se detallará más adelante.

La incidencia de los aminoácidos más lábiles se reduce significativamente en las enzimas termoestables para evitar la desnaturalización proteica a altas temperaturas derivada de su degradación (Demirjian *et al.*, 2001). En la Rha-1PA de *T. maritima* se refleja claramente en el bajo número de residuos de asparagina y glutamina presentes, aminoácidos propensos a experimentar la desaminación a altas temperaturas (Danson y Hough, 1998; Nonaka *et al.*, 2008). De la misma manera, se ve reducida la presencia de residuos de cisteína hasta un tercio en la Rha-1PA de *T. maritima* con respecto a la aldolasa de *E. coli*, ya que son susceptibles de oxidarse, especialmente en presencia de  $Cu^{2+}$ , provocando la formación de puentes disulfuro intra e intermoleculares y la generación de ácido sulfónico (Vieille y Zeikus, 2001).

Por último, basándonos en la composición global de aminoácidos de estas dos proteínas se aprecia que, en la enzima hipertermófila, hay un aumento en el contenido de residuos cargados a expensas de los aminoácidos polares sin carga (Tabla 3RD). Una mayor proporción de aminoácidos cargados favorece la formación de puentes de hidrógeno y la de interacciones electroestáticas, incrementándose así la estabilidad de la enzima (Jelesarov y Karshikoff, 2009; Saelensminde *et al.*, 2009). En cuanto a los aminoácidos apolares, las enzimas hipertermófilas generalmente tienen un ligero aumento en su porcentaje con respecto a las mesófilas, propiciando las interacciones hidrofóbicas que son consideradas como el mecanismo de estabilidad principal (Takano *et al.*, 2013; Gromiha *et al.*, 2013). Sin embargo, esto no se da en la Rha-1PA de *T. maritima* que mantiene una proporción similar, aunque ligeramente inferior, de estos residuos en comparación con

la Rha-1PA de *E. coli*. No obstante, aunque la composición aminoacídica puede dar una aproximación de la termoestabilidad, probablemente sea más importante la distribución de los aminoácidos en la estructura tetramérica de la proteína y su capacidad de establecer interacciones que la estabilicen (Numata *et al.*, 2001; Kumar *et al.*, 2014). Por ejemplo, la *O*<sup>6</sup>-metilguanina-ADN metiltransferasa de *Thermococcus kodakaraensis* (*Tk*-MGMT) contiene una secuencia de aminoácidos muy parecida a la de su equivalente de *E. coli*, con diferencias en el contenido de aminoácidos con carga y apolares poco significativas. Sin embargo, cuando se realizó un estudio del área de superficie accesible al disolvente (SASA) de las dos proteínas se puso de manifiesto que el contenido en aminoácidos con carga en la superficie de la proteína era mucho mayor (54%) en la enzima hipertermófila, concomitante con la disminución de los residuos hidrofóbicos y polares no cargados (32%) (Imanaka, 2011).

**Tabla 3RD.** Comparación de la composición en los distintos tipos de aminoácidos de la Rha-1PA de *T. maritima* y la Rha-1PA de *E. coli*.

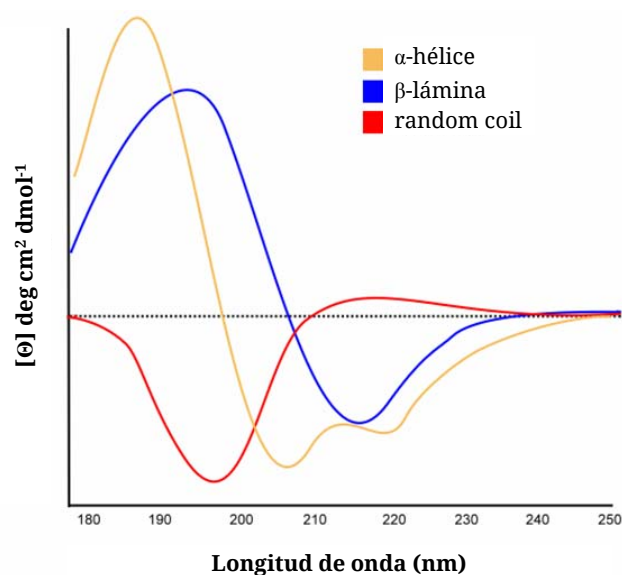
Tipos de aminoácidos	Rha-1PA de <i>T. maritima</i>		Rha-1PA de <i>E. coli</i>	
	Nº de aa	% de aa	Nº de aa	% de aa
<b>aa polares con carga</b>	93	39,4	81	29,6
<b>aa polares sin carga</b>	39	16,5	66	24,1
<b>aa apolares</b>	120	50,8	115	52,6

[a] Algunos aa se han incluido en varios grupos atendiendo a su doble naturaleza como la fenilalanina (aa con carga y apolares) o la tirosina (aa polares neutros y con carga).

### ***Estructura secundaria***

La estructura secundaria de una proteína se puede estudiar mediante espectroscopía de dicroísmo circular en el ultravioleta lejano (190-250 nm), donde el cromóforo objeto de estudio es el enlace peptídico y la señal es dependiente del plegamiento. Como se puede observar en la Figura 15RD, las estructuras de  $\alpha$ -hélice,  $\beta$ -lámina y random coil (RC) presentan espectros de

DC característicos en forma e intensidad. Así, los espectros de DC de una estructura predominantemente  $\alpha$ -hélice se caracterizan por tener dos mínimos de intensidad a 222 y 208 nm y un máximo a 192 nm. Cuando la estructura es predominantemente  $\beta$ -lámina presenta un mínimo a 215 nm y un máximo a 198 nm. Cuando la proteína se muestra mayoritariamente como random coil el espectro de DC presenta un máximo a 212 nm y un mínimo a 195 nm (Greenfield, 2006a; Greenfield, 2006b).

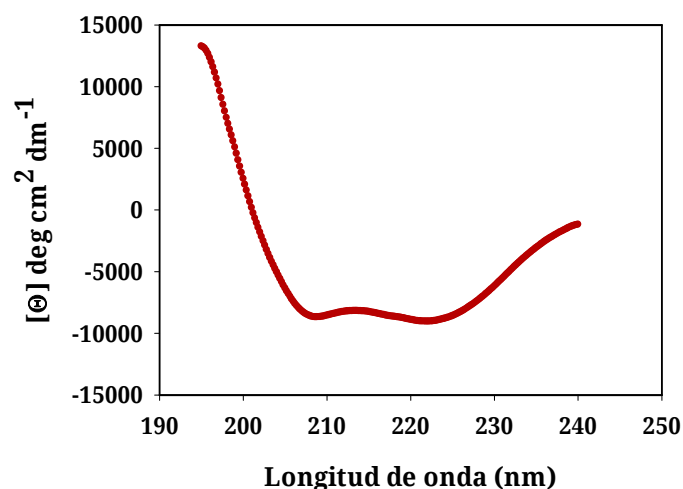


**Figura 15RD.** Espectros de DC en la región del UV-lejano para una cadena de polilisinas,  $(Lys)_n$ , en tres conformaciones distintas:  $\alpha$ -hélice (a pH 10,8),  $\beta$ -lámina (a pH 11,1 después de calentar a 52°C y volver a enfriar) y random coil (a pH 7,0).

Para el estudio de la estructura secundaria de la proteína se obtuvo un espectro formado por la media de cuatro registros en la región del ultravioleta lejano (195-240 nm), a los cuales se les restó el correspondiente blanco. El espectro resultante se trató y suavizó con el programa informático Jasco Spectra Analysis para, a continuación, analizarlo con el paquete informático CDPro, compuesto por tres programas de cálculo: CONTINLL, SELCON3 y CDSSTR (Sreerama y Woody, 2000).

El espectro se realizó a 20 °C utilizando la aldolasa sin cola de histidinas para evitar cualquier posible interferencia de ésta en la estructura secundaria. En la Figura 16RD se puede distinguir que el espectro de la proteína presentó mínimos en la señal a ~208 y ~222 nm y un máximo a ~192

nm, indicativos de una estructura secundaria mayoritaria de  $\alpha$ -hélice (Pelton y Mc Lean, 2000).



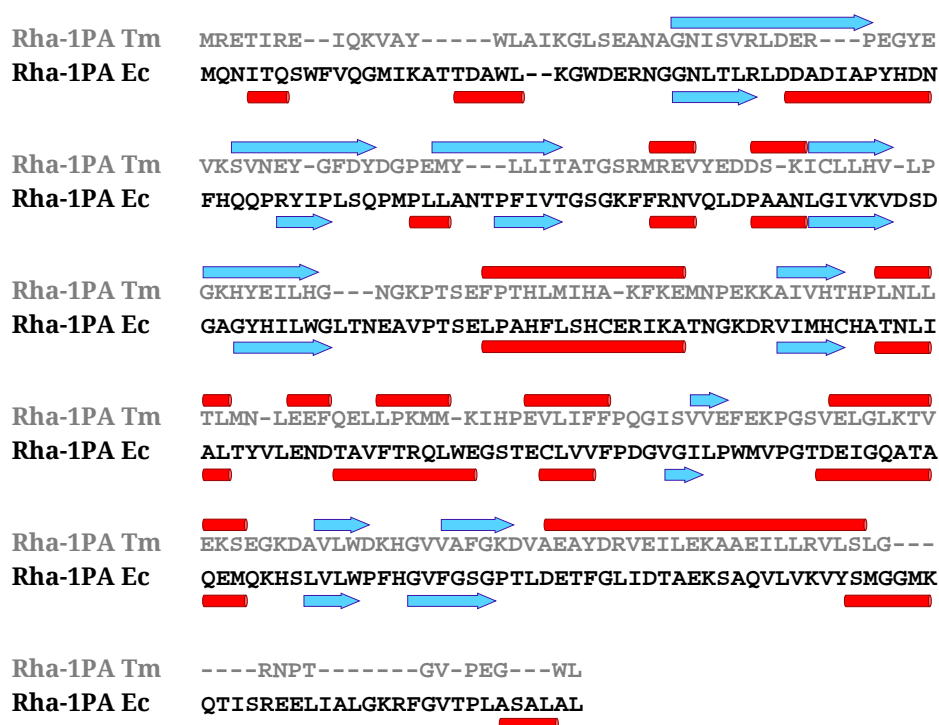
**Figura 16RD.** Espectro de DC de la Rha-1PA Tm SHT a 20°C.



Dicho espectro de DC se ajustó con muy buena correlación a los valores teóricos. Además, el resultado de los tres programas de cálculo fue en muy similar, por lo que se puede utilizar la media de los tres programas como resultado (Tabla 4RD). Estos resultados se corresponden con la estructura cristalográfica descrita por Osipiuk *et al.* (2003) (PDB: 1PVT).

**Tabla 4RD.** Resumen de los resultados de los tres elementos estructurales analizados por el paquete CDPro para la Rha-1PA Tm SHT.

Programa	Estructura secundaria (%)		
	$\alpha$ -hélice	$\beta$ -lámina	RC
CONTINLL	29,0	18,7	52,3
SELCON3	29,6	19,7	50,7
CDSSTR	29,4	20,7	49,9
Media	29,3	19,7	51

Cabe destacar que, a pesar de que estructura secundaria mayoritaria es de  $\alpha$ -hélice, el contenido de esta estructura en la Rha-1PA de *T. maritima* es inferior al presente en la enzima homóloga de *E. coli* (~37%) (Fig 17RD). Este dato no concuerda *a priori* con la hipótesis que propugna que un mayor contenido en  $\alpha$ -hélice puede ser una de las claves para la gran estabilidad de algunas de las proteínas pertenecientes a microorganismos termófilos (Facchiano *et al.*, 1998). Sin embargo, no solo se ha de tener en cuenta el contenido de  $\alpha$ -hélice, sino, además, la estabilidad que presenta gracias a su composición en aminoácidos (los aminoácidos que poseen cadenas laterales ramificadas tienden a desestabilizar la hélice debido a que las cadenas laterales son más difíciles de acomodar) y a la capacidad de la misma de generar un mayor momento dipolar, estabilizando la estructura por medio de interacciones electrostáticas (Li *et al.*, 2005).



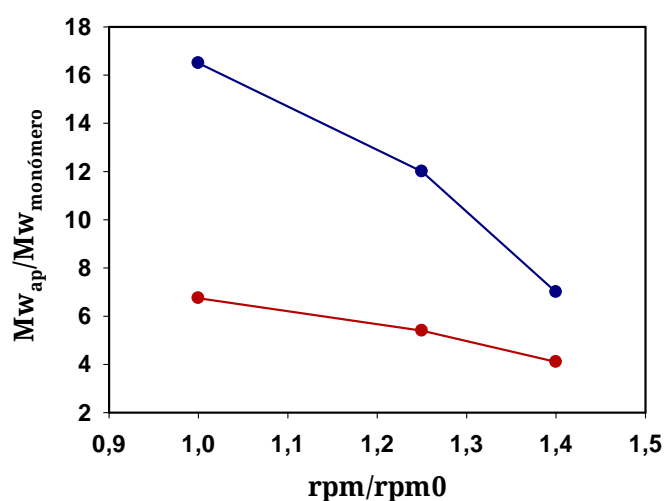
**Figura 17RD.** Comparación de la estructura secundaria obtenida por cristalización de la Rha-1PA de *E. coli* (PDB:1GT7) y de la Rha-1PA de *T. maritima* (PDB:1PVT).   $\alpha$ -hélice;   $\beta$ -lámina.

### *Estructura cuaternaria*

En una primera aproximación, se llevó a cabo el estudio de la estructura cuaternaria de la Rha-1PA de *T. maritima* mediante equilibrio de sedimentación. Las muestras de proteína para la ultracentrifugación se prepararon y se analizaron por triplicado según se describe en la sección de Materiales y Métodos.

El equilibrio de sedimentación de la Rha-1PA de *T. maritima* dio una masa molecular aparente dependiente de la velocidad de centrifugación, incluso variando las condiciones del experimento (temperatura, concentración de proteína, tampón, fuerza iónica). Normalmente, este comportamiento tiene lugar cuando existen fenómenos de agregación (Fig. 18RD).

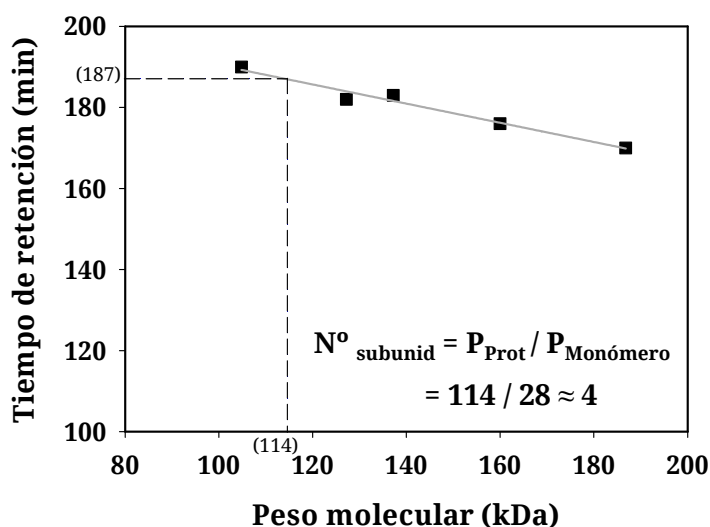
En el caso particular de ésta enzima se formaron agregados utilizando ambas versiones enzimáticas. En la fase inicial del experimento el peso de las macromoléculas fue mucho mayor al utilizar la Rha-1PA Tm, con un peso aproximado 16,5 veces superior al del monómero, mientras que al utilizar la Rha-1PA Tm SHT el peso era 6,7 veces mayor. Cuando se aumentaron las revoluciones de la ultracentrifugación en ambos casos se observa una disminución del peso de los agregados moleculares hasta llegar a 7 y 4,1 veces el del monómero, respectivamente (Fig. 18RD).



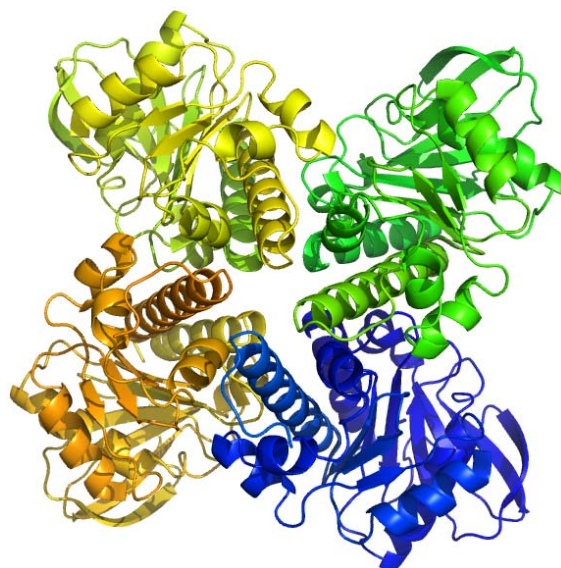
**Figura 18RD.** Equilibrio de sedimentación de la proteína Rha-1PA de *T. maritima* con (●) y sin (●) cola de histidinas.

Al no alcanzar resultados concluyentes con la ultracentrifugación, como herramienta para la identificación de la estructura cuaternaria de la proteína, se inyectó una muestra de cada una de las versiones de la aldolasa, previamente purificadas, en una columna de exclusión molecular en condiciones no desnaturizantes. Con el objetivo de minimizar la desnaturalización y agregación, la fase móvil elegida fue el tampón fosfato 20 mM con NaCl 150 mM a pH 7,2, ya que tiene una alta concentración en sales y un pH adecuado para la enzima.

El tiempo de retención obtenido en ambos casos fue de 187 min a un flujo de 1 ml min<sup>-1</sup>. Al interpolar este tiempo de retención en la curva de calibración previamente obtenida, el peso molecular estimado para la proteína recombinante fue de 114,59 kDa (Fig.19RD). Teniendo en cuenta que el peso del monómero (aproximadamente 28 kDa según ha sido anteriormente descrito), este resultado señala que la Rha-1PA de *T. maritima* posee una estructura cuaternaria tetramérica como su homóloga de *E. coli* (Fig. 20RD).

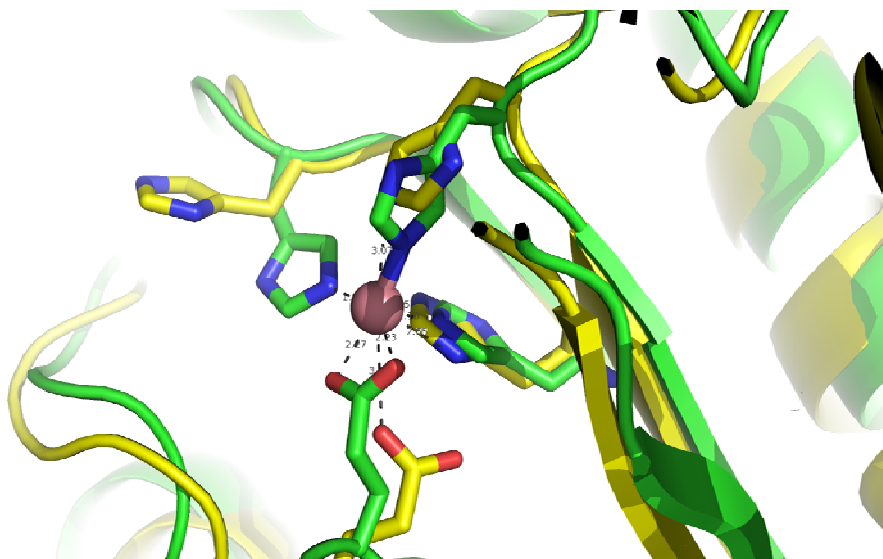


**Figura 19RD.** Curva de calibrado utilizada para la determinación de la estructura cuaternaria de la Rha-1PA de *T. maritima*. Las enzimas utilizadas para realizar la curva de calibración fueron la fuculosa-1-fosfato aldolasa de *E. coli* (104,8 kDa), la DHAK de *Citrobacter freundii* (127,2 kDa), la Rha-1PA de *E. coli* (137,2 kDa), la fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa de *Oryctolagus cuniculus* (RAMA) (160 kDa) y la proteína de fusión DLF (186,8 kDa).



**Figura 20RD.** Estructura cuaternaria de la Rha-1PA de *T. maritima*. Cada monómero aparece en un color diferente.

Al comparar la secuencia de aminoácidos de la Rha-1PA de *T. maritima* con la de *E. coli* se puede comprobar que estas dos proteínas tienen una identidad de secuencia del 43,6%. Sabiendo que, además de una gran identidad de secuencia, ambas enzimas poseen el mismo mecanismo catalítico y que sus estructuras han sido previamente cristalizadas (PDB: 1PVT y 1GT7, respectivamente), se realizó una superposición de la estructura cristalina con el objetivo de establecer qué aminoácidos son los responsables de la unión del cofactor. Como se puede ver en la Figura 21RD, las enzimas presentan una gran homología estructural, por lo que es de esperar que los residuos aminoacídicos de la Rha-1PA de *T. maritima* involucrados en la formación de los enlaces de coordinación con el  $\text{Co}^{2+}$  sean las histidinas 123, 125 y 192, junto con el ácido glutámico 100, ya que se corresponden con los aminoácidos catalíticos de la aldolasa de *E. coli* (His 141, His 143, His 212 y Glu 117) (Kroemer y Schutz, 2002; Kroemer *et al.*, 2003).



**Figura 21RD.** Superposición de la Rha-1PA de *E. coli* (en verde, PDB: 1GT7) unida a Zn<sup>2+</sup> y de la Rha-1PA de *T. maritima* (en amarillo, PDB: 1PVT).

### **Estudio del efecto de la temperatura en la actividad enzimática de la rhamnulosa-1-fosfato aldolasa de *T. maritima***

La mayoría de las enzimas caracterizadas en hipertermófilos tienen una temperatura de actividad óptima similar a la temperatura óptima de crecimiento del microorganismo hipertermófilo del que proceden. Normalmente dicha temperatura se encuentra entre 75 y 115 °C, aunque en algunas de estas proteínas es muy superior como en el caso de la amilopululanasa de *Thermococcus litoralis* cuya temperatura óptima es 30 °C superior a la temperatura óptima de crecimiento del microorganismo (Brown *et al.*, 1993).

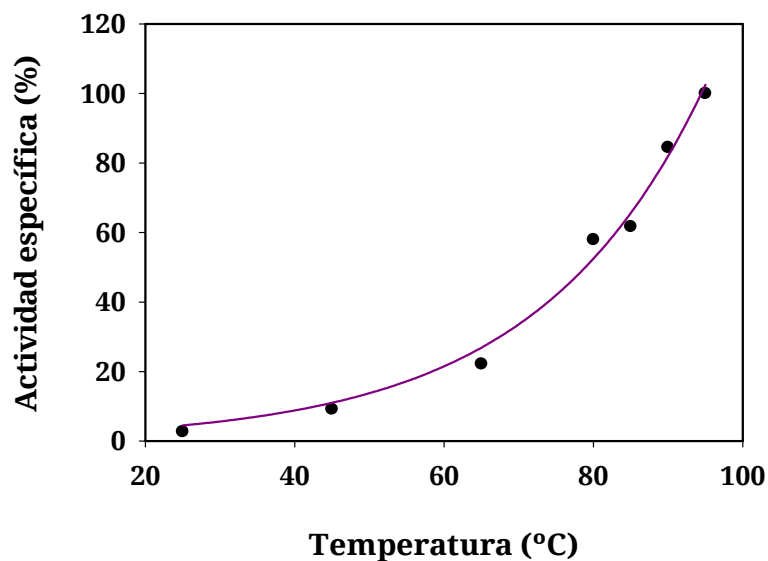
En las enzimas hipertermófilas parece que la temperatura de crecimiento del microorganismo juega un papel fundamental en el correcto plegamiento de la proteína. Esta hipótesis se sustenta en la diferencia estructural que presenta una misma enzima dependiendo si es la forma silvestre, obtenida directamente del microorganismo hipertermófilo, o si es la forma recombinante, producida en un microorganismo mesófilo como *E. coli*. El tratamiento térmico de la enzima recombinante, a la temperatura óptima de

crecimiento de la bacteria hipertermófila de la que procede, produce un cambio en la estructura de la proteína transformándose en la estructura de la enzima silvestre. Esta conversión estructural depende de la temperatura y es reversible (Fujiwara, 2002; Imanaka, 2011). En la Tabla 5RD se muestran algunos ejemplos de enzimas hipertermófilas que necesitan tratamiento térmico para su maduración estructural.

**Tabla 5RD.** Enzimas de hipertermófilos cuya estructura depende de la temperatura.

<b>Microorganismo</b>	<b>Enzima</b>	<b>Referencia</b>
<i>Thermotoga maritima</i>	D-gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	Rehaber y Jaenicke (1992)
<i>Pyrococcus furiosus</i>	Glutamato deshidrogenasa	DiRuggiero y Robbs (1995)
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	Hierro superóxido dismutasa	Kardinahl <i>et al.</i> (1996)
<i>Pyrococcus kodakaraensis</i>	Indolpiruvato ferredoxina oxidoreductasa	Siddiqui <i>et al.</i> (1998)
<i>Methanothermus fevidus</i>	Histona de archea	Sandman <i>et al.</i> (1994)
<i>Pyrococcus sp</i>	Ferredoxina	Siddiqui <i>et al.</i> (1998)
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Catalasa I	Kobayashi <i>et al.</i> (1997)
<i>Thermococcus sp</i>	Ciclodextrina glucano transferasa	Yamamoto <i>et al.</i> (1999)

El efecto de la temperatura se estudió en la reacción de adición aldólica catalizada por la Rha-1PA de *T. maritima*. La actividad específica de la enzima aumentó exponencialmente con la temperatura (Fig. 22RD), alcanzando el máximo a los 95 °C. Sin embargo, no podemos afirmar que esta sea la temperatura óptima del enzima ya que no pudimos ensayar temperaturas superiores.



**Figura 22RD.** Ensayo de actividad específica de la Rha-1PA de *T. maritima* a diferentes temperaturas.

La temperatura máxima observada para Rha-1PA de *T. maritima* es del mismo orden que la temperatura óptima de reacción descrita para otras enzimas de esta bacteria (Tabla 6RD). Como puede observarse en la Tabla 6RD, en muchos casos la temperatura óptima de reacción supera los 80 °C que es la temperatura óptima de crecimiento del microorganismo. Esto puede explicar por qué *T. maritima* es capaz de crecer a temperaturas superiores a 90 °C (Hubert *et al.*, 1986). Los datos obtenidos avalan la hipótesis expuesta anteriormente según la cual es necesario una alta temperatura de reacción para que exista un correcto plegamiento de la proteína y por lo tanto una máxima actividad.

Normalmente, la mayoría de las enzimas pertenecientes a hipertermófilos son inactivas a bajas temperaturas debido a una gran rigidez estructural a esas temperaturas (Vieille y Zeikus, 2001). Sin embargo, es importante señalar que la aldolasa de *T. maritima* mantiene una actividad apreciable en temperaturas cercanas a la del ambiente, reteniendo aproximadamente el 20% de su actividad inicial a 45 °C. Una posible explicación para esta cualidad tan peculiar, es la combinación de flexibilidad local en el centro catalítico, que sería responsable de la actividad a bajas temperaturas, junto con una alta rigidez global que permitiría mantener el carácter

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Tabla 6RD.** Temperatura de actividad óptima para diferentes enzimas pertenecientes a *T. maritima*.

Enzima	T <sup>a</sup> ópt (°C)	Referencia
Tagaturonato-fructuronato epimerasa	60	Rodionova <i>et al.</i> (2012)
Glutamato deshidrogenasa	65	Lebbink <i>et al.</i> (1999)
β-glucuronidasa	65	Xu <i>et al.</i> (2012)
Aspartato deshidrogenasa	70	Yang <i>et al.</i> (2003)
Ribosa-5-fosfato isomerasa	70	Sun <i>et al.</i> (2012)
Aminopeptidasa	70	Dutoit <i>et al.</i> (2012)
L(+)-lactato deshidrogenasa	80	Ostendorp <i>et al.</i> (1996)
Fosfogluconato aldolasa	80	Griffiths (2002)
Transaldolasa	80	Huang <i>et al.</i> (2012)
L-isoaspartato O-metiltransferasa	85	Ichikawa y Clarke (1998)
Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	85	McCarthy <i>et al.</i> (2003)
L-rhamnosa isomerasa	85	Park <i>et al.</i> (2010)
β-galactosidasa	85	Kim <i>et al.</i> (2004)
ATP/polifosfato xilulokinasa	85	Martín del Campo <i>et al.</i> (2013)
Ribonucleosidotrifosfato reductasa	90	Jordan <i>et al.</i> (1997)
Acetato quinasa	90	Bock <i>et al.</i> (1999)
Fosfato acetiltransferasa	90	Bock <i>et al.</i> (1999)
Celulasa	90	Rahman <i>et al.</i> (2002)
Acetil xilano esterasa	90	Drzewiecki <i>et al.</i> (2010)
α-amylasa	90	Ballschmiter <i>et al.</i> (2006)
Aldoceto reductasa	90	Ma <i>et al.</i> (2013)
β-fructosidasa	95	Liebl <i>et al.</i> (1998)
Glicerol hidrogenasa	95	Beauchamp <i>et al.</i> (2014)
Manitol deshidrogenasa	95	Song <i>et al.</i> (2008)
Acetil esterasa	100	Levisson <i>et al.</i> (2012)

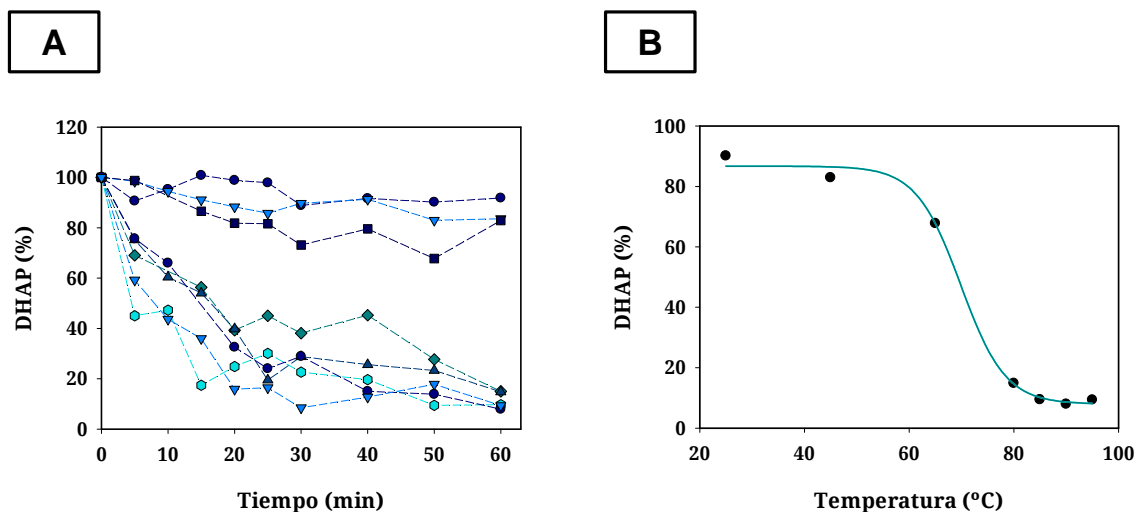
hipertermófilo de la enzima (Sterner *et al.*, 1998; Ichikawa y Clarke, 1998; Merz *et al.*, 1999; Wintrode y Arnold, 2001; Dellus-Gur *et al.*, 2013). Este hecho es de gran importancia desde el punto de vista de la aplicación sintética de la enzima, ya que posibilita su utilización en un amplio intervalo de temperaturas, no siendo necesario calentar el medio de reacción y, por lo tanto, evitando el gasto de energía extra y la posible degradación de los sustratos.

### **Efecto de la temperatura en las condiciones de reacción**

#### ***Medida de la degradación de DHAP***

La DHAP es muy lábil a pHs neutros y básicos y a la temperatura, por lo que tiende a degradarse en la reacción catalizada por la aldolasa. La inestabilidad que presenta la DHAP es un dato importante para la aplicación sintética de la enzima por lo que fue necesario medir su degradación a lo largo del tiempo en el intervalo de temperaturas utilizado anteriormente (Fig. 23(A)RD).

La degradación de la DHAP varía mucho en función de la temperatura, siendo prácticamente despreciable al cabo de una hora a 25 °C (se conserva el 91,8% de la concentración inicial) mientras que a 95 °C solo mantiene el 9,3%. Como se puede ver en la Figura 23(B)RD la estabilidad de la DHAP sigue una curva sigmoidea decreciente en donde la máxima variación de la degradación se encuentra entre 65 y 85 °C (tras 1 hora el porcentaje de DHAP a 65 °C es siempre superior al 75% y sin embargo a los 85 °C no llega al 15%). A la vista de estos resultados, una de las temperaturas utilizadas en las reacciones empleando Rha-1PA de *T. maritima* fue de 45 °C, ya que se llega a un compromiso entre la degradación de DHAP (no supera el 10% con respecto a la DHAP inicial) y la actividad de la enzima que se ve aumentada 5 veces respecto a la actividad a temperatura ambiente.

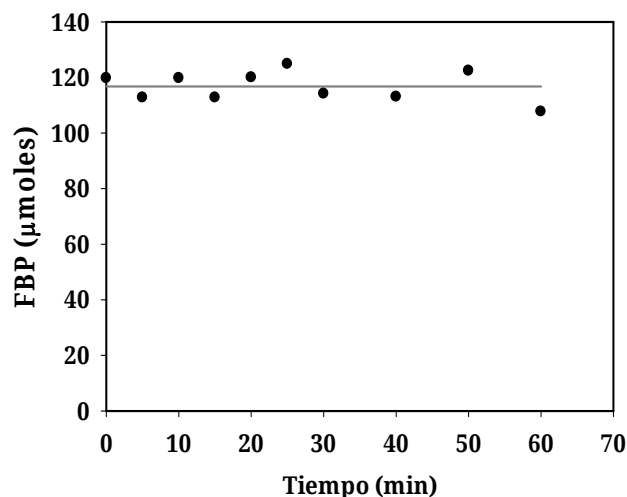


**Figura 23RD.** (A) Porcentaje de DHAP a diferentes tiempos en función de la temperatura. (●)  $T^a=25$  °C, (▼)  $T^a= 45$  °C, (■)  $T^a= 65$  °C, (◆)  $T^a= 75$  °C, (▲)  $T^a= 80$  °C, (◐)  $T^a= 85$  °C, (●)  $T^a= 90$  °C, (▼)  $T^a= 95$  °C. (B) Porcentaje de DHAP tras una hora de incubación a diferentes temperaturas.

### *Comprobación de la concentración de aldol*

Este ensayo se realizó para comprobar que la medida de la concentración de aldol formado en los estudios de temperatura óptima no se falseaba debido a la evaporación del disolvente a causa de las altas temperaturas utilizadas.

Para este ensayo se utilizó la FBP ya que este compuesto es comercial. Los  $\mu$ moles de aldol presentes en el medio permanecen constantes a lo largo del tiempo como se representa en la Figura 24RD por lo que podemos descartar una sobreestimación del aldol formado en las reacciones incubadas a alta temperatura debida a la variación del volumen.



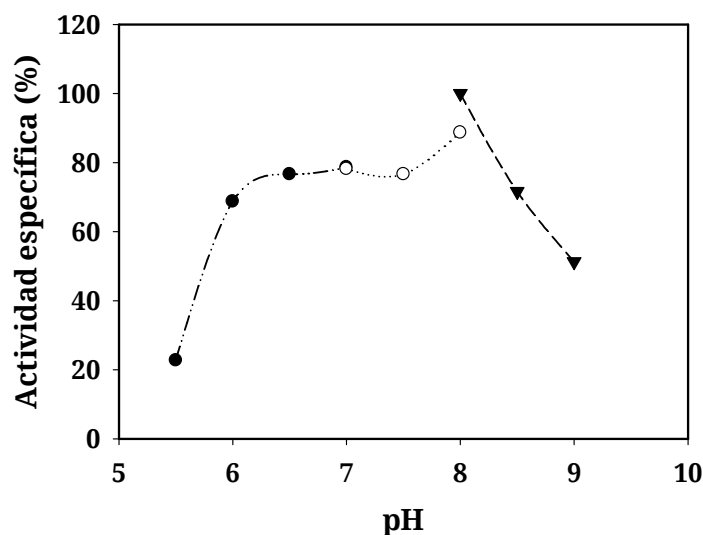
**Figura 24RD.** Valoración los µmoles de FBP a lo largo de una hora de incubación a 95 °C.

### Determinación del pH óptimo de la rhamnulosa-1-fosfato aldolasa de *T. maritima*

El pH óptimo se calculó mediante valoración del aldol formado en reacciones de adición aldólica entre el L-lactaldehído y la DHAP catalizadas por la Rha-1PA de *T. maritima*, variando el pH del medio de reacción (Fig. 25RD). Para cada rango de pH se eligieron distintos tampones, manteniendo la fuerza iónica constante gracias a la adición de diferentes cantidades de NaCl. El pH óptimo calculado para la Rha-1PA de *T. maritima* fue 8,0, similar al descrito no solo para la Rha-1PA de *E. coli* (Chiu *et al.*, 1975), sino también para la mayoría de aldolasas de tipo II dependientes de DHAP, todas ellas con un máximo de actividad en el intervalo de pH de entre 7,0 y 8,0 (Hill *et al.*, 1976; Hodgson y Plaxton, 1998; Nakahara *et al.*, 2003; Kakita *et al.*, 2006; Ertunga *et al.*, 2007; Labbé *et al.*, 2011).

Como se puede apreciar en el perfil de actividad específica en función del pH del medio, el intervalo de pH para el cual la Rha-1PA de *T. maritima* retiene al menos el 50% de su actividad máxima está comprendido entre pH=5,7 y pH=9,0. Este intervalo es ligeramente superior al de su homóloga mesófila de *E. coli*, que está comprendido entre pH=6,3 y pH=9,0 (Sawada y Takagi, 1964; Chiu *et al.*, 1975). Este dato es especialmente interesante ya que

demuestra la capacidad de la enzima para ser usada a pH ligeramente ácidos donde la DHAP utilizada como sustrato es más estable.



**Figura 25RD.** Perfil de actividad de la Rha-1PA Tm en función del valor de pH. Las reacciones se realizaron utilizando diferentes tampones cuyos intervalos de pH se solaparon: Bis/Tris (●); fosfato sódico (○); Tris/HCl (▼).

### Estudio de la estabilidad de la rhamnulosa-1-fosfato aldolasa de *T. maritima*

La necesidad de adaptarse a ambientes extremos de los microorganismos extremófilos ha generado el desarrollo de proteínas con propiedades extraordinarias. En concreto, las enzimas de los microorganismos termófilos e hipertermófilos no son solo termoestables, sino que también generalmente son muy resistentes frente a la desnaturalización por la acción de agentes químicos, detergentes, agentes caotrópicos, disolventes orgánicos, proteólisis, así como a su exposición a diferentes pHs (Champdoré *et al.*, 2007). Consecuentemente, el uso de enzimas termófilas e hipertermófilas representa una alternativa muy interesante en procesos biotecnológicos, ya que amplían el intervalo de condiciones en el que pueden ser usadas. Además, pueden utilizarse como modelo para el diseño y construcción de nuevas proteínas con propiedades determinadas, evitando así los problemas inherentes al uso de enzimas en síntesis orgánica.

### ***Estudio de la estabilidad térmica***

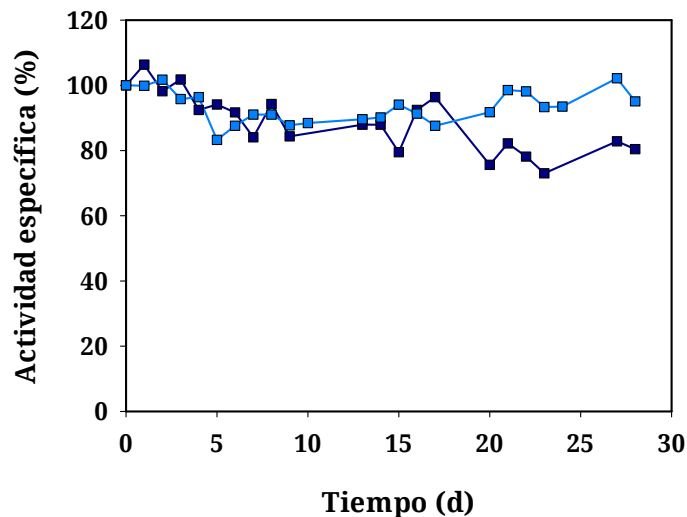
Las enzimas de microorganismos termófilos e hipertermófilos, además de ser capaces de trabajar a altas temperaturas, presentan por lo general una gran termoestabilidad. La estabilidad térmica de estas enzimas se debe a diversos factores que se pueden agrupar en (Li *et al.*, 2005):

1. Interacciones moleculares adicionales como puentes de hidrógeno, interacciones electroestáticas, interacciones hidrofóbicas, puentes disulfuro y la unión a metales.
2. Una buena configuración estructural, más rígida, más compacta, con un mayor porcentaje de  $\alpha$ -hélice y una disminución de las zonas sin estructura en la proteína.

Sin embargo, en algunos casos, la termoestabilidad de las enzimas intracelulares depende de la presencia de determinados factores de estabilización internos como sales, cofactores, sustratos, activadores, estabilizadores generales como la termamina o una alta concentración de proteínas. Además, incluso en el caso de ser estables frente a altas temperaturas, muchas enzimas hipertermófilas no lo son frente a temperaturas moderadas o bajas.

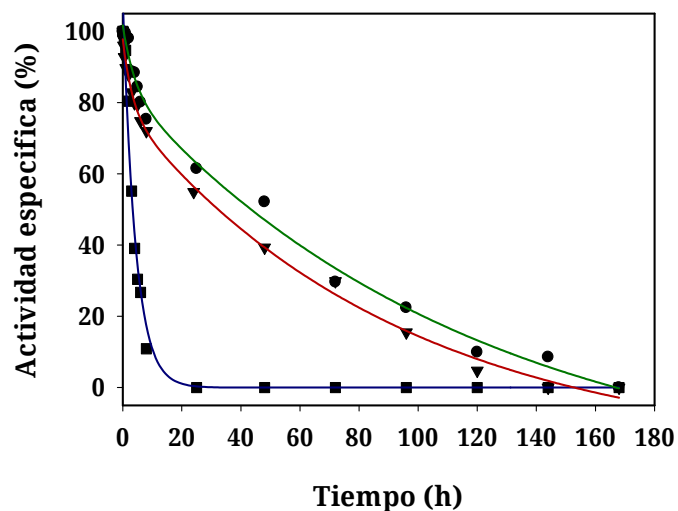
Por lo tanto, para determinar no sólo si la Rha-1PA de *T. maritima* era una enzima termoestable, sino también si era resistente a temperaturas muy por debajo de su temperatura metabólica, se estudió su estabilidad en un amplio intervalo de temperaturas.

En primer lugar, se estudió su estabilidad a 4 °C y a temperatura ambiente. Como muestra la Figura 26RD, a 4 °C la actividad aldolasa tras 28 días de almacenamiento, nunca fue inferior al 83% de la actividad inicial. Durante ese mismo periodo de tiempo, al conservar la enzima a temperatura ambiente, la actividad se mantuvo en todo momento por encima del 73%. La pérdida de actividad de la Rha-1PA de *T. maritima* es muy lenta en estas condiciones.



**Figura 26RD.** Estabilidad de la Rha-1PA de *T. maritima* a bajas temperaturas. (■) Porcentaje de actividad específica conservada a temperatura ambiente, (■) porcentaje de actividad específica conservada a 4°C.

La estabilidad frente a altas temperaturas se estudió por incubación de la proteína a 80, 95 y 115 °C (Fig. 27RD). En este ensayo la desnaturalización irreversible se evaluó midiendo la actividad específica retenida por la enzima a 45 °C a distintos tiempos de incubación. Como se puede observar en la Figura 27RD, el tiempo de vida media de la aldolasa (tiempo que tarda en perder el 50% de su actividad) a estas tres temperaturas fue de 44, 33 y 3,5 h, respectivamente.



**Figura 27RD.** Estabilidad enzimática de la Rha-1PA de *T. maritima* a altas temperaturas. (●) Estabilidad a 80 °C, (▼) estabilidad a 95 °C, (■) estabilidad a 115 °C.

Estos datos, tomados en conjunto, demuestran la elevada estabilidad y resistencia a la desnaturalización de la enzima frente a altas temperaturas y, como se verá a continuación, son concordantes con la temperatura de desnaturalización de la misma. Hasta donde llega nuestro conocimiento, es la aldolasa más termoestable descrita hasta el momento, ya que el resto de aldolasas de este tipo poseen tiempos de vida media menores a temperaturas inferiores. Algunos ejemplos de las aldolasas más termoestables encontradas en la bibliografía se resumen en la Tabla 7RD.

**Tabla 7RD.** Tiempo de vida media en función de la temperatura para diferentes aldolasas de microorganismos hipertermófilos.

Microorganismo	Enzima	T <sup>a</sup> (°C)	T <sub>1/2</sub>	Referencia
<i>T. aquaticus</i>	FBPA	105	5 min	Freeze y Brock (1970)
<i>B.stearothermophilus</i>	FBPA	75	10 min	Sugimoto y Nosoh (1971)
<i>M. jannaschii</i>	FucA	85	24 h	Choi <i>et al.</i> (1998)
<i>S.solfataricus</i>	KDG-aldolasa	100	2,5 h	Buchanan <i>et al.</i> (1999)
<i>A. aeolicus</i>	FBPA	110	40 min	La <i>et al.</i> (2009)

La termoestabilidad inherente a la Rha-1PA de *T. maritima* es comparable incluso a la descrita para enzimas de microorganismos como *Pyrococcus furiosus*, el cual tiene una temperatura óptima de crecimiento 20 °C superior a la de *T. maritima* (100 °C) (Kengen *et al.*, 1993; Ikeda y Clark, 1998; Bauer *et al.*, 1999; Vieille y Zeikus, 2001).

### ***Determinación de la temperatura de desnaturalización***

El estudio del efecto la temperatura sobre la estructura de la enzima se realizó por dicroísmo circular mediante un barrido de temperatura entre 20

y 110 °C registrando la señal de dicroísmo a 222 nm, con un incremento de temperatura de 30 °C h<sup>-1</sup>.

Las curvas de desnaturalización térmica se pueden analizar suponiendo un modelo de dos estados en el proceso de desnaturalización en el que solo se encuentran presentes un estado inicial (nativo) y un estado final (desnaturalizado). Este modelo se ajusta a la Ecuación 2RD (Mayr *et al.*, 1993):

$$Y = (D_0 + m_D \times X) - \frac{(D_0 - N_0) + (m_D - m_N) \times X}{1 + \exp \frac{H_D \times (X - T_M)}{1,98 \times (273,15 + X) \times (273,15 + T_M)}} \quad \text{Ec. 2RD}$$

donde:

$D_0$  es el valor de la señal de DC (en mdeg) del estado desnaturalizado a  $T^a=0$  °C.

$m_D$  es la pendiente del estado desnaturalizado.

$N_0$  es el valor de la señal de DC (en mdeg) del estado nativo a  $T^a=0$  °C.

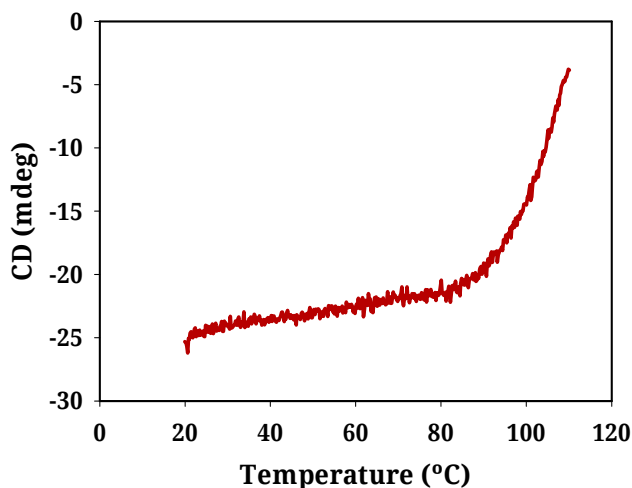
$m_N$  es la pendiente del estado nativo.

$T_M$  es la temperatura (en °C) del punto de inflexión de la transición.

$H_D$  es la entalpía van't Hoff asociada al proceso de desnaturalización a  $T^a=T_M$ .

La Figura 28RD muestra que Rha-1PA de *T. maritima* presentó un comportamiento que se ajusta a un modelo de transición en dos estados. Este modelo de transición se produce debido a la existencia de cooperatividad en el proceso de desplegamiento de la proteína –una vez que una molécula comienza a desplegarse se desencadena el desplegamiento rápido de todas las demás moléculas– y a la baja estabilidad de los intermedios de desplegamiento (Van Mierlo y Steensma, 2000). La cooperatividad de la reacción de desnaturalización de una proteína se puede medir cualitativamente por el ancho y la forma de la transición. Así, la Rha-1PA de *T. maritima*, donde la desnaturalización tiene lugar en con una transición rápida entre los dos estados (Fig. 28RD), muestra una transición altamente

cooperativa, propia de una proteína que se encuentra, inicialmente, en una estructura compacta y bien plegada.



**Figura 28RD.** Desnaturalización térmica de la Rha-1PA de *T. maritima*.

Al ajustar los datos experimentales con la Ecuación 2RD la  $T_M$  resulto ser de 102 °C. Esta temperatura de desnaturalización es más de 20 °C superior a la temperatura óptima de *T. maritima* e indica que la temperatura óptima de reacción de la enzima no puede ser muy superior a 95 °C, la mayor temperatura a la cual se ha medido la actividad de la enzima anteriormente.

Además, la estabilidad demostrada por la enzima frente a la desnaturalización térmica la convierte en una de las pocas enzimas conocidas con una  $T_M$  superior a los 100 °C (Razvi y Scholtz, 2006).

### ***Determinación de la estabilidad en presencia de cosolventes orgánicos en el medio de reacción***

Las enzimas son biocatalizadores que han evolucionado para llevar a cabo las reacciones orgánicas en medios acuosos. Sin embargo, en los últimos años se ha comprobado la necesidad de la utilización de disolventes orgánicos en los procesos biocatalíticos debido a la naturaleza hidrófoba de la mayoría de los sustratos (Sellek y Chaudhuri, 1999; Gupta y Khare, 2009; Roy *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2013).

El uso de disolventes orgánicos en biotransformaciones conlleva ventajas asociadas como son una mayor solubilidad de los sustratos con baja solubilidad en sistemas acuosos, lo que disminuye las limitaciones de transferencia de masa dando lugar a un aumento de la velocidad de reacción con dichos compuestos, ofrecen la posibilidad de que se vea alterada la regio- y estereoespecificidad de la enzima, desplazan el equilibrio termodinámico hacia el sentido de la síntesis en las reacciones de hidrólisis mediante la reducción de la actividad del agua y evitan la contaminación microbiana de las reacciones (Sellek y Chaudhuri, 1999; Iver y Ananthanarayan, 2008; Doukyu y Ogino, 2010).

Por otra parte, las enzimas generalmente sufren una disminución de su actividad y de su estabilidad en presencia de disolventes orgánicos debido a procesos de desnaturalización e inhibición causados por la interacción del disolvente con la proteína.

Así pues, la obtención de enzimas capaces de tolerar disolventes orgánicos en el medio de reacción es de gran utilidad para su aplicación en procesos biotecnológicos. En este sentido, el empleo de enzimas obtenidas de microorganismos termófilos e hipertermófilos tiene un gran potencial ya que poseen una estructura intrínsecamente estable frente a diversos agentes desnaturalizantes (Cowan, 1997; Sellek y Chaudhuri, 1999).

En lo que respecta a la estabilidad de la Rha-1PA de *T. maritima*, se estudió su tolerancia a la presencia de diferentes cosolventes orgánicos en el medio de reacción midiendo la actividad aldólica específica.

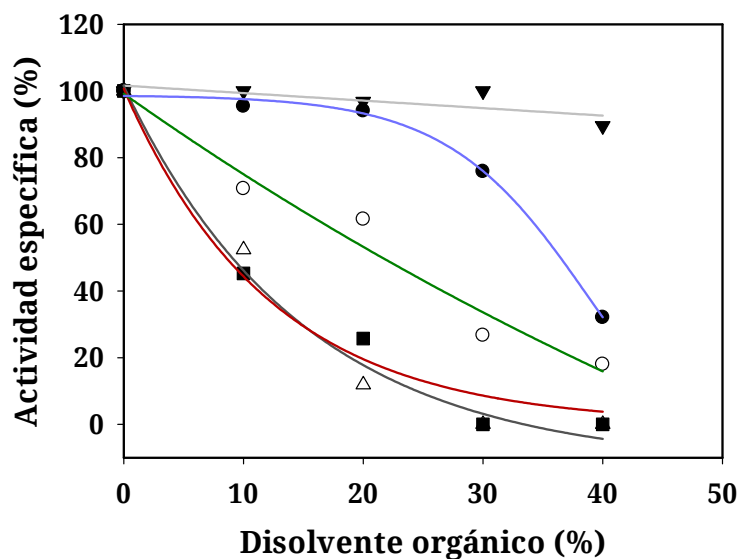
Los cosolventes usados se eligieron teniendo en cuenta la hidrofobicidad de los mismos de tal manera que cubrieran el máximo intervalo de Log P (que se define como el coeficiente de distribución de una sustancia en un sistema bifásico *n*-octanol/H<sub>2</sub>O), siempre y cuando formasen sistemas homogéneos al ser añadidos a la fase acuosa (Tabla 8RD).

**Tabla 8RD.** Coeficiente de distribución en un sistema bifásico *n*-octanol/H<sub>2</sub>O de los cosolventes utilizados.

Disolvente	DMSO	DMF	AcN	Isopropanol	THF
Log P	-1,380	-1,038	-0,394	0,074	0,526

Como se muestra en la Figura 29RD, la presencia de disolventes orgánicos en el medio es bien tolerada por la Rha-1PA de *T. maritima*, que retiene su actividad incluso a altas concentraciones. La estabilidad de esta enzima es notablemente alta en acetonitrilo, reteniendo el 90% de su actividad específica inicial en H<sub>2</sub>O/AcN 60:40. Por otra parte, cuando se utiliza DMSO la enzima mantiene el 100% de su actividad hasta una concentración del 20% de disolvente, y con DMF, retiene el 50% de actividad a porcentajes cercanos al 25%. A pesar de que la estabilidad del enzima disminuye mucho al utilizar isopropanol y THF, hay que resaltar que, incluso en esos casos, en presencia de 10% de cosolvente la actividad mostrada por la aldolasa es del 40%.

Exceptuando al acetonitrilo, en los resultados obtenidos para el resto de disolventes ensayados se puede apreciar que la actividad catalítica disminuye con el aumento de la apolaridad del sistema (Fig. 29RD). Estos datos concuerdan con la hipótesis que considera que el plegamiento de las proteínas se debe principalmente a la tendencia natural de los aminoácidos más apolares a replegarse en el interior de la proteína, exponiendo así los aminoácidos hidrofílicos al medio acuoso externo. Por lo tanto, la estructura proteica es mantenida por un intrincado balance entre estas fuerzas de unión. La interacción de los disolventes orgánicos con los aminoácidos hidrofóbicos del interior de la proteína altera la solubilidad de estos residuos aminoacídicos permitiendo la desnaturalización de la enzima y, consecuentemente, la pérdida de actividad de la misma (Tanford, 1961; Klibanov, 1997; Careri, 1998; Serdakowski y Dordick, 2008).



**Figura 29RD.** Estabilidad enzimática de la Rha-1PA de *T. maritima* frente a la presencia diferentes cosolventes orgánicos en el medio de reacción: acetónitrilo (▼); DMF (○); DMSO (●); isopropanol (Δ); THF (■).

## Estudio de la influencia de la cola de histidinas y del $\text{Co}^{2+}$ en la rhamnulosa-1-fosfato aldolasa de *T. maritima*

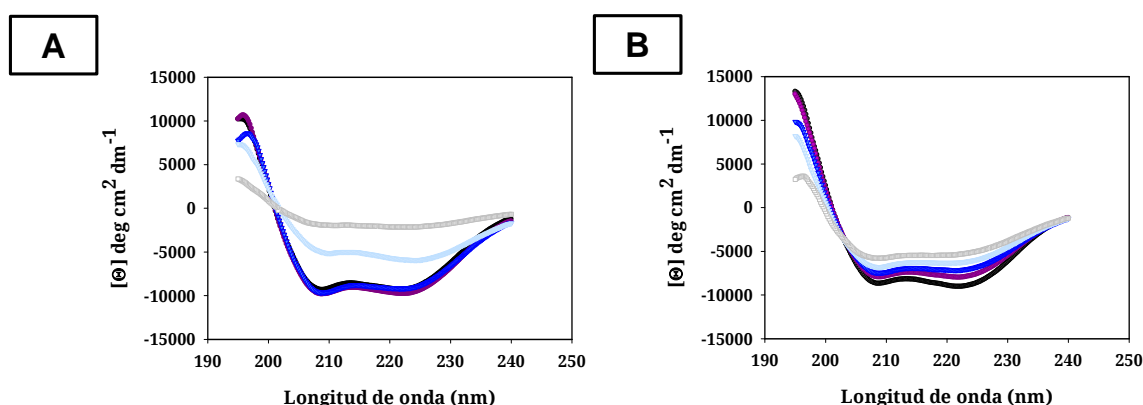
### *Efecto estructural*

#### Estudio del efecto de la introducción de colas de histidinas en el extremo N-terminal en función de la temperatura

En primer lugar, con el objetivo de conocer la influencia que ejerce la presencia de la cola de histidinas en la estructura secundaria de la proteína se realizaron espectros de DC utilizándose ambas versiones de la enzima, con y sin cola de histidinas sin que hubieran sido sometidas a tratamiento con EDTA (Rha-1PA Tm01 y Rha-1PA Tm01 SHT). Adicionalmente, para saber si el aumento de la temperatura modificaba la posible influencia de la cola de histidinas los experimentos se ejecutaron en un intervalo de temperaturas creciente (de 20 °C a 110 °C).

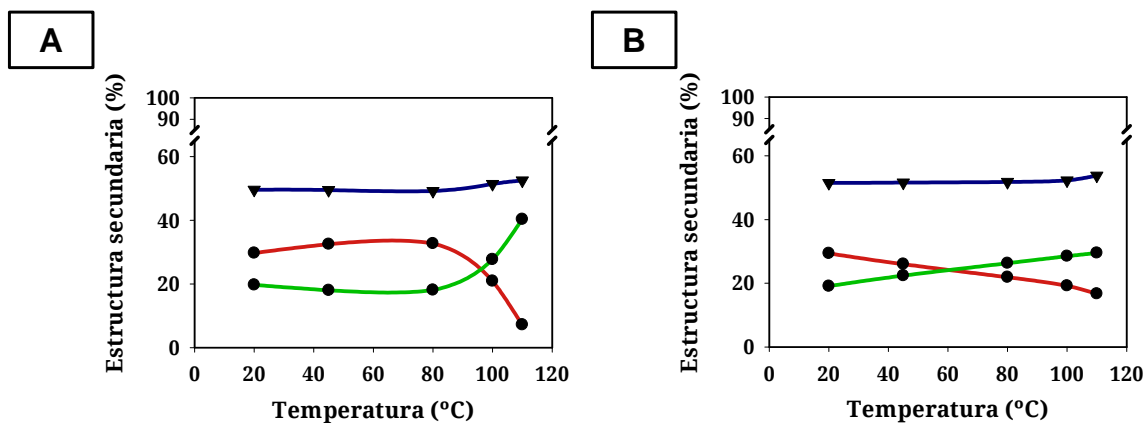
El análisis de la estructura secundaria para cada uno de los espectros obtenidos se efectuó de la misma manera que en el estudio de la estructura secundaria precedente.

Como se comprueba en la Figura 30RD, en ambos casos el perfil que presentan los espectros de DC evoluciona a medida que se aumenta la temperatura. Se produce una transición desde los perfiles a 20 °C, que denotan claramente una estructura secundaria mayoritaria de  $\alpha$ -hélice (mínimos en la señal a ~208 y ~222 nm y un máximo a ~192 nm), hasta los obtenidos a 100 °C, en donde el mínimo en la señal se desplaza a 215 nm y el máximo a 198 nm, indicando un aumento en  $\beta$ -lámina. Esta alteración es más acentuada en el caso de la Rha-1PA Tm que en el de la Rha-1PA Tm SHT, estando acompañada de una pérdida progresiva de la intensidad de la señal característica de la desnaturalización proteica.



**Figura 30RD.** Espectros de DC a 20 (●), 45 (●), 80 (▼), 100 (▼) y 110 (■) °C de (A) Rha-1PA Tm01 y (B) Rha-1PA Tm01 SHT.

Al calcular la contribución a la estructura secundaria de las estructuras  $\alpha$ -hélice,  $\beta$ -lámina y random coil se puede apreciar que existen diferencias significativas en la aportación de cada una de las estructuras dependiendo de la versión proteica y de la temperatura a la que está sometida (Fig. 31RD).



**Figura 31RD.** Resumen del porcentaje de  $\alpha$ -hélice (—),  $\beta$ -lámina (—) y random coil (—) obtenido en el análisis por el paquete CDPro, en función de la temperatura de las proteínas (A) Rha-1PA Tm01 y (B) Rha-1PA Tm01 SHT.

De los datos recogidos se deduce que a 20 °C existe una buena correlación entre los resultados teóricos de estructura secundaria (27,54%  $\alpha$ -hélice y 22,88%  $\beta$ -lámina) y los resultados experimentales de la Rha-1PA Tm01 SHT (29,4%  $\alpha$ -hélice y 19,1%  $\beta$ -lámina) y de la Rha-1PA Tm01 (29,7%  $\alpha$ -hélice y 19,7%  $\beta$ -lámina). A medida que la temperatura se aumentó, la composición estructural permaneció estable hasta aproximadamente los 80 °C. Sin embargo, a partir de esta temperatura, el contenido en  $\alpha$ -hélice sufrió una disminución en ambos casos que no se reparte equitativamente entre los otros tipos de estructura estudiados, sino que en su mayoría se traduce en un aumento del porcentaje de  $\beta$ -lámina y en menor medida en el aumento de los porcentajes de giro o de estructura desordenada. Este proceso fue más acusado en el caso de la proteína con cola de histidinas, produciéndose una disminución de  $\alpha$ -hélice del 22,5% al aumentar la temperatura de 20 a 110 °C, con el correspondiente incremento de  $\beta$ -lámina. En la proteína sin cola de histidinas el porcentaje de  $\alpha$ -hélice que se pierde es menor, pasando del 29,4% a 20 °C hasta 16,7% a 110 °C.

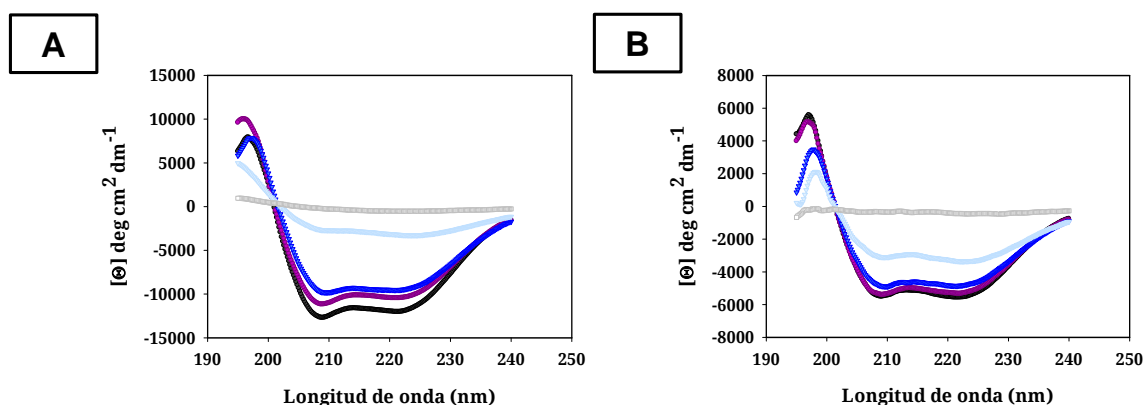
De estos resultados se deduce que la presencia de la cola de histidinas facilita la transición  $\alpha$ -hélice/ $\beta$ -lámina de la enzima, siendo este proceso dependiente de la temperatura y produciéndose a partir de temperaturas superiores a 80 °C.

### Estudio del efecto del cofactor en la estructura secundaria

Es sabido que la unión de cofactores metálicos juega un papel importante no sólo en la actividad, sino también en la conformación estructural de las enzimas (Wilson *et al.*, 2004), siendo la unión a metales uno de los mecanismos para la estabilización de las enzimas hipertermófilas. Por lo tanto en segundo lugar, dado que la Rha-1PA de *T. maritima* precisa del  $\text{Co}^{2+}$  como cofactor para llevar a cabo la reacción aldólica, se estudió mediante DC el efecto del metal divalente sobre las estructura secundaria.

Por otro lado, teniendo en cuenta la influencia de la cola de histidinas en la estructura secundaria y su dependencia de la temperatura, los experimentos se realizaron con las dos versiones proteicas, con y sin cola de histidinas, tratadas con EDTA (Rha-1PA Tm02 y Rha-1PA Tm02 SHT) y en el mismo intervalo de temperaturas utilizado previamente (desde 20 °C a 110 °C).

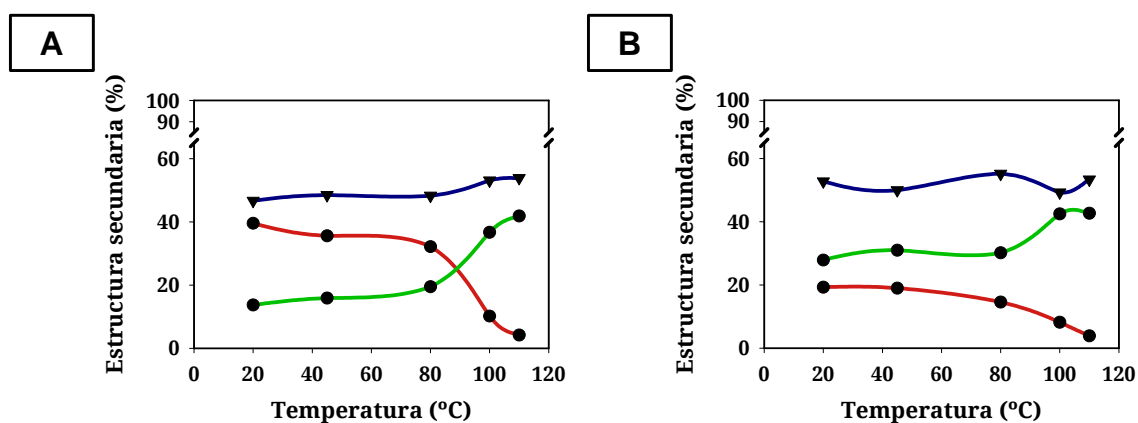
Los perfiles de DC obtenidos para las dos versiones proteicas mostraron un cambio progresivo en función del aumento de la temperatura similar al observado anteriormente. Sin embargo, en este caso la variación es más pronunciada, llegándose a alcanzar una pérdida total de la elipticidad a 110 °C en ambos casos (Fig. 32RD).



**Figura 32RD.** Espectros de DC a 20 (●), 45 (●), 80 (▼), 100 (▼) y 110 (■) °C de (A) Rha-1PA Tm02 y (B) Rha-1PA Tm02 SHT.

Sorprendentemente, al analizar los datos se puede apreciar que (Fig. 33RD), mientras que en el experimento anterior a 20 °C la estructura

secundaria era muy similar sin importar la existencia o no de la cola de histidinas (~30% de  $\alpha$ -hélice), en este caso los porcentajes iniciales de  $\alpha$ -hélice se diferencia en un 20%, siendo del 39,6% para la enzima con cola de histidinas y de un 19,3% para la enzima que no la tiene. Por lo tanto, al comparar estos datos con respecto a los recopilados en presencia de iones divalentes, se advierte una variación del contenido de  $\alpha$ -hélice, suponiendo un aumento del 10% en el caso de la Rha-1PA Tm y una disminución del 10% en el caso de la Rha-1PA Tm SHT. Curiosamente, esta pérdida de contenido en  $\alpha$ -hélice en la Rha-1PA Tm SHT hace que la estructura secundaria predominante sea  $\beta$ -lámina.



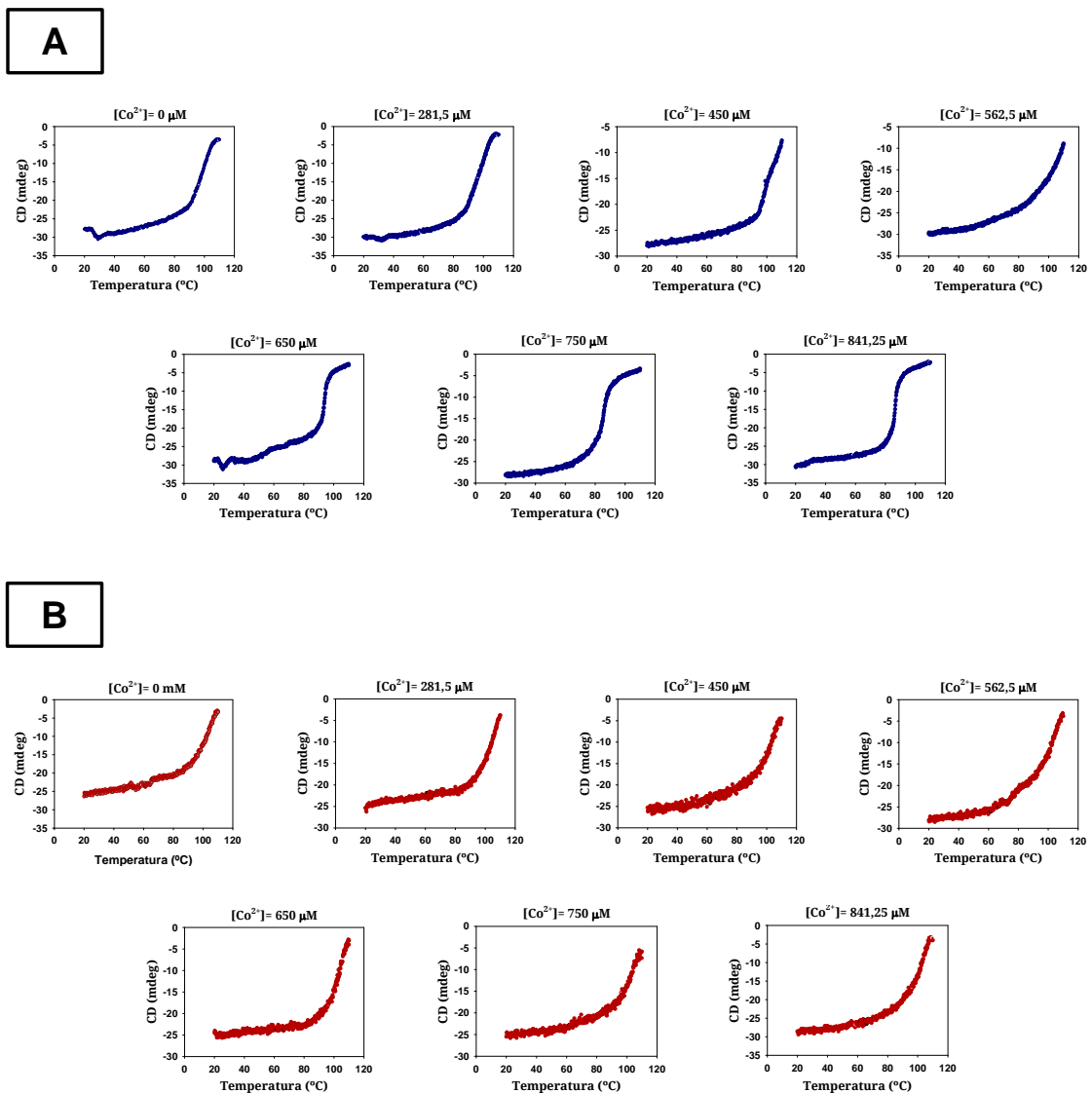
**Figura 33RD.** Resumen del porcentaje de  $\alpha$ -hélice (—),  $\beta$ -lámina (—) y random coil (—) obtenido en el análisis por el paquete CDPro, en función de la temperatura de las proteínas (A) Rha-1PA Tm02 y (B) Rha-1PA Tm02 SHT.

De igual forma que anteriormente, al aumentar la temperatura la composición estructural permaneció estable hasta aproximadamente los 80 °C, momento en el cual se agudiza la transición  $\alpha$ -hélice/ $\beta$ -lámina, llegando hasta la desnaturalización completa a 110 °C en ambos casos.

Por consiguiente, estos resultados indican que la presencia del cofactor no sólo es necesaria para llevar a cabo la catálisis, sino que también ayuda a retener la configuración estructural. Así, por un lado cuando el centro catalítico no se encuentra ocupado por el cofactor la estructura proteica se ve alterada, viéndose facilitada la transición  $\alpha$ -hélice/ $\beta$ -lámina, y por otro, la presencia de cola de histidinas produce un cambio estructural que se traduce en un incremento de la cantidad de  $\alpha$ -hélice.

*Efecto en la temperatura de desnaturalización*

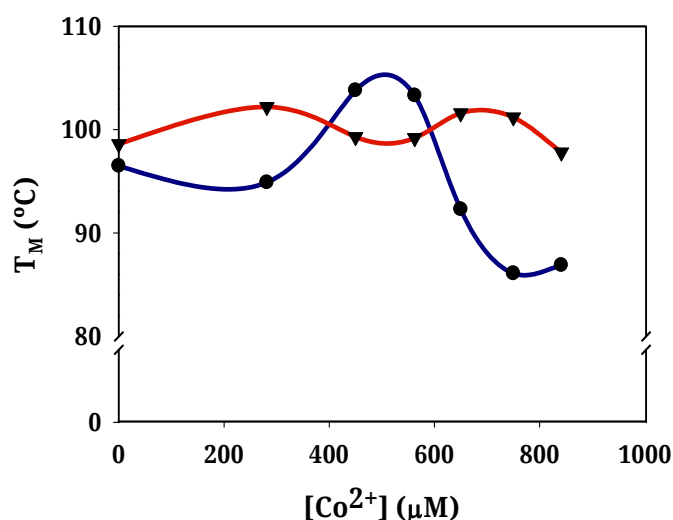
Teniendo como punto de partida la influencia que ejerce la presencia tanto del cofactor como de la cola de histidinas en la estructura secundaria de la proteína, es lógico pensar que estas dos variables pueden alterar la termoestabilidad de la misma. Por esta razón, se comparó la temperatura de desnaturalización de ambas versiones proteicas a concentraciones crecientes de  $\text{Co}^{2+}$ , previo tratamiento con EDTA. Los ensayos se llevaron a cabo de forma análoga a la determinación de la temperatura de desnaturalización previamente descrita, añadiendo concentraciones crecientes de  $\text{Co}^{2+}$  (entre 0 y 841,25  $\mu\text{M}$ ) a la enzima previamente tratada con EDTA (Fig. 34RD).



**Figura 34RD.** Desnaturalización térmica de la Rha-1PA de *T. maritima* a diferentes concentraciones de  $\text{Co}^{2+}$  en el medio. (A) Rha-1PA Tm; (B) Rha-1PA Tm SHT.

Como era de esperar, en todos los casos la proteína presentó un comportamiento que se ajusta a un modelo de transición en dos estados, sin importar el tipo de proteína utilizada ni la concentración de  $\text{Co}^{2+}$  presente en el medio. En cambio sí que pueden apreciarse diferencias en las curvas de desnaturalización pertenecientes a la proteína sin cola de histidinas y la proteína con cola de histidinas. En este último caso, además, la variación del perfil depende de la concentración de  $\text{Co}^{2+}$  presente en el medio (Fig. 34RD).

Consecuentemente, al comparar la  $T_M$  de la proteína con y sin His-tag, se puede percibir una diferencia en su comportamiento según aumenta la concentración de  $\text{Co}^{2+}$  presente en el medio (Fig. 35RD). Así, la  $T_M$  de la Rha-1PA Tm SHT se mantuvo constante en torno a los 100 °C (entre 97,8 y 102,2 °C) independientemente de la concentración del catión. Sin embargo, en el caso de la Rha-1PA Tm, la  $T_M$  dependió de la concentración de cofactor, exhibiendo una  $T_M$  máxima de 103,8 °C a  $[\text{Co}^{2+}] = 450 \mu\text{M}$  y una  $T_M$  mínima de 86,1 °C a  $[\text{Co}^{2+}] = 750 \mu\text{M}$ .



**Figura 35RD.** Comparativa de la  $T_M$  entre la Rha-1PA Tm (●) and Rha-1PA Tm SHT (●) en función de la concentración de  $\text{Co}^{2+}$  en el medio.

Teniendo en cuenta que la  $T_M$  es similar para ambas proteínas cuando no hay  $\text{Co}^{2+}$  en el medio y que solo se ve afectada al incrementar la concentración del cofactor en el caso de la enzima con cola de histidinas, se puede suponer que la alteración en la estabilidad enzimática sea debida a la

coordinación del exceso de catión presente en el medio con las histidinas extra y no únicamente a la presencia de la cola de histidina *per se*. Éste no es un hecho aislado, pudiéndose consultar en la bibliografía ejemplos de la influencia de la cola de histidina sobre diferentes proteínas en presencia de iones en el medio (Trofimov *et al.*, 2012; Kolaj-Robin *et al.*, 2013).

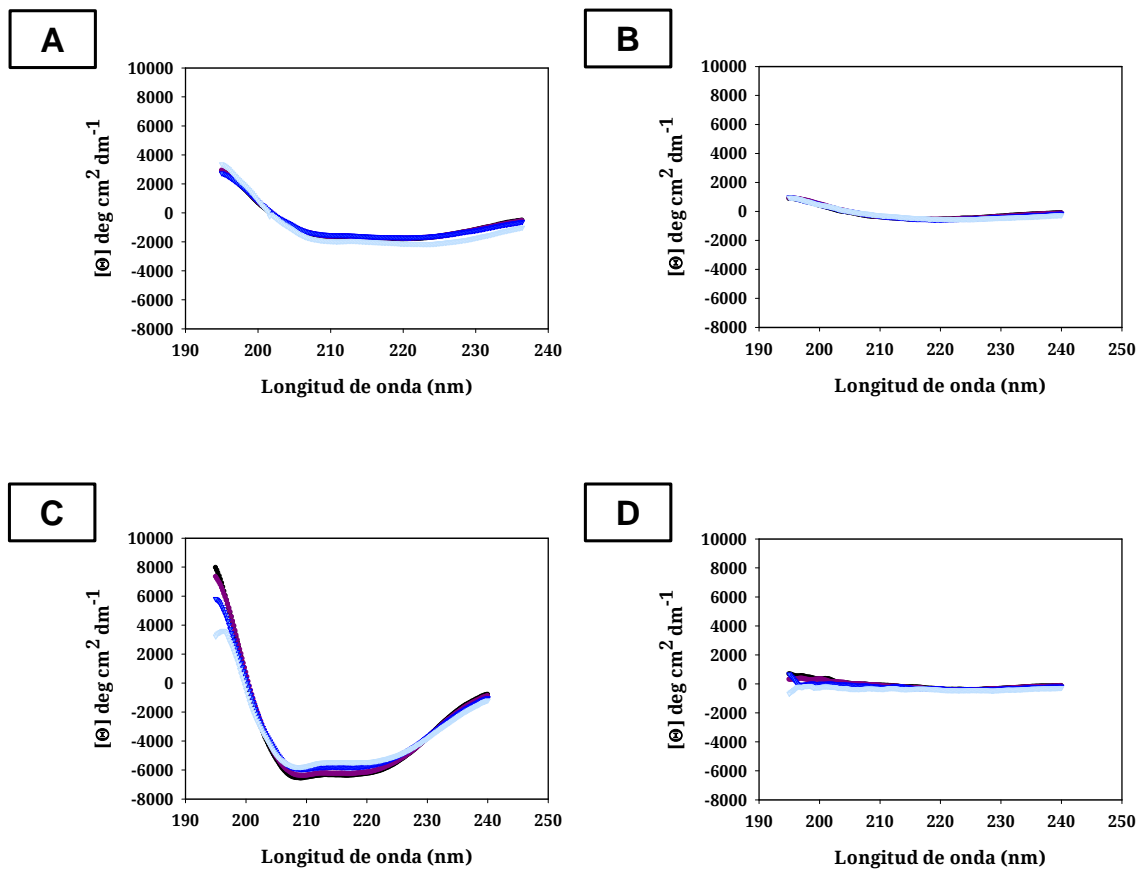
### *Estudio de la capacidad de renaturalización de la Rha-1PA de T. maritima*

El cálculo de los parámetros de equilibrio termodinámico ( $\Delta G_m$ ,  $\Delta H_m$  y  $\Delta C_p$ ) sólo puede realizarse si la desnaturalización es reversible (Duy and Fitter, 2005; Greenfield, 2006c; Benjwal *et al.*, 2006). Por lo tanto, una vez conocido el comportamiento tanto de la estabilidad térmica como de la estructura en función de la variación de la temperatura, la existencia de cola de histidinas y la ocupación del centro catalítico por el cofactor, se realizó el estudio de la capacidad de renaturalización de la enzima. Para ello se repitieron los experimentos descritos anteriormente para la elucidación de la estructura secundaria a temperaturas decrecientes.

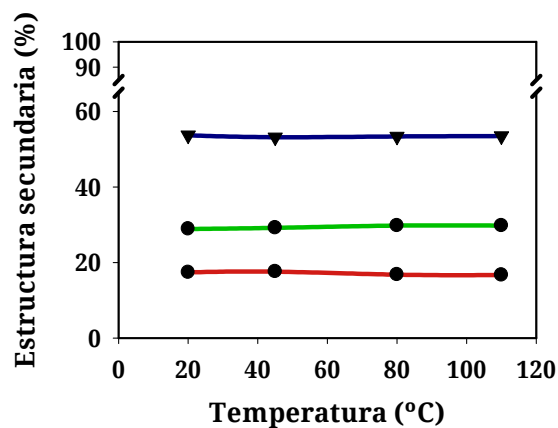
Como se puede comprobar en la Figura 36RD, los espectros obtenidos para cada caso permanecen constantes, no observándose ninguna variación que pudiera conllevar un cambio en la estructura secundaria al disminuir la temperatura (Fig. 36RD).

El análisis de la estructura secundaria sólo pudo realizarse con los espectros obtenidos para la Rha-1PA Tm SHT en presencia del cofactor (Rha-1PA Tm01 SHT), ya que en el resto de las ocasiones la proteína agregó, como indica la pérdida total de la elipticidad a 110 °C. En cuanto a la proteína Rha-1PA Tm SHT en presencia del cofactor los análisis estructurales mostraron que, como se presumía, la estructura secundaria permaneció constante al disminuir la temperatura desde 110 hasta 20 °C (Fig. 37RD). Los valores obtenidos de la aportación de los diferentes tipos de estructura secundaria fueron concordantes con los conseguidos anteriormente para la proteína en esas mismas condiciones (Fig. 31(B)RD).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN



**Figura 36RD.** Espectros de DC a 20 (●), 45 (●), 80 (▼) y 110 (■) °C de la renaturalización de las proteínas (A) Rha-1PA Tm01; (B) Rha-1PA Tm02; (C) Rha-1PA Tm01 SHT y (D) Rha-1PA Tm02 SHT.



**Figura 37RD.** Resumen del porcentaje de  $\alpha$ -hélice (—),  $\beta$ -lámina (—) y random coil (—) obtenido en el análisis por el paquete CDPro, en la renaturalización de Rha-1PA Tm01 SHT.

Estos resultados tomados en su conjunto muestran la irreversibilidad de desnaturalización por calor de la Rha-1PA de *T. maritima*. En cualquier caso, este comportamiento fue el esperado debido a que el desplegamiento inducido por la temperatura en la mayoría de las proteínas multiméricas va acompañado de su agregación y, por tanto, es irreversible (Duy y Fitter, 2005; Fitter y Haber-Pohlmeier, 2004; Kishore *et al.*, 2011). De hecho, en el caso de la Rha-1PA de *T. maritima*, cuando la temperatura empleada superó los 100 °C, se produjo la aparición de agregados proteicos, exceptuando al utilizar la Rha-1PA Tm01 SHT, es decir, la construcción sin colas de histidina y en presencia de metales divalentes. El fenómeno de agregación proteica coincide con el aumento de estructura en  $\beta$ -lámina, por lo que es de esperar que exista un proceso de agregación similar al de las proteínas amiloides (Kusumoto *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 2003; Benjwal *et al.*, 2006) que impide la posterior renaturalización.

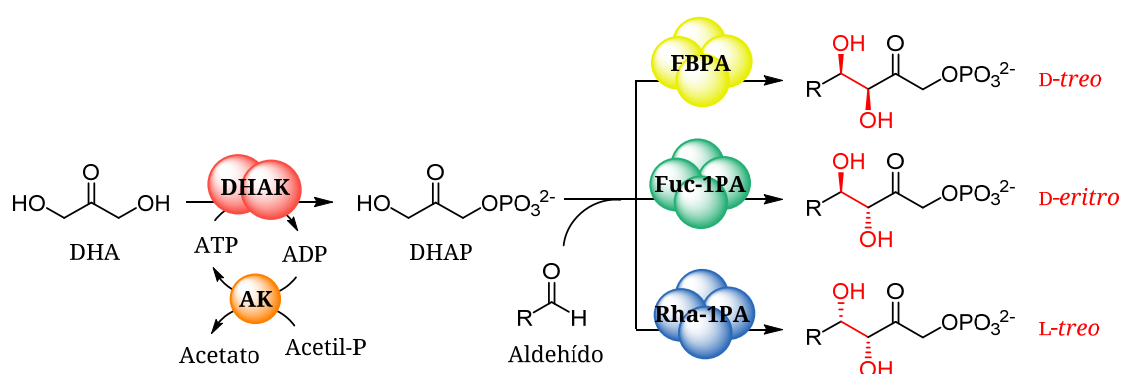
### **ESTUDIO DE LA APLICABILIDAD SINTÉTICA DE LA RHAMNULOSA-1-FOSFATO ALDOLASA DE *T. MARITIMA***

#### **Optimización de las reacciones para la formación de enlaces C-C en el contexto de un sistema multienzimático**

Como hemos visto en la Introducción, las aldolasas dependientes de DHAP tienen limitada su aplicabilidad sintética debido a su gran dependencia de la DHAP, un sustrato caro desde el punto de vista comercial y lábil a pHs neutros y básicos, que es el rango óptimo de trabajo para las aldolasas. El grupo de trabajo del Dr. Eduardo Gacía-Junceda ha diseñado un sistema multienzimático que permite la formación “one-pot” de enlaces C-C a partir de DHA (Sánchez-Moreno *et al.*, 2004; Sánchez-Moreno *et al.*, 2009b; Oroz-Guinea *et al.*, 2012). Este sistema está compuesto por tres enzimas que permiten por un lado, la fosforilación de la DHA catalizada por la DHAK de *C. freundii* con consumo de ATP y la regeneración de ese ATP catalizada por la AK de *E. coli* usando acetil fosfato como donador de fosfato. Esta

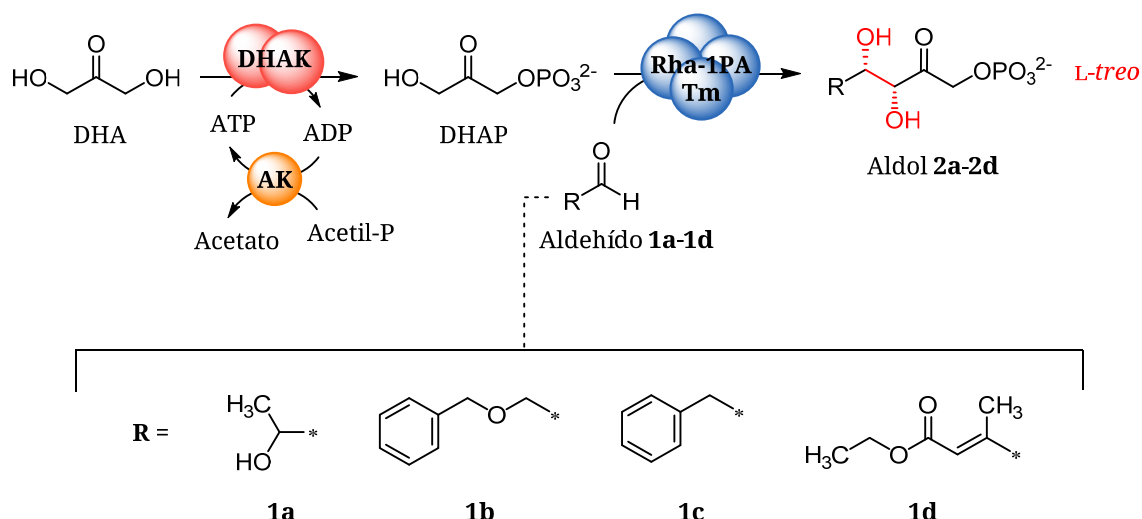
regeneración permite economizar un sustrato caro como es el ATP y evita la acumulación de ADP, que es inhibidor de la DHAK. Por otro lado, el acoplamiento “one-pot” de una aldolasa dependiente de DHAP permite llevar a cabo la reacción aldólica de manera simultánea a la formación de la DHAP, evitando pasos intermedios de purificación (Fig. 38RD).

Tras la obtención y completa caracterización de la Rha-1PA de *T. maritima*, se procedió a evaluar su capacidad como biocatalizador en el contexto del sistema multienzimático para la formación de enlaces C-C previamente diseñado por nuestro grupo.



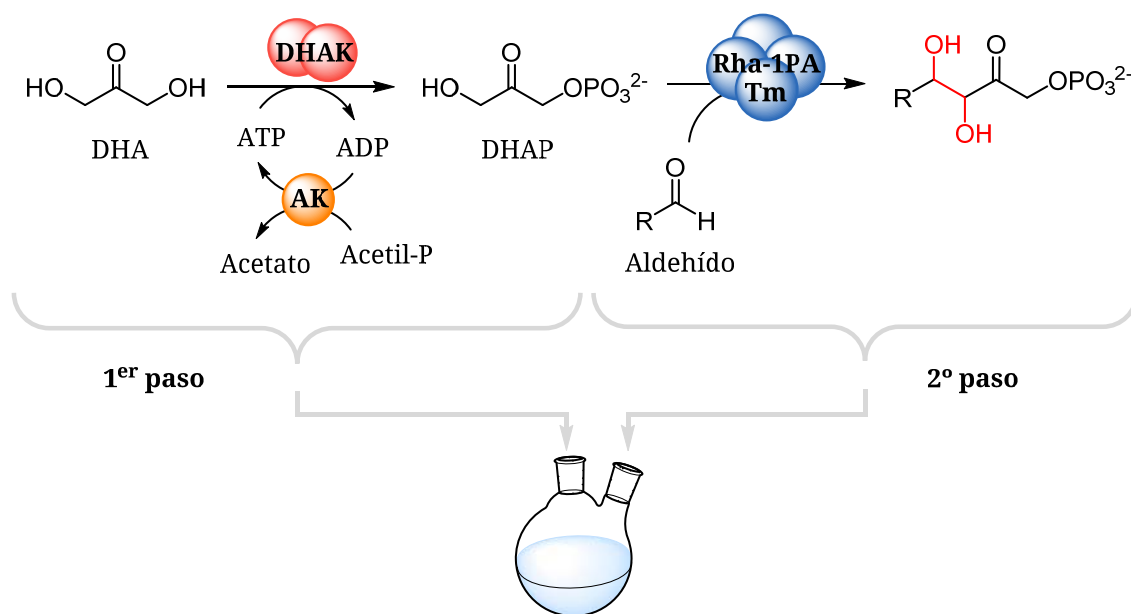
**Figura 38RD.** Sistema multienzimático acoplado para la formación de enlaces C-C mediante reacción aldólica entre DHAP, generada *in situ* por fosforilación de DHA, y distintos aldehídos, catalizada por tres aldolasas dependientes de DHAP.

La optimización de las condiciones de reacción utilizando el sistema multienzimático. Para ello, además del L-lactaldehído, que es el aceptor natural, se eligieron otros 3 aldehídos comerciales que, además de presentar una alta diversidad estructural (Tabla 3MM), ya han sido estudiados en nuestro grupo como sustratos de la Rha-1PA de *E. coli* (Iturrate, 2008) (Fig. 39RD).



**Figura 39RD.** Sistema multienzimático acoplado para la formación de enlaces C-C mediante reacción aldólica entre DHAP, generada *in situ* por fosforilación de DHA, y distintos aldehídos, catalizada por la Rha-1PA Tm dependientes de DHAP.

El primer problema que se plantea para la aplicación de la Rha-1PA de *T. maritima* en el contexto del sistema multienzimático, es la incompatibilidad con las condiciones de reacción de la DHAK y la AK, puesto que estas enzimas no presentan estabilidad frente a la temperatura. Afortunadamente, una de las ventajas fundamentales que conlleva este sistema multienzimático es que puede ser usado utilizando un protocolo “one-pot/one-step” o “one-pot/two-steps”, dependiendo de las condiciones requeridas en la síntesis. En este caso, se siguió la estrategia en dos pasos de manera que la reacción se comenzó únicamente con los componentes necesarios para la fosforilación de la DHA. Cuando la acumulación de DHAP superó el 95%, el pH se bajó hasta 6,8, momento en el cual se añadieron la aldolasa y el aldehído para iniciar la reacción aldólica (Fig. 40RD). Es importante resaltar que, por un lado, durante la fase de acumulación de DHAP el pH debe mantenerse a pH 7,5 mediante ajuste continuo del mismo para asegurar el funcionamiento del sistema de regeneración de ATP. Posteriormente el pH del medio debe ajustarse inmediatamente a 6,8 ya que a este valor de pH la estabilidad de la DHAP se incrementa considerablemente y las aldolasas dependientes de funcionan perfectamente en estas condiciones, siendo posible llevar a cabo el segundo paso de la estrategia minimizando la pérdida del sustrato, puesto que esta etapa se suele prolongar varias horas.



**Figura 40RD.** Representación esquemática de la estrategia en dos pasos (“one-pot/two-steps”).

En segundo lugar, se siguieron dos estrategias con el fin de maximizar el rendimiento final de la reacción. Dichas estrategias consistieron en la optimización tanto de la temperatura de reacción como del ratio DHAP/aldehído utilizado. Con respecto a la temperatura, se decidió incubar las reacciones a dos temperaturas diferentes: a 45 °C, que es la temperatura de compromiso entre la máxima actividad del enzima y la mínima degradación de DHAP, y a 80 °C, ya que es la temperatura metabólica óptima de *T. maritima*. En cuanto a las proporciones de sustratos elegidas, se probó a ambas temperaturas con exceso de aldehído (1:2; 1:5) y de DHAP (2:1).

Como se puede comprobar en la Tabla 9RD, en general los mejores rendimientos se obtuvieron con exceso de DHAP. Estos resultados se explican debido al hecho de que la DHAP es inestable a altas temperaturas, produciéndose su degradación, por lo que es necesario poner un exceso en el medio para favorecer la reacción, desplazando el equilibrio hacia la formación de producto. Sin embargo, en el caso particular del benciloxiacetaldehído (**1b**), los mejores resultados se producen cuando existe un exceso de aldehído en el medio. Estos datos pueden ser debidos a la baja solubilidad que presenta este compuesto en medio acuoso (incluso en presencia del 10% de DMSO), de tal manera que, al aumentar su

concentración en el medio, facilitamos su disponibilidad para la enzima, mejorando por tanto el rendimiento.

**Tabla 9RD.** Porcentajes de formación de aldol en las reacciones de optimización de la condensación aldólica empleando Rha-1PA de *T. maritima*.

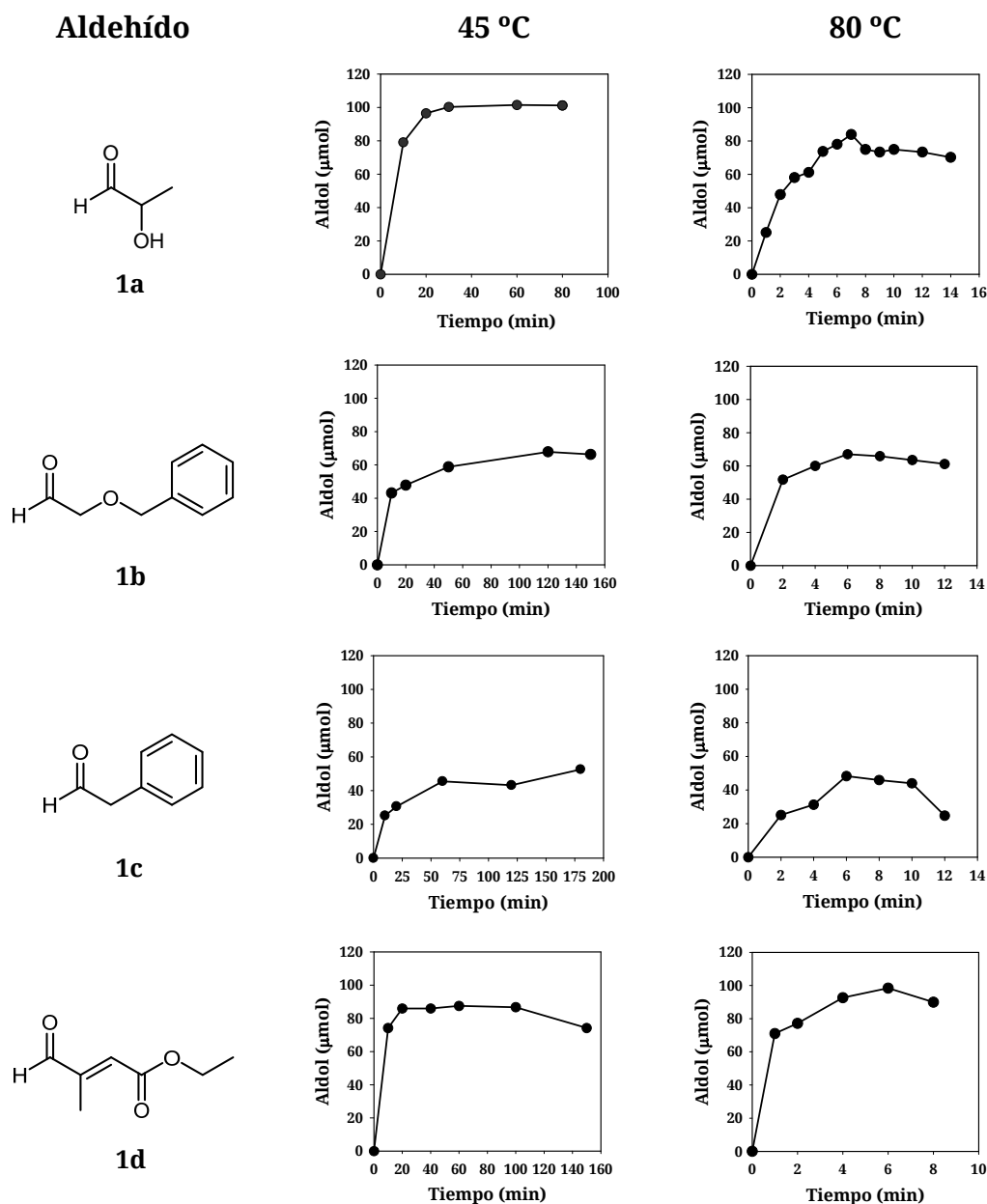
Aldehído	Aldol 2a-2d (%)					
	1:2 <sup>[a]</sup>		1:5 <sup>[a]</sup>		2:1 <sup>[a]</sup>	
	45 °C	80 °C	45 °C	80 °C	45 °C	80 °C
<b>1a</b>	91,5	62,5	-	-	>99,9	85,91
<b>1b</b> <sup>[b]</sup>	85,91	80,1	86,11	78,65	67,8	69,08
<b>1c</b> <sup>[b]</sup>	50,32	41	56,7	33,34	52,57	48,23
<b>1d</b>	76,39	57,5	79,63	55,7	87,5	98,39

[a] ratio DHAP/aldehído

[b] 10% de DMSO en el medio de reacción.

Con la intención de unificar las condiciones de reacción para todos los aldehídos, todas las reacciones se realizaron con exceso de DHAP. Los tiempos de reacción fueron optimizados para cada uno de los aldehídos, monitorizando el progreso de las reacciones mediante la valoración de la cantidad de aldol con la Rha-1PA de *E. coli* (ver Materiales y Métodos). Los resultados se resumen en la Figura 41RD.

Bajo estas condiciones optimizadas, al analizar las reacciones aldólicas a 45 °C de los aldehídos **1a** y **1d** se obtuvieron rendimientos de reacción entorno al 100% tras 20 min de reacción. Sin embargo, para los aldehídos **1b** y **1c** los tiempos de reacción se alargaron hasta más de una hora y el porcentaje de conversión cayó hasta el 68% y el 53%, respectivamente.



**Figura 41RD.** Reacciones de adición aldólica entre la DHAP, obtenida *in situ* por fosforilación enzimática de la DHAP, y los aldehídos **1a-1d** catalizada por la Rha-1PA de *T. maritima* a 45 °C y a 80 °C.

Cuando las mismas reacciones se repitieron a 80 °C, los tiempos de reacción se redujeron considerablemente, situándose en todos los casos en torno a los 6 min del comienzo de la reacción. En cuanto a la producción de aldol, los rendimientos permanecieron estables o disminuyeron ligeramente en el caso de los aldehídos **1a** (84%), **1b** (67%) y **1c** (48%). Por el contrario, en la reacción con el aldehído **1d** se incrementó (98%).

Al comparar estos resultados con los previamente obtenidos en nuestro laboratorio usando Rha-1PA de *E. coli* como biocatalizador (Iturrate, 2008), se aprecia que en todos los casos el porcentaje de obtención de aldol es igual (**2c**) o superior (**2a**, **2b** y **2d**) al utilizar la Rha-1PA de *T. maritima* (Tabla 10RD). Especialmente destacable es el aumento del rendimiento al utilizar el benciloxiacetaldehído (**1b**) a 45 °C y el etil-3-metil-4-oxocrotonato (**1d**) a 80 °C como aceptores, donde se da un aumento del 36% en ambos casos.

**Tabla 10RD.** Máximos de conversión utilizando la Rha-1PA de *T. maritima* y la Rha-1PA de *E. coli* en el sistema multienzimático para la formación de enlaces C-C en “one-pot/two-steps”.

Aldehído	Aldol 2a-2d (%)		
	Rha-1PA Tm (45 °C)	Rha-1PA Tm (80 °C)	Rha-1PA Ec
<b>1a</b>	100	84	83
<b>1b</b>	68	67	32
<b>1c</b>	53	48	49
<b>1d</b>	87	98	62

Como se explicó en la Introducción, las aldolasas dependientes de DHAP catalizan la adición aldólica con un alto control de la estereoquímica en los dos nuevos centros estereogénicos formados. No obstante, está descrito que las aldolasas dependientes de DHAP son altamente estereoselectivas en la posición C3 del aldol (la que proviene de la DHAP en la reacción aldólica), mientras que la estereoselectividad de la posición C4 (la que proviene del aldehído en la reacción aldólica) en ocasiones puede depender de la estructura y estereoquímica del aldehído utilizado, pudiéndose generar a una mezcla de diastereoisómeros (Schoevaart *et al.*, 2001; Clapés y Garrabou, 2011).

Teniendo en cuenta este hecho, se realizó una primera aproximación a la estereoselectividad de la aldolasa de *T. maritima*. Para ello el aldol **2d** se sintetizó a mayor escala (0,5 mmol de aldehído), siguiendo siempre la estrategia en dos pasos y manteniéndose las relaciones indicadas de volumen y concentración de sustratos. Adicionalmente, con la intención de conocerla

influencia de la temperatura en la estereoselectividad de la enzima (si la hubiera), se emplearon las dos temperaturas para incubar la reacción durante la condensación aldólica. En ambos casos se obtuvieron rendimientos de acumulación de aldol muy similares a los obtenidos a menor escala (95,7% a 45 °C y 97,3% a 80 °C). Asimismo, el tiempo óptimo de reacción permaneció inalterado (25 min y 7 min, respectivamente).

La elección de este aldehído en particular para realizar las síntesis a gran escala fue motivada por haber sido utilizado en trabajos previos en el laboratorio en los que se caracterizó la aplicabilidad como sustrato aceptor del etil-3-metil-4-oxocrotonato (**1d**), empleando tres de las cuatro enzimas estereocomplementarias DHAP-dependientes (RAMA, FucA Ec y Rha-1PA Ec) dentro del sistema multienzimático (Sánchez-Moreno *et al.*, 2009a).

Cuando se sintetizó el aldol **2d** con estas enzimas los rendimientos máximos estuvieron entre el 30 y el 60% y los tiempos de reacción se alargaron entre las 6 y las 20 horas. Las unidades de enzima utilizadas también se vieron incrementadas (540 U RAMA, 72 U Rha-1PA Ec, 150 U Fuc-1PA Ec) frente a las 1,5 U utilizadas con la Rha-1PA de *T. maritima*. La mayor eficiencia en la catálisis por parte de la enzima hipertermófila podría deberse a factores tales como un aumento de la tolerancia hacia el aldehído, mayor estabilidad de la enzima en las condiciones de reacción, el aumento de la solubilidad del sustrato al trabajar a altas temperaturas o a la mejora de los parámetros termodinámicos del proceso.

La formación del aldol **2d** en las reacciones se monitorizó mediante dos técnicas en paralelo: (i) valoración espectrofotométrica con ensayo enzimático acoplado, y (ii) detección por HPLC. Posteriormente, el producto de dichas reacciones se purificó siguiendo el protocolo de sales de bario y fue inequívocamente identificado mediante experimentos de 1D y 2D RMN (ver Materiales y Métodos).

Los análisis de RMN coincidieron con los previamente descritos para este producto (Sánchez-Moreno *et al.*, 2009a) al catalizar la reacción con la aldolasa de *E. coli*, mostrando una relación *treo:eritro* 80:20. Este resultado fue independiente de la temperatura de incubación. No obstante, la técnica de RMN no permite distinguir en este caso entre las dos formas

enantioméricas del diastereoisómero. A pesar de ello, es bien conocido que el estereoisómero mayoritario formado en adiciones aldólicas catalizadas por la rhamnulosa-1-fosfato aldolasa es el *L-treo*, por lo que se puede presuponer que los diastereoisómeros purificados corresponden a la conformación (3*R*, 4*S*) y (3*R*, 4*R*). Estos datos son análogos a los descritos para la Rha-1PA de *E. coli* (Sánchez-Moreno *et al.*, 2009a).

Esta falta de selectividad la Rha-1PA de *T. maritima* indica que el ataque producido por el complejo Rha-1PATm-DHAP se da por las dos caras enantiotópicas del aldehído aceptor, en lugar de únicamente por la cara *re*, dando lugar al isómero (3*R*, 4*S*). Probablemente esto sea debido a las diferencias estructurales entre el aldehído estudiado y su sustrato natural, el L-lactaldehído.

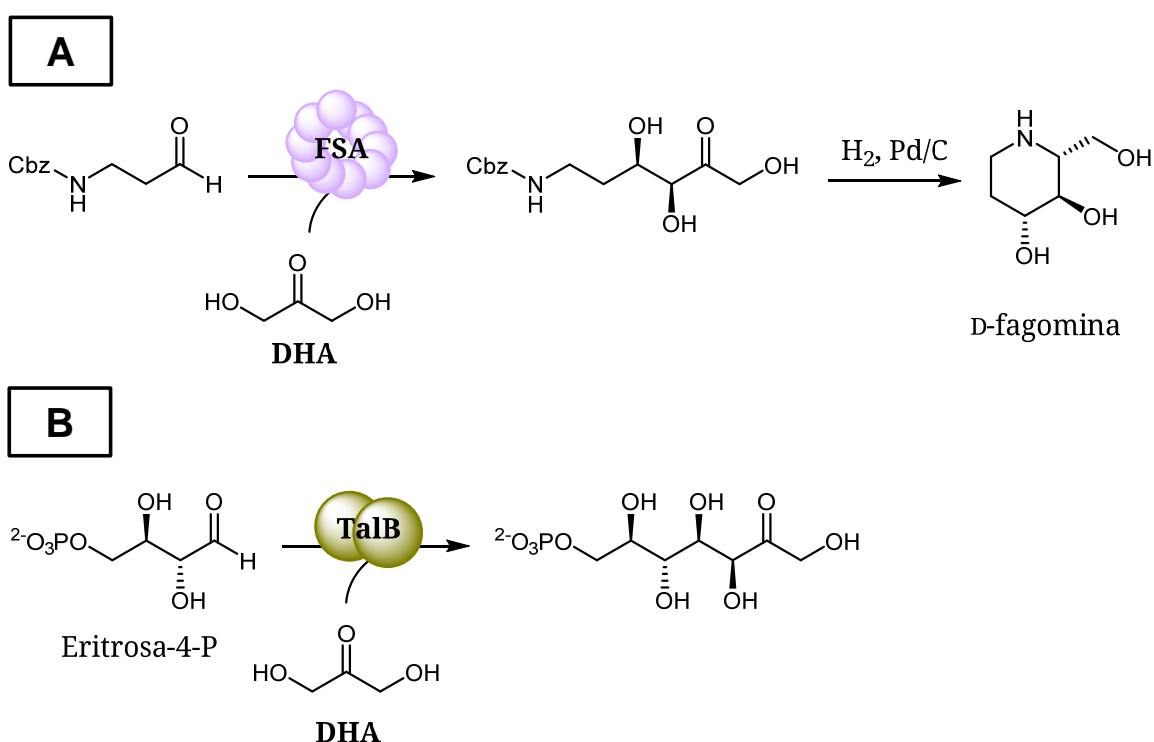
De los resultados presentados podemos concluir que la Rha-1PA de *T. maritima* es adaptable dentro del contexto de un sistema multienzimático acoplado para la obtención de enlaces C-C. Además, no solo es aplicable con diferentes aldehídos de gran diversidad estructural, sino que ofrece la posibilidad de optimizar el tiempo de reacción mediante el control de la temperatura de reacción.

### **¿Es la DHA sustrato de la Rha-1PA?**

Como se ha explicado en la Introducción, la principal limitación que presenta el uso de las enzimas dependientes de DHAP es su estricta especificidad por este sustrato, ya que es un sustrato caro desde el punto de vista comercial y se degrada en metilglioxal a pHs neutros y básicos y a altas temperaturas, que es el rango óptimo para las aldolasas.

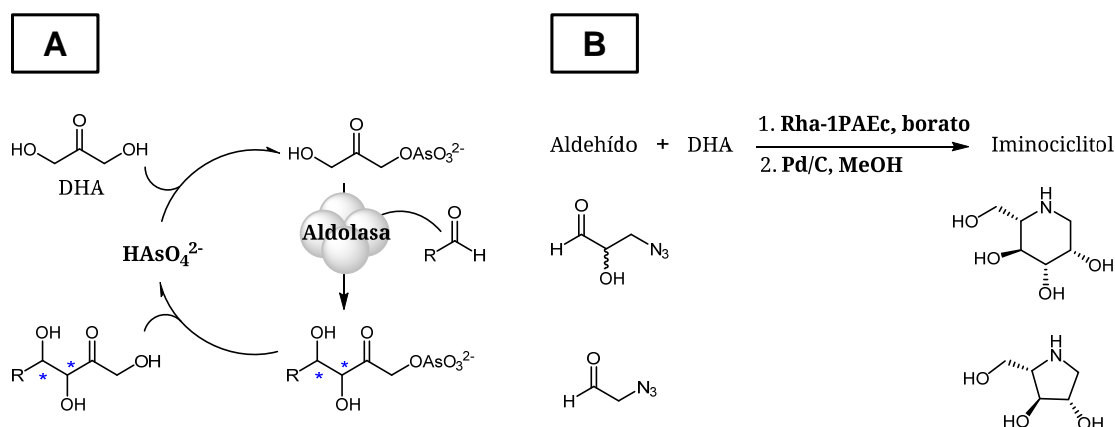
En este sentido, recientemente se ha descrito una fructosa-6-fosfato aldolasa (FSA), una nueva aldolasa tipo I, que cataliza la adición aldólica de DHA a gliceraldehído-3-fosfato (Schürmann y Sprenger, 2001). Además, esta enzima tolera otros aceptores no fosforilados como el glicolaldehído (GA), la hidroxiacetona (HA) y la hidroxibutanona (HB), generando la misma estereoquímica que la fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa (3*S*,4*R*) (Schürmann *et al.*, 2002). Aunque esta enzima ha demostrado su aplicabilidad en síntesis de

compuestos como la D-fagomina (Castillo *et al.*, 2006) y otros iminociclitoles (Sugiyama *et al.*, 2007, Concia *et al.*, 2009; Garrabou *et al.*, 2009), así como derivados de azúcares monofosfato (Sánchez-Moreno *et al.*, 2012), de momento, sólo se ha encontrado esta estereoquímica dentro de un posible grupo de aldolasas dependientes de DHA. Por otra parte, también se ha detallado la actividad aldolasa DHA-dependiente de una variante de la transaldolasa B (TalB) de *E. coli* (Schneider *et al.*, 2008). No obstante, sigue siendo necesario buscar nuevas enzimas capaces de, valiéndose de la DHA, generar nuevos estereocentros (Fig. 42RD).



**Figura 42RD.** (A) Aplicabilidad de la fructosa-6-fosfato aldolasa (FSA) en la síntesis de D-fagomina; (B) Actividad aldolasa de la transaldolasa B (TalB) de *E. coli*.

Recientemente, Wong y colaboradores han descrito la utilización de borato como mimético del éster de fosfato (Sugiyama *et al.*, 2006). Aunque, por el momento, sólo han demostrado la aplicabilidad del borato-mimético con L-rhamnulosa-1-fosfato aldolasa de *E. coli*, su utilización en síntesis de iminociclitoles permite evitar el empleo de DHAP y simplifica la síntesis eliminando el tratamiento con fosfatasa ácida (Garrabou *et al.*, 2011) (Fig. 43RD).



**Figura 43RD.** (A) Empleo de arsenatos como miméticos de DHAP; (B) síntesis de iminociclitos catalizada por Rha-1PA Ec en presencia de borato.

Dada la gran homología entre las dos rhamnulosa-1-fosfato aldolasas, decidimos evaluar la capacidad de la Rha-1PA de *T. maritima* para utilizar la DHA como sustrato donador en lugar de la DHAP. Se ensayaron diversas reacciones, variando la concentración del sustrato y del tampón borato, las unidades de enzima añadida, temperatura y pH del medio (ver Materiales y Métodos). Además, se llevaron a cabo de forma paralela reacciones blanco en las que no se añadió la aldolasa para descartar la adición aldólica no catalizada por la enzima. La aparición de producto se monitorizó por HPLC.

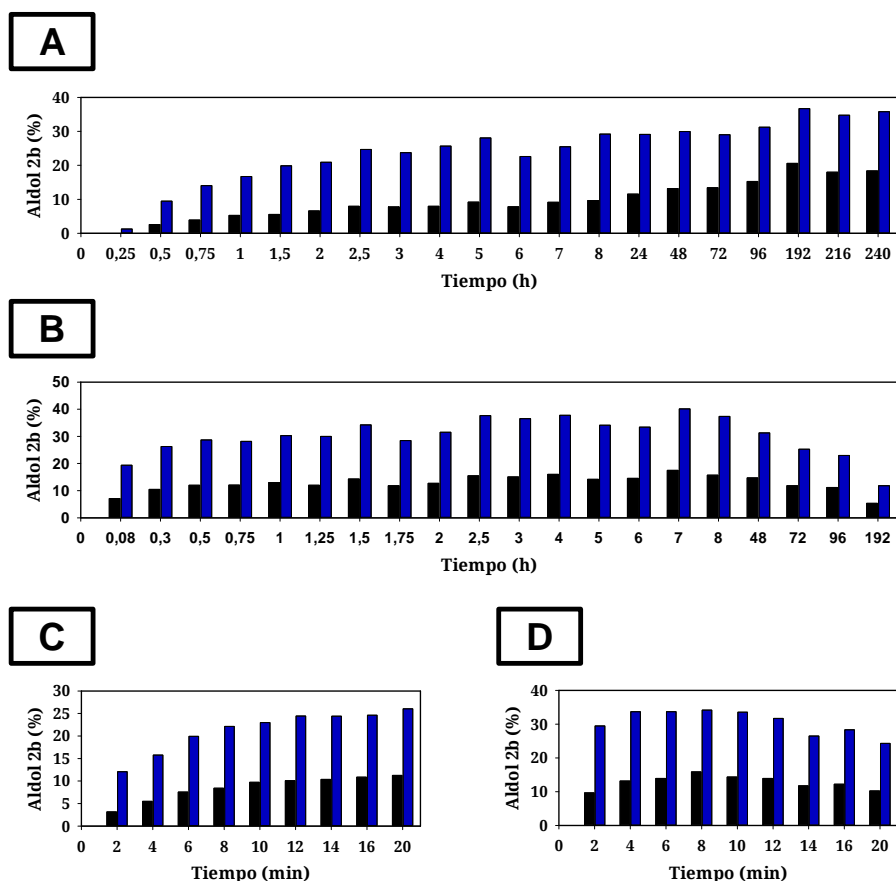
Desafortunadamente, la Rha-1PA de *T. maritima* no tuvo actividad catalítica detectable bajo ninguna de las diferentes condiciones ensayadas. Hay dos posibles explicaciones a este hecho: (i) que el borato análogo de la DHAP no forme los puentes de hidrógeno adecuados y, por lo tanto, no se estabilice en el centro catalítico de la enzima, (ii) o puede que sea causa del carácter inhibitorio que presenta el borato frente a algunas enzimas, bien por la esterificación de grupos hidroxilo de algunos residuos aminoácidos de la enzima (Kroemer *et al.*, 2003), o bien por la formación de análogos que mimetizan el estado de transición (Wolny, 1977; Tate y Meister, 1978; Baggio *et al.*, 1997; Wada y Asano, 2003; Transue *et al.*, 2004; Iwig *et al.*, 2005).

La utilización de DHA en presencia de tampón borato parece ser una característica exclusiva de la Rha-1PA de *E. coli*, ya que ninguna otra aldolasa dependiente de DHAP ha mostrado esta facultad a pesar de sí haber podido utilizar otros análogos del grupo fosfato como vanadatos o arsenatos

(Drueckhammer *et al.*, 1989; Crans *et al.*, 1992; Schoevaart *et al.*, 2001; Garrabou *et al.*, 2011).

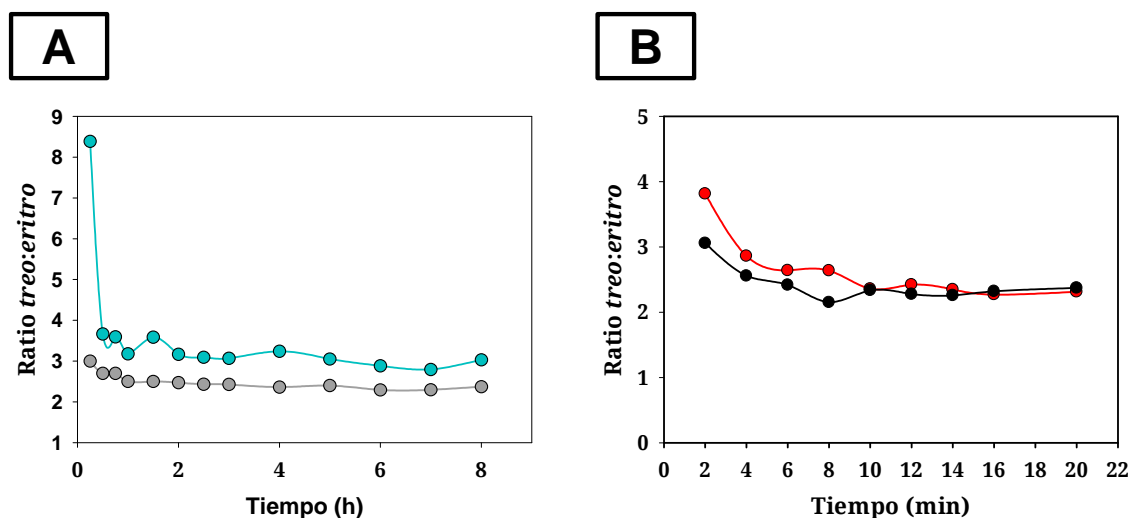
## Estudio del control estereoquímico de la rhamnulosa-1-fosfato de *T. maritima*

Se investigó el control estereoquímico de la enzima utilizando como sustrato aceptor el benciloxiacetaldehído (aldehído **1b**). Para ello, se cuantificó el porcentaje y la relación de los diferentes diastereoisómeros formados en función del tiempo y de la temperatura de reacción. Las reacciones se llevaron a cabo a cuatro temperaturas diferentes (4 °C, R/T, 45 °C y 80 °C), tomándose alícuotas para monitorizar la formación de los isómeros mediante HPLC (Fig. 44RD).



**Figura 44RD.** Porcentaje de cada uno de los isómeros *treo* (azul) y *eritro* (negro) presentes durante la condensación aldólica con el benciloxiacetaldehído (aldehído **1b**) catalizada por la Rha-1PA de *T. maritima* a diferentes temperaturas: (A) 4 °C; (B) R/T; (C) 45 °C y (D) 80 °C.

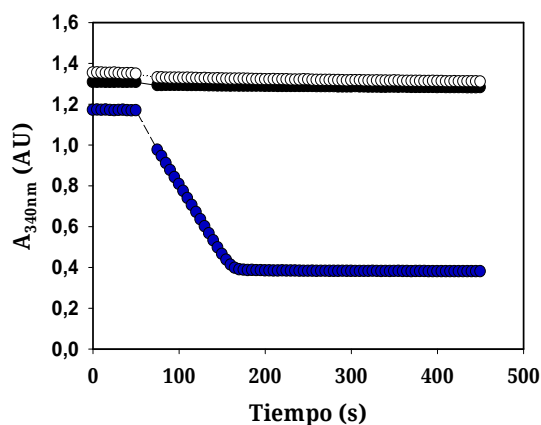
Como era de esperar, el diastereoisómero *L-treo* (3*R*,4*S*), que es el de preferencia natural de la enzima, fue el isómero bajo control cinético. A las cuatro temperaturas ensayadas, éste fue el diastereoisómero más rápidamente producido. Según avanzó el tiempo de reacción la relación *treo:eritro* ((3*R*,4*S*): (3*R*,4*R*)) disminuyó hasta estabilizarse aproximadamente en un ratio 2:1. Al contrario que lo descrito para otras enzimas con determinados aldehídos (Calveras *et al.*, 2009; Carmona *et al.*, 2003), no se observó ningún aumento de la estereoselectividad al disminuir la temperatura de reacción. No obstante, no se puede descartar que la Rha-1PA de *T. maritima* pueda comportarse de manera distinta junto con otros aldehídos. En este sentido, la Rha-1PA de *E. coli* no presenta cambios en su estereoselectividad en la síntesis aldólica en presencia de (*R*)-fenil-(1-oxohexan-2-il)carbamato, pero sí cuando los aceptores son el (*R*)-fenil (1-oxopentan-2-il)carbamato o el (*R*)-*N*-Cbz-leucinal (Calveras *et al.*, 2009) (Fig. 45RD).



**Figura 45RD.** Relación *treo:eritro* [(3*R*,4*S*): (3*R*,4*R*)] presente en el medio de reacción en función del tiempo transcurrido y la temperatura de incubación: 4 °C (●); R/T (●); 45 °C (●) y 80 °C (●).

Con la intención de confirmar que la relación diastereoisomérica que se alcanzaba se debía a la estabilidad del isómero (3*R*,4*R*) (isómero termodinámico), derivada de la incapacidad de la Rha-1PA de *T. maritima* de catalizar la reacción retroaldólica sobre aldoles con una estereoquímica diferente a la de su sustrato natural, se probó la incompetencia de la enzima

para la retroaldólisis utilizando la fuculosa-1-fosfato (3*R*,4*R*) y la fructosa-1,6-bisfosfato (3*S*,4*R*) como sustratos. Este experimento se monitorizó en el espectrofotómetro UV-Vis (Fig.46RD).



**Figura 46RD.** Determinación de la actividad retroaldólica de la Rha-1PA de *T. maritima* frente a su sustrato natural, la rhamnulosa-1-fosfato (●) y frente a sus estereoisómeros, fructosa-1,6-bisfosfato (○) y fuculosa-1-fosfato (●).

En el ensayo realizado con la Rha-1PA de *T. maritima* no fue posible detectar ninguna actividad retroaldólica de la enzima cuando se añadió fuculosa-1-fosfato o la fructosa-1,6-bisfosfato como sustrato, pero sí cuando se adicionó su sustrato natural la rhamnulosa-1-fosfato (Fig.46RD). Estos resultados corroboran que solo el isómero natural es hidrolizado por la aldolasa de *T. maritima*, convirtiendo al diastereoisómero (3*R*,4*R*) en el de preferencia termodinámica y facilitando su acumulación en el medio. Teniendo en cuenta que hasta ahora todas las reacciones aldólicas han sido continuadas hasta la máxima conversión, este hecho explica la obtención de mezclas de los dos diastereoisómeros.

## Síntesis de análogos nitrogenados de azúcares

Los derivados nitrogenados de azúcares, polioles cíclicos en cuya estructura presentan uno o más grupos amino, son un grupo de compuestos naturales ampliamente distribuidos en la naturaleza (Duchek *et al.*, 2011; Kilbas y Balci, 2011). En esta familia se pueden incluir los aminociclitoles y

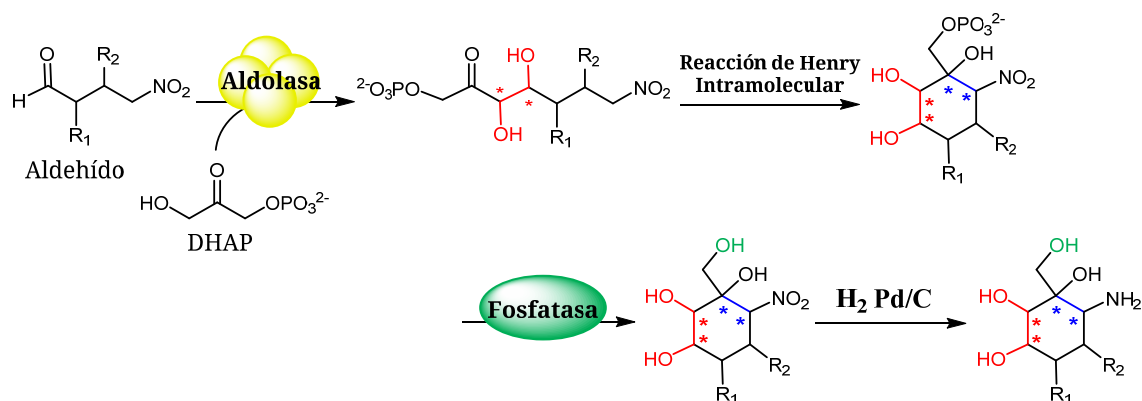
los iminociclitoles, que están involucrados *in vivo* en el funcionamiento y regulación de un gran número de procesos biológicos, entre los que se encuentran procesos de reconocimiento celular, transducción de señales e inhibición selectiva de glicosidasas (Cosgrove e Irving, 1980; Greimel *et al.*, 2006; Kobayashi, 2008). En concreto, estas enzimas son responsables del metabolismo de carbohidratos involucrados en muchos procesos de reconocimiento bioquímico. Así pues, los trastornos que atañen a la capacidad de glicosilación de estas enzimas afectan a la capacidad de comunicación celular y a los procesos de repuesta inmune (Varki, 2006; Yu y Yanagisawa, 2007; Marco-Ramell *et al.*, 2014). Además, glicosidasas y glicosiltransferasas están relacionadas con determinadas enfermedades como el cáncer, la enfermedad de Gaucher, la enfermedad de Fabry, la artritis reumatoide (poliartritis crónica) o determinadas infecciones virales incluyendo VIH o hepatitis B y C, entre otras (Koeller y Wong, 2000; Bertozzi y Kiessling, 2001; Wrondnigg *et al.*, 2008; Trapero y Llebaria, 2013; Tuccillo *et al.*, 2014).

Los aminociclitoles e iminociclitoles mimetizan el estado de transición de las glicosidasas, por lo que constituyen una forma valiosa de investigar el mecanismo de estas enzimas (Heightman y Vasella, 1999; Vasella y Davies, 2002). Debido a estas interesantes propiedades biológicas, el estudio tanto de estas moléculas como de sus análogos ha despertado un gran interés en las últimas décadas, mostrando la capacidad de algunos para actuar no sólo como potentes inhibidores de glicosidasas sino también como antibióticos o como agentes antivirales (Ogawa, 1998; Compain y Martin, 2001; Chen *et al.*, 2003; Mahmud, 2003; Compain y Martin, 2007; Mahmud, 2009; Díaz y Delgado, 2010; Gómez *et al.*, 2012; Concia *et al.*, 2013). Consecuentemente, se han realizado grandes esfuerzos para alcanzar la síntesis de derivados de estas estructuras con la intención de aumentar la actividad biológica o de mejorar la selectividad de los compuestos ya conocidos (Chen *et al.*, 2003; Ogawa *et al.*, 2004; Cipolla *et al.*, 2006; Greimel *et al.*, 2006; Flatt y Mahmud, 2007; Wrondnigg *et al.*, 2008).

### ***Síntesis de nitrociclitoles***

Recientemente, el grupo de la Profesora Marielle Lemaire de la Universidad Blaise Pascal, ha desarrollado una nueva metodología “one-pot” para la síntesis de aminociclitoles análogos a valiolumina (Kobata, 1979; Melendez-Hevia *et al.*, 1993), validamina (Sharon y Lis, 1989; Sharon y Lis, 1993) y valienamina (Kang *et al.*, 1995; Herscovics, 1999). Éstos y sus análogos pueden ser inhibidores específicos de las glicosidasas relacionadas con la degradación intestinal de carbohidratos ya que mimetizan el estado de transición durante la hidrólisis glicosídica (Lillelund *et al.*, 2002). Dichos compuestos también se están ensayando como chaperonas moleculares de glicosidasas lisosomales, y, por lo tanto, para el tratamiento de ciertas variantes de la enfermedad de Pompe, provocada por deficiencias en la maduración de estas enzimas (Suzuki, 2006; Okumiya *et al.*, 2007; Suzuki, 2008).

La clave de esta ruta quimioenzimática es el proceso de formación estereoselectiva del polirol cíclico, para lo cual se lleva a cabo la condensación aldólica entre la DHAP y un nitroaldehído catalizada por una aldolasa dependiente de DHAP, formando de esta manera el enlace entre los carbonos C2 y C3. A continuación, se produce una reacción de Henry intramolecular altamente estereoselectiva, creando el segundo enlace entre los carbonos C1 y C6. Posteriormente, se realiza la desfosforilación del producto obtenido mediante la hidrólisis del grupo fosfato catalizada por una fosfatasa. De esta manera, se logra un nuevo nitrociclitol enantioméricamente puro con cuatro nuevos estereocentros por cada aldehído probado. Por último, el nitrociclitol formado se somete a hidrogenación en presencia de H<sub>2</sub> Pd/C, obteniendo así el aminociclitol deseado (El Blidi *et al.*, 2006; El Blidi *et al.*, 2009; Camps Bres *et al.*, 2013) (Fig. 47RD). La utilización del sistema multienzimático facilita la formación de los nuevos aminociclitoles ya que posibilita la síntesis de compuestos enantiocomplementarios con el uso alternativo de RAMA, Rha-1PA y Fuc-1PA.



**Figura 47RD.** Esquema de reacción de la síntesis multienzimática en “one-pot” para la obtención de nitrociclitolos desarrollada por el grupo de la Profesora Marielle Lemaire.

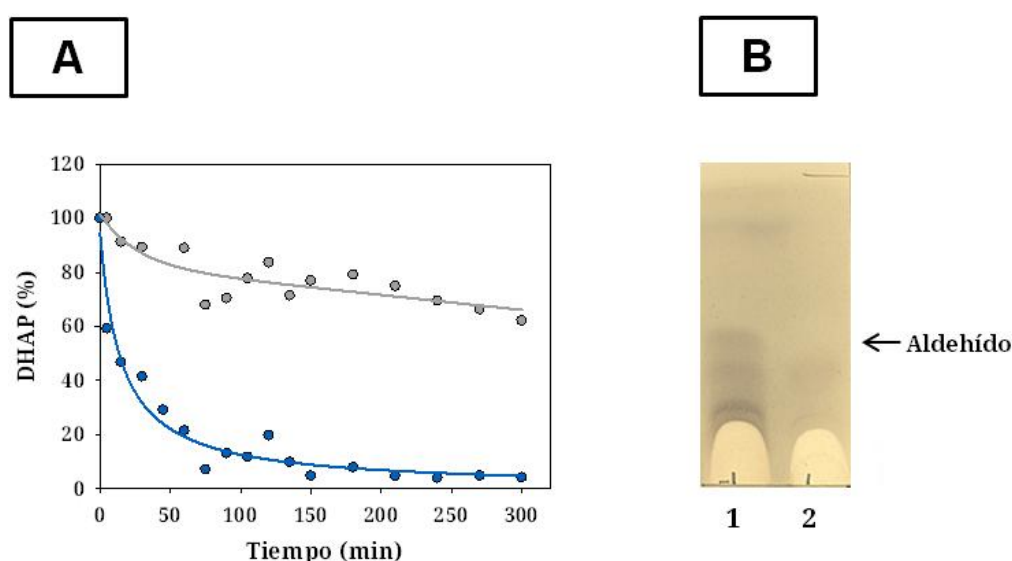
La aplicación de esta estrategia usando la Rha-1PA de *T. maritima* y su combinación con el sistema multienzimático desarrollado por el grupo del Doctor Eduardo García-Junceda (Sánchez-Moreno *et al.*, 2004; Sánchez-Moreno *et al.*, 2009a), se evaluó utilizando tres nitroaldehídos como sustratos aceptores (Tabla 4MM).

Como primera aproximación, este sistema multienzimático se ensayó a 45 °C en una escala de 0,1 mmoles de aldehído **1e** (4-nitrobutanal) y un ratio DHAP/nitroaldehído 2:1. Anteriormente fue necesaria la desprotección del aldehído, previamente sintetizado en forma de hemiacetal. La obtención de DHAP se llevó a cabo a una escala de 5 mmol y el producto fue dividido posteriormente en alícuotas, que serían empleadas cuando fuese requerido para los segundos pasos independientes para cada aldehído, siendo la aplicación práctica más sencilla (ver Materiales y Métodos).

A diferencia de las reacciones anteriores, la valoración espectrofotométrica del aldol formado utilizando Rha-1PA de *E. coli* no fue posible dado que, una vez formado el aldol, sufre de manera instantánea la ciclación por una reacción de Henry intramolecular, lo que impide la cuantificación del producto formado por reacción retroaldólica. Por lo tanto, la formación del correspondiente nitrociclitol fosforilado tuvo que ser monitorizada mediante dos técnicas en paralelo: (i) la valoración espectrofotométrica con ensayo enzimático acoplado de la DHAP presente en el medio, y (ii) la desaparición de aldehído por TLC.

De forma simultánea a estas reacciones, con el fin de cuantificar el nitrociclitol fosforilado obtenido, se efectuaron reacciones blanco en las que no se añadió el aldehído. De esta manera el aldol formado correspondería a la diferencia entre la DHAP consumida y aquella que hubiera sido degradada por el efecto del calor.

En la Figura 48RD se observa que al cabo de 2,5 horas de reacción no se pudo apreciar aldehído **1e** presente en el medio y que la DHAP consumida fue en torno al 96%, mientras que en la reacción blanco persistió todavía aproximadamente el 80% de la misma.



**Figura 48RD.** Seguimiento de la reacción aldólica entre la DHAP y el 4-nitrobutanal (aldehído **1e**) empleando la Rha-1PA de *T. maritima*. (A) Valoración de la DHAP remanente en el medio mediante valoración espectrofotométrica de la reacción aldólica (●) y la reacción blanco (●). (B) Cromatografía en capa fina al cabo de 2,5 horas de la reacción blanco (1) y la reacción aldólica (2).

Sorprendentemente, cuando se analizó una muestra del crudo de reacción por RMN no se consiguió distinguir el producto esperado.

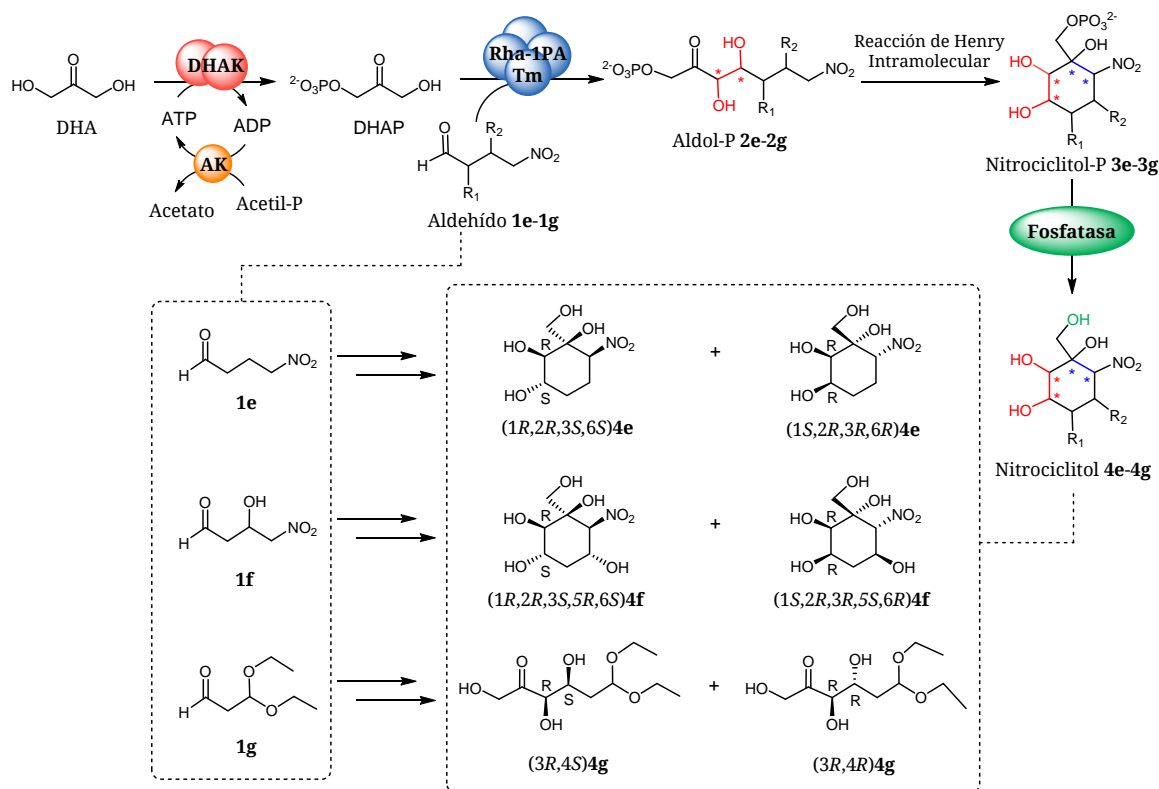
A la vista de este resultado, se decidió hacer una prueba de la estabilidad de los sustratos frente a la temperatura. Las condiciones fueron las mismas que las utilizadas previamente, exceptuando la ausencia de aldolasa en el medio. Como control blanco se incubó la misma mezcla, esta vez sin el aldehído **1e**. Análogamente, la presencia de DHAP se valoró

espectrofotométricamente y la del aldehído mediante cromatografía en capa fina.

Así se comprobó que, en la mezcla que contenía ambos sustratos, el 4-nitrobutal (**1e**) desaparecía completamente transcurridos 90 minutos de incubación y la DHAP presente en el medio disminuía hasta el 23,6% sin que hubiera aparición del producto deseado. Por el contrario, en el caso de la reacción blanco el porcentaje de DHAP al cabo de ese mismo tiempo era superior al 80% de la concentración inicial. Estos datos indicaban que el nitroaldehído utilizado no solo era lábil al calor sino que también desestabilizaba a la DHAP a temperaturas moderadas.

Por lo tanto, para alcanzar la síntesis de los nitrociclitoles fue necesario realizar las reacciones aldólicas a temperatura ambiente. Afortunadamente, a pesar de su naturaleza hipertermófila, la Rha-1PA de *T. maritima* es activa a R/T y, por consiguiente, capaz de utilizar los aldehídos **1e-1g** como sustratos aceptores.

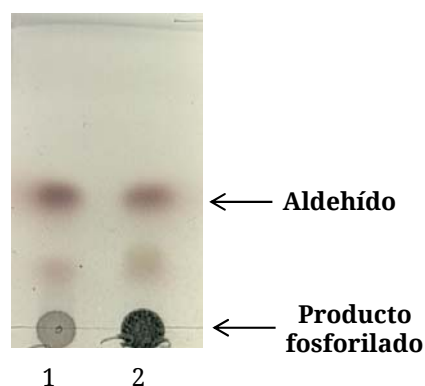
La adición aldólica se repitió a temperatura ambiente, empleando 3 U de aldolasa de *T. maritima* y 0,5 mmol de cada uno de los tres aldehídos mencionados en la Tabla 4MM (4-nitrobutanal **1e**, 3-hidroxi-4-nitrobutanal **1f** y 3,3-dietoxipropanal **1g**) por separado (Fig. 49RD). El resto de relaciones indicadas de volumen y concentración del resto de componentes se mantuvieron. Con el fin de cerciorar la estabilidad de los sustratos en estas condiciones, antes de añadir la enzima en cada una de las reacciones se recogió una muestra que sirvió de control. De la misma manera que anteriormente, el desarrollo de las reacciones se analizó valorando la desaparición de los sustratos.



**Figura 49RD.** Síntesis de nitroderivados utilizando cuatro enzimas en una reacción "one pot". El primer paso de esta cascada enzimática es la fosforilación de la DHA por la DHAK de *C. freundii*, seguida de la condensación aldólica catalizada por la aldolasa de *T. maritima* y la subsecuente reacción de Henry intramolecular. El último paso es la hidrólisis del grupo fosfato empleando la fosfatasa ácida de patata.

Bajo estas condiciones, en aquellas reacciones en las que la aldolasa estuvo presente, se evidenció la desaparición total de los sustratos y la aparición del producto fosforilado al cabo de 12 horas (Fig. 50RD). En los controles la concentración de DHAP y aldehído se mantuvo constante durante este tiempo.

En el caso del 3,3-dietoxipropanal (aldehído **1g**), al no ser un nitroaldehído sino un precursor incapaz de realizar la ciclación espontáneamente, la acumulación de aldol se midió, además, por valoración retroaldólica. El rendimiento de esta reacción fue superior al 98%.



**Figura 50RD.** Ejemplo del seguimiento por TLC de la reacción aldólica entre la DHAP y el aldehído **1g** al cabo de una hora de reacción. (1) Reacción blanco; (2) reacción con la Rha-1PA de *T. maritima*.

Una vez solventado el problema de la inestabilidad de los aldehídos y tras la obtención de los productos fosforilados, se llevó a cabo la hidrólisis del grupo fosfato catalizada por la fosfatasa ácida de patata. Anteriormente, el pH de la reacción se disminuyó hasta 4,7 y la aldolasa precipitada se eliminó por centrifugación. El proceso de desfosforilación se siguió por cromatografía en capa fina y se detuvo cuando el rendimiento alcanzó el 100% (Fig.49RD).

Los nitrociclitoles obtenidos se purificaron por columna de sílica y fueron identificados por RMN según el trabajo desarrollado anteriormente por la Profesora Marielle Lemaire. En todos los casos, se obtuvieron rendimientos globales en torno al 70% al utilizar la combinación de estos dos sistemas multienzimáticos (Tabla 11RD). Cabe resaltar que las condiciones de purificación no fueron optimizadas, por lo que es de esperar que los rendimientos finales se vieran reducidos.

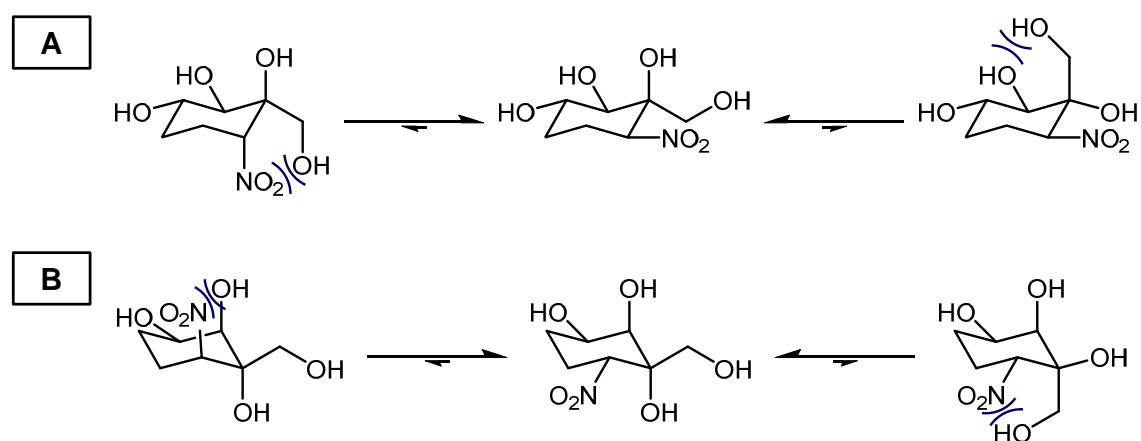
**Tabla 11RD.** Rendimiento total de la síntesis multienzimática de nitroderivados utilizando la Rha-1PA de *T. maritima* para la condensación aldólica

Nitroderivado	4e	4f	4g
Rendimiento (%)	70	71	67

En cuanto a la estereoquímica de los productos formados, se estudió a partir de los compuestos obtenidos, aislados y purificados para cada uno de los aldehídos utilizados.

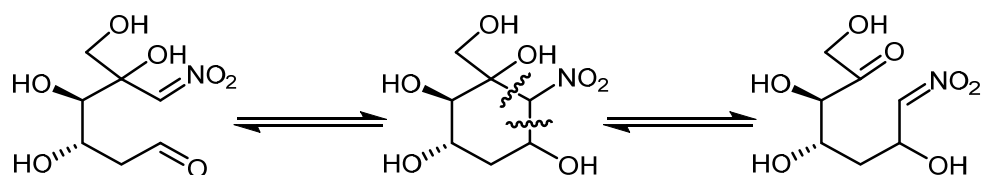
Durante la creación de los nitrociclitoles **4e** y **4f** se establecen 4 nuevos centros quirales a partir de precursores aquirales. En concreto, la quiralidad de los carbonos C2 y C3 se debe a la estereoselectividad de la aldolasa empleada y la de los carbonos C1 y C6 a la estereoselectividad de la reacción de Henry intramolecular. Esta última reacción ha probado ser extraordinariamente selectiva no solo a la hora de la obtención de aminociclitoles como ha descrito el grupo de la Dra. Lemaire (El Blidi *et al.*, 2004; El Blidi *et al.*, 2006; El Blidi *et al.*, 2009; Camps Bres *et al.*, 2013), sino también en la síntesis de numerosos compuestos asimétricos descritos en la literatura (Boruwa *et al.*, 2006).

Uno de los factores principales para definir la estereoquímica de los carbonos C1 y C6 en el momento de la ciclación es la naturaleza y configuración de los grupos presentes en el futuro anillo. Así, la estereoquímica adoptada será aquella que permita la adopción de la configuración más estable, es decir, aquella que permita que la mayoría de los grupos químicos se sitúen en posición ecuatorial respecto al anillo formado. Por ejemplo, cuando se utiliza el nitroaldehído **1e**, que no presenta grupos hidroxilos en C4 o en C5 se aprecia claramente que la estereoquímica de C1 y C6 es dependiente de la configuración establecida por la reacción aldólica (Fig. 51RD).



**Figura 51RD.** Equilibrios conformacionales de los posibles isómeros en C1 y C6 de (A) el aldol (**2R,3S**)4e y (B) (**2R,3R**)4e.

Además de los isómeros derivados de la quiralidad en C1 y C6, cuando fue utilizada una mezcla racémica del aldehído **1f** se debería haber formado el producto con las dos configuraciones del alcohol en posición C5 en una proporción 50:50. Sin embargo, se llevó a cabo únicamente la formación de los esteroisómeros más estables ((**1R,2R,3S,5R,6S**)**4f** y (**1S,2R,3R,5S,6R**)**4f**) (Fig. 49RD). Este fue posible gracias a la agitación de la mezcla de reacción en medio básico (pH=9,0) durante 3 h. Se ha sugerido que este proceso tiene lugar debido a una doble retroaldolización de los enlaces C1-C6 y C5-C6 que conllevaría posteriormente la formación del isómero más estable (Ballini *et al.*, 2007; Camps Bres *et al.*, 2013) (Fig. 52RD).



**Figura 52RD.** Doble retroaldolización sugerida para la formación de esteroisómero más estable en la obtención de nitrociclitoles.

En lo concerniente a la estereoquímica de los centros quirales formados durante la reacción aldólica, los análisis de RMN desvelaron que la estereoselectividad de la enzima no fue completa, obteniéndose mezclas de los diasteroisómeros *L-treo* y *D-eritro* con cada uno de los aldehídos ensayados (**1e**, **1f** y **1g**). En los tres casos el diasteroisómero mayoritario correspondió a aquel que exhibía la preferencia estereoquímica natural de la enzima (Tabla 12RD).

**Tabla 12RD.** Relación de diasteroisómeros obtenidos para la síntesis de **4e**, **4g** y **4f**, utilizando Rha-1PA de *T. maritima*, Rha-1PA y Fuc-1PA de *E. coli*.

Aldehído	<i>treo:eritro</i>		
	Rha-1PA Tm	Rha-1PA Ec	Fuc-1PA Ec
<b>1e</b>	95:5	95:5	—
<b>1f</b>	75:25	84:16	—
<b>1g</b>	70:30	—	50:50

Como se puede comprobar en los resultados mostrados en la Tabla 12RD, la relación *treo:eritro* obtenida para los nitrociclitoles **4e** y **4f** con la aldolasa de *T. maritima* es comparable a la conseguida con Rha-1PA de *E. coli* en el desarrollo de la Tesis Doctoral de la Dra. Flora Camps Bres (Camps Bres, 2010).

Por otra parte, el aldol **4g** ha sido obtenido por primera vez empleando una rhamnulosa-1-fosfato aldolasa en este trabajo, aunque sí había sido previamente sintetizado y caracterizado por Wong *et al.* (1995) utilizando la Fuc-1PA de *E. coli* debido a la falta de estereoselectividad mostrada por la aldolasa empleada.

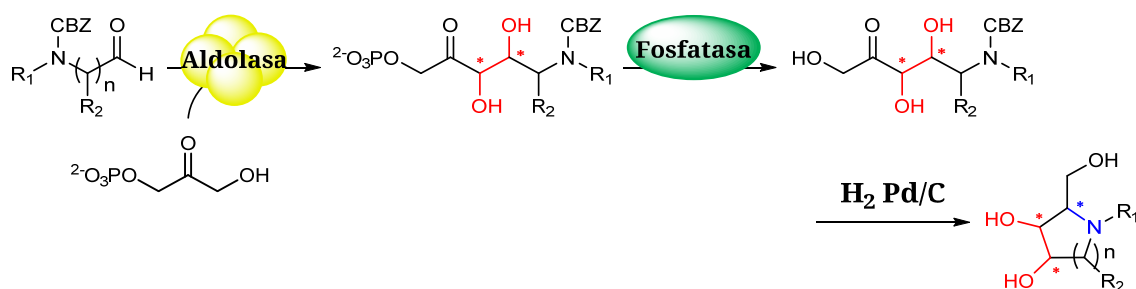
A la vista de estos resultados se puede concluir que, la Rha-1PA de *T. maritima* se puede aplicar en la síntesis de nitrociclitoles y de sus precursores dentro del contexto de un sistema multienzimático, el cual emplea 4 enzimas diferentes en una estrategia “one-pot” evitando la necesidad de purificar ninguno de los intermedios de reacción.

### ***Síntesis de iminociclitoles***

Como se ha explicado anteriormente, los iminociclitoles son compuestos naturales polihidroxilados miméticos de azúcares, en los cuales el átomo de oxígeno del anillo se ha sustituido por un átomo de nitrógeno, con un gran potencial terapéutico. Basándonos en la bibliografía, la presencia de sustituyentes hidrofóbicos, alifáticos o aromáticos cerca del átomo de nitrógeno produce una mejora en la selectividad de estos compuestos frente a las glicosidasas y glicosiltransferasas (Saotome *et al.*, 2001; Carmona *et al.*, 2003; Cheng *et al.*, 2013). Asimismo, la configuración de los centros estereogénicos es de la máxima importancia para la actividad de los iminociclitoles.

Es por este motivo que recientemente, el grupo del Profesor Pere Clapés ha desarrollado una estrategia quimioenzimática para la síntesis de iminociclitoles utilizando la estereocomplementariedad de las aldolasas dependientes de DHAP para conseguir una gran diversidad configuracional. Esta síntesis comienza con la condensación aldólica entre la cetona

donadora, DHAP, y un (*R*)- o (*S*)- *N*-Cbz-aminoaldehído. A continuación, se realiza la hidrólisis del grupo fosfato gracias a la fosfatasa ácida de patata, seguida de la eliminación del grupo Cbz y de la reducción por H<sub>2</sub> en presencia de Pd/C. Este proceso permite la obtención de derivados de piperidina, pirrolidina y pirrolizidina enantioméricamente puros con tres nuevos estereocentros por cada aldehído probado. La configuración en C3 y C4 (C1 y C2 en el caso de los derivados pirrolidínicos) son controladas por la estereoselectividad de la aldolasa DHAP dependiente, el nuevo centro quiral formado en C2 (C3 en los análogos de pirrolizidina) durante la hidrogenación depende, en la mayoría de los casos, de la estereoquímica presente en C4 (C1 en el caso de los derivados pirrolidínicos) y, por último, la quiralidad de C5 (C7a en los análogos de pirrolizidina) viene fijada por el aminoaldehído de partida (Espelt *et al.*, 2003; Espelt *et al.*, 2005; Calveras *et al.*, 2005; Castillo *et al.*, 2006; Concia *et al.*, 2009; Garrabou *et al.*, 2011) (Fig. 53RD).



**Figura 53RD.** Esquema de reacción de la síntesis quimioenzimática en “one-pot” para la obtención de imiciclitoles desarrollada por el grupo del Profesor Pere Clapés.

Análogamente a lo expuesto para la síntesis de nitrociclitoles, se estudió la capacidad de la Rha-1PA de *T. maritima* para aceptar *N*-Cbz-aminoaldehídos (Tabla 5MM) en el contexto de este sistema quimioenzimático.

### Reacciones con *N*-Cbz-aminoaldehídos

Inicialmente, se estudió la capacidad de la Rha-1PA de *T. maritima* para aceptar *N*-Cbz-aminoaldehídos como sustratos aceptores llevando a cabo las reacciones de condensación aldólica a escala analítica (Tabla 5MM). Para ello previamente fue necesaria la síntesis de la DHAP catalizada por la DHAK de

*C. freundii* y la obtención de los aminoaldehídos por oxidación controlada de los correspondientes aminoalcoholes usando IBX.

Una vez se obtuvieron los sustratos, las reacciones se incubaron a 45 °C utilizando DMF como cosolvente (30% del volumen final de reacción) para disolver los *N*-Cbz-aminoaldehídos (Garrabou *et al.*, 2011) y un exceso de DHAP (1:1,7 aminoaldehído:DHAP). Las condiciones elegidas fueron estas ya que, como se ha comprobado anteriormente, tanto la temperatura como el exceso de DHAP favorecen la actividad de la aldolasa, mientras que la presencia de DMF a esa concentración no la afecta.

La monitorización de la adición aldólica por HPLC mostró que todos los *N*-Cbz-aminoaldehídos probados (**1h-1n**) fueron aceptados como sustratos por la Rha-1PA de *T. maritima*. Los resultados se resumen en la Tabla 13RD, en donde se evidencia la posibilidad de servirse de *N*-Cbz-aminoaldehídos con sustituyentes en C $\alpha$  lineares y ramificados para la formación de aldoles fosforilados. Si bien esta habilidad de aceptar una gran variedad de sustituyentes en el C $\alpha$  es compartida con Rha-1PA de *E. coli*, los estudios realizados con las otras aldolasas dependientes de DHAP demuestran que no todas las aldolasas exhiben esta misma tolerancia en lo tocante a la variedad estructural de la cadena lateral de los *N*-Cbz-aminoaldehídos. En concreto, la Fuc-1PA de *E. coli* no admite aquellos aminoaldehídos con sustituyentes ramificados en C $\alpha$  (pero sí los lineares y aromáticos) y RAMA consigue rendimientos muy bajos con los aldehídos **1i** y **1j** no siendo capaz de catalizar la adición aldólica entre la DHAP y ningún otro de los *N*-Cbz-aminoaldehídos (Calveras *et al.*, 2009).

**Tabla 13RD.** Máximo de conversión y tiempo óptimo de reacción utilizando la Rha-1PA de *T. maritima* con los diferentes *N*-Cbz-aminoaldehídos.

Aldehído	Aldol 2h-2n (%)	Tiempo de reacción (min)
<b>1h</b>	51,0	15
<b>1i</b>	60,9	20
<b>1j</b>	74,3	30
<b>1k</b>	48,5	10
<b>1l</b>	38,9	60
<b>1m</b>	37,5	30
<b>1n</b>	36,8	10

Por otro lado, la Rha-1PA de *T. maritima* no discriminó en función de la estereoquímica del aldehído, obteniendo rendimientos similares con los enantiómeros (*S*) y (*R*). Este comportamiento es compartido por la Rha-1PA y por la Fuc-1PA de *E. coli*, pero no así por la RAMA, que muestra preferencia por el isómero (*R*) frente al (*S*) al utilizar los aldehídos **1i** y **1j** (Espelt *et al.*, 2003; Calveras *et al.*, 2009).

Los rendimientos máximos de reacción variaron dependiendo del aldehído usado desde un 74% (aldehído **1j**) hasta un 37% (aldehído **1n**). De igual forma que en las reacciones con la Rha-1PA de *E. coli*, cuanto más pequeño fue el sustituyente presente en  $C\alpha$ , mayores fueron las conversiones obtenidas.

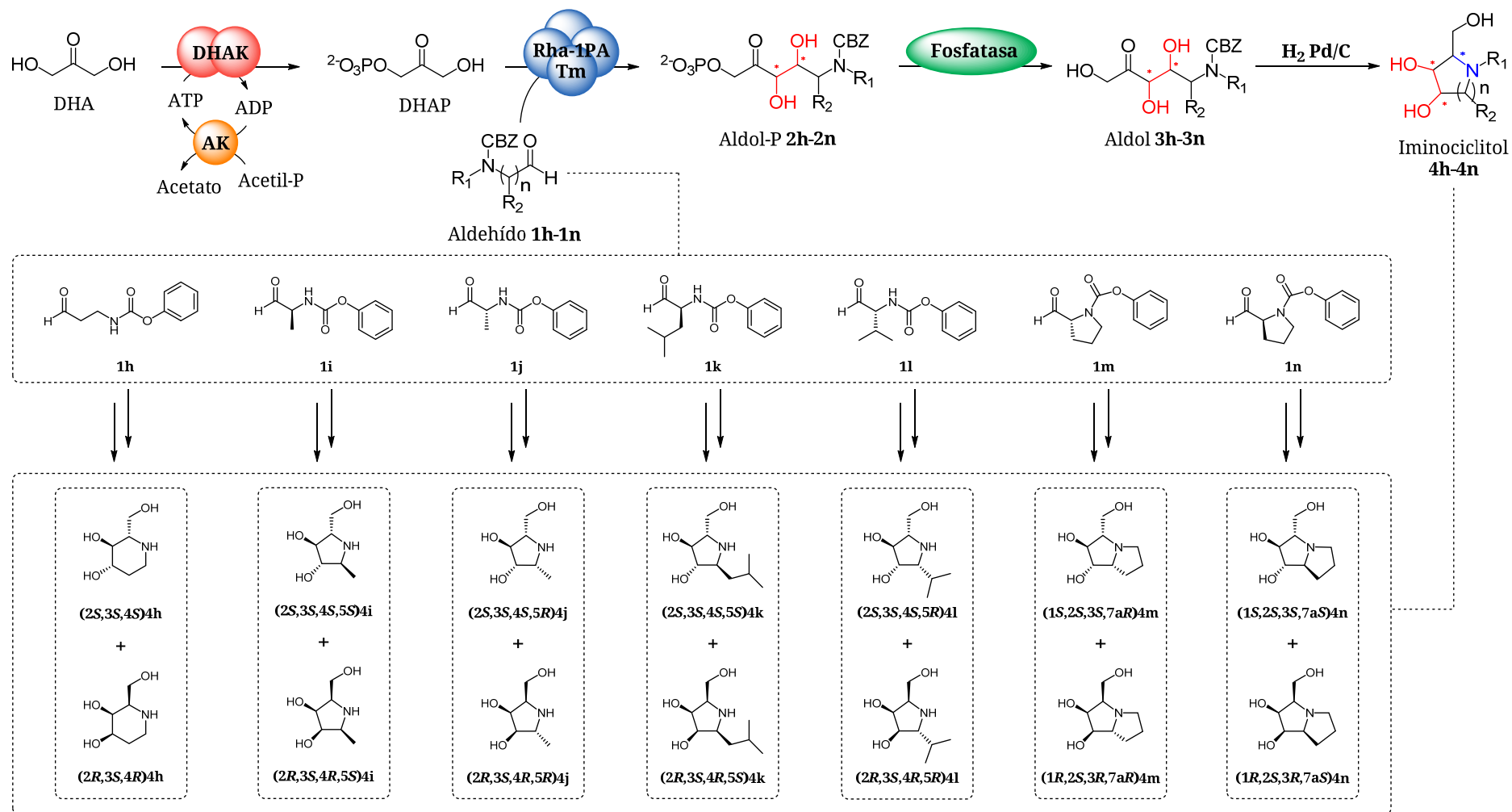
El tiempo óptimo de reacción para obtener el máximo rendimiento se situó entre los 10 y los 60 min, dependiendo del aldehído. A partir del momento en que se alcanzó la acumulación máxima de aldol descrita, las reacciones evolucionaron hacia una disminución progresiva del producto debido al desplazamiento del equilibrio de reacción hacia la reacción retroaldólica. A esto contribuye no solo la consabida inestabilidad de la DHAP, sino también el equilibrio en el que se encuentra el aminoaldehído con su forma hidratada y con otras formas poliméricas que pueden variar

con el progreso de la reacción (Lees y Whitesides, 1993). Consecuentemente, tanto la cantidad de enzima añadida como el tiempo de reacción han de ser estrictamente controlados con el fin de evitar el desplazamiento de la actividad enzimática hacia la reacción retroaldólica, alcanzando el mayor nivel de conversión posible.

### **Escalado de las reacciones para la obtención de iminociclitoles**

Con el propósito de llevar a cabo la formación de los correspondientes iminociclitoles utilizando la ruta sintética representada en la Figura 54RD, las reacciones aldólicas se realizaron a escala milimolar (2 mmol DHAP; 1,2 mmol aldehído). De la misma manera que ha sido explicado anteriormente, el sistema multienzimático empleado se dividió en varios pasos, comenzando con la síntesis de la DHAP, (ver Materiales y Métodos).

Un factor determinante para alcanzar el máximo rendimiento en la síntesis del aldol correspondiente es evitar la reversión del equilibrio hacia la reacción retroaldólica. Por lo tanto, para obtener rendimientos similares a los conseguidos en las reacciones con los *N*-Cbz- aminoaldehídos a pequeña escala, se modificaron dos aspectos: por un lado las U de enzima añadidas a la reacción fueron proporcionalmente inferiores a las que se adicionaron en las reacciones a menor escala, favoreciendo de esta manera que los tiempos de reacción fueran más largos y por lo tanto las reacciones fueran más fáciles de monitorizar. En segundo lugar, la formación de los aldoles se siguió espectrofotométricamente, además de mediante el HPLC, con la intención de parar la reacción inmediatamente una vez hubiera llegado a su rendimiento máximo. Así, los tiempos óptimos de reacción se vieron incrementados entre los 60 y los 150 min, mientras que porcentajes de aldol obtenidos fueron equiparables a los alcanzados preliminarmente (Tabla 14RD).



**Figura 54RD.** Síntesis de iminociclitos utilizando cuatro enzimas en una reacción “one pot”. El primer paso de esta cascada enzimática es la fosforilación de la DHA por la DHAK de *C. freundii*, seguida de la condensación aldólica catalizada por la aldolasa de *T. maritima* y la subsecuente hidrólisis del grupo fosfato empleando la fosfatasa ácida de patata. El último paso es la aminación reductora con  $\text{H}_2$  Pd/C.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Tabla 14RD.** Resultados del rendimiento y relación estereoquímica en las reacciones de síntesis de iminociclitoles al usar la Rha-1PA de *T. maritima*.

<i>N</i> -Cbz-aminoaldehído	Aldol 2h-2n (%)	Tiempo de reacción <sup>[a]</sup> (min)	Iminociclitol 4h-4n (%)	<i>treo:eritro</i> (%)
<b>1h</b>	60,7	105	31,6	>98: 2
<b>1i</b>	63,3	90	19,3	>97:3
<b>1j</b>	72,8	75	47,2	67:33
<b>1k</b>	51,0	150	11,8	>97:3
<b>1l</b>	41,3	150	18,0	42:58
<b>1m</b>	22,6	90	12,4	65:35
<b>1n</b>	24,9	60	9,4	>98:2

[a] Tiempo hasta alcanzar el máximo rendimiento en la reacción de adición aldólica.

Una vez las reacciones de condensación aldólica llegaron a su máximo rendimiento se pararon añadiendo dos volúmenes de MeOH y la enzima precipitada se descartó mediante centrifugación. Antes de añadir la fosfatasa ácida de patata se eliminó el aldehído que no hubo reaccionado y se acidificó el medio hasta un pH de 4,7. No fue hasta que el compuesto fue desfosforilado al 100%, que se procedió a su purificación mediante HPLC de fase reversa, prestando especial interés a evitar la eliminación de cualquier posible estereoisómero que pudiera haber sido formado durante la catálisis enzimática. Después se hidrogenó el aminopoliol con la intención de desproteger el grupo amino, desencadenando la ciclación de la molécula y generando el correspondiente iminociclitol. Los rendimientos globales de esta cascada quimioenzimática oscilaron entre el 9,4 y el 47,2% (Tabla 14RD). Cabe resaltar que las condiciones de purificación no fueron optimizadas.

Como se ha mencionado antes, los iminociclitoles generados mediante este proceso portan 4 centros quirales: los tres nuevos que se originan durante su síntesis, los dos de la condensación aldólica en C3 y C4 (C1 y C2 en el caso de los productos pirrolidínicos derivados de los aldehídos **1m** y **1n**) y el que se

forma en la aminación reductora en C2 (C3 en **4m** y **4n**), y el preexistente en el aldehído escogido (C5 en **4h**, **4i**, **4j**, **4k** y **4l** y C7a en **4m** y **4n**). La separación de los posibles isómeros se llevó a cabo sirviéndonos de la cromatografía de intercambio iónico y su identificación y cuantificación se consiguió por RMN. Así, los análisis por RMN dieron señales coincidentes con los productos sintetizados por el grupo de trabajo del Profesor Pere Clapés (Espelt *et al.*, 2003; Calveras *et al.*, 2005; Calveras *et al.*, 2009). Además de para su identificación, la caracterización por resonancia magnética nuclear permitió el estudio de la capacidad de la Rha-1PA de *T. maritima* de fijar los diferentes *N*-Cbz-aminoaldehídos en la posición correcta en el centro catalítico durante el ataque del sustrato donador. Los datos expuestos en la Tabla 14RD, muestran que, en concordancia con los resultados previamente obtenidos, la estereoselectividad de la enzima durante la condensación aldólica fue incompleta, obteniéndose mezclas de los diastereoisómeros *L*-*treo* y *D*-*eritro* con todos los aldehídos ensayados (Fig. 54RD).

No obstante, a pesar de la obtención de dichas combinaciones, la estereoselectividad conseguida por la enzima fue muy buena en el caso de los iminociclitoles **4h**, **4i**, **4k** y **4n**, reacciones en las que se consiguió un porcentaje superior al 97% del diastereoisómero de preferencia natural. Esta relación disminuyó hasta el 65-70% en caso de los productos **4j** y **4m**. Sorprendentemente, en contra de lo ocurrido hasta el momento, al utilizar el (*R*)-*N*-Cbz-valinal (aldehído **1l**) el diastereoisomero mayoritario fue el *D*-*eritro* frente al *L*-*treo* natural (Tabla 14RD).

A la vista de estos resultados, es interesante resaltar que la estereoselectividad de la que hace gala la Rha-1PA de *T. maritima* depende no solo de la estructura, sino también de la estereoquímica del C $\alpha$  del aldehído. Así, en tanto que la estereoselectividad frente a los (*S*)-Cbz-aminoaldehídos (**1i**, **1k** y **1n**) es prácticamente del 100%, cuando se recurre a los aldehídos con configuración (*R*) la cantidad de isómero *D*-*eritro* obtenido aumenta. De igual manera, en los estudios de estereoselectividad realizados con la Rha-1PA y la Fuc-1PA de *E. coli* se ha visto un comportamiento similar (Espelt *et al.*, 2005; Calveras *et al.*, 2009). Contrariamente, mientras que la longitud y lo ramificado de la cadena lateral no influyó en la relación de diastereoisómeros

obtenidos por la Rha-1PA de *T. maritima*, sí que lo hace en el caso de las aldolasas de *E. coli*.

Es de esperar que, dada la elevada identidad de secuencia y homología estructural, la falta de selectividad de la Rha-1PA de *T. maritima* venga determinada por razones similares a las elucidadas para la Rha-1PA de *E. coli*. Así, según los estudios de Kroemer *et al.*, (2003), el L-lactaldehído se fija al centro catalítico de la Rha-1PA de *E. coli* a través de dos puentes de hidrógeno, orientando el grupo metilo hacia el entorno hidrofóbico. Por lo tanto, el sustrato queda anclado al sitio activo de la enzima, favoreciendo el ataque nucleofílico en una única cara enantiotópica. Sin embargo, las restricciones impuestas por la estructura de los diferentes aminoaldehídos, así como la falta del grupo hidroxilo director, pueden favorecer una incorrecta orientación del aldehído en el bolsillo catalítico. Simulaciones de *docking* utilizando esta aldolasa de *E. coli* y el 3-aminopropionaldehído *N*-protegido sugieren que el grupo protector no tiene cabida en el centro catalítico y, por lo tanto, impide su correcta colocación (Von der Osten *et al.*, 1989; Espelt *et al.*, 2005; Calveras *et al.*, 2007).

Comparando la estereoselectividad de la aldolasa de *T. maritima* con la de *E. coli* podemos discernir tres grupos de aldehídos: (i) aquellos en el que el comportamiento es igual para las dos enzimas (aldehídos **1i**, **1j**, **1k** y **1m**), (ii) aquellos con los cuales se ve una mayor estereoselectividad al usar la proteína de *T. maritima*, como es el caso de la utilización del *N*-Cbz-propanal (**1h**) y del (*S*)-*N*-Cbz-prolinal (**1n**) con un ratio *treo:eritro* de 98:2 frente al 80:20 (aldehído **1h**) y 66:34 (aldehído **1n**) exhibido por Rha-1PA Ec. Por último, (iii) el tercer grupo lo conforma el (*R*)-*N*-Cbz-valinal (aldehído **1l**). Este caso es especial ya que, en la reacción catalizada por la enzima de *E. coli* es más estereoselectiva obteniéndose únicamente la forma *D-eritro* mientras que, como se ha puntualizado antes, en el caso de la proteína de *T. maritima* la relación *treo:eritro* es 42:58. Sin embargo, a pesar de la selectividad mostrada por la Rha-1PA Ec, el diastereoisómero alcanzado (*R,R*) no es el natural y, por lo tanto, la obtención del isómero (*R,S*) del iminociclitol **4l**, aunque de una manera minoritaria, solo puede ser conseguida hasta el momento usando la enzima de *T. maritima*.

Finalmente, con respecto a la quiralidad en C2 (C3 en el caso de los productos pirrolidínicos derivados de los aldehídos **1m** y **1n**) el estudio de la estereoquímica de los productos reveló que, como ha sido ya descrito, la aminación reductora fue altamente diastereoselectiva. De hecho, la hidrogenación tuvo lugar en todas las ocasiones por la cara opuesta al hidroxilo presente en C4 (C1 en el caso de los productos pirrolidínicos derivados de los aldehídos **1m** y **1n**), sin tener en cuenta la estereoquímica de ninguno de los otros sustituyentes (Von der Osten *et al.*, 1989; Liu *et al.*, 1991; Kajimoto *et al.*, 1991; Takayama *et al.*, 1997).

Teniendo en cuenta el conjunto de los resultados obtenidos en la aplicación de la Rha-1PA de *T. maritima* en los diversos sistemas multienzimáticos para la obtención de una gran variedad de compuestos, incluyendo aldoles, nitrociclitoles e iminociclitoles, podemos afirmar que es un biocatalizador muy útil para la formación de enlaces C-C, ya que ha demostrado ser una enzima muy versátil y robusta que puede ser usada bajo diferentes condiciones de reacción utilizando una amplia batería de aldehídos con gran diversidad estructural.



# **CONCLUSIONES**



Las conclusiones obtenidas en la presente Tesis Doctoral se pueden agrupar entorno a los dos grandes aspectos tratados: caracterización bioquímica y aplicación sintética de la rhamnulosa-1-fosfato aldolasa de *T. maritima*.

La caracterización funcional a la que hemos sometido a esta enzima nos ha permitido concluir que:

- La rhamnulosa-1-fosfato aldolasa de *T. maritima* es una aldolasa dependiente de DHAP de clase II, que utiliza  $\text{Co}^{2+}$  como cofactor.
- El estudio de actividad de la Rha-1PA de *T. maritima* demuestra que es una enzima hipertermófila ya que puede llevar a cabo la síntesis aldólica a temperaturas superiores a 80 °C, siendo la máxima actividad medida a 95 °C. Además, los resultados obtenidos muestran que, al contrario que muchas enzimas pertenecientes a microorganismos hipertermófilos, la Rha-1PA de *T. maritima* mantiene la actividad a temperatura ambiente.
- Se ha puesto de manifiesto el amplio rango de condiciones bajo las cuales esta enzima puede ser utilizada, incluyendo no sólo un amplio intervalo de temperaturas (desde los 20 °C hasta los 95 °C) y sino también de pH (al menos el 50% de su actividad máxima entre pH 5,7 y pH 9) y tolerando la presencia de diversos cosolventes en el medio de reacción (actividad del 90% en  $\text{H}_2\text{O}/\text{AcN}$  60:40, del 100% en  $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$

## CONCLUSIONES

---

80:20, del 50% en H<sub>2</sub>O/DMF 75:25 y del 40% en 90:10 de H<sub>2</sub>O/isopropanol y H<sub>2</sub>O/THF).

- Se ha determinado la gran estabilidad de la aldolasa frente a altas temperaturas, exhibiendo una temperatura de desnaturalización de 102 °C y un tiempo de vida media a 80, 95 y 115 °C de 44, 33 y 3,5 h, respectivamente.
- El efecto del cofactor y de la cola de histidinas influye tanto en la estructura secundaria de la proteína a diferentes temperaturas, como en la estabilidad térmica de la misma. Esta influencia se puede resumir en:
  - La presencia de la cola de histidinas se traduce en un aumento de la transición  $\alpha$ -hélice/ $\beta$ -lamina a temperaturas superiores a 80 °C, lo que facilita la desnaturalización proteica.
  - El Co<sup>2+</sup> está involucrado en la retención de la configuración nativa de la proteína. Así, en la enzima sin cola de histidinas la ausencia del cofactor se traduce en una pérdida de entre el 10 y el 12% de estructura  $\alpha$ -hélice con respecto a la misma proteína en presencia del catión divalente, lo que conlleva la desnaturalización proteica a 110 °C. Por otro lado, en la proteína con cola de histidinas a 20 °C la ausencia del cofactor produce un aumento del 10% en el contenido en  $\alpha$ -hélice con respecto a la misma proteína en presencia del catión divalente. Este dato corrobora no sólo el papel estructural que juega el Co<sup>2+</sup>, sino también que la presencia de cola de histidinas puede influir en la estructura secundaria.
  - En cuanto a la influencia de estos dos elementos en la T<sub>M</sub>, sólo pueden apreciarse variaciones en este parámetro en la construcción enzimática con cola de histidinas. Así, a concentraciones crecientes de Co<sup>2+</sup> la T<sub>M</sub> de la proteína sin cola de histidinas permanece constante en torno a los 100 °C, mientras que en el caso de la aldolasa con cola de histidinas si

se observa dependencia de la concentración de metal divalente, dándose una disminución de 15 °C en la  $T_M$  a concentraciones tres veces superiores a la concentración óptima para la máxima actividad catalítica ( $[Co^{2+}] = 750 \mu M$ ).

En segundo lugar, los estudios de aplicabilidad sintética realizados sobre la Rha-1PA de *T. maritima* nos han permitido concluir que:

- La Rha-1PA de *T. maritima* es un biocatalizador compatible con sistemas multienzimáticos quinasa/aldolasa o quinasa/aldolasa /fosfatasa en el que el resto de enzimas tiene un origen mesófilo.
- Asimismo, esta enzima se ha mostrado útil en la síntesis de diferentes compuestos orgánicos como aldoles, nitrociclitoles e iminociclitoles, obteniendo en todos los casos rendimientos comparables o superiores a los de la Rha-1Pa de *E. coli*.
- La DHA no es aceptada como sustrato donador en lugar de su sustrato natural, la DHAP, no detectándose actividad catalítica de la Rha-1PA de *T. maritima* al llevar a cabo estas reacciones en tampón borato.
- La estereoselectividad de la Rha-1PA  $T_m$  es similar a la mostrada por el enzima de *E. coli*. En ambos casos el control de la estereoselectividad no es completo, dando lugar a mezclas de los diastereoisómeros *L-treo*:*D-eritro*.
- Al estudiar la estereoquímica de los productos formados, en todas las reacciones de síntesis, salvo al utilizar como sustrato aceptor el aldehído **11**, el isómero mayoritario fue el de la estereopreferencia natural de la enzima, *L-treo* (*R,S*), y el minoritario el *D-eritro* (*R,R*).
- En el caso del iminociclitol **41** el isómero mayoritario fue el *D-eritro* (*R,R*), obteniéndose una mezcla diastereoisomérica *treo:eritro* 42:58. Dado que la Rha-1PA *Ec* cataliza únicamente la formación del isómero *D-eritro*, la obtención del isómero *L-treo* (*R,S*), aunque de una manera minoritaria, solo puede ser conseguida hasta el momento usando la enzima de *T. maritima*.

## CONCLUSIONES

---

- Hemos demostrado que el diastereoisómero *L-treo* (*R,S*) es el isómero bajo control cinético, mientras que el *D-eritro* (*R,R*) es el isómero bajo control termodinámico, no observándose ningún efecto de la temperatura.

**SUMMARY FOR THE  
EUROPEAN MENTION**



**RHAMNULOSE-1-PHOSPHATE ALDOLASE FROM *THERMOTOGA MARITIMA*: CHARACTERIZATION AND APPLICABILITY OF A NEW THERMOSTABLE BIOCATALYST FOR C-C BOND FORMATION**

## **INTRODUCTION**

Carbon-Carbon bond formation reactions can be considered the essence of organic synthesis (Corey and Cheng, 1989). The aldol addition reaction has long been recognized as one of the most useful tools that has the synthetic chemist for the construction of new C–C bonds (Palomo *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2005) since, concomitant with the bond forming process, is the formation of one or two new stereocenters, allowing to approach a broad range of both, natural and novel compounds. Nature builds up carbohydrate, amino acids, hydroxy acids and other molecules by the use of aldol reactions catalysed by aldolase enzymes. This class of enzymes, which are part of the lyases family, catalyse reversibly and stereoselectively an aldol addition reaction between a donor compound (nucleophile) and an acceptor compound (electrophile), with a high degree of stereochemical control. Usually, these enzymes show high specificity towards the donor substrate but tolerate a broad range of acceptor substrates; therefore, aldolases have been extensively used in chemo-enzymatic syntheses to produce carbohydrate, carbohydrate-like structures, or non-carbohydrate compounds (Clapés *et al.*, 2010; Fessner and Jennewein, 2007; Dean *et al.*, 2007). Aldolases can be classified in two different ways: (i) according to the different enzyme mechanisms they display to activate the nucleophilic component and (ii) according to their donor specificity. The mechanistically differentiation discern between class I aldolases, which perform a Schiff base between the donor compound and a

lysine residue in their active site, generating an enamine nucleophile. Thus, this class of aldolases can be irreversibly inhibited by reduction agents like  $\text{NaBH}_4$  that reduces the enamine to an amine. And class II aldolases, which need a divalent metal ion as cofactor for the enolization of the donor substrate via Lewis acid complexation, usually  $\text{Zn}^{2+}$ . The nucleophilic enamine or enolate then attacks the carbonyl carbon of the acceptor substrate forming the new C–C bond. Due to the need of a divalent metal ion as cofactor class II aldolases can be reversibly inhibited by chelation agents as EDTA. Classification according to their donor specificity includes pyruvate/oxaloacetate/2-oxobutyrate-dependent, dihydroxyacetone phosphate (DHAP)-dependent, dihydroxyacetone and other unphosphorylated analogues-dependent, threonine-dependent and acetaldehyde-dependent aldolases. Dihydroxyacetone phosphate (DHAP)-dependent aldolases constitute the main group utilized in organic synthesis and numerous examples for the application of DHAP-dependent aldolases have been reported (Samland and Sprenger, 2006; Dean *et al.*, 2007; Iturrate and García-Junceda, 2008; Clapés *et al.*, 2010; Clapés and Fessner, 2011; Brovetto *et al.*, 2011; Müller, 2012; Oroz-Guinea *et al.*, 2012; Clapés *et al.*, 2013; Fesko *et al.*, 2013). Their major synthetic advantage is that the stereochemistry of the two newly formed stereogenic centers is controlled by the enzymes and, moreover, they are stereocomplementary: they can synthesize the four possible diastereoisomers of vicinal diols from an achiral aldehyde acceptors and DHAP. Despite this well proven synthetic utility of aldolases, still there are few processes that have been developed at industrial scale and none of them—in the best of our knowledge—used DHAP-dependent aldolases. Therefore, the search for new enzymes with improved properties from the biocatalysis point of view it is still necessary.

Enzymes as catalysts offer many advantages such as high efficiency, chemo-, regio- and stereoselectivity, avoids the need for functional group activation and protection/deprotection steps and are environmentally friendly since they are biodegradable, use mostly water as solvent system and works under mild reaction conditions (Anastas and Eghbali, 2010). Despite these advantages, the enzymes present some limitations being perhaps the most important—especially from the point of view of industrial

application— their intrinsic instability since they have evolved to work in aqueous media and in a narrow range of pH and temperature. An approximation to overcome the instability of enzymes under adverse reaction conditions is the use of enzymes from extremophile microorganisms (Unsworth *et al.*, 2007; Champdoré *et al.*, 2007; Canganella *et al.*, 2011). These organisms have adapted to live in extreme environments offering useful enzymes that should enable us to expand the range of reaction conditions suitable for biocatalysis.

In particular, thermophiles (optimal growth temperature between 50 and 80 °C) and hyperthermophiles (optimal growth temperature between 80 and 110 °C) have attracted the attention from a biocatalytical point of view since these microorganisms are source of thermostable enzymes (thermozymes) that have developed molecular mechanisms of adaptation to extreme physicochemical conditions and represent unique biocatalysts that function under harsh reaction conditions, in which their mesophilic enzymes counterparts are often not well suited. In particular, they have attracted the attention for their outstanding stability against high temperature and, furthermore, has also been reported that these enzymes show enhanced tolerance against other denaturalization conditions such as presence of organic solvents, detergents or extreme pHs (Vieille and Zeikus, 2001; Atomi, 2005; Bertoldo and Antranikian, 2008; Atomi *et al.*, 2011). Moreover, carrying out the reactions at high temperatures involves other advantages like allowing use higher concentrations of substrates, to decrease the viscosity of the reaction medium, to prevent against possible microbial contamination and frequently leads to higher reaction rates.

The hyperthermophilic microorganism *Thermotoga maritima* is a bacterium with an optimum growth temperature of 80 °C and a maximum growth temperature of 90 °C (Connors *et al.*, 2006), originally isolated from a geothermal feature from Vulcano Island, Italy (Huber *et al.*, 1986). In fact, *T. maritima* is believed to be one of the oldest and most slowly evolving lineages in the eubacteria (Achenbach-Richter *et al.*, 1987).

In this Thesis, we describe the heterologous expression of the rhamnulose-1-phosphate aldolase from *Thermotoga maritima*, the biochemical

characterization of the recombinant enzyme and the study of its applicability as biocatalyst.

### OBJECTIVES

The main goal of this PhD Thesis was the integral study of rhamnulose-1-phosphate aldolase from *Thermotoga maritima* as a new biocatalyst for C-C bond formation. This study includes:

- Cloning, over-expression and purification of two different constructions of the Rha-1PA from *T. maritima*, with or without His-tag.
- Biochemical characterization of the two recombinant enzyme versions:
  - Catalytic mechanism determination.
  - Basic kinetic parameters obtaining.
  - Study of the structure.
  - Optimum reaction conditions determination.
  - Enzyme stability study.
  - His-tag and cofactor effect analysis on the secondary structure and the thermostability.
- Study of the synthetic applicability
  - Applicability in the context of a multi-enzyme synthesis.
  - Chemo-enzymatic synthesis of nitrogenated sugar analogues.

## RESULTS AND DISCUSSION

### **Heterologous expression and purification of rhamnulose-1-phosphate aldolase from *Thermotoga maritima***

In a databank search for predicted aldolase enzymes we found that the TM1072 gene from *Thermotoga maritima* codifies for a putative rhamnulose-1-phosphate aldolase (Rha-1PA Tm). To investigate this enzyme further, the TM1072 gene was cloned, with and without His-tag, and expressed in *Escherichia coli*. The gene was amplified by PCR from the genomic DNA of *T. maritima* strain BMS8. The resulting amplified DNA fragments had the expected size (~711 bp) and were digested and cloned in the expression vector pET-28b(+), obtaining the plasmids pET-28b(+)-*r1patm* and pET-28b(+)-*r1patmsht* (Fig. 1RD, Pag. 100). *E. coli* BL21 (DE3) cells were transformed with both plasmids and the expression of recombinant proteins were induced with 0.4 mM of isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG) at OD<sub>600nm</sub> 0.5-0.6.

Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) analysis of Rha-1PA from *T. maritima* expression, with and without His-tag (Rha-1PA Tm and Rha-1PA Tm SHT respectively), showed a band of the expected molecular mass (29 kDa) for each protein. These bands represented more than the 50% of the total protein of the cell (Fig. 3RD, Pag. 102).

After growing and disrupting the *E. coli* cells, the recombinant enzymes were easily purified by a heat treatment. The time and temperature of the treatment were optimized in order to get a purification degree higher than 90% (Fig. 4RD, Pag. 103). In those cases in which a higher degree of purity was required, the enzyme was purified combining heat treatment at 60 °C during 20 min followed by a step of IMAC chromatography when the His-tagged protein was used (Fig. 5RD, Pag. 104), and followed by size-exclusion chromatography when the Rha-1PA Tm SHT protein was purified (Fig. 6RD, Pag. 105). Thus, purification degrees over 98% for both enzymes were obtained.

## **Biochemical characterization of rhamnulose-1-phosphate aldolase from *Thermotoga maritima***

### **Catalytic mechanism**

Rha-1PA from *T. maritima* has been described as a putative class II aldolase by nucleotide sequence homology. In order to confirm this assignation, we try to inhibit the recombinant aldolase by incubating it in EDTA 0.1 M for 1 h at 4 °C and then the mixture was dialyzed to eliminate the quelation complex and, subsequently, to remove any divalent cation present. Activity of the resulting enzyme was measured with increasing concentrations of Zn<sup>2+</sup> at R/T. Rha-1PA from *E. coli*, which is well known that belongs to class II aldolases, treated in the same way was used as reference. Meanwhile specific activity of the Rha-1PA from *E. coli* was clearly dependent on Zn<sup>2+</sup> concentration, the activity of the Rha-1PA from *T. maritima* remained unalterable in the absence or presence of different concentrations of Zn<sup>2+</sup>. This behavior could be explained because the active site from the enzyme retained, even after treatment with EDTA, the divalent cation responsible of the residual activity.

To completely remove the metal from the enzyme active site and thus inactivated the aldolase, before to extensive dialysis was necessary to carried out the incubation with EDTA at 80 °C. High temperature was needed to reduce the rigidity and compactness of the enzyme and thus allowed the divalent cation to go out. The enzyme treated in this manner showed no activity in absence of divalent cation and was not possible to recover the activity by increasing the concentration of Zn<sup>2+</sup> in the medium (Fig. 11RD, Pag. 113). Consequently, metal ion-dependent activation of the Rha-1PA from *T. maritima* was assayed with several divalent cations (Co<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup>). As can be observed in Figure 12RD (Pag. 115), Co<sup>2+</sup> was found to be the most potent activator, reaching a maximum activity at a concentration of Co<sup>2+</sup> of 187.5 μM. Besides Co<sup>2+</sup>, only Ni<sup>2+</sup> showed a slight activation capacity at high concentrations, above 400 μM. Based on these data, Rha-1PA from *T. maritima* was confirmed as a class II aldolase requiring Co<sup>2+</sup> instead of Zn<sup>2+</sup> as cofactor for its maximum activity. In the literature this preference has

been reported also for other meso- or thermophile DHAP-dependent aldolases (Freeze and Brock, 1970; Barnes *et al.*, 1971; de Montiny y Sygusch, 1996; Sauvé and Sygusch, 2001; Izard and Sygusch, 2004; La *et al.*, 2009 Labbé *et al.*, 2011).

### **Basic kinetic parameters for rhamnulose-1-phosphate aldolase from *T. maritima***

Kinetic parameters for Rha-1PA from *T. maritima* were calculated for rhamnulose-1-phosphate cleavage reaction. The kinetic behaviour of two different preparations of the recombinant enzyme was analysed. In the first preparation (Rha-1PA Tm1), recombinant enzyme was purified by heat shock followed by IMAC chromatography. In the second case (Rha-1PA Tm2), after purification the enzyme was incubated with EDTA at 80 °C as described before to remove the divalent cation. In both cases Rha-1PA Tm showed Michaelis-Menten behavior (Fig. 13RD, Pag. 118). The calculated kinetic parameters are summarized in Table 2RD (Pag. 118). The different treatment of the enzyme did not substantially modify the  $K_M$  of the aldolase but  $k_{cat}$  was 7-fold higher in Rha-1PA Tm2 pointing out the importance of all the active sites were occupied by  $Co^{2+}$ .

The kinetic parameters previously reported in the literature for the Rha-1PA from *E. coli* differ significantly from the values obtained for the *Thermotoga* enzyme (Chiu *et al.*, 1975). Especially significant is the  $k_{cat}$  value, which is more than an order of magnitude higher in the *E. coli* enzyme. However, it should be taken into consideration that kinetic parameters for Rha-1PA Tm were calculated at 25 °C where the specific activity of the enzyme is more than 20-fold lower than at 95 °C. If we have in mind the  $Q_{10}$  values —average fold-increase in reaction rate per 10 °C increase in temperature— of the vast majority of thermophilic enzymes are the same as for mesophilic enzymes, that is  $Q_{10}=2$ , when Rha-1PA Tm work at temperatures closer to the optimal one, the turnover number ( $k_{cat}$ ) must increase significantly (Elias *et al.*, 2014).

## **Study of the structure of rhamnulose-1-phosphate-aldolase from *T. maritima***

### ***Primary structure***

To unambiguously identify the overexpressed proteins as the TM1072 gene product, the amino acid composition and peptide-mass fingerprinting of the recombinant protein were obtained. Amino acid analysis showed a good correlation with the theoretical values (Table 1RD, Pag. 108).

The Molar extinction coefficient at  $\lambda=280$  nm experimentally determined was  $\epsilon^{280} = 32,161 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  and  $\epsilon^{280} = 32,306 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , for Rha-1PA Tm and Rha-1PA Tm SHT, consecutively. The identity of the recombinant protein was further confirmed by peptide-mass fingerprinting (Fig. 9RD, Pag. 110).

### ***Secondary structure***

Secondary structure of the enzyme was analyzed by CD spectroscopy (Greenfield, 2006a; Greenfield, 2006b). In order to know the influence of the temperature on the secondary structure an analysis of the molar ellipticity of Rha-1PA from *T. maritima* between 190 and 240 nm was done at different temperatures from 20 °C to 110 °C. The experiment was carried out using the protein with (Rha-1PA Tm) and without (Rha-1PA Tm SHT) His-tag and in presence and absence of divalent cations. To evaluate the content of secondary structure of the protein, we analyzed the far-UV CD spectra using the CDPro software package containing three commonly used programs: SELCON3, CONTIN, and CDSSTR (Sreerama and Woody, 2000).

Spectra obtained for the enzymes are indicative of a high content of  $\alpha$ -helical structure, with two minima at approximately  $\lambda=208$  and 222 nm (Fig. 30RD, Pag. 145; Fig. 32RD, Pag. 147). In all the cases, secondary structure was almost the same until 80 °C, at this point when temperature raised the percentage of the random coil remained constant (~50%) while the  $\beta$ -sheet structure increased (10 – 30%) and the  $\alpha$ -helix structure decreased (10 – 40%). The contribution of each type of secondary structure is summarized in Figures 31RD and 33RD (Pag. 146 and 148). This change in the secondary

structure of the protein varied with the presence of His-tag and divalent ions. The absence of divalent cations in the medium as well as the presence of His-tag facilitates the thermal denaturalization of the enzyme. When temperatures above 100 °C were achieved the protein aggregated, except in case of the Rha-1PA Tm SHT without EDTA treatment. This could be due to the heat induced misfolding that leads to  $\beta$ -sheet to form aggregates, which resemble natural amyloid (Kusumoto *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 2003; Benjwal *et al.*, 2006).

We also studied the ability of the enzymes to recover their natural conformation after heat denaturation/renaturalization. The same experiment as described above was carried out by heating the protein at 110 °C and, subsequently, analyzing the secondary structure and then cooling down the sample until 80, 45 and 20 °C. As shown in Figure 36RD (Pag. 152) once the protein was heated until 110 °C it was denaturalized and, then, was not further able to refold again (Fig. 37RD, Pag. 152). These results indicated the irreversibility of the heat-induced denaturalization of the protein.

### *Quaternary structure*

Sedimentation equilibrium analysis of the purified protein did not stabilize even changing the sedimentation conditions (temperature, buffer, ionic strength). Molecular weight and quaternary structure were confirmed using size-exclusion chromatography with no-denaturing conditions. Retention time was 187 min with a 1 ml min<sup>-1</sup> flux. The recombinant enzyme was estimated as a tetramer as its mesophile counterpart, the Rha-1PA from *E. coli*, with a molecular mass of 114.59 kDa (Fig. 19RD, Pag. 127). This result agreed with the high sequence homology usually displayed by hyperthermophilic and mesophilic proteins (in this case 46.3%), which normally entail superposable 3D structures and similar catalytic mechanisms.

## Temperature and pH optimum determination

### *Optimum temperature*

To determine the optimal temperature of Rha-1PA from *T. maritima*, the specific activity of the enzyme was measured in a temperature range between 20 and 95 °C. Rha-1PA from *T. maritima* was active in the entire temperature range tested and the specific activity increased with temperature up to a maximum at 95 °C (Fig. 22RD, Pag. 131). We cannot affirm that 95 °C is the optimum temperature because we could not perform reactions at higher temperatures. Interestingly, this temperature is higher than the optimum growth temperature for *T. maritima* that is 80 °C. Most enzymes characterized from hyperthermophiles have a maximum or optimal temperature near the microorganism optimum growth temperature. *T. maritima* seems to have a particular behavior because, besides the aldolase described in this work, many of the enzymes isolated from this organism exhibit a similar performance with optimum temperatures around 95 °C (Table 6RD, Pag. 132). This fact can explain the capacity of this eubacteria to grow at temperatures above 90 °C (Hubert *et al.*, 1986).

Another interesting feature of this enzyme, especially from the perspective of its application in synthesis, is that it maintains a significant percentage of activity at temperatures far below 95 °C (e.g. about 20% of activity at 45 °C) allowing its use in a broad temperature range. This is a very interesting and distinctive property since most hyperthermophile enzymes are often inactive at low temperatures due to an excessive structural rigidity at these temperatures (Vieille and Zeikus, 2001). It is possible to hypothesize that Rha-1PA from *T. maritima* combines local flexibility in its active site (which must be responsible for the activity at low temperatures) with a high overall rigidity (which must be responsible for the thermostability) (Sternner *et al.*, 1998; Ichikawa and Clarke, 1998; Merz *et al.*, 1999; Wintrode and Arnold, 2001; Dellus-Gur *et al.*, 2013).

### ***Optimum pH***

The Rha-1PA from *T. maritima* optimum pH was determined by measuring the rate of aldol formation at different pHs (Fig. 25RD, Pag. 136). The maximum reaction rate was observed at pH 8.0. This value is similar not only to the one described for the Rha-1PA from *E. coli* but also to the most part of class II aldolases (Hill *et al.*, 1976; Hodgson and Plaxton, 1998; Nakahara *et al.*, 2003; Kakita *et al.*, 2006; Ertunga *et al.*, 2007; Labbé *et al.*, 2011). The range of pH where the Rha-1PA from *T. maritima* kept at least 50% of maximum activity was between pH 5.7 and pH 9.0. This result is especially interesting because allow to use the enzyme in slightly acidic media where DHAP is more stable.

### **Enzyme stability**

#### ***Thermal stability***

Thermal stability of the Rha-1PA from *T. maritima* was evaluated by incubation of the enzyme at 80, 95 and 115 °C. As can be observed in Figure 27RD (Pag. 138), the half-life of Rha-1PA from *T. maritima* did not greatly change between 80 and 95 °C (about 44 h and 33 h respectively). However, at 115 °C the half-life dropped to 3.5 h. These results indicate that the Rha-1PA Tm is not only thermophile but also thermo resistant. In fact, to the best of our knowledge the Rha-1PA from *T. maritima* is the most thermostable aldolase reported until nowadays.

Thermal stability was also assayed at 25 and 4 °C to determine possible storage conditions. In these conditions Rha-1PA from *T. maritima* was remarkably stable. After 28 days at 4 °C, the remaining activity was greater than 80% of the initial activity. At 25 °C the stability was slightly lower but over 70% of the initial activity was still kept (Fig. 26RD, Pag. 138).

#### ***Stability in presence of organic cosolvents***

As previously discussed, thermozyms are usually extremely resistant to the action of organic solvents, reason why we proceeded to study its stability

against different percentages of co-solvents with partition coefficient ( $\log P$ ) between -1.378 and 0.526 (Fig. 29RD, Pag. 144). Rha-1PA from *T. maritima* showed a quite remarkable stability in all cases, although stability increased as the  $\log P$  of the solvent decreased. The enzyme's stability in acetonitrile was remarkably high keeping a 90% of the initial activity in H<sub>2</sub>O/AcN 60:40 mixtures. The high stability exhibited by the enzyme in DMSO, where keeps nearly 100% activity in presence of 20% of co-solvent, and DMF, where keeps 50% activity with percentages of organic solvent near to 25%, was also remarkable. The stability of the enzyme was lower in isopropanol and THF but even in these cases, retained 40% of activity with a 10% of co-solvent.

### **Melting temperature of the rhamnulose-1-phosphate aldolase from *T. maritima***

Circular dichroism (CD) is an excellent spectroscopic technique for following the unfolding and folding of proteins as a function of temperature. As we investigated the study of the secondary structure, we studied the stability of the protein, with and without His-tag, in presence of different concentrations of Co<sup>2+</sup> (between 0 and 841.25  $\mu$ M). The enzyme was previously incubated with EDTA at 80 °C to remove all the divalent cations. From these curves (Fig. 34RD, Pag. 149), the melting temperature ( $T_M$ ) of the proteins was calculated, fitting a two-state folding model. All the curves following the thermal unfolding could be fitted to a simple thermodynamic unfolding model (Eq. 2, Pag. 140), where  $D_0$  is the value of the DC signal (mdeg) of the unfolded state at  $T^a=0$  °C;  $m_D$  is the slope of the unfolded state;  $N_0$  is the value of the DC signal (mdeg) of the native state at  $T^a=0$  °C;  $m_N$  is the slope of the native state;  $T_M$  is the temperature (°C) of the inflection point, and  $H_D$  is the Van't Hoff enthalpy associated to the denaturation process at  $T^a=T_M$  (Mayr *et al.*, 1993).

The transition region was very narrow and sharp, thus indicating that the protein existed initially as a compact, well-folded structure and that the unfolding reaction was highly cooperative.

$T_M$  (100 °C) of the Rha-1PA Tm SHT remained constant with successive additions of  $\text{Co}^{2+}$ . However, when the same experiments was carried out with the His-tagged Rha-1PA Tm it can be observed that the  $T_M$  depends on the  $\text{Co}^{2+}$  concentration with a maximum  $T_M$  of 103.8 °C at 450  $\mu\text{M}$  of  $\text{Co}^{2+}$  and a minimum  $T_M$  of 86.1 °C at 750  $\mu\text{M}$  of  $\text{Co}^{2+}$ . The variation on the  $T_M$  could be due to the coordination of the excess of  $\text{Co}^{2+}$  with the His-tag of the protein, being this interaction responsible of the decrease in the  $T_M$  of the enzyme (Fig. 35RD, Pag. 150) (Trofimov *et al.*, 2012; Kolaj-Robin *et al.*, 2013).

$T_M$  value is directly related to conformational stability only if the unfolding is fully reversible. As a consequence of the irreversibility of the process with the Rha-1PA from *T. maritima*, analysis of thermostabilities in terms of equilibrium thermodynamics is not applicable in our case (Duy and Fitter, 2005). In general, the thermal unfolding transitions of multidomain proteins are accompanied by irreversible aggregation at elevated temperature (Kishore *et al.*, 2012).

## **Study of rhamnulose-1-phosphate aldolase from *T. maritima* as biocatalyst**

### **Preliminary studies in the context of a multi-enzyme synthesis**

The utility of Rha-1PA from *T. maritima* as biocatalyst for C-C bond formation was proved at analytical scale in the context of the multi-enzyme system previously developed in our group (Sánchez-Moreno *et al.*, 2004; Sánchez-Moreno *et al.*, 2009a; Oroz-Guinea *et al.*, 2012). This system is based on the use of the recombinant ATP-dependent dihydroxyacetone kinase (DHAK) from *C. freundii* CECT 4626 for the *in situ* phosphorylation of DHA (Sánchez-Moreno *et al.*, 2009b). One advantage of this system is that it can be used in a one-pot/one-step or one-pot/two-steps approach depending on the reaction conditions required. Rha-1PA from *T. maritima* was assayed using the one-pot/two-steps protocol. In this case at the beginning of the reaction only the components for the enzymatic phosphorylation of DHA are added, allowing DHAP to accumulate. When at least 95% of DHA has been

phosphorilated, the pH is dropped to 6.8 and then, both aldolase and aldehyde are added to initiate the aldol addition as a second step.

Four different aldehydes were used as donor to test the synthetic utility of the Rha-1PA from *T. maritima*: the natural donor L-lactaldehyde (**1**), benzyloxyacetaldehyde (**2**), phenylacetaldehyde (**3**) and ethyl-3-methyl-4-oxocrotonate (**4**). Reactions were carried out using 100  $\mu\text{mol}$  of the aldehyde (aldehyde/DHAP 1:2 ratio) at two different temperatures: 45 and 80  $^{\circ}\text{C}$ . Rha-1PA from *T. maritima* was able to use the four aldehydes tested at both temperatures. At 45  $^{\circ}\text{C}$  more than 90% of aldol **1a** was formed after 20 min reaction. Also in the case of aldol **4a**, the maximum formation was achieved after 20 min reaction. For aldols **2a** and **3a** the formation rate was lower and 2.5 and 3 h were necessary to raise the maximum formation (68 and 53 % respectively) (Fig. 41RD, Pag. 158; Table 10RD, Pag. 159). As expected, when the reactions were carried out at 80  $^{\circ}\text{C}$  the reaction time decreased dramatically. However aldol formation percentages varied only slightly. In general, percentages of aldol formation decreased probably due to the much faster DHAP degradation rate at this temperature (Fig. 23RD, Pag. 134). Thus, formation of aldol **1a** dropped from 100% to 84% and aldol **3a** formation decreased from 53% to 48%. On the other hand, in the case of aldol **2a**, the percentage of formation obtained was identical at 45 and 80  $^{\circ}\text{C}$  and, interestingly, an increase in the formation of aldol **4a** from 87% to 98% was observed.

Finally, a preliminary study of the stereochemistry of the reaction catalysed by the Rha-1PA from *T. maritima* was carried out. Reaction with **4** was repeated in a 500  $\mu\text{mol}$  of aldehyde scale and aldol **4b** was purified and characterized by NMR in order to evaluate if the *threo:erythro* ratio was modified with the reaction temperature. NMR spectra of aldol **4b** were coincident with those previously described for this compound (Sánchez-Moreno et al., 2009a), showing a 80:20 *threo:erythro* ratio both at 45 and 80  $^{\circ}\text{C}$ . These results indicates that temperature does not affect the stereochemical course of the reaction and were consistent with the stereochemistry expected for this enzyme and with the results previously reported for the Rha-1PA from *E. Coli* (Sánchez-Moreno et al., 2009a).

**DHA utilization by Rha-1PA from *T. maritima***

The main drawback of DHAP-dependent aldolases is their strict specificity toward the donor substrate. Furthermore, the phosphate group of the product must be removed in many cases disfavoring the atom economy of the process. A very promising progress in this field is the report of the discovery of a novel D-fructose-6-phosphate aldolase isoenzyme (FSA) from *E. coli* (Schürmann and Sprenger, 2001), which is able to accept unphosphorylated DHA as donor. Moreover, this enzyme also accepts monohydroxylated donors in place of DHA such as hydroxyacetone (HA), glycolaldehyde (GA) and hydroxybutanone (HB) (Castillo *et al.*, 2006; Sugiyama *et al.*, 2007; Concia *et al.*, 2009; Garrabou *et al.*, 2009; Sánchez-Moreno *et al.*, 2012). Besides, an enzyme variant derived from transaldolase B (TalB) of *E. coli*, showing activity as a DHA-dependent aldolase was also described recently (Schneider *et al.*, 2008). However, new DHA-dependent enzymes are needed to create new compounds with different stereocenters. An alternative to this approach has been recently reported: the DHAP-dependent Rha-1PA from *E. coli* can accept DHA at reasonable rates when reactions are conducted in borate buffer (Sugiyama *et al.*, 2006; Garrabou *et al.*, 2011).

Thus, the capacity of the Rha-1PA from *T. maritima* to accept DHA as donor was evaluated. Several reaction conditions were tested varying not only the concentration of the substrates, catalyst or borate buffer but also the reaction conditions as temperature and pH of the medium. Unfortunately, the aldolase had no detectable activity with DHA under any circumstance. Hence, the tolerance of unphosphorylated DHA seems to be an exclusive property of the Rha-1PA from *E. coli*, since no other DHAP-dependent aldolase tested has shown this capability yet (Garrabou *et al.*, 2011).

**Study of the stereochemistry of the rhamnulose-1-phosphate aldolase from *Thermotoga maritima***

Finally, the effect of the temperature on the stereoselectivity of Rha-1PA from *T. maritima* was investigated. To this end, percentage of each

diastereoisomer formed by the aldol addition of DHAP to the benciloxyacetaldehyde (**2**) was measured at different times. Reactions were conducted at four different temperatures: 4 °C, R/T, 45 °C and 80 °C.

As expected, the (*R,S*) diastereoisomer, which is the natural preference of the enzyme, was the one kinetically preferred (Fig. 44RD, Pag. 164). In all the cases, the (*R,S*):(*R,R*) ratio decreased with the time until its stabilization at a 2:1 ratio (Fig. 45RD, Pag. 165). This fact could be due to the stability of the (*R,R*) aldol adduct obtained, since Rha-1PA from *T. maritima* can only perform the retro-aldol reaction on aldol compounds with the configuration of its natural substrate, being unable to hydrolyze molecules with (*R,R*) configuration (such as fuculose-1-phosphate) (Fig. 46RD, Pag. 166). In addition, in contrast with the behavior observed in other aldolases, the temperature of the reaction did not affect to the *syn:anti* ratio (Calveras *et al.*, 2009; Carmona *et al.*, 2003).

### **Synthesis of nitrogenated sugar analogues**

nitrogenated glycomimetics, such as aminocyclitols and iminocyclitols are naturally polyhydroxylated compounds, which have attracted much interest due to their potential therapeutic applications as inhibitors of glycosidases and glycosyltransferases by mimicking the transition state (TS) that occurs in an enzymatic glycoside hydrolysis (Compain and Martin, 2001; Lillelund *et al.*, 2002; Compain and Martin, 2007; Wrodnigg *et al.*, 2008). For this reason many efforts have been done during recent years to overcome the synthesis of this class of compounds, obtaining a wide variety of natural and non-natural analogues (Chen *et al.*, 2003; Ogawa *et al.*, 2004; Cipolla *et al.*, 2006; Greimel *et al.*, 2006).

#### ***Obtaining nitrocyclitols***

Recently, Prof. Marielle Lemaire's group has developed a new straightforward methodology to access to nitrocyclitols and aminocyclitols analogues. This chemo-enzymatic strategy is a stereoselective process in which the cyclitol ring is built by an aldol reaction between dihydroxyacetone phosphate (DHAP) and an aldehyde catalysed by a DHAP-

dependent aldolase, forming the C2–C3 bond. Subsequently, a highly stereoselective intramolecular cyclization (Henry reaction) took place, forming the second C–C bond between C1 and C6. Afterwards, the nitrocyclitols formed were dephosphorylated by a phosphatase-catalysed hydrolysis step. Enantiomerically pure nitrocyclitols with four new stereocenters for each aldehyde tested were created during this one-pot cascade reaction (Fig. 47, Pag. 169) (El Blidi *et al.*, 2006; El Blidi *et al.*, 2009).

Herein, we have tested the application of this highly stereoselective chemo-enzymatic cascade process combined with the kinase-catalysed synthesis of the DHAP developed in our group (Sánchez-Moreno *et al.*, 2009a), using the Rha-1PA from *T. maritima*.

Therefore, the syntheses of these compounds were achieved in a one pot/two steps reaction, involving four different enzymes and a chemical transformation (Fig. 49RD, Pag. 172). This process did not need any intermediate product purification. Firstly, the DHA was converted into DHAP. When DHAP accumulation was higher than 95%, the pH was adjusted to 6.8, subsequently adding the corresponding aldehyde and the aldolase as previously described. Two nitroaldehydes (4-nitrobutanal **5** and 3-hydroxy-4-nitrobutanal **6**) and a diethylacetaldehyde (3,3-diethoxypropanal **7**) were used as acceptor substrates. Reactions were carried out at R/T due to the lack of stability of the aldehydes at higher temperatures. Fortunately, this fact did not affect to the aldol reaction catalysed by the Rha-1PA from *T. maritima*, since, in spite of its hyperthermophile nature, this enzyme retains its activity at R/T. Aldolase-catalysed reactions were monitored by both, measuring DHAP consumption spectrophotometrically and by disappearance of the aldehyde by TLC. Using the three aldehydes (**5**, **6** and **7**) both, the DHAP and the aldehyde were completely consumed, indicating a fully conversion to the phosphorylated products. In addition to these methods, when the aldehyde **7** was used the aldol formed was also measured spectrophotometrically by retro-aldol reaction using Rha-1PA from *E. coli*. Aldol accumulation measured when using aldehyde **7** was 98%. Later on, the course of the phosphate group hydrolysis was followed regarding the consumption of the

phosphorilated compound by TLC. Reactions were stopped when the dephosphorylation was complete.

In all the cases good overall yields of these one-pot four reactions cascade process were achieved. Products were purified by silica column and the final yield obtained was 70% for aldehyde **5**, 71% for aldehyde **6** and 67% for aldehyde **7**. It must be taken into consideration that the purification conditions were not optimized.

A study of the stereochemistry was also carried out. According to the previous work developed in Prof. Lemaire's group the products were isolated and characterized by NMR in order to evaluate the *threo:erythro* diastereoisomers ratio. NMR analysis for both nitrocyclitols, **5** and **6**, were consistent with those previously described for these compounds by Prof. Lemaire and co-workers (Camps-Bres, 2010). In these results the stereoselectivity showed by the aldolase was not complete since mixtures of *L-threo* and *D-erythro* diastereomers were obtained with all the nitroaldehydes used (Table 11RD, Pag. 173), being the *L-threo* the major one that corresponds to the natural stereochemical preference for the Rha-1PA from *T. maritima*. This data was consistent with the stereochemistry previously showed by this enzyme and with the results of the Rha-1PA from *E. coli* described in the literature for nitrocyclitols **5b** and **6b**. Both, *L-threo* and *D-erythro* diastereomers, of aldol **7b** has been obtained for first time in this work, however, they were previously synthesized by Wong *et al.* (1995) using a *L*-fuculose-1-phosphate aldolase from *E. coli*.

### ***Synthesis of iminocyclitols***

Recently, the group of Dr. Pere Clapés has developed a chemoenzymatic methodology for obtaining iminocyclitols (Garrabou *et al.*, 2011). This synthesis started with the aldol condensation of DHAP to either (*R*)- or (*S*)-*N*-Cbz-aminoaldehydes followed by a phosphatase-catalysed hydrolysis of the phosphate group and subsequent treatment with H<sub>2</sub> in presence of Pd/C. Importantly, this process allowed the formation of enantiomerically pure compounds with three new stereocenters for each aldehyde tested. Herein, we describe the application of this chemo-enzymatic synthesis combined

with the DHAK-catalysed DHAP formation and using the Rha-1PA from *T. maritima* as catalyst for the aldol reaction step (Fig. 54RD, Pag. 181). Chirality of the stereocenters formed depends on the stereoselectivity of the aldolase and on the reductive amination, which is highly stereoselective, being the hydrogen delivered from the face opposite to the hydroxy group at the C1 position.

Reactions to obtain the corresponding iminocyclitols were performed on the millimol scale (2 mmol DHAP; 1.2 mmol aldehyde) in order to synthesize the final products on the milligram scale. To avoid the retro-aldol reaction, aldol formation between DHAP and the *N*-Cbz-aminoaldehydes was followed spectrophotometrically. Therefore, maximum aldol addition yield could be achieved (Table 14RD, Pag. 182). Subsequently, the aldehyde that did not react was removed and the aldol derivative obtained was treated with acid phosphatase from potato under acidic conditions until 100% of the compound was dephosphorilated. Afterwards, the corresponding intermediate products were purified by reverse-phase HPLC, paying special attention to prevent the removal of possible diastereoisomers formed during the enzymatic catalysis. Then, linear *N*-Cbz-aminopolyols were submitted to intramolecular reductive amination to afford the corresponding iminocyclitols, following the methodology described by Prof. Clapés group (Espelt *et al.*, 2005). This procedure provided product recoveries, without any purification optimization, ranged from 9.4 to 47.2% (Table 14RD, Pag. 182).

Separation of the putative diastereoisomers was accomplished by ion exchange methodologies. NMR spectroscopy characterization of the resulting iminocyclitols allowed the study of the stereoselectivity of the Rha-1PA from *T. maritima*. The results, which are summarized on Table 14RD (Pag. 182), displayed that mixtures of *L-threo* and *D-erythro* diastereoisomers were obtained in all the cases, indicating partial stereoselectivity in the enzymatic aldol addition. NMR analyses were consistent with those previously described in the literature (Espelt *et al.*, 2003; Calveras *et al.*, 2005; Calveras *et al.*, 2009). Hence, this allowed us to identify unequivocally and quantify the diastereoisomers formed. As has already been reported by other authors, stereochemistry of the iminocyclitols at C2 (C3 at the pyrrolizidine products

derived from aldehydes **13** and **14**) revealed that the reductive amination with H<sub>2</sub> in presence of Pd/C was highly diastereoselective. Indeed, hydrogenation took place from the face opposite to the C4 hydroxyl group, regardless of the relative stereochemistry of the other substituents. The aldol additions catalysed by Rha-1PA from *T. maritima* provided good stereoselectivity obtaining between a 98% and a 48% of the natural diastereoisomer. Interestingly, the diastereoselectivity observed depended not only on the structure but also on the stereochemistry of the acceptor aldehyde. Rha-1PA from *T. maritima* displayed excellent stereoselectivity towards the (*S*)-*N*-Cbz-aminoaldehydes (**8b**, **9b**, **11b** and **14b**) while the stereoselectivity significantly decreased with the (*R*) configuration (**10b**, **12b** and **13b**). In all the cases, except for the iminocyclitol derived from the (*R*)-*N*-Cbz-valinal (**12**), the major diastereoisomer observed was the one of the natural stereopreference of Rha-1PA (Table 14RD, Pag. 182).

## CONCLUSIONS

Conclusions obtained in this Thesis can be grouped around the two general subjects studied the biochemical characterization synthetic applicability of the rhamnulose-1-phosphate aldolase from *Thermotoga maritima*.

The biochemical characterization allowed us to conclude that:

- Rhamnulose-1-phosphate aldolase from *T. maritima* is a class II DHAP-dependent aldolase, which catalyse aldol addition using Co<sup>2+</sup>.
- Rha-1PA from *T. maritima* is a hyperthermophile enzyme with an optimum activity measured at 95 °C. Furthermore, in contrast with other hyperthermophilic enzymes, it maintains a significant percentage of activity at R/T.
- This enzyme can be used in a wide range of reaction conditions, including different temperatures (between 20 and 95 °C), pH values (at least 50% of activity between pH 5.7 and 9.0) and presence of

organic co-solvents (90% of the initial activity in H<sub>2</sub>O/AcN 60:40, 100% in H<sub>2</sub>O/DMSO 80:20, 50% in H<sub>2</sub>O/DMF 75:25 and 40% in 90:10 H<sub>2</sub>O/isopropanol and H<sub>2</sub>O/THF).

- It is been showed the great stability of the aldolase at high temperatures, displaying a T<sub>M</sub> of 102 °C and showing a half-life of 44, 33 and 3,5 h at 80, 95 and 115 °C, respectively.
- His-tag and cofactor affect not only to secondary structure of the protein, but also to thermostability. This influence can be summarized in:
  - $\alpha$ -helix/ $\beta$ -sheet shift is incremented at temperatures above 80 °C by His-tag presence, favouring protein denaturalization.
  - Co<sup>2+</sup> is involve in the native structure retention. Cofactor absence of the enzyme without His-tag entails an  $\alpha$ -helix loss of ~10%, resulting in protein aggregation at 110 °C. On the other hand, Co<sup>2+</sup> absence of the enzyme without His-tag leads into a ~10% increase of  $\alpha$ -helix at 20 °C. Thus, this result confirms not only the structural role Co<sup>2+</sup> plays, but also that his-tag can have influence in the secondary structure of the protein.
  - Regarding aldolase T<sub>M</sub>, changes can only be observed with the His-tagged enzyme at high concentrations of Co<sup>2+</sup>. (15 °C T<sub>M</sub> decrease at [Co<sup>2+</sup>]= 750  $\mu$ M).

Finally, synthetic applicability studies allowed us to conclude that:

- Rha-1PA from *T. maritima* is a useful biocatalyst compatible with multi-enzyme systems for C-C bond formation, involving mesophilic enzymes.
- Furthermore, this aldolase can be applied to the synthesis of several organic compounds like, aldols, nitrocyclitols and iminocyclitols, obtaining similar or higher yields than Rha-1Pa from *E. coli*.

## SUMMARY

---

- Unfortunately, DHA is not accepted as substrate instead of DHAP, the aldolase do not show activity in presence of borate buffer.
- Stereoselectivity of the enzyme is similar to Rha-1Pa from *E. coli*. In both cases stereoselectivity control is not total since mixtures of L-*threo* (R,S) and D-*erythro* (R,R) diastereoisomers are obtained.
- Study of the stereochemistry showed that in all the cases the major diastereoisomer formed is the coincident with the natural stereopreference of the enzyme (L-*threo* (R,S)) except when aldehyde **11** was used as acceptor.
- When iminocyclitol **41** was synthesized a diastereoisomeric mixture was obtained (*threo:erythro* 42:58). Considering that Rha-1PA Ec achieve a 100% of D-*erythro* (R,R) diastereoisomer, L-*threo* (R,S) can only be synthesized, although in a minority way, using Rha-1PA from *T. maritima*.
- Reaction control of the enzyme was studied, being the formation of L-*threo* isomer kinetically controlled and D-*erythro* isomer under thermodynamic control.

# **BIBLIOGRAFÍA**



- Abraham, C. J., Paull, D. H., Bekele, T., Scerba, M. T., Dudding, T. y Lectka, T., (2008), "A surprising mechanistic "switch" in Lewis acid activation: a bifunctional, asymmetric approach to  $\alpha$ -hydroxy acid derivatives." *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 17085-17094.
- Achenbach-Richter, L., Gupta, R., Stetter, K. y Woese, C., (1987), "Were the original eubacteria thermophiles?" *Syst. Appl. Microbiol.*, **9**, 34-39.
- Akey, D. L., Kittendorf, J. D., Giraldez, J. W., Fecik, R. A., Sherman, D. H. y Smith, J. L., (2006), "Structural basis for macrolactonization by the pikromycin thioesterase." *Nat. Chem. Biol.*, **2**, 537-542.
- Alcalde, M., Ferrer, M., Plou, F. J. y Ballesteros, A., (2006), "Environmental biocatalysis: from remediation with enzymes to novel green processes." *Trends Biotechnol.*, **24**, 281-287.
- Aldrich, C. C., Venkatraman, L., Sherman, D. H. y Fecik, R. A., (2005), "Chemoenzymatic synthesis of the polyketide macrolactone 10-deoxymethynolide." *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 8910-8911.
- Anastas, P. T. y Warner, J. C., (1998), "Green Chemistry: Theory and Practice." *Oxford University Press* Nueva York.
- Anastas, P. y Eghbali, N., (2010), "Green Chemistry: Principles and Practice." *Chem. Soc. Rev.*, **39**, 301-312.
- André, C., Guerard, C., Hecquet, L., Demuynck, C. y Bolte, J., (1998), "Modified L-threose and D-erythrose as substrates of transketolase and fructose-1,6-bisphosphate aldolase. Application to the synthesis of new heptulose analogues." *J. Mol. Catal. B*, **5**, 459-466.
- Angelov, A., Ballschmiter, M., Tiefenbach, K. J., Sterner, R. y Liebl, W., (2010), "Hyperthermostable acetyl xylan esterase." *Microb Biotechnol.*, **3**, 84-92.

- Argos, P., Rossmann, M. G., Grau, U. M., Zuber, H., Frank, G. y Tratschin, J. D., (1979), "Thermal stability and protein structure." *Biochemistry*, **18**, 5698-5703.
- Atomi, H., (2005), "Recent progress towards the application of hyperthermophiles and their enzymes." *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **9**, 166-173.
- Atomi, H., Sato, T. y Kanai, T., (2011), "Application of hyperthermophiles and their enzymes." *Curr. Opin. Biotechnol.*, **22**, 618-26.
- Aucamp, J. P., Martinez-Torres, R. J., Hibbert, E. G. y Dalby, P. A., (2008), "A microplate-based evaluation of complex denaturation pathways: structural stability of *Escherichia coli* transketolase." *Biotechnol. Bioeng.*, **99**, 1303-1310.
- Babich, L., van Hemert, L. J. C., Bury, A., Hartog, A. F., Falcicchio, P., van der Oost, J., van Herk, T., Wever, R. y Rutjes, F. P. J. T., (2011), "Synthesis of non-natural carbohydrates from glycerol and aldehydes in a one-pot four-enzyme cascade reaction." *Green Chem.*, **13**, 2895-2900.
- Baggio, R., Elbaum, D., Kanyo, Z. F., Carroll, P. J., Cavalli, R. C., Ash, D. E. y Christianson, D. W., (1997), "Inhibition of  $Mn^{2+}$  2-Arginase by Borate Leads to the Design of a Transition State Analogue Inhibitor, 2(S)-Amino-6-boronhexanoic Acid." *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 8107-8108.
- Ballini, R., Barboni, L., Fringuelli, F., Palmieri, A., Pizzo, F. y Vaccaro, L., (2007), "Recent developments on the chemistry of aliphatic nitro compounds under aqueous medium." *Green Chem.*, **9**, 823-838.
- Ballschmiter, M., Futterer, O. y Liebl, W., (2006), "Identification and characterization of a novel intracellular alkaline alpha-amylase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* MSB8." *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 2206-2211.
- Barnes, E. M., Akagi, J. M. y Himes, R. H., (1971), "Properties of fructose-1,6-diphosphate aldolase from thermophilic and mesophilic *Clostridia*." *Biochim. Biophys. Acta*, **227**, 199-203.

- Bastida, A., Fernández-Mayoralas, A., Gómez-Arrayás, R., Iradier, F., Carretero, J. C. y García-Junceda, E., (2001), "Heterologous over-expression of  $\alpha$ -1,6-Fucosyltransferase from *Rhizobium* sp.: application to the synthesis of the trisaccharide  $\beta$ -D-GlcNAc(1 $\rightarrow$ 4)-[ $\alpha$ -l-Fuc-(1 $\rightarrow$ 6)]-D-GlcNAc, study of the acceptor specificity and evaluation of polyhydroxylated indolizidines as inhibitors." *Chem. Eur. J.*, **7**, 2390-2397.
- Bauer, M. W., Driskill, L. E., Callen, W., Snead, M. A., Mathur, E. J. y Kelly, R. M., (1999), "An endoglucanase, EglA, from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* hydrolyzes  $\beta$ -1,4 bonds in mixed-linkage (1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucans and cellulose." *J. Bacteriol.*, **181**, 284-290.
- Beauchamp, J., Gross, P. G. y Vieille, C., (2014), "Characterization of *Thermotoga maritima* glycerol dehydrogenase for the enzymatic production of dihydroxyacetone." *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, DOI 10.1007/s00253-014-5658-y.
- Bednarski, M. D., Simon, E. S., Bischofberger, N., Fessner, W. D., Kim, M. J., Lees, W., Saito, T., Waldmann, H. y Whitesides, G. M., (1989), "Rabbit muscle aldolase as a catalyst in organic synthesis." *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 627-635.
- Bednarski, M. D., Waldmann, H. J. y Whitesides, G. M., (1986), "Aldolase-catalyzed synthesis of complex C-8 and C-9 monosaccharides." *Tetrahedron Lett.*, **27**, 5807-5810.
- Benjwal, S., Verma, S., Röhm, K. H. y Gursky, O., (2006), "Monitoring protein aggregation during thermal unfolding in circular Dichroism experiments." *Protein Sci.*, **15**, 635-639.
- Bernhardt, P., Usera, A. R. y O'Connor, S. E., (2010), "Biocatalytic asymmetric formation of tetrahydro-beta-carbolines." *Tetrahedron Lett.*, **51**, 4400-4402.
- Bertoldo, C. y Antranikian, G. (2008), "Biocatalysis under Extreme Conditions" In *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis: A Comprehensive Handbook, Second Edition*. Editado por Drauz, K. y Waldmann,; Wiley-VCH Weinheim, 313-334.

- Bertozzi, C. R. y Kiessling, L. L., (2001), "Chemical glycobiology." *Science*, **291**, 2357-2364.
- Blumer-Schuette, S. E., Kataeva, I., Westpheling, J., Adams, M. W. W y Kelly, R. M., (2008), "Extremely thermophilic microorganisms for biomass conversion: status and prospects." *Curr. Opin. Biotechnol.*, **19**, 210–217.
- Bock, A. K., Glasemacher, J., Schmidt, R. y Schönheit, P., (1999), "Purification and characterization of two extremely thermostable enzymes, phosphate acetyltransferase and acetate kinase, from the hyperthermophilic eubacterium *Thermotoga maritima*." *J. Bacteriol.*, **181**, 1861-1867.
- Bolte, J., Demuynck, C. y Samaki, H., (1987), "Utilisation of enzymes in organic chemistry –transketolase catalyzed synthesis of ketoses." *Tetrahedron Lett.*, **28**, 5525–5528.
- Bonamore, A., Rovardi, I., Gasparrini, F., Baiocco, P., Barba, M., Molinaro, C., Botta, B., Boffia, A. y Macone, A., (2010), "An enzymatic, stereoselective synthesis of (S)-norcoclaurine." *Green Chem.*, **12**, 1623-1627.
- Boruwa, J., Gogoi, N., Saikia, P. P. y Barua, N. C., (2006), "Catalytic asymmetric Henry reaction." *Tetrahedron: Asymmetry*, **17**, 3315-3326.
- Bradford M. M., (1976), "A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
- Brady, S. F., Simmons, L., Kim, J. H. y Schmidt, E. W., (2009), "Metagenomic approaches to natural products from free-living and symbiotic organisms." *Nat. Prod. Rep.*, **26**, 1488-1503.
- Brandt, W., Bräuer, L., Günnewich, N., Kufka, J., Rausch, F., Schulze, D., Schulze, E., Weber, R., Zakharova, S. y Wessjohann, L., (2009), "Molecular and structural basis of metabolic diversity mediated by prenyldiphosphate converting enzymes." *Phytochemistry*, **70**, 1758–1775.
- Braun, S. D., Hofmann, J., Wensing, A., Ullrich, M. S., Weingart, H., Volksch, B. y Spittler, D., (2010), "Identification of the biosynthetic gene cluster for 3-

- methylarginine, a toxin produced by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 22d/93." *Appl. Environ. Microbiol.*, **76**, 2500-2508.
- Breuer, M. y Hauer, B., (2003), "Carbon-carbon coupling in biotransformation." *Curr. Opin. Biotechnol.*, **14**, 570-576.
- Brock, T. D., Brock, K. M., Belly, R. T. y Weiss, R. L., (1972), "Sulfolobus: a new genus of sulfur-oxidizing bacteria living in low pH and high temperature." *Arch. Mikrobiol.*, **84**, 54-68.
- Brovetto, M., Gamenara, D., Saenz Méndez, P. y Seoane, G. A., (2011), "C-C bond-forming lyases in organic synthesis." *Chem. Rev.*, **111**, 4346-4403.
- Brown, S. H., Sjøholm, C. y Kelly, R. M., (1993), "Purification and characterization of a highly thermostable glucose isomerase produced by the extremely thermophilic eubacterium *Thermotoga maritima*." *Biotechnol. Bioeng.*, **41**, 878-886.
- Brunel, J. M. y Holmes, I. P., (2004), "Chemically catalyzed asymmetric cyanohydrin syntheses." *Angew. Chem., Int. Ed.*, **43**, 2752-2778.
- Brussee, J., Roos, E. C. y van der Gen, A., (1988), "Bio-organic synthesis of optically active cyanohydrins and acyloins." *Tetrahedron Lett.*, **29**, 4485-4488.
- Buckel, W. y Thauer, R. K., (2011) "Dual Role of S-Adenosylmethionine (SAM<sup>+</sup>) in the Methylation of sp<sup>2</sup>-Hybridized Electrophilic Carbons" *Angew. Chem.*, **123**, 10676-10678; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **50**, 10492-10494.
- Bühler, H., Bayer, A. y Effenberger, F., (2000), "A convenient synthesis of optically active 5,5-disubstituted 4-amino- and 4-hydroxy-2(5H)-furanones from (S)-ketone cyanohydrins." *Chem. Eur. J.*, **6**, 2564-2565.
- Busch, B., Ueberschaar, N., Behnken, S., Sugimoto, Y., Werneburg, M., Traitcheva, N., He, J. y Hertweck, C., (2013), "Multifactorial Control of Iteration Events in a Modular Polyketide Assembly Line." *Angew. Chem. Int. Ed.*, **52**, 5285-5289.

- Calveras, J., Casas, J., Parella, T., Joglar, J. y Clapés, P., (2005), "Chemoenzymatic Synthesis and Inhibitory Activities of Hyacinthacines A1 and A2 Stereoisomers." *Adv. Synth. Catal.*, **349**, 1661-1666.
- Calveras, J., Egado-Gabás, M., Gómez, L., Casas, J., Parella, T., Joglar, J., Bujons, J. y Clapés, P., (2009), "Dihydroxyacetone Phosphate Aldolase Catalysed Synthesis of Structurally Diverse Polyhydroxylated Pyrrolidine Derivatives and Evaluation of their Glycosidase Inhibitory Properties." *Chem. Eur. J.*, **15**, 7310-7328.
- Camps-Bres, (2010) "Synthèse d'aminocyclitols, inhibiteurs potentiels de glycosidases lysosomales, via des aldolases." Tesis Doctoral, *Université Blaise Pascal*, Clermont-Ferrand (France).
- Canganella, F. y Wiegel, J., (2011), "Extremophiles: from abyssal to terrestrial ecosystems and possibly beyond." *Naturwissenschaften*, **98**, 253-279.
- Careri, G., (1998), "Cooperative charge fluctuations by migrating protons in globular proteins." *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **70**, 223-249.
- Carmona, A. T., Fuentes, J., Robina, I., Garcia, E. R., Demange, R., Vogel, P. y Winters, A. L., (2003), "Stereoselective syntheses of 1,4-dideoxy-1,4-imino-octitols and novel tetrahydroxyindolizidines." *J. Org. Chem.*, **68**, 3874-3883.
- Castillo, J. A., Calveras, J., Casas, J., Mitjans, M., Vinardell, M. P., Parella, T., Inoue, T., Sprenger, G. A., Joglar, J. y Clapés, P., (2006), "Fructose-6-phosphate aldolase in organic synthesis: preparation of D-fagomine, N-alkylated derivatives, and preliminary biological assays." *Org. Lett.*, **8**, 6067-6070.
- Champdoré, M., Staiano, M., Rossi, M. y D'Auria, S., (2007), "Proteins from extremophiles as stable tools for advanced biotechnological applications of high social interest." *J. R. Soc. Interface*, **4**, 183-191.
- Charmantray, F., Dellis, P., Samreth, S. y Hecquet, L., (2006), "An efficient chemoenzymatic route to dihydroxyacetone phosphate from glycidol for the *in situ* aldolase-mediated synthesis of monosaccharides." *Tetrahedron Lett.*, **47**, 3261-3263.

- Charmantray, F., El Blidi, L., Gefflaut, T., Hecquet, L., Bolte, J. y Lemaire, M., (2004), "Improved straightforward chemical synthesis of dihydroxyacetone phosphate through enzymatic desymmetrization of 2,2-dimethoxypropane-1,3-diol." *J. Org. Chem.*, **69**, 9310-9312.
- Charmantray, F., Helaine, V., Legeret, B. y Hecquet, L., (2009), "Preparative scale enzymatic synthesis of D-sedoheptulose-7-phosphate from  $\beta$ -hydroxypyruvate and D-ribose-5-phosphate." *J. Mol. Catal. B*, **57**, 6-9.
- Chen, L., Dumas, D. P., Wong, C. H., (1992), "Deoxyribose 5-phosphate aldolase as a catalyst in asymmetric aldol condensation." *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 741-748.
- Chen, X., Fan, Y., Zheng, Y. y Shen, Y., (2003), "Properties and production of valienamine and its related analogues." *Chem. Rev.*, **103**, 1955-1977.
- Chênevert, R. y Dasser, M., (2000), "Chemoenzymatic synthesis of the microbial elicitor (-)-syringolide via a fructose 1,6-diphosphate aldolase-catalyzed condensation reaction." *J. Org. Chem.*, **65**, 4529-4531.
- Chênevert, R., Lavoie, M. y Dasser, M., (1997), "Use of aldolases in the synthesis of non-carbohydrate natural products. Stereoselective synthesis of aspicilin C-3-C-9 fragment." *Can. J. Chem.*, **75**, 68-73.
- Cheng T. J., Chan, T. H., Tsou, E. L., Chang, S. Y., Yun, W. Y., Yang, P. J., Wu, Y. T. y Cheng, W. C., (2013), "From natural product-inspired pyrrolidine scaffolds to the development of new human Golgi  $\alpha$ -mannosidase II inhibitors." *Chem. Asian J.*, **8**, 2600-2604.
- Chiba, Y., Terada, T., Kameya, M., Shimizu, K., Arai, H., Ishii, M. y Igarashi, Y., (2012), "Mechanism for folate-independent aldolase reaction catalyzed by serine hydroxymethyltransferase." *FEBS J.*, **279**, 504-514.
- Chiu, T. H., Evans, K. L. y Feingold, D. S., (1975), "L-Rhamnulose-1-phosphate aldolase." *Methods Enzymol.*, **42**, 364-369.
- Choi, I. G., Cho, C. S., Yunje, C. y Yu, Y. G., (1998), "Overproduction, Purification, and Characterization of Heat Stable Aldolase from

- Methanococcus Jannaschii*, a Hyperthermophilic Archea.” *J. Biochem. Mol. Biol.*, **31**, 130-134.
- Cipolla, L., La Ferla, B. y Gregori, M., (2006), “Combinatorial approaches to iminosugars as glycosidase and glycosyltransferase inhibitors.” *Comb. Chem. High Throughput Screening*, **9**, 571-582.
- Clapés, P. y Fessner, W. D., (2011), “Enzymatic direct aldol additions.” In *Science of Synthesis. Stereoselective Synthesis 2. Stereoselective Reactions of Carbonyl and Imino Groups*. Editado por Georg Thieme Verlag K. G.; 677-734.
- Clapés, P. y Garrabou, X., (2011), “Current Trends in Asymmetric Synthesis with Aldolases.” *Adv. Synth. Catal.*, **353**, 2263.
- Clapés, P. y Joglar, J., (2013), “Enzyme-Catalyzed Aldol Additions” In *Modern Methods in Stereoselective Aldol Reactions*. Editado por Mahrwald R.; Wiley-VCH Weinheim; 475-527.
- Clapés, P., Fessner W. D., Sprenger, G. A. y Samland A. K., (2010), “Recent progress in stereoselective synthesis with aldolases.” *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **14**, 154-167.
- Compain, P. y Martin, O. R., (2001), “Carbohydrate mimetics-based glycosyltransferase inhibitors.” *Bioorg. Med. Chem.*, **9**, 3077-3092.
- Compain, P. y Martin, O. R., (2007), “From Synthesis Iminosugars to Therapeutic Applications.” John Wiley & Sons, New York, 467.
- Concia, A. L., Gómez, L., Bujons, J., Parella, T., Vilaplana, C., Cardona, P. J., Joglar, J. y Clapés P., (2013), “Chemo-enzymatic synthesis and glycosidase inhibitory properties of DAB and LAB derivatives.” *Org. Biomol. Chem.*, **11**, 2005-2021.
- Concia, A. L., Lozano, C., Castillo, J. A., Parella, T., Joglar, J. y Clapés, P., (2009), “D-Fructose-6-phosphate aldolase in organic synthesis: cascade chemical-enzymatic preparation of sugar-related polyhydroxylated compounds.” *Chem. Eur. J.*, **15**, 3808-3816.

- Conners, S. C., Mongodin, E. F., Johnson, M. R., Montero, C. I., Nelson, E. K. y Kelly, R. M., (2006), "Microbial biochemistry, physiology, and biotechnology of hyperthermophilic *Thermotoga* species." *FEMS Microbiol. Rev.*, **30**, 872-905.
- Corey, E. J. y Cheng, X. M., (1989), *The Logic of Chemical Synthesis*; John Wiley & Sons, New York.
- Cosgrove, D. J. e Irving, G. C. J., (1980). In *Inositol Phosphates: their Chemistry, Biochemistry, and Physiology*. Elsevier.
- Cosp, A., Dresen, C., Pohl, M., Walter, L., Röhr, C. y Müller, M., (2008), "α,β-Unsaturated Aldehydes as Substrates for Asymmetric C—C Bond Forming Reactions with Thiamin Diphosphate (ThDP)-Dependent Enzymes" *Adv. Synth. Catal.*, **350**, 759-771.
- Cowan, D. A., (1997), "Thermophilic Proteins: Stability and Function in Aqueous and Organic Solvents." *Comp. Biochem. Physiol.*, **118**, 429-438.
- Crans, D. C. y Whitesides, G. M., (1983), "A convenient synthesis of disodium acetyl phosphate for use in *in situ* ATP cofactor regeneration." *J. Org. Chem.*, **48**, 3130-3132.
- Crans, D. C., Sudhakar, K. y Zamborelli, T. J., (1992), "Interaction of rabbit muscle aldolase at high ionic strengths with vanadate and other oxoanions." *Biochemistry*, **31**, 6812-6821.
- Crestia, D., Demuynck, C. y Bolte, J., (2004), "Transketolase and fructose-1,6-bis-phosphate aldolase, complementary tools for access to new ulosonic acid analogues." *Tetrahedron*, **60**, 2417-2425.
- Dadashipour M. y Asano Y., (2011), "Hydroxynitrile Lyases: Insights into Biochemistry, Discovery, and Engineering." *ACS Catal.*, **1**, 1121-1149.
- Danson, M. J. y Hough, D. W., (1998), "Structure, function and stability of enzymes from the Archaea." *Trends Microbiol.*, **6**, 307-314.
- de Montigny, C. y Sygusch, J., (1996), "Functional characterization of an extreme thermophilic class II fructose-1,6-bisphosphate aldolase." *Eur. J. Biochem.*, **241**, 243-248.

- De Rosa, M., Morana, A., Riccio, A., Gambacorta, A., Trincone, A. y Incani, O., (1994), "Lipids of the *archaea*: a new tool for bioelectronics." *Biosens. Bioelectr.*, **9**, 669-675.
- De Vendittis, E., Castellano, I., Cotugno, R., Ruocco, M. R., Raimo, G., Masullo, M., (2008), "Adaptation of model proteins from cold to hot environments involves continuous and small adjustments of average parameters related to amino acid composition." *J. Theor. Biol.*, **250**, 156-171.
- Dean, S. M., Greenberg, W. A. y Wong, C. H., (2007), "Recent Advances in Aldolase-Catalyzed Asymmetric Synthesis." *Adv. Synth. Catal.*, **349**, 1308-1320.
- DeChristopher, B. A., Loy, B. A., Marsden, M. D., Schrier, A. J., Zack, J. A. y Wender, P. A., (2012), "Designed, synthetically accessible bryostatin analogues potently induce activation of latent HIV reservoirs *in vitro*." *Nat. Chem.*, **4**, 705-710.
- Dellus-Gur, E., Toth-Petroczy, A., Elias, M. y Tawfik, D. S., (2013), "What makes a protein fold amenable to functional innovation? Fold polarity and stability trade-offs." *J. Mol. Biol.*, **425**, 2609-2621.
- Demir, A. S., Ayhan, P. y Sopaci, S. B., (2007), "Thiamine Pyrophosphate Dependent Enzyme Catalyzed Reactions: Stereoselective C-C Bond Formations in Water." *Clean*, **35**, 406-412.
- Demir, A. S., Sesenoglu, O., Eren, E., Hosrik, B., Pohl, M., Janzen, E., Kolter, D., Feldmann, R., Dünkemann, P. y Müller, M., (2002), "Enantioselective Synthesis of  $\alpha$ -Hydroxy Ketones via Benzaldehyde Lyase-Catalyzed C-C Bond Formation Reaction." *Adv. Synth. Catal.*, **344**, 96-103.
- Demirjian, D. C., Morís-Varas, F. y Cassidy, C. S., (2001), "Enzymes from extremophiles." *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **5**, 144-151.
- Demuyne, C., Bolte, J., Hecquet, L. y Dalmas, V., (1991), "Enzyme-catalysed synthesis of carbohydrates –synthetic potential of transketolase." *Tetrahedron Lett.*, **32**, 5085-5088.

- Díaz, L. y Delgado, A., (2010), "Medicinal Chemistry of Aminocyclitols." *Curr. Med. Chem.*, **17**, 2393-2418.
- Dinkelbach, M., Hodenius, M., Steigel, A. y Kula, M. R., (2001), "Fructose-1,6-bisphosphate aldolase from *Staphylococcus carnosus*: selective enzymatic synthesis of ketose-1-phosphates and successive reactions to 1,3-dioxanes." *Biocatal. Biotransfor.*, **19**, 51-68.
- DiRuggiero, J. y Robb, F. T., (1995), "Expression and *in vitro* assembly of recombinant glutamate dehydrogenase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*." *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 159-164.
- Djinni, I., Defant, A., Kecha, M. y Mancini, I., (2013), "Antibacterial polyketides from the marine alga-derived endophytic *Streptomyces sundarbansensis*: a study on hydroxypyrrone tautomerism." *Mar. Drugs*, **11**, 124-135.
- Dong, G., Vieille, C., Savchenko, A. y Zeikus. J. G., (1997), "Cloning, sequencing, and expression of the gene encoding extracellular  $\alpha$ -amylase from *Pyrococcus furiosus* and biochemical characterization of the recombinant enzyme." *Appl. Environ. Microbiol.*, **6**, 3569-3576.
- Doukyu, N. y Ogino, H., (2010), "Organic solvent-tolerant enzymes." *Biochem. Eng. J.*, **48**, 270-282.
- Dresen, C., Richter, M., Pohl, M., Lüdeke, S. y Müller, M., (2010), "The Enzymatic Asymmetric Conjugate Umpolung Reaction." *Angew. Chem.*, **122**, 6750-6753; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **49**, 6600-6603.
- Drueckhammer, D. G., Durrwachter, J. R., Pedersen, R. L., Crans, D. C., Daniels, L. y Wong, C. H., (1989), "Reversible and *in situ* formation of organic arsenates and vanadates as organic phosphate mimics in enzymatic reactions: mechanistic investigation of aldol reactions and synthetic applications." *J. Org. Chem.*, **54**, 70-77.
- Drzewiecki, K., Angelov, A., Ballschmiter, M., Tiefenbach, K. J., Sterner, R. y Liebl W., (2010), "Hyperthermostable acetyl xylan esterase." *Microb. Biotechnol.*, **3**, 84-92.

- Duchek, J., Adams, D. R. y Hudlicky, T., (2011), "Chemoenzymatic synthesis of inositols, conduritols, and cyclitol analogues." *Chem. Rev.*, **111**, 4223-4258.
- Dückers, N., Baer, K., Simon, S., Gröger, H. y Hummel, W., (2010), "Threonine aldolases-screening, properties and applications in the synthesis of non-proteinogenic beta-hydroxy-alpha-amino acids." *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **88**, 409-424.
- Dünkelmann, P., Kolter-Jung, D., Nitsche, A., Demir, A. S., Siegert, P., Lingen, B., Baumann, M., Pohl, M. y Müller, M., (2002), "Communication Development of a Donor-Acceptor Concept for Enzymatic Cross-Coupling Reactions of Aldehydes: □ The First Asymmetric Cross-Benzoin Condensation." *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 12084-12085.
- Dünnwald, T., Demir, A. S., Siegert, P., Pohl, M. y Müller, M., (2000), "Enantioselective Synthesis of (S)-2-Hydroxypropanone Derivatives by Benzoylformate Decarboxylase Catalyzed C-C Bond Formation." *Eur. J. Org. Chem.*, 2161-2170.
- Dutoit, R., Brandt, N., Legrain, C. y Bauvois, C., (2012), "Functional Characterization of Two M42 Aminopeptidases Erroneously Annotated as Cellulases." *PLoS One.*, **7**, e50639.
- Duy, C. y Fitter, J., (2005), "Thermostability of irreversible unfolding  $\alpha$ -amylases analyzed by unfolding kinetics." *J. Biol. Chem.*, **280**, 37360-37365.
- Effenberger, F. y Stelzer, U., (1991), "Synthesis and Stereoselective Reactions of (R)- $\alpha$ -Sulfonyloxynitriles." *Angew. Chem., Int. Ed.*, **30**, 873-874.
- Effenberger, F. y Stelzer, U., (1995), "A convenient preparation of 2-substituted (S)-aziridines." *Tetrahedron: Asymmetry*, **6**, 283-286.
- Effenberger, F., Gutterer, B. y Jäger, J., (1997), "Stereoselective synthesis of (1R)- and (1R,2S)-1-aryl-2-alkylamino alcohols from (R)-cyanohydrins" *Tetrahedron: Asymmetry*, **8**, 459-467.
- Effenberger, F., Kremser, A. y Stelzer, U., (1996), "A convenient synthesis of (S)-2-Azidonitriles, (S)-2-aminonitriles and (S)-1,2-diamines." *Tetrahedron: Asymmetry*, **7**, 607-618.

- El Blidi, L., Ahbala, M., Bolte, J. y Lemaire, M., (2006), "Straightforward chemo-enzymatic synthesis of new aminocyclitols, analogues of valioline and their evaluation as glycosidase inhibitors." *Tetrahedron: Asymmetry*, **17**, 2684-2688.
- El Blidi, L., Assaf, Z., Camps-Bres, F., Veschambre, H., They, V., Bolte, J. y Lemaire, M., (2009), "Fructose-1,6-bisphosphate aldolase-mediated synthesis of aminocyclitols (analogues of valioline) and their evaluation as glycosidase inhibitors." *ChemCatChem*, **1**, 463-471.
- El Blidi, L., Crestia, D., Gallienne, E., Demuynck, C., Bolte, J. y Lemaire, M., (2004), "A straightforward synthesis of an aminocyclitol based on an enzymatic aldol reaction and a highly stereoselective intramolecular Henry reaction." *Tetrahedron: Asymmetry*, **15**, 2951-2954.
- Elias, M., Wieczorek, G., Rosenne, S. y Tawfik, D. S., (2014), "The universality of enzymatic rate-temperature dependency." *Trends Biochem. Sciences*, **39**, 1-7.
- Elleuche, S., Schröder, C., Sahm, K y Antranikian, G., (2014), "Extremozymes —biocatalysts with unique properties from extremophilic microorganisms." *Curr. Opin. Chem. Biotechnol.*, **29**, 116-123.
- Ertunga, N. S., Colak, A., Belduz, A. O., Canakci, S., Karaoglu, H. y Sandalli, C., (2007), "Cloning, expression, purification and characterization of fructose-1,6-bisphosphate aldolase from *Anoxybacillus gonensis* G2." *J. Biochem.*, **141**, 817-825.
- Espelt, L., Bujons, J., Parella, T., Calveras, J., Joglar, J., Delgado, A. y Clapés, P., (2005), "Aldol additions of dihydroxyacetone phosphate to *N*-Cbz-aminoaldehydes catalysed by L-fucose-1-phosphate aldolase in emulsion systems: inversión of stereoselectivity as a function of the acceptor aldehyde." *Chem. Eur. J.*, **11**, 1392-1401.
- Espelt, L., Parella, T., Bujons, J., Solans C., Joglar, J., Delgado, A. y Clapés, P., (2003), "Stereoselective Aldol Additions Catalysed by Dihydroxyacetone Phosphate-Dependent Aldolases in Emulsion Systems: Preparation and

- Structural Characterization of Linear and Cyclic Iminopolyols from Aminoaldehydes." *Chem. Eur. J.*, **9**, 4887-4899.
- Evans, D. A. y Bartroli, J., (1982), "Stereoselective reactions of chiral enolates. Application to the synthesis of (+)-prelog-djerassi lactonic acid." *Tetrahedron Lett.*, **23**, 807-810.
- Evans, D. A., Bartroli, J. y Shih, T. L., (1981), "Enantioselective aldol condensations. 2-Erythro-selective chiral aldol condensations via boron enolates." *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 2127-2129.
- Evans, K. L. y Feingold, D. S., (1975), "L-Rhamnulose-1-phosphate aldolase." *Methods Enzymol.*, **42**, 364-369.
- Everly, C. y Alberto, J., (2000), "Stressors, stress and survival: overview." *Front. Biosci.*, **5**, 780-786.
- Faber, K. y Kroutil, W., (2005), "New enzymes for biotransformations." *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **9**, 181-187.
- Facchiano, A. M., Colonna, G. y Ragone, R., (1998), "Helix stabilizing factors and stabilization of thermophilic proteins: an X-ray based study." *Prot. Eng.*, **11**, 753-60.
- Falcicchio, P., Wolterink-Van Loo, S., Franssen, M.C. R. y van der Oost, J., (2014), "DHAP-dependent aldolases from (hyper)thermophiles: biochemistry and applications." *Extremophiles*, **18**, 1-13.
- Fedorov, D. N., Doronina, N. V. y Trotsenko, Y. A., (2010), "Cloning and characterization of indolepyruvate decarboxylase from *Methylobacterium extorquens* AM1." *Biochemistry*, **75**, 1435-1443.
- Fesko, K. y Gruber-Khadjawi, M., (2013), "Biocatalytic Methods for C-C Bond Formation" *ChemCatChem.*, **5**, 1248-1272.
- Fesko, K., Reisinger, C., Steinreiber, J., Weber, H., Schürmann, M. y Griengl, H., (2008), "Four types of threonine aldolases: Similarities and differences in kinetics/thermodynamics." *J. Molec. Catal. B Enz.*, **52-53**, 19-26.

- Fessner, W. D. y Jennewein, S., (2007), "Biotechnological applications of aldolases." En *Biocatalysis in the Pharmaceutical Biotechnological Industries*. Editado por Patel R. N. Marcel Dekker; 363-400.
- Fessner, W. D. y Sinerius, G., (1994), "Synthesis of dihydroxyacetone phosphate (and isosteric analogues) by enzymatic oxidation: sugars from glycerol." *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **33**, 209-212.
- Fessner, W. D., (1998), "Enzyme mediated C-C bond formation." *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2**, 85-97.
- Fessner, W. D., Badia, J., Eyrisch, O., Schneider, A. y Sinerius, G., (1992), "Enzymes in organic-synthesis. 5. Enzymatic syntheses of rare ketose-1-phosphates." *Tetrahedron Lett.*, **33**, 5231-5234.
- Fessner, W. D., Schneider, A., Held, H., Sinerius, G., Walter, C., Hixon, M. y Schloss, J. V., (1996), "The Mechanism of Class II, Metal-Dependent Aldolases." *Angew. Chem., Int. Ed.*, **35**, 2219-2221.
- Fessner, W. D., Sinerius, G., Schneider, A., Dreyer, M., Schulz, G. E., Badia, J. y Aguilar, J., (1991), "Diastereoselective enzymatic aldol additions: L-rhamnulose and L-fuculose 1-phosphate aldolases from *E. coli*." *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **30**, 555-558.
- Fields, P. A., (2001), "Protein function at thermal extremes: balancing stability and flexibility." *Comp. Biochem. Physiol.*, **129**, 417-431.
- Fischbach, M. A. y Walsh, C. T., (2006), "Assembly-line enzymology for polyketide and nonribosomal Peptide antibiotics: logic, machinery, and mechanisms." *Chem. Rev.*, **106**, 3468-3496.
- Fitter, J. y Haber-Pohlmeier, S., (2004), "Structural stability and unfolding properties of thermostable bacterial  $\alpha$  -amylases: a comparative study of homologous enzymes." *Biochemistry*, **43**, 9589-9599.
- Flatt, P. M. y Mahmud, T., (2007), "Biosynthesis of aminocyclitol-aminoglycoside antibiotics and related compounds." *Nat. Prod. Rep.*, **24**, 358-392.

- Forterre, P., (1996), "A hot topic: the origin of hyperthermophiles." *Cell*, **85**, 789-792.
- Fox, R. J., Davis, S. C., Mundorff, E. C., Newman, L. M., Gavrilovic, V., Ma, S. K., Chung, L. M., Ching, C., Tam, S., Muley, S., Grate, J., Gruber, J., Whitman, J. C., Sheldon, R. A. y Huisman, G. W., (2007), "Improving catalytic function by ProSAR-driven enzyme evolution." *Nat. Biotechnol.*, **25**, 338-344.
- Franz, S. E. y Stewart, J. D., (2014), "Threonine Aldolases." *Adv. Appl. Microbiol.*, **88**, 57-101.
- Freeze, H. y Brock, T. D., (1970), "Thermostable Aldolase from *Thermus aquaticus*." *J. Bacteriol.*, 541-550.
- Frock, A. D. y Kelly, R. M., (2012), "Extreme thermophiles: moving beyond single-enzyme biocatalysis." *Curr. Opin. Chem. Engin.*, **1**, 363-372.
- Fujiwara, S., (2002), "Extremophiles: Developments of their special functions and potential resources." *J. Biosci. Bioeng.*, **94**, 518-525.
- Galkin, A., Li, Z., Li, L., Kulakova, L., Pal, L. R., Dunaway-Mariano, D. y Herzberg, O., (2009), "Structural insights into the substrate binding and stereoselectivity of giardia fructose-1,6-bisphosphate aldolase." *Biochemistry*, **48**, 3186-3196
- Galperin, M. Y., Aravind, L. y Koonin, E. V., (2000), "Aldolases of the Dhna family: a possible solution to the problem of pentose and hexose biosynthesis in *archaea*." *FEMS Microbiol. Lett.*, **183**, 259-264.
- García-Junceda, E., García-García, J. F., Bastida, A. y Fernández-Mayoralas, A., (2004), "Enzymes in the synthesis of bioactive compounds: the prodigious decades." *Bioorg. Med. Chem.*, **12**, 1817-1834.
- García-Junceda, E., Shen, G. J., Sugai, T. y Wong, C. H., (1995), "A new strategy for the cloning, overexpression and one step purification of three DHAP-dependent aldolases: Rhamnulose-1-phosphate aldolase, fuculose-1-phosphate aldolase and tagatose-1,6-diphosphate aldolase1." *Bioorg. Med. Chem.*, **3**, 945-953.

- Garrabou, X., Calveras, J., Joglar, J., Parella, T., Bujons, J. y Clapés, P., (2011), "Highly efficient aldol additions of DHA and DHAP to *N*-Cbz-amino aldehydes catalysed by L-rhamnulose-1-phosphate and L-fuculose-1-phosphate aldolases in aqueous borate buffer." *Org. Biomol. Chem.*, **9**, 8430-8436.
- Garrabou, X., Castillo, J. A, Guérard-Hélaine, C., Parella, T., Joglar, J., Lemaire, M. y Clapés, P., (2009), "Asymmetric self- and cross-aldol reaction of glycolaldehyde catalysed by D-fructose-6-phosphate aldolase." *Angew. Chem. Int. Ed.*, **48**, 5521-5525.
- Garrabou, X., Gomez, L., Joglar, J., Gil, S., Parella, T., Bujons, J. y Clapés, P., (2010), "Structure-guided minimalist redesign of the L-fuculose-1-phosphate aldolase active site: expedient synthesis of novel polyhydroxylated pyrrolizidines and their inhibitory properties against glycosidases and intestinal disaccharidases." *Chem. Eur. J.*, **16**, 10691-10706.
- Garrabou, X., Joglar, J., Parella, T., Bujons, J. y Clapés, P., (2011), "Redesign of the Phosphate Binding Site of L-Rhamnulose-1-Phosphate Aldolase towards a Dihydroxyacetone Dependent Aldolase" *Adv. Synth. Catal.*, **353**, 89-99.
- Gaucher, A., Ollivier, J. y Salaün, J., (1991), "Diastereoselective preparation of cyclopropane amino acids synthesis of norcoronamic acid." *Synlett.*, **3**, 151-153.
- Gazak, R., Sedmera, P., Marzorati, M., Riva, S. y Kren, V., (2008), "Laccase mediated dimerization of the flavonolignan silybin." *J. Mol. Catal. B Enzym.*, **50**, 87-92.
- Gefflaut, T., Lemaire, M., Valentin, M. L. y Bolte, J., (1997), "A novel efficient synthesis of dihydroxyacetone phosphate and bromoacetol phosphate for use in enzymatic aldol syntheses." *J. Org. Chem.*, **62**, 5920-5922.
- Gijsen H. J. M. y Wong, C. H., (1995a), "Sequential One-Pot Aldol Reactions Catalyzed by 2-Deoxyribose-5-phosphate Aldolase and Fructose-1,6-diphosphate Aldolase." *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 2947-2948.

- Gijsen H. J. M. y Wong, C.-H., (1995b), "Sequential Three- and Four-Substrate Aldol Reactions Catalyzed by Aldolases." *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 7585-7591.
- Gijsen, H. J. M., Qiao, L., Fitz, W. y Wong, C. H., (1996), "Recent advances in the chemoenzymatic synthesis of carbohydrates and carbohydrate mimetics." *Chem. Rev.*, **96**, 443-473.
- Giraldes, J. W., Akey, D. L., Kittendorf, J. D., Sherman, D. H., Smith, J. L. y Fecik, R. A., (2006), "Structural and mechanistic insights into polyketide macrolactonization from polyketide-based affinity labels." *Nat. Chem. Biol.*, **2**, 531-536.
- Gocke, D., Graf, T., Brosi, H., Frindi Wosch, I., Walter, L., Müller, M., Pohl, M., (2009), "Comparative characterisation of thiamin diphosphate-dependent decarboxylases" *J. Mol. Catal. B Enzym.*, **61**, 30-35.
- Gómez, L., Garrabou, X., Joglar, J., Bujons, J., Parella, T., Vilaplana, C., Cardona, P. J. y Clapés, P., (2012), "Chemoenzymatic synthesis, structural study and biological activity of novel indolizidine and quinolizidine iminocyclitols." *Org. Biomol. Chem.*, **10**, 6309-6321.
- González-García, E., Helaine, V., Klein, G., Schürmann, M., Sprenger, G. A., Fessner, W.-D. y Reymond, J. L., (2003), "Fluorogenic stereochemical probes for transaldolases." *Chem. Eur. J.*, **9**, 893-899.
- Goswami, R. K., Huang, Z. Z., Forsyth, J. S., Felding-Habermann, B., Sinha, S. C., (2009), "Multiple catalytic aldolase antibodies suitable for chemical programming." *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **19**, 3821-3824.
- Greenberg, W. A., Varvak, A., Hanson, S. R., Wong, K., Huang, H. J., Chen, P. y Burk, M. J., (2004), "Asymmetric Catalysis." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 5788-5793.
- Greenfield, N. J., (2006a), "Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure." *Nat. Protoc.*, **1**, 2876-2890.
- Greenfield, N. J., (2006b), "Analysis of the kinetics of folding of proteins and peptides using circular dichroism." *Nat. Protoc.*, **1**, 2891-2899.

- Greenfield, N. J., (2006c), "Using circular dichroism collected as a function of temperature to determine the thermodynamics of protein unfolding and binding interactions." *Nat. Protoc.*, **1**, 2527-2535.
- Greimel, P., Spreitz, J., Sprenger, F. K., Stütz, A. E. y Wrodnigg, T. M., (2006), "Sugars with Endocyclic Heteroatoms Other than Oxygen." En *The Organic Chemistry of Sugars*. Editado por Levy, D. E. y Fügedi, P.; CRC Press; 383-424.
- Griffiths, J. S., Wymer, N. J., Njolito, E., Niranjankumari, S., Fierke, C. A. y Toone, E. J., (2002), "Cloning, isolation and characterization of the *Thermotoga maritima* KDPG aldolase." *Bioorg. Med. Chem.*, **10**, 545-50.
- Gröger, H., (2001), "Enzymatic Routes to Enantiomerically Pure Aromatic alpha-Hydroxy Carboxylic Acids: A Further Example for the Diversity of Biocatalysis." *Adv. Synth. Catal.*, **343**, 547-558.
- Gromiha, M. M., Pathak, M. C., Saraboji, K., Ortlund, E. A. y Gaucher E. A., (2013), "Hydrophobic environment is a key factor for the stability of thermophilic proteins." *Proteins*, **81**, 715-721.
- Guan, Z., Fu, J. P. y He, Y. H., (2012), "Biocatalytic promiscuity: lipase-catalyzed asymmetric aldol reaction of heterocyclic ketones with aldehydes." *Tetrahedron Lett.*, **53**, 4959-4961.
- Guo, Z., Goswami, A., Mirfakhrae, K. D. y Patel, R. N., (1999), "Asymmetric acyloin condensation catalyzed by phenylpyruvate decarboxylase." *Tetrahedron: Asymmetry*, **10**, 4667-4675.
- Guo, Z., Goswami, A., Nanduri, V. B. y Patel, R. N., (2001), "Asymmetric acyloin condensation catalysed by phenylpyruvate decarboxylase. Part 2: Substrate specificity and purification of the enzyme." *Tetrahedron: Asymmetry*, **12**, 571-577.
- Hailes, H. C., Rother, D., Müller, M., Westphal, R., Ward, J. M., Pleiss, J., Vogel, C. y Pohl, M., (2013), "Engineering stereoselectivity of ThDP-dependent enzymes." *FEBS J.*, **280**, 6374-6394.

- Hajdok, S., Conrad, J., Leutbecher, H., Strobel, S., Schleid, T. y Beifuss, U., (2009), "The laccase-catalyzed domino reaction between catechols and heterocyclic 1,3-dicarbonyls and the unambiguous structure elucidation of the products by NMR spectroscopy and X-ray crystal structure analysis." *J. Org. Chem.*, **74**, 7230-7237.
- Haki, G. D. y Rakshit, S. K., (2003), "Developments in industrially important thermostable enzymes: a review." *Biores. Technol.*, **89**, 17-34.
- Hansen, D. A., Rath, C. M., Eisman, E. B., Narayan, A. R. H., Kittendorf, J. D., Mortison, J. D., Yoon Y. J. y Sherman, D. H., (2013), "Biocatalytic Synthesis of Pikromycin, Methymycin, Neomethymycin, Novamethymycin, and Ketomethymycin." *J. Am. Chem. Soc.*, **135**, 11232-11238.
- Hasnaoui-Dijoux, G., Majeric Elenkov, M., Lutje Spelberg, J. H., Hauer, B. y Janssen, D. B., (2008), "Catalytic promiscuity of halohydrin dehalogenase and its application in enantioselective epoxide ring opening." *ChemBioChem*, **9**, 1048-1051.
- He, Y. H., Li, H. H., Chen, Y. L., Xue, Y., Yuan, Y. y Guan, Z., (2012), "Chymopapain-Catalyzed Direct Asymmetric Aldol Reaction" *Adv. Synth. Catal.*, 712-719.
- Hecquet, L., Bolte, J. y Demuynck, C., (1994), "Chemoenzymatic synthesis of 6-deoxy-D-fructose and 6-deoxy-L-sorbose using transketolase." *Tetrahedron*, **50**, 8677-8684.
- Heide, L., (2009), "Prenyl transfer to aromatic substrates: genetics and enzymology." *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **13**, 171-179.
- Heightman, T. D. y Vasella, A. T., (1999), "Recent Insights into Inhibition, Structure, and Mechanism of Configuration-Retaining Glycosidases." *Angew. Chem. Int. Ed.*, **38**, 750-770.
- Herbert, R. y Sharp, R., (1992), "Molecular Biology and Biotechnology of Extremophiles." Chapman and Hall, NY.
- Herscovics, A., (1999), "Importance of glycosidases in mammalian glycoprotein biosynthesis." *Biochim. Biophys. Acta*, **1473**, 96-107.

- Hertweck, C., (2009), "The Biosynthetic Logic of Polyketide Diversity" *Angew. Chem.*, **121**, 4782-4811; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **48**, 4688-4716.
- Hill, H. A., Lobb, R. R., Sharp, S. L., Stokes, A. M., Harris, J. I. y Jack, R. S., (1976), "Metal-replacement studies in *Bacillus stearothermophilus* aldolase and a comparison of the mechanisms of class I and class II aldolases." *Biochem. J.*, **153**, 551-560.
- Hoaglin, R. I., Kubler, D. G. y Montagna, A. E., (1958), "The Chemistry of  $\alpha,\beta$ -Unsaturated Ethers." *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 5460-5463.
- Hobbs, G. R., Lilly, M. D., Turner, N. J., Ward, J. M., Willets, A. J. y Woodley, J. M., (1993), "Enzyme-catalyzed carbon-carbon bond formation –use of transketolase from *Escherichia coli*." *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, **1**, 165-166.
- Hodgson, R. J. y Plaxton, W. C., (1998), "Purification and characterization of cytosolic fructose-1,6-bisphosphate aldolase from endosperm of germinated castor oil seeds." *Arch. Biochem. Biophys.*, **355**, 189-196.
- Hough, D. W. y Danson, M. J., (1999), "Extremozymes." *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **3**, 39-46.
- Hoyos, P., Sinisterra, J. V., Molinari, F., Alcántara, A. y Domínguez de María, P., (2010), "Biocatalytic strategies for the asymmetric synthesis of  $\alpha$ -hydroxy ketones." *Acc. Chem. Res.*, **43**, 288-299.
- Hu, Y., Lee, C. C. y Ribbe, M. W., (2011), "Extending the carbon chain: hydrocarbon formation catalyzed by vanadium/molybdenum nitrogenases." *Science*, **333**, 753-755.
- Huang, S. Y., Zhang, Y. H. P y Zhong, J. J., (2012), "A thermostable recombinant transaldolase with high activity over a broad pH range." *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **93**, 2403-2410.
- Huber, R., Langworthy, T. A., König, H., Thomm, M., Woese, C. R., Sleytr, U. B. y Stetter, K. O., (1986), "*Thermotoga maritima* sp. nov. represents a new genus of unique extremely thermophilic eubacteria growing up to 90 °C." *Arch. Microbiol.*, **144**, 324-333.

- Ichikawa, J. K. y Clarke, S., (1998), "A highly active protein repair enzyme from an extreme thermophile: the L-isoaspartyl methyltransferase from *Thermotoga maritima*." *Arch. Biochem. Biophys.*, **358**, 222-231.
- Ikeda, M. y Clark, D. S., (1998), "Molecular cloning of extremely thermostable esterase gene from hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* in *Escherichia coli*." *Biotechnol. Bioeng.*, **57**, 624-629.
- Imanaka, H., Fukui, T., Atomi, H. y Imanaka, T., (2002), "Gene cloning and characterization of fructose-1,6-bisphosphate aldolase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1." *J. Biosci. Bioeng.*, **94**, 237-243.
- Imanaka, T., (2011), "Molecular bases of thermophily in hyperthermophiles." *Proc. Jpn. Acad. Ser. B*, **87**, 587-601.
- Iturrate, L., (2008), "Nuevos sistemas biocatalíticos para la formación de enlaces C-C. Diseño, caracterización y aplicación sintética de una enzima de fusión quinasa-aldolasa." Tesis Doctoral. *Universidad Autónoma de Madrid*.
- Iturrate, L., Sánchez-Moreno, I., García-Doyagüez, E. y García-Junceda, E., (2009), "Substrate channelling in an engineered bifunctional aldolase/kinase enzyme confers catalytic advantage for C-C bond formation." *Chem. Commun.*, 1721-1723.
- Iturrate, L., Sánchez-Moreno, I., Oroz-Guinea, I., Pérez-Gil, J. y García-Junceda, E., (2010), "Preparation and characterization of a bifunctional aldolase/kinase enzyme: a more efficient biocatalyst for C-C bond formation." *Chem. Eur. J.*, **16**, 4018-4030.
- Iwig, D. F., Uchida, A., Stromberg, J. A. y Booker, S. J., (2005), "The Activity of *Escherichia coli* Cyclopropane Fatty Acid Synthase Depends on the Presence of Bicarbonate." *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 11612-11613.
- Iyer, P. V. y Ananthanarayan, L., (2008), "Enzyme stability and stabilization—Aqueous and non-aqueous environment." *Proc. Biochem.*, **43**, 1019-1032.

- Izard, T. y Sygusch, J., (2004), "Induced fit movements and metal cofactor selectivity of class II aldolases: structure of *Thermus aquaticus* fructose-1,6-bisphosphate aldolase." *J. Biol. Chem.*, **279**, 11825-11833.
- Jelesarov, I. y Karshikoff, A., (2009), "Defining the role of salt bridges in protein stability." *Methods Mol. Biol.*, **490**, 227-260.
- Jeyakanthan, J., Taka, J., Kikuchi, A., Kuroishi, C., Yutani, K. y Shiro, Y., (2005), "Purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic study of the L-fuculose-1-phosphate aldolase (FucA) from *Thermus thermophilus* HB8." *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.*, **61**, 1075–1077.
- Jiang, L., Althoff, E. A., Clemente, F. R., Doyle, L., Rothlisberger, D., Zanghellini, A., Gallaher, J. L., Betker, J. L., Tanaka, F., Barbas, C. F., Hilvert, D., Houk, K. N., Stoddard, B. L. y Baker, D., (2008), "De Novo Computational Design of Retro-Aldol Enzymes." *Science*, **319**, 1387-1391.
- Jordan, A., Torrents, E., Jeanthon, C., Eliasson, R., Hellman, U., Wernstedt, C., Barbé, J., Gibert, I. y Reichard, P., (1997), "B<sub>12</sub>-dependent ribonucleotide reductases from deeply rooted eubacteria are structurally related to the aerobic enzyme from *Escherichia coli*." *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **94**, 13487-13492.
- Jung, S. H., Jeong, J. H., Miller, P. y Wong, C. H., (1994) "An efficient multigram-scale preparation of dihydroxyacetone phosphate." *J. Org. Chem.*, **59**, 7182-7184.
- Kajimoto, T., Chen, L., Liu, K. K. C. y Wong, C. H., (1991), "Palladium-mediated stereocontrolled reductive amination of azido sugars prepared from enzymic aldol condensation: a general approach to the synthesis of deoxy aza sugars." *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 6678-6680.
- Kakita, H., Kamishima, H. y Inouye, K., (2006), "Purification and some properties of a D-fructose-1,6-bisphosphate aldolase from the red alga, *Gracilaria chorda* Holmes." *Bot. Mar.*, **49**, 174-181.
- Kang, M. S., Liu, P. S., Bernotas, R. C., Harry, B. S. y Sunkara, P. S., (1995), "Castanospermine analogues: their inhibition of glycoprotein processing

- alpha-glucosidases from porcine kidney and B16F10 cells." *Glycobiology*, **5**, 147-152.
- Kardinahl, S., Schmidt, C. L., Petersen, A. y Schafer, G., (1996), "Isolation, characterization and crystallization of an iron-superoxide dismutase from the crenarchaeon *Sulfilobus acidocaldarius*." *FEMS Microbiol. Lett.*, **138**, 65-70.
- Kengen, S. W., Luesink, E. V., Stams, A. J. y Zehnder, A. J., (1993), "Purification and characterization of an extremely thermostable  $\beta$ -glucosidase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*." *Eur. J. Biochem.*, **213**, 305-312.
- Khersonsky, O. y Tawfik, D. S., (2010), "Enzyme promiscuity: a mechanistic and evolutionary perspective." *Annu. Rev. Biochem.*, **79**, 471-505.
- Khosla, C., Herschlag, D., Cane, D. E., Walsh, C. T., (2014), "Assembly line polyketide synthases: mechanistic insights and unsolved problems." *Biochemistry*, **53**, 2875-2883.
- Khosla, C., Tang, Y., Chen, A. Y., Schnarr, N. A. y Cane, D. E., (2007), "Structure and mechanism of the 6-deoxyerythronolide B synthase." *Annu. Rev. Biochem.*, **76**, 195-221.
- Kilbas, B. y Balci, M., (2011), "Recent advances in inositol chemistry: synthesis and applications." *Tetrahedron*, **67**, 2355-2389.
- Kim, C. S., Ji, E. S. y Oh, D. K., (2004), "Characterization of a thermostable recombinant  $\beta$ -galactosidase from *Thermotoga maritima*." *J. Appl. Microbiol.*, **97**, 1006-1014.
- Kim, C. W., Markiewicz, P., Lee, J. J., Schierle, C. F. y Miller, J. H., (1993), "Studies of the hyperthermophile *Thermotoga maritima* by random sequencing of cDNA and genomic libraries. Identification and sequencing of the trpEG (D) operon." *J. Mol. Biol.*, **231**, 960-981.
- Kishore, D., Kundu, S. y Kayastha A. M., (2012), "Thermal, Chemical and pH Induced Denaturation of a Multimeric  $\beta$ -Galactosidase Reveals Multiple Unfolding Pathways." *PLOS One*, **7**, e50380.

- Kitanosono, T. y Kobayashi, S., (2014), "Development of chiral catalysts for Mukaiyama aldol reactions in aqueous media." *Chem Rec.*, **14**, 130-143.
- Klibanov, A. M., (1997), "Why are enzymes less active in organic solvents than in water?" *Trends Biotechnol.*, **15**, 97-101.
- Kluger, R., (1990), "Ionic Intermediates in Enzyme Catalyzed Carbon-Carbon Bond Formation: Patterns, Prototypes, and Proposals." *Chem. Rev.*, **90**, 1151-1169.
- Kobata, A., (1979), "Use of Endo- and Exoglycosidases for Structural Studies of Glycoconjugates." *Anal. Biochem.*, **100**, 1-14.
- Kobayashi, C., Suga, Y., Yamamoto, K., Yomo, T., Ogasahara, K., Yutani, K. y Urabe, I., (1997), "Thermal conversi3n from low- to high-activity forms of catalase I from *Bacillus stearothermophilus*." *J. Biol. Chem.*, **272**, 23011-23016.
- Kobayashi, Y., (2008), "Carbasugars: Synthesis and Functions." In *Glycoscience*, Editado por Fraser-Reid, B. O., Tatsuta, K., Thiem, J.; Springer; 1913-1997.
- Kobori, Y., Myles, D. C. y Whitesides, G. M., (1992), "Substrate-specificity and carbohydrate synthesis using transketolase." *J. Org. Chem.*, **57**, 5899-5907.
- Koeller, K. M. y Wong, C. H., (2000), "Emerging themes in medicinal glycoscience." *Nat. Biotechnol.*, **18**, 835-841.
- K3ksal, M., Jin, Y., Coates, R. M., Croteau, R. y Christianson, D. W., (2011), "Taxadiene synthase structure and evolution of modular architecture in terpene biosynthesis." *Nature*, **469**, 116-120.
- Kolaj-Robin, O., Noor, M. R., O'Kane, S. R., Baymann, F. y Soulimane, T., (2013), "Atypical Features of *Thermus thermophiles* Succinate: Quinone Reductase." *PLoS One*, **8**, e53559.
- Kriebel, V. K. y Wieland, W. A., (1921), "The properties of oxynitrilase." *J. Am. Chem. Soc.*, **43**, 164-175.

- Kroemer, M, Merkel, I. y Schulz, G. E., (2003), "Structure and catalytic mechanism of L-rhamnulose-1-phosphate aldolase." *Biochemistry*, **42**, 10560-10568.
- Kroemer, M. y Schulz, G. E., (2002), "The structure of L-rhamnulose-1-phosphate aldolase (class II) solved by low-resolution SIR phasing and 20-fold NCS averaging." *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **58**, 824-832.
- Kumar, R., Singh, R. y Kaur, J., (2014), "Combinatorial reshaping of a lipase structure for thermostability: Additive role of surface stabilizing single point mutations." *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, doi: 10.1016/j.bbrc.2014.04.051.
- Kusumoto, Y., Lomakin, A., Teplow, D. B., y Benedek, G. B., (1998), "Temperature dependence of amyloid  $\beta$ -protein fibrillization." *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **95**, 12277-12282.
- La, I. J., Eum, D. Y., Gedi, V., Kim, J., Jeong, B. y Yoon, M. Y., (2009), "Characterization of an extreme thermostable fructose-1,6-bisphosphate aldolase from hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*." *Enzym. Microb. Technol.*, **45**, 261-266.
- Labbé, G., de Groot, S., Rasmusson, T., Milojevic, G., Dmitrienko, G. I. y Guillemette J. G., (2011), "Evaluation of four microbial Class II fructose 1,6-bisphosphate aldolase enzymes for use as biocatalysts." *Protein Expr. Purif.*, **80**, 224-233.
- Lebbink, J. H., Knapp, S., van der Oost, J., Rice, D., Ladenstein, R. y de Vos, W. M., (1999), "Engineering activity and stability of *Thermotoga maritima* glutamate dehydrogenase. II: construction of a 16-residue ion-pair network at the subunit interface." *J. Mol. Biol.*, **289**, 357-69.
- Lee, C. C., Hu, Y. y Ribbe, M. W., (2010), "Vanadium nitrogenase reduces CO." *Science*, **329**, 642.
- Lee, C. C., Hu, Y. y Ribbe, M. W., (2011) "Tracing the hydrogen source of hydrocarbons formed by vanadium nitrogenase." *Angew. Chem.*, **123**, 5659-5661; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **50**, 5545-5547.

- Lee, C. C., Hu, Y. y Ribbe, M. W., (2012), "ATP-Independent Formation of Hydrocarbons Catalyzed by Isolated Nitrogenase Cofactors" *Angew. Chem.*, **124**, 1983-1985; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **51**, 1947-1949.
- Lee, J. H., Bae, J., Kim, D., Choi, Y., Im, Y. J., Koh, S., Kim, J. S., Kim, M. K., Kang, G. B., Hong, S. I., Lee, D. S. y Eom, S. H., (2006), "Stereoselectivity of fructose-1,6-bisphosphate aldolase in *Thermus caldophilus*." *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **347**, 616-625.
- Lees, W. J. y Whitesides, G. M., (1993), "Diastereoselectivity (enantioselectivity) of aldol condensations catalyzed by rabbit muscle aldolase at C-2 of RCHOHCHO if R has an appropriately placed negatively charged group." *J. Org. Chem.*, **58**, 1887-1894.
- Lehwald, P., Richter, M., Röhr, C., Liu, H. W. y Müller, M., (2010), "Enantioselective Intermolecular Aldehyde-Ketone Cross-Coupling through an Enzymatic Carbonylation Reaction" *Angew. Chem.*, **122**, 2439-2442; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **49**, 2389-2392.
- Leutbecher, H., Hajdok, S., Braunberger, C., Neumann, M., Mika, S., Conrad, J. y Beifuss, U., (2009), "Combined action of enzymes: the first domino reaction catalyzed by *Agaricus bisporus*." *Green Chem.*, **11**, 676-679.
- Levisson, M., Han, G. W., Deller, M. C., Xu, Q., Biely, P., Hendriks, S., Ten Eyck, L. F., Flensburg, C., Roversi, P., Miller, M. D., McMullan, D., von Delft, F., Kreuzsch, A., Deacon, A. M., van der Oost, J., Lesley, S. A., Elsliger, M. A., Kengen, S. W. y Wilson, I. A., (2012), "Functional and structural characterization of a thermostable acetyl esterase from *Thermotoga maritima*." *Proteins*, **80**, 1545-1559.
- Li, C., Zhou, Y. J., Wang, N., Feng, X. W., Li, K. y Yu, X. Q., (2010), "Promiscuous protease-catalyzed aldol reactions: a facile biocatalytic protocol for carbon-carbon bond formation in aqueous media." *J. Biotechnol.*, **150**, 539-545.
- Li, W. F., Zhou, X. X. y Lu, P., (2005), "Structural features of thermozymes." *Biotechnol. Adv.*, **23**, 271-281.

- Li, Z., Cai, L., Qi, Q., Styslinger, T. J., Zhao, G. y Wang, P. G., (2011), "Synthesis of rare sugars with L-fuculose-1-phosphate aldolase (FucA) from *Thermus thermophilus* HB8." *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **21**, 5084-5087.
- Liang, P. H., (2009), "Reaction kinetics, catalytic mechanisms, conformational changes, and inhibitor design for prenyltransferases." *Biochemistry*, **48**, 6562-6570.
- Liebl, W., Brem, D. y Gotschlich, A., (1998), "Analysis of the gene for  $\beta$ -fructosidase (invertase, inulinase) of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*, and characterisation of the enzyme expressed in *Escherichia coli*." *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **50**, 55-64.
- Lillelund, V. H., Jensen, H. H., Liang, X. y Bols, M., (2002), "Recent developments of transition-state analogue glycosidase inhibitors of non-natural product origin." *Chem. Rev.*, **102**, 515-553.
- Lingen, B., Kolter Jung, D., Dünkemann, P., Feldmann, R., Grötzinger, J., Pohl, M. y Müller, M., (2003), "Alteration of the substrate specificity of benzoylformate decarboxylase from *Pseudomonas putida* by directed evolution." *ChemBioChem*, **4**, 721-726.
- Littlechild, J. A., Guy, J., Connelly, S., Mallett, L., Waddell, S., Rye, C. A., Line, K. y Isupov, M., (2007), "Natural methods of protein stabilization: thermostable biocatalysts." *Biochem. Soc. Trans.*, **35**, 1558-1563.
- Liu, J. Q., Dairi, T., Itoh, N., Kataoka, M., Shimizu, S. y Yamada, H., (2000), "Diversity of microbial threonine aldolases and their application." *J. Mol. Catal. B*, **10**, 107.
- Liu, K. K. C., Kajimoto, T., Chen, L., Zhong, Z., Ichikawa, Y. y Wong, C. H., (1991), "Use of dihydroxyacetone phosphate-dependent aldolases in the synthesis of deoxyazasugars." *J. Org. Chem.*, **56**, 6280-6289.
- Lodge, E. P. y Heathcock, C. H., (1987), "Acyclic stereoselection .40. Steric effects, as well as sigma-star-orbital energies, are important in diastereoface differentiation in additions to chiral aldehydes." *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 3353-3361.

- Lopez, G., (1999), "DNA supercoiling and temperature adaptation: a clue to early diversification of life." *J. Mol. Evol.*, **46**, 439-452.
- López-Iglesias, M., Busto, E., Gotor, V. y Gotor-Fernández, V., (2011), "Use of Protease from *Bacillus licheniformis* as Promiscuous Catalyst for Organic Synthesis: Applications in C-C and C-N Bond Formation Reactions" *Adv. Synth. Catal.*, **353**, 2345-2353.
- Lu, W., Chen, P. y Lin, G., (2008), "New stereoselective synthesis of thiamphenicol and florfenicol from enantiomerically pure cyanohydrin: a chemo-enzymatic approach." *Tetrahedron*, **64**, 7822-7827.
- Ma, S. K., Gruber, J., Davis, C., Newman, L., Gray, D., Wang, A., Grate, J., Huisman, G. W. y Sheldon, R. A., (2010) "A green-by-design biocatalytic process for atorvastatin intermediate." *Green Chem.*, **12**, 81-86.
- Ma, Y. H., Lv, D. Q., Zhou, S., Lai, D.Y., Chen, Z. M., (2013), "Characterization of an aldo-keto reductase from *Thermotoga maritima* with high thermostability and a broad substrate spectrum." *Biotechnol. Lett.*, **35**, 757-762.
- Machajewski, T. D. y Wong, C. H., (2000), "The catalytic asymmetric aldol reaction." *Angew. Chem. Int. Ed.*, **39**, 1352-1375.
- Mahajan, G. B. y Balachandran, L., (2012), "Antibacterial agents from actinomycetes - a review." *Front. Biosci.*, **4**, 240-253.
- Mahlert, C., Kopp, F., Thirlway, J., Micklefield, J. y Marahiel, M. A., (2007), "Stereospecific enzymatic transformation of alpha-ketoglutarate to (2S,3R)-3-methyl glutamate during acidic lipopeptide biosynthesis." *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 12011-12018.
- Mahmud, T., (2003), "The C<sub>7</sub>N aminocyclitol family of natural products" *Nat. Prod. Rep.*, **20**, 137-166.
- Mahmud, T., (2009), "Progress in aminocyclitol biosynthesis." *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **13**, 161-170.
- Mahrwald, R., (2013), "Organocatalytic methods for C-C bond formation." *Drug Discov. Today Technol.*, **10**, 29-36.

- Malleron, A. y David, S., (1996), "An enzymatic approach to sequence 12-20 of amphotericin B." *New J. Chem.*, **20**, 153-159.
- Marco-Ramell, A., Miller, I., Nöbauer, K., Möglinger, U., Segalés, J., Razzazi-Fazeli, E., Kolarich, D. y Bassols A., (2014), "Proteomics on porcine haptoglobin and IgG/IgA show protein species distribution and glycosylation pattern to remain similar in PCV2-SD infection." *J. Proteomics*, **14**, 205-216.
- Marsh, E. N. G., Patterson, D. P. y Li, L., (2010), "Adenosyl Radical: Reagent and Catalyst in Enzyme Reactions." *ChemBioChem*, **11**, 604-621.
- Martín del Campo, J. S., Chun, Y., Kim, J. E., Patiño, R. y Zhang, Y. H., (2013), "Discovery and characterization of a novel ATP/polyphosphate xylulokinase from a hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*." *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **40**, 661-669.
- Masamune, S., Choy, W., Petersen, J. S. y Sita, L. R., (1985), "Double asymmetric synthesis and new strategy for stereochemical control in organic-synthesis". *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.*, **24**, 1-30.
- Mayr, L. M., Landt, O., Hahn, U. y Schmidt, F. X., (1993), "Stability and folding kinetics of ribonuclease T1 are strongly altered by the replacement of cis-proline 39 with alanine." *J. Mol. Biol.*, **231**, 897-912.
- McCarthy, J. K., O'Brien, C. E. y Eveleigh, D. E., (2003), "Thermostable continuous coupled assay for measuring glucose using glucokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase from the marine hyperthermophile *Thermotoga maritima*." *Anal. Biochem.*, **318**, 196-203.
- Melendez-Hevia, E., Waddell, T. G. y Shelton, E. D., (1993), "Optimization of molecular design in the evolution of metabolism: the glycogen molecule." *Biochem. J.*, **295**, 477-483.
- Merkler, D. J., Farrington, G. K. y Wedler, F. C., (1981), "Protein thermostability. Correlations between calculated macroscopic parameters and growth temperature for closely related thermophilic and mesophilic bacilli." *Int. J. Pept. Protein Res.*, **18**, 430-442.

- Merz, A., Knöchel, T., Jansonius, J. N. y Kirschner, K., (1999), "The hyperthermostable indoleglycerol phosphate synthase from *Thermotoga maritima* is destabilized by mutational disruption of two solvent-exposed salt bridges." *J. Mol. Biol.*, **288**, 753-763.
- Miller, S. L. y Lazcano, A., (1995), "The origin of life —did it occur at high temperatures?" *J. Mol. Evol.*, **41**, 689-692.
- Mlynarski, J. y Paradowska, J., (2008), "Catalytic asymmetric aldol reactions in aqueous media." *Chem. Soc. Rev.*, **37**, 1502-1511.
- Montaser, R. y Luesch, H., (2011), "Marine natural products: a new wave of drugs?" *Future Med. Chem.*, **3**, 1475-1489.
- Monterde, M. I., Nazabadioko, S., Rebolledo, F., Brieva, R. y Gotor, V., (1999), "Chemoenzymatic synthesis of azacycloalkan-3-ols." *Tetrahedron: Asymmetry*, **10**, 3449-3455.
- Morita, H., Yamashita, M., Shi, S. P., Wakimoto, T., Kondo, S., Kato, R., Sugio, S., Kohn, T. y Abe I., (2011), "Synthesis of unnatural alkaloid scaffolds by exploiting plant polyketide synthase." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 13504-13509.
- Mrabet, N. T., Van den Broeck, A., Van den brande, I., Stanssens, P., Laroche, Y., Lambeir, A. M., Matthijssens, G., Jenkins, J., Chiadmi, M., van Tilbeurgh, H., Rey, F., Janin, J., Quax, W. J., Lasters, I., De Mayer, M. y Wodak, S. J., (1992), "Arginine residues as stabilizing elements in proteins." *Biochemistry*, **31**, 2239-2253.
- Mukaiyama, T., (1982), "Synthetic control leading to natural-products." *ACS Symposium Series*, **185**, 21-36.
- Müller, M., (2012), "Recent Developments in Enzymatic Asymmetric C-C Bond Formation" *Adv. Synth. Catal.*, **354**, 3161-3174.
- Müller, M., Gocke, D. y Pohl, M., (2009), "Thiamin diphosphate in biological chemistry: exploitation of diverse thiamin diphosphate-dependent enzymes for asymmetric chemoenzymatic synthesis." *FEBS J.*, **276**, 2894-2904.

- Myles, D. C., Andrulis, P. J. III y Whitesides, G. M., (1991), "A transketolase-based synthesis of (+)-exo-brevicomín." *Tetrahedron Lett.*, **32**, 4835-4838.
- Nakahara, K., Yamamoto, H., Miyake, C. y Yokota, A., (2003), "Purification and characterization of class-I and class-II fructose-1,6-bisphosphate aldolases from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803." *Plant Cell Physiol.*, **44**, 326-333.
- Navarra, C., Goodwin, C., Burton, S., Danieli, B. y Riva, S., (2010), "Laccase mediated oxidation of phenolic derivatives." *J. Mol. Catal. B Enzym.*, **65**, 52-57.
- Nestl, B. M., Hammer, S. C., Nebel, B. A. y Hauer, B., (2014), "New Generation of Biocatalysts for Organic Synthesis." *Angew. Chem. Int. Ed.*, **53**, 2-28.
- Niehaus, F., Bertoldo, C., Kähler, M. y Antranikian, G., (1999), "Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application." *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **51**, 711-729.
- Nonaka, Y., Aizawa, T., Akieda, D., Yasui, M., Watanabe, M., Watanabe, N., Tanaka, I., Kamiya, M., Mizuguchi, M., Demura, M. y Kawano, K., (2008), "Spontaneous asparaginyl deamidation of canine milk lysozyme under mild conditions." *Proteins*, **72**, 313-322.
- Numata, K., Hayashi-Iwasaki, Y., Kawaguchi, J., Sakurai, M., Moriyama, H., Tanaka, N. y Oshima, T., (2001), "Thermostabilization of a chimeric enzyme by residue substitutions: four amino acid residues in loop regions are responsible for the thermostability of *Thermus thermophilus* isopropylmalate dehydrogenase." *Biochim. Biophys. Acta*, **1545**, 174-83.
- Ocejo, M., Carrillo, L., Vicario, J. L., Badía, D. y Reyes, E., (2011), "Role of pseudoephedrine as chiral auxiliary in the "acetate-type" aldol reaction with chiral aldehydes; asymmetric synthesis of highly functionalized chiral building blocks." *J. Org. Chem.*, **76**, 460-470.
- Ogawa, S., (1998) "Synthetic studies on glycosidase inhibitors composed of 5  $\alpha$ -carba-sugars." In *Carbohydrate Mimics: Concepts and Methods*. Editado por Chapleur, Y.; Wiley-VCH; 87-106.

- Ogawa, S., Ohishi, Y., Asada, M., Tomoda, A., Takahashi, A., Ooki, Y., Mori, M., Itoh, M. y Korenaga, T., (2004), "Convenient synthesis of (+)-valiolamine and (-)-1-epi-valiolamine from (-)-vibo-quercitol." *Org. Biomol. Chem.*, **3**, 884-889.
- Ogura, K. y Koyama, T., (1998), "Enzymatic Aspects of Isoprenoid Chain Elongation." *Chem. Rev.*, **98**, 1263-1276.
- Oikawa, H. y Tokiwano, T., (2004), "Enzymatic catalysis of the Diels-Alder reaction in the biosynthesis of natural products." *Nat. Prod. Rep.*, **21**, 321-352.
- Okumiya, T., Kroos, M. A., Vliet, L. V., Takeuchi, H., Van der Ploeg, A. T. y Reuser, A. J., (2007), "Chemical chaperones improve transport and enhance stability of mutant alphasglucosidases in glycogen storage disease type II." *Mol. Genet. Metab.*, **90**, 49-57.
- Oroz-Guinea, I., Sánchez-Moreno, I., y García-Junceda, E., (2012), "Aldolase based multi-enzyme system for carbon-carbon bond formation." In *Practical Methods in Biocatalysis and Biotransformations*. Editado por Whittall J, Sutton P.; John Wiley & Sons; 323-331.
- Osipiuk, J., Cuff, M. E., Korolev, O., Skarina, T., Savchenko, A., Edwards, A. y Joachimiak, A., (2003), PDB:1PVT
- Ostendorp, R., Auerbach, G. y Jaenicke, R., (1996), "Extremely thermostable L(+)-lactate dehydrogenase from *Thermotoga maritima*: Cloning, characterization, and crystallization of the recombinant enzyme in its tetrameric and octameric state." *Protein Science*, **5**, 862-873.
- Palomo, C., Oiarbide, M. y García, J. M., (2004), "Current progress in the asymmetric aldol addition reaction." *Chem. Soc. Rev.*, **33**, 65-75.
- Park, C. H., Yeom, S. J., Lim, Y. R., Kim, Y. S. y Oh, D. K., (2010), "Characterization of a recombinant thermostable L-rhamnose isomerase from *Thermotoga maritima* ATCC 43589 and its application in the production of L-lyxose and L-mannose." *Biotechnol. Lett.*, **32**, 1947-1953.

- Patel, R. N., (2011), "Biocatalysis: Synthesis of Key Intermediates for Development of Pharmaceuticals." *ACS Catalysis*, **1**, 1056-1074.
- Pelton J. T. y McLean, L. R., (2000), "Spectroscopic methods for analysis of protein secondary structure." *Anal. Biochem.*, **277**, 167-176.
- Perkins, D. N., Pappin, D. J. C., Creasy, D. M. y Cottrell, J. S., (1999), "Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data." *Electrophoresis*, **20**, 3551-3567.
- Phung, A. N., Zannetti, M. T., Whited, G. y Fessner, W. D., (2003), "Stereospecific biocatalytic synthesis of pancratistatin analogues." *Angew. Chem. Int. Ed.*, **42**, 4821-4824.
- Pickl, A., Johnsen, U. y Schönheit, P. (2012), "Fructose degradation in the haloarchaeon *Haloferax volcanii* involves a bacterial type phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system, fructose-1-phosphate kinase, and class II fructose-1,6-bisphosphate aldolase." *J. Bacteriol.*, **194**, 3088-3097.
- Pidot, S., Ishida, K., Cyrulies, M. y Hertweck C., (2014), "Discovery of Clostrubin, an Exceptional Polyphenolic Polyketide Antibiotic from a Strictly Anaerobic Bacterium." *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, doi: 10.1002/anie.201402632.
- Pohnert, G., (2001), "Diels-Alderases." *ChemBioChem*, **2**, 873-875.
- Purkarthofer, T., Skranc, W., Schuster, C. y Griengl, H., (2007), "Potential and capabilities of hydroxynitrile lyases as biocatalysts in the chemical industry." *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **76**, 309-320.
- Racker, E., (1961), "The Enzymes." **5**. *Academic Press*, New York.
- Rahman, M., Bhuiyan, S. H., Nirasawa, S., Kitaoka, M. y Hayashi, K., (2002), "Characterization of an endo- $\beta$ -1,4-glucanase of *Thermotoga maritima* expressed in *Escherichia coli*." *J. Appl. Glycosci.*, **49**, 487-495.
- Razvi A. y Scholtz, J. M., (2006), "Lessons in stability from thermophilic proteins." *Prot. Sci.*, **15**, 1569-1578.

- Reed, C. J., Lewis, H., Trejo, E., Winston, V. y Evilia, C., (2013), "Protein adaptations in archaeal extremophiles." *Archaea*, **2013**, 373-375.
- Rehaber, V. y Jaenicke, R., (1992), "Stability and reconstitution of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from hyperthermophilic eubacterium *Thermotoga maritima*." *J. Biol. Chem.*, **267**, 10999-11006.
- Resch, V., Schrittwieser, J. H., Siirola, E. y Kroutil, W., (2011a), "Novel carbon-carbon bond formations for biocatalysis." *Curr. Opin. Biotechnol.*, **22**, 793-799.
- Resch, V., Schrittwieser, J. H., Wallner, S., Macheroux, P. y Kroutil, W. (2011b), "Biocatalytic Oxidative C—C Bond Formation Catalysed by the Berberine Bridge Enzyme: Optimal Reaction Conditions." *Adv. Synth. Catal.*, **353**, 2377-2383.
- Riley, M., Abe, T., Arnaud, M. B., Berlyn, M. K., Blattner, F. R., Chaudhuri, R. R., Glasner, J. D., Horiuchi, T., Keseler, I. M., Kosuge, T., Mori, H., Perna, N. T., Plunkett, G., Rudd, K. E., Serres, M. H., Thomas, G. H., Thomson, N. R., Wishart, D. y Wanner, B.L., (2006), "*Escherichia coli* K-12: a cooperatively developed annotation." *Nucleic Acids Res.*, **34**, 1-9.
- Ritzen, B., Hoekman, S., Verdasco, E. D., van Delft, F. L. y Rutjes, F. P., (2010), "Enantioselective chemoenzymatic synthesis of cis- and trans-2,5-disubstituted morpholines." *J. Org. Chem.*, **75**, 3461-3464.
- Rivkin, A., Chou, T. C. y Danishefsky, S. J., (2005), "On the Remarkable Antitumor Properties of Fludelone: How We Got There." *Angew. Chem.*, **117**, 2898-2910; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **44**, 2838-2850.
- Roberge, C., Fleitz, F., Pollard, D. y Devine, P., (2007), "Asymmetric synthesis of cyanohydrin derived from pyridine aldehyde with cross-linked aggregates of hydroxynitrile lyases." *Tetrahedron Lett.*, **48**, 1473-1477.
- Rodionova, I. A., Scott, D. A., Grishin, N. V., Osterman, A. L. y Rodionov, D. A., (2012), "Tagaturonate-fructuronate epimerase UxaE, a novel enzyme in the hexuronate catabolic network in *Thermotoga maritima*." *Environ. Microbiol.*, **14**, 2920-34.

- Rosche, B., Sandford, V., Breuer, M., Hauer, B. y Rogers, P. L., (2002), "Enhanced production of *R*-phenylacetylcarbinol (R-PAC) through enzymatic biotransformation." *J. Mol. Catal. B Enzym.*, **19**, 109-115.
- Roy, I., Mukherjee, J. y Gupta, M. N., (2013), "High activity preparations of lipases and proteases for catalysis in low water containing organic solvents and ionic liquids." *Methods Mol. Biol.*, **1051**, 275-284.
- Saelensminde, G., Halskau, Ø. Jr. y Jonassen I., (2009), "Amino acid contacts in proteins adapted to different temperatures: hydrophobic interactions and surface charges play a key role." *Extremophiles*, **13**, 11-20.
- Sagui, F., Chirivì, C., Fontana, G., Nicotra, S., Passarella, D., Riva, S. y Danieli, B., (2009), "Laccase-catalyzed coupling of catharanthine and vindoline: an efficient approach to the bisindole alkaloid anhydrovinblastine." *Tetrahedron*, **65**, 312-317.
- Saleh, O., Haagen, Y., Seeger, K. y Heide, L., (2009), "Prenyl transfer to aromatic substrates in the biosynthesis of aminocoumarins, meroterpenoids and phenazines: the ABBA prenyltransferase family." *Phytochemistry*, **70**, 1728-1738.
- Samland, A. K. y Sprenger, G. A., (2006), "Microbial aldolases as C-C bonding enzymes: unknown treasures and new developments." *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **71**, 253-264.
- Sánchez-Moreno, I., (2009), "Dihidroxiacetona quinasa de *Citrobacter freundii* CECT 4626. Una aproximación integral a un nuevo biocatalizador para la formación de enlaces C-C." Tesis Doctoral. *Universidad Autónoma de Madrid*.
- Sánchez-Moreno, I., García-García, J. F., Bastida, A. y García-Junceda, E., (2004), "Multienzyme system for dihydroxyacetone phosphate-dependent aldolase catalyzed C-C bond formation from dihydroxyacetone." *Chem Commun.*, 1634-1635.
- Sánchez-Moreno, I., Hélaine, V., Poupard, N., Charmantray, F., Légeret, B., Hecquet, L., García-Junceda, E., Wohlgemuth, R., Guérard-Hélaine, C. y

- Lemaire, M., (2012), "One-pot cascade reactions using fructose-6-phosphate aldolase: efficient synthesis of d-arabinose 5-phosphate, d-fructose-6-phosphate and analogues." *Adv. Synth. Catal.*, **354**, 1725-1730.
- Sánchez-Moreno, I., Iturrate, L., García-Doyagüez, E., Martínez, J. A., Fernández-Mayoralas, A. y García-Junceda, E., (2009a), "Activated  $\alpha,\beta$ -Unsaturated Aldehydes as Substrate of Dihydroxyacetone Phosphate (DHAP)-Dependent Aldolases in the Context of a Multienzyme System" *Adv. Synth. Catal.*, **351**, 2967-2975.
- Sánchez-Moreno, I., Iturrate, L., Martín-Hoyos, R., Jimeno, M. L., Mena, M., Bastida, A. y García-Junceda, E., (2009b), "From kinase to cyclase: an unusual example of catalytic promiscuity modulated by metal switching." *ChemBioChem*, **10**, 225-229.
- Sandman, K., Grayling, A. R., Dobrinski, B., Lury, R. y Reeve, J. N., (1994), "Growth-phase-dependent synthesis of histones in the archaeon *Methanothermus fevidus*." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 12624-12628.
- Saotome, C., Wong, C. H. y Kanie, O., (2001), "Combinatorial library of five-membered iminocyclitol and the inhibitory activities against glycoenzymes." *Chem. Biol.*, **8**, 1061-1070.
- Sauvé, V. y Sygusch, J., (2001), "Molecular Cloning, Expression and Characterization of Fructose-1,6-bisphosphate Aldolase from *Thermus aquaticus*." *Protein Expr. Purif.*, **21**, 293-302.
- Savchenko, A., Vieille, C. y Zeikus. J. G., (2001), " $\alpha$ -Amylases and amylopullulanase from *Pyrococcus furiosus*." *Methods Enzymol.*, **330**, 354-363.
- Sawada, H. y Takagi, Y., (1964), "The metabolism of L-rhamnose in *Escherichia coli*." *Biochim. Biophys. Acta*, **92**, 26-32.
- Say, R. F., y Fuchs, G., (2011), "Fructose 1,6-bisphosphate aldolase/phosphatase may be an ancestral gluconeogenic enzyme." *Nature*, **464**, 1077-1081.

- Schneider, S., Sandalova, T., Schneider, G., Sprenger, G. A. y Samland, A. K., (2008), "Replacement of a phenylalanine by a tyrosine in the active site confers fructose 6-phosphate aldolase activity to the transaldolase of *Escherichia coli* and human origin." *J. Biol. Chem.*, **283**, 30064-30072.
- Schoevaart, R., van Rantwijk, F. y Sheldon, R. A., (2001), "Facile enzymatic aldol reactions with dihydroxyacetone in the presence of arsenate." *J. Org. Chem.*, **66**, 4559-4562.
- Schrittwieser, J. H., Resch, V., Sattler, J., Lienhart, W. D., Durchschein, K., Winkler, A., Gruber, K., Macheroux, P. y Kroutil, W., (2011a), "Biocatalytic enantioselective oxidative C–C coupling by aerobic C–H activation." *Angew. Chem. Int. Ed.*, **50**, 1068-1071.
- Schrittwieser, J. H., Resch, V., Wallner, S., Lienhart, W. D., Sattler, J. H., Resch, J., Macheroux, P. y Kroutil, W., (2011b), "Biocatalytic Organic Synthesis of Optically Pure (S)-Scoulerine and Berbine and Benzylisoquinoline Alkaloids." *J. Org. Chem.*, **76**, 6703-6714.
- Schultz, M., Waldmann, H., Vogt, W. y Kunz, H., (1990), "Stereospecific C-C bond formation with rabbit muscle aldolase: a chemoenzymatic synthesis of (+)-exo-brevicomine." *Tetrahedron Lett.*, **31**, 867-868.
- Schümperli, M., Pellaux, R. y Panke, S., (2007), "Chemical and enzymatic routes to dihydroxyacetone phosphate." *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **75**, 33-45.
- Schürmann, M. y Sprenger, G. A., (2001), "Fructose-6-phosphate aldolase is a novel class I aldolase from *Escherichia coli* and is related to a novel group of bacterial transaldolases." *J. Biol. Chem.*, **276**, 11055-11061.
- Schütz, A., Golbik, R., König, S., Hübner, G. y Tittmann, K., (2005), "Intermediates and Transition States in Thiamin Diphosphate-Dependent Decarboxylases. A Kinetic and NMR Study on Wild-Type Indolepyruvate Decarboxylase and Variants Using Indolepyruvate, Benzoylformate, and Pyruvate as Substrates" *Biochemistry*, **44**, 6164-6179.

- Schwartz, N. B. y Feingold, D. S., (1972), "L-Rhamnulose-1-phosphate Aldolase from *Escherichia coli*. III. The Role of Divalent Cations in Enzyme Activity." *Bioinorg. Chem.*, **2**, 75-86.
- Seisser, B., Zinkl, R., Gruber, K., Kaufmann, F., Hafner, A. y Kroutil, W., (2010), "Cutting Long Syntheses Short: Access to Non-Natural Tyrosine Derivatives Employing an Engineered Tyrosine Phenol Lyase." *Adv. Synth. Catal.*, **352**, 731-736.
- Sellek, G. A. y Chaudhuri, J. B., (1999), "Biocatalysis in organic media using enzymes from extremophiles." *Enz. Microb. Techn.*, **25**, 471-482.
- Seoane, G., (2000), "Enzymatic C-C bond-forming reactions in organic synthesis." *Curr. Org. Chem.*, **4**, 283-304.
- Serdakowski, A. L. y Dordick, J. S., (2008), "Enzyme activation for organic solvents made easy." *Trends Biotechnol.*, **26**, 48-54.
- Shaeri, J., Wright, I., Rathbone, E. B., Wohlgemuth, R. y Woodley, J. M., (2008), "Characterization of enzymatic D-xylulose 5-phosphate synthesis." *Biotechnol. Bioeng.*, **101**, 761-767.
- Sharon, N. y Lis, H., (1989), "Lectins as cell recognition molecules." *Science*, **246**, 227-234.
- Sharon, N. y Lis, H., (1993), "Carbohydrates in cell recognition." *Sci. Am.*, **268**, 82-89.
- Sheldon, R. A. y van Rantwijk, F., (2004), "Biocatalysis for sustainable organic synthesis." *Aust. J. Chem.*, **57**, 281-289.
- Shiina, I., (2014), "Asymmetric Mukaiyama aldol reactions using chiral diamine-coordinated Sn(II) triflate: development and application to natural product synthesis." *Chem Rec.*, **14**, 144-183.
- Shimagaki, M., Muneshima, H., Kubota, M. y Oishi, T., (1993), "Chemoenzymatic carbon-carbon bond formation leading to non-carbohydrate derivative: stereoselective synthesis of pentamycin C-11-C-16 fragment." *Chem. Pharm. Bull.*, **41**, 282-286.

- Siddiqui, M. A., Fujiwara, S., Takagi, M. e Imanaka, T., (1998), "In vitro heat effect on heterooligomeric subunit assembly of thermostable indolepyruvate ferredoxin oxidoreductase." *FEBS Lett.*, **434**, 372-376.
- Siebers, B., Brinkmann, H., Dorr, C., Tjaden, B., Lilie, H., van der Oost, J. y Verhees, C. H. (2001), "Archaeal fructose-1,6-bisphosphate aldolases constitute a new family of archaeal type class I aldolase." *J. Biol. Chem.*, **276**, 28710-28718.
- Siegel, J. B., Zanghellini, A., Lovick, H. M., Kiss, G., Lambert, A. R., St. Clair, J. L., Gallaher, J. L., Hilvert, D., Gelb, M. H., Stoddard, B. L., Houk, K. N., Michael, F. E., y Baker, D., (2010), "Computational design of an enzyme catalyst for a stereoselective bimolecular Diels-Alder reaction." *Science*, **239**, 309-313.
- Siegert, P., McLeish, M. J., Baumann, M., Iding, H., Kneen, M. M., Kenyon, G. L. y Pohl, M., (2005), "Exchanging the substrate specificities of pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis* and benzoylformate decarboxylase from *Pseudomonas putida*." *Protein Eng. Des. Sel.*, **18**, 345-357.
- Siemer, C., Aspland, S. E., Mhaka, A. M. y Goeiet, P., (2010), "Production of isoprene photosynthetically by a recombinant *Thermosynchococcus elongatus* strain expressing poplar isoprene synthase." WO 2010099550.
- Sims, P. A. y Reed, G. H., (2005), "Method for the enzymatic synthesis of 2-phospho-D-glycerate from adenosine 5'-triphosphate and D-glycerate via D-glycerate-2-kinase." *J. Mol. Catal. B. Enzym.*, **32**, 77-81.
- Singh, S., Zhang, J., Huber, T. D., Sunkara, M., Hurley, K., Goff, R. D., Wang, G., Zhang, W., Liu, C., Rohr, J., Van Lanen S. G., Morris A. J. y Thorson J. S., (2014), "Facile Chemoenzymatic Strategies for the Synthesis and Utilization of S-Adenosyl-L-Methionine Analogues" *Angew. Chem.*, **53**, 3965-3969.
- Sofia, H. J., Chen, G., Hetzler, B. G., Reyes-Spindola, J. F. y Miller, N. E., (2001), "Radical SAM, a novel protein superfamily linking unresolved steps in familiar biosynthetic pathways with radical mechanisms: functional

- characterization using new analysis and information visualization methods." *Nucleic Acids Res.*, **29**, 1097-1106.
- Song, S. H., Ahluwalia, N., Leduc, Y., Delbaere, L. T. y Vieille, C., (2008), "Thermotoga maritima TM0298 is a highly thermostable mannitol dehydrogenase." *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **81**, 485-95.
- Sreerama, N. y Woody R. W., (2000), "Estimation of Protein Secondary Structure from Circular Dichroism Spectra: Comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR Methods with an Expanded Reference Set." *Anal. Biochem.*, **287**, 252-260.
- Srere, P., Cooper, J. R., Tabachnick, M. y Racker, E., (1958), "The oxidative pentose phosphate cycle. I. Preparation of substrates and enzymes." *Arch. Bioch. Biophys.*, **74**, 295-305.
- Stecher, H., Tengg, M., Ueberbacher, B. J., Remler, P., Schwab, H., Griengl, H. y Gruber-Khadjawi, M., (2009), "Biocatalytic Friedel–Crafts Alkylation Using Non-natural Cofactors" *Angew. Chem.*, **121**, 9710-9712; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **48**, 9546-9548.
- Steinreiber, J., Fesko, K., Reisinger, C., Schürmann, M., van Assema, F., Wolberg, M., Mink, D. y Griengl, H., (2007a), "Threonine aldolases—an emerging tool for organic synthesis." *Tetrahedron*, **63**, 918-926.
- Steinreiber, J., Schürmann, M., van Assema, F., Wolberg, M., Fesko, K., Reisinger, C., Mink, D. y Griengl, H., (2007b), "Synthesis of Aromatic 1,2-Amino Alcohols Utilizing a Biezymatic Dynamic Kinetic Asymmetric Transformation." *Adv. Synth. Catal.*, **349**, 1379-1386.
- Steinreiber, J., Schürmann, M., Wolberg, M., van Assema, F., Reisinger, C., Fesko, K., Mink, D. y Griengl, H., (2007c), "Overcoming Thermodynamic and Kinetic Limitations of Aldolase-Catalyzed Reactions by Applying Multienzymatic Dynamic Kinetic Asymmetric Transformations." *Angew. Chem. Int. Ed.*, **46**, 1624-1626.
- Stelzer, U. y Effenberger, F., (1993), "Preparation of (S)-fluoronitriles" *Tetrahedron: Asymmetry*, **4**, 161-164.

- Sterner, R., Kleemann, G. R., Szadkowski, H., Lustig, A., Hennig, M. y Kirschner, K., (1996), "Phosphoribosyl anthranilate isomerase from *Thermotoga maritima* is an extremely stable and active homodimer." *Protein Sci.*, **5**, 2000-2008.
- Stetter, K. O., (2006), "History of discovery of the first hypertermophiles." *Extremophiles*, **10**, 357-362.
- Sugimoto, S., y Nosoh, Y., (1971), "Thermal properties of fructose-1,6-diphosphate aldolase from thermophilic bacteria." *Biochim. Biophys. Acta*, **235**, 210-221.
- Sugiyama, M., Hong, Z., Liang, P. H., Dean, S. M., Whalen, L. J., Greenberg, W. A. y Wong, C. H., (2007), "D-Fructose-6-phosphate aldolase-catalysed one-pot synthesis of iminocyclitols." *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 14811-14817.
- Sugiyama, M., Hong, Z., Whalen, L. J., Greenberg, W. A. y Wong, C. H., (2006), "Borate as a Phosphate Ester Mimic in Aldolase-Catalysed Reactions: Practical Synthesis of L-Fructose and L-Iminocyclitols." *Adv. Synth. Catal.*, **348**, 2555-2559.
- Sukumaran, J. y Hanefeld, U., (2005), "Enantioselective C–C bond synthesis catalysed by enzymes." *Chem. Soc. Rev.*, **34**, 530-542.
- Sun, F., Zhang, X. Z., Myung, S. y Zhang, Y. H., (2012), "Thermophilic *Thermotoga maritima* ribose-5-phosphate isomerase RpiB: optimized heat treatment purification and basic characterization." *Protein Expr. Purif.*, **82**, 302-307.
- Suzuki, Y., (2006), "Beta-galactosidase deficiency: an approach to chaperone therapy." *J. Inherit. Metab. Dis.*, **29**, 471-476.
- Suzuki, Y., (2008), "Chemical chaperone therapy for GM1-gangliosidosis." *CMLS.*, **65**, 351-353.
- Takano, K., Aoi, A., Koga, Y. y Kanaya, S., (2013), "Evolvability of thermophilic proteins from archaea and bacteria." *Biochemistry*, **52**, 4774-4780.
- Takayama, S., Martin, R., Wu, J., Laslo, K., Siuzdak, G. y Wong, C. H., (1997), "Chemoenzymatic Preparation of Novel Cyclic Imine Sugars and Rapid

- Biological Activity Evaluation Using Electrospray Mass Spectrometry and Kinetic Analysis.” *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 8146-8151.
- Tanaka, F., Fuller, R., Shim, H., Lerner, R. A. y Barbas, C. F. III, (2004), “Evolution of aldolase antibodies in vitro: correlation of catalytic activity and reaction-based selection.” *J. Mol. Biol.*, **335**, 1007-1018.
- Tanford, C., (1961), *Physical Chemistry of Macromolecules*, John Wiley.
- Tate, S. S. y Meister, A., (1978), “Serine-borate complex as a transition-state inhibitor of  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase.” *Biochemistry*, **75**, 4806-4809.
- Thomson, G. J., Howlett, G. J., Ashcroft, A. E., Berry, A., (1998), “The dhna gene of *Escherichia coli* encodes a class I fructose bisphosphate aldolase.” *Biochem. J.*, **331**, 345–437.
- Townsend, C. A., (2011), “A Diels-Alderase at Last.” *ChemBioChem*, **12**, 2267-2269.
- Transue, T. R., Krahn, J. M., Gabel, S. A., DeRose, E. F. y London, R. E., (2004), “X-ray and NMR Characterization of Covalent Complexes of Trypsin, Borate, and Alcohols.” *Biochemistry*, **43**, 2829-2839.
- Trapero, A. y Llebaria, A., (2013), “Glucocerebrosidase inhibitors for the treatment of Gaucher disease.” *Future. Med. Chem.*, **5**, 573-590.
- Trofimov, A. A., Slutskaia, E. A., Polyakov, K. M., Dorovatovskii, P. V., Gumerov, V. M. y Popov, V. O., (2012), “Influence of intermolecular contacts on the structure of recombinant prolidase from *Thermococcus sibiricus*.” *Acta Cryst.*, **68**, 1275-1278.
- Trost, B. M. y Dong, G. (2008), “Total synthesis of bryostatin 16 using atom-economical and chemoselective approaches.” *Nature*, **456**, 485-488.
- Trost, B. M., Dumas, J. y Villa, M., (1992), “New Strategies for the Synthesis of Vitamin D Metabolites via Pd-Catalysed Reactions” *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 9836–9845.
- Tuccillo, F. M., de Laurentiis, A., Palmieri, C., Fiume, G., Bonelli, P., Borrelli, A., Tassone, P., Scala, I., Buonaguro, F. M., Quinto, I. y Scala, G., (2014),

- “Aberrant Glycosylation as Biomarker for Cancer: Focus on CD43.” *Biomed. Res. Int.*, **2014**, 742831.
- Unsworth, L. D., van der Oost, J. y Koutsopoulos, S., (2007), “Hyperthermophilic enzymes —stability, activity and implementation strategies for high temperature applications.” *FEBS J.*, **274**, 4044-4056.
- van den Burg, B., (2003), “Extremophiles as a source for novel enzymes.” *Curr. Opin. Microbiol.*, **6**, 213-218.
- van Herk, T., Hartog, A. F., Schoemaker, H. E. y Wever, R., (2006), "Simple enzymatic *in situ* generation of dihydroxyacetone phosphate and its use in a cascade reaction for the production of carbohydrates: Increased efficiency by phosphate cycling." *J. Org. Chem.*, **71**, 6244-6247.
- van Mierlo, C. P. M. y Steensma, E., (2000), “Protein holding and stability investigated by fluorescence, circular dichroism (CD), and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy: the flavodoxin story.” *J. Biotechnol.*, **79**, 281-298.
- Varki, A., (2006), “Nothing in glycobiology makes sense, except in the light of evolution.” *Cell*, **126**, 841-845.
- Vasella, A., Davies, G. J. y Böhm, M., (2002), “Glycosidase mechanisms.” *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **6**, 619-629.
- Verhees, C. H., Kengen, S. W., Tuininga, J. E., Schut, G. J., Adams, M. W., de Vos, W. M. y van der Oost, J., (2003), “The unique features of glycolytic pathways in *Archaea*.” *Biochem. J.*, **375**, 231–246.
- Vieille, C. y Zeikus, G. J., (2001), “Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability.” *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **65**, 1-43.
- Villafranca, J. J. y Axelrod, B., (1971), “Heptulose synthesis from nonphosphorylated aldoses and ketoses by spinach transketolase.” *J. Biol. Chem.*, **246**, 3126-3131.
- Von der Osten, C. H., Sinskey, A. J., Barbas III, C. F., Pederson, R. L., Wang, Y. y Wong, C. H., (1989), “Use of a recombinant bacterial fructose-1,6-

- diphosphate aldolase in aldol reactions: preparative syntheses of 1-deoxynojirimycin, 1-deoxymannojirimycin, 1,4-dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol, and fagomine.” *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 3924-3927.
- Wada, K. y Asano, Y., (2003), “Use of Borate To Control the 5´-Position-Selective Microbial Glucosylation of Pyridoxine.” *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 7058-7062.
- Wagner, J., Lerner, R. A. y Barbas, C. F. III, (1995), “Efficient aldolase catalytic antibodies that use the enamine mechanism of natural enzymes.” *Science*, **270**, 1797-800.
- Wakimoto, T., Mori, T., Morita, H. y Abe I., (2011), “Cytotoxic tetramic acid derivative produced by a plant type-III polyketide synthase.” *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 4746-4749.
- Wang, L., Huan, H., Nguyen, H. H., Allen, K. N., Mariano, P. S. y Dunaway-Mariano, D., (2010), “Divergence of biochemical function in the HAD superfamily: D-glycero-D-manno-heptose-1,7-bisphosphate phosphatase (GmhB).” *Biochemistry*, **49**, 1072-1081.
- Wang, W. y Seah, S. Y. K., (2005), “Purification and biochemical characterization of a pyruvate-specific class II aldolase, HpaI.” *Biochemistry*, **44**, 9447.
- Williams, G. J., Domann, S., Nelson, A. y Berry, A., (2003), “Modifying the stereochemistry of an enzyme-catalyzed reaction by directed evolution.” *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **100**, 3143-3148.
- Wilson, C. J., Apiyo, D. y Wittung-Stafshede, P., (2004), “Role of cofactors in metalloprotein folding.” *Q. Rev. Biophys.*, **7**, 285-314.
- Winkler, A., Lyskowski, A., Riedl, S., Puhl, M., Kutchan, T. M., Macheroux, P. y Gruber, K., (2008), “A concerted mechanism for berberine bridge enzyme.” *Nat. Chem. Biol.*, **4**, 739-741.
- Winkler, A., Puhl, M., Weber, H., Kutchan, T. M., Gruber, K. y Macheroux, P., (2009), “Berberine bridge enzyme catalyzes the six electron oxidation of (S)-reticuline to dehydroscoulerine.” *Phytochemistry*, **70**, 1092-1097.

- Wintrode, P. L. y Arnold, F. H., (2000), "Temperature adaptation of enzymes: lessons from laboratory evolution." *Adv. Protein Chem.*, **55**, 161-225.
- Witayakran, S. y Ragauskas, A. J., (2009), "Cocatalytic enzyme system for the Michael addition reaction of *in-situ*-generated orthoquinones." *Eur. J. Org. Chem.*, 358-363.
- Witayakran, S. y Ragauskas, A. J., (2009), "Synthetic applications of laccase in green chemistry." *Adv. Synth. Catal.*, **351**, 1187-1209.
- Woese, C. R, Kandler, O. y Wheelis, M. L., (1990), "Towards a natural system of organisms: proposal for the domains *archaea*, *bacteria*, and *eucarya*." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 4576-4579.
- Woese, C. R., (1998), "The universal ancestor." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 6854-6859.
- Wohlgemuth, R., (2009), "C2-Ketol elongation by transketolase-catalyzed asymmetric synthesis." *J. Mol. Catal. B*, **61**, 23-29.
- Wolberg, M., Dassen, B. H. N., Schürmann, M., Jennewein, S., Wubbolts, M. G., Schoemaker, H. E. y Min, D., (2008), "Large-Scale Synthesis of New Pyranoid Building Blocks Based on Aldolase-Catalysed Carbon-Carbon Bond Formation." *Adv. Synth. Catal.*, **350**, 1751-1759.
- Wolny, M., (1977), "Effect of Borate on the Catalytic Activities of Muscle Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase." *Eur. J. Biochem.*, **80**, 551-556.
- Wong, C. H, Alajarin, R., Moris-Varas, F., Blanco, O. y García-Junceda E., (1995), "Enzymatic Synthesis of L-Fucose and Analogues." *J. Org. Chem.*, **60**, 7360-7363.
- Wong, C. H. y Whitesides, G. M., (1983), "Synthesis of sugars by aldolase catalyzed condensation reactions." *J. Org. Chem.*, **48**, 3199-3205.
- Wrodnigg, T. M., Steiner, A. J. y Ueberbacher, B. J., (2008), "Natural and synthetic iminosugars as carbohydrate processing enzyme inhibitors for cancer therapy." *Anti-Cancer Agents Med. Chem.*, **8**, 77-85.

- Xu, J., Tian, Y. S., Peng, R. H., Zhu, B., Gao, J.J. y Yao, Q. H., (2012), "Characterization of a thermostable  $\beta$ -glucuronidase from *Thermotoga maritima* expressed in *Arabidopsis thaliana*." *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **95**, 1211-1219.
- Yamamoto, T., Shiraki, K., Fujiwara, S., Takagi, M., Fukui, K. e Imanaka, T., (1999), "In vitro heat effect on functional and conformational changes of cyclodextrin glucanotransferase from hyperthermophilic archaea." *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **265**, 57-61.
- Yang, H., Mu, Y., Chen, H., Xiu, Z. y Yang, T., (2013), "Enzymatic synthesis of feruloylated lysophospholipid in a selected organic solvent medium." *Food Chem.*, **141**, 3317-3322.
- Yang, J., Wang, T., Ding, Z., Shen, Z. y Zhang, Y., (2009), "Highly diastereo- and enantioselective organocatalytic addition of acetone to  $\beta$ -substituted  $\alpha$ -ketoesters via dynamic kinetic resolution." *Org. Biomol. Chem.*, **7**, 2208-2213.
- Yang, W. Y., Larios, E. y Gruebele, M., (2003), "On the extended  $\beta$ -conformation propensity of polypeptides at high temperature." *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 16220-16227.
- Yang, Z., Savchenko, A., Yakunin, A., Zhang, R., Edwards, A., Arrowsmith, C. y Tong, L., (2003), "Aspartate dehydrogenase, a novel enzyme identified from structural and functional studies of TM1643." *J. Biol. Chem.*, **278**, 8804-8808.
- Yeoman, C. J., Han, Y., Dodd, D., Schroeder, C. M., Mackie, R. I. y Cann, I. K., (2010), "Thermostable enzymes as biocatalysts in the biofuel industry." *Adv. Appl. Microbiol.*, **70**, 1-55.
- Yin, W. B., Cheng, J. y Li, S. M., (2009), "Stereospecific synthesis of aszonalenins by using two recombinant prenyltransferases." *Org. Biomol. Chem.*, **7**, 2202-2207.
- Yu, R. K. y Yanagisawa, M., (2007), "Glycosignaling in neural stem cells: involvement of glycoconjugates in signal transduction modulating the neural stem cell fate." *J. Neurochem.*, **103**, 39-46.

- Yurimoto, H., Kato, N. y Sakai, Y., (2005), "Assimilation, dissimilation, and detoxification of formaldehyde, a central metabolic intermediate of methylotrophic metabolism." *Chem. Rec.*, **5**, 367-375.
- Zagalak, B., Frey, P. A., Karabatsos, G. L. y Abeles, R. H., (1966), "The stereochemistry of the conversion of D- and L-1,2-propanediols to propionaldehyde." *J. Biol. Chem.*, **241**, 3028-3035.
- Zandbergen, P., Brussee, J. y van der Gen, A., (1992), "Stereoselective synthesis of  $\beta$ -hydroxy- $\alpha$ -amino acids from chiral cyanohydrins." *Tetrahedron: Asymmetry*, **3**, 769-774.
- Zandvoort, E., Geertsema, E. M., Baas, B. J., Quax, W. J. y Poelarends, G. J., (2012a), "Bridging between Organocatalysis and Biocatalysis: Asymmetric Addition of Acetaldehyde to  $\beta$ -Nitrostyrenes Catalyzed by a Promiscuous Proline-Based Tautomerase." *Angew. Chem.*, **124**, 1266-1269; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **51**, 1240-1243.
- Zandvoort, E., Geertsema, E. M., Quax, W. J. y Poelarends, G. J., (2012b), "Enhancement of the promiscuous aldolase and dehydration activities of 4-oxalocrotonate tautomerase by protein engineering." *ChemBioChem*, **13**, 1274-1277.
- Zgiby, S. M., Thomson, G. J., Qamar, S. y Berry, A., (2000), "Exploring substrate binding and discrimination in fructose-1,6-bisphosphate and tagatose 1,6-bisphosphate aldolases." *Eur. J. Biochem.*, **267**, 1858-1868.
- Zhao, J. y Zhong, C. J., (2009), "A review on research progress of transketolase." *Neurosci. Bull.*, **25**, 94-99.
- Zimmermann, F. T., Schneider, A., Schörken, U., Sprenger, G. y Fessner, W. D., (1999), "Efficient multi-enzymatic synthesis of D-xylulose 5-phosphate." *Tetrahedron: Asymmetry*, **10**, 1643-1646.
- Zou, H. X., Xie, X., Zheng, X. D. y Li, S. M., (2011), "The tyrosine O-prenyltransferase SirD catalyzes O-, N-, and C-prenylations." *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **89**, 1443-1451.



