



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Orgánica**

**Nuevas estrategias para el estudio de glicoconjugados:
glicómica, glicoproteómica.**

Tesis presentada para optar al título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires
Área Química Orgánica

Gustavo Javier Cavallero

Directora de tesis: **Dra. Alicia S. Couto**
Directora Asistente: **Dra. Adriana C. Casabuono**
Consejero de Estudios: **Dra. Alicia S. Couto**

Buenos Aires, 2020

A mis amigos,
por compartir el gran cariño, cuidado
y confianza logrando que todo
sea más fácil

A mi familia,
que son las personas que mas quiero y admiro
por su inmenso e incondicional amor,
apoyo y confianza

A la Dra. Alicia S. Couto,
por confiar en mi, dándome la posibilidad de
desarrollar este gran trabajo de Tesis y por compartir con
tanta generosidad su tiempo, espacio y conocimientos que me
permitieron crecer tanto a nivel profesional como personal

AGRADECIMIENTOS:

A las instituciones y personas que contribuyeron a la realización del presente trabajo de tesis:

Al CONICET, ANPCyT, CIHIDECAR, CEQUIBIEM

Al Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires donde se desarrolló el presente trabajo de Tesis

A la Dra. Couto, por su constante y enorme motivación y su admirable profesionalidad

A la Dra. Casabuono, por los conocimientos compartidos y su buena predisposición.

A mi Familia, por confiar en mi, por su incondicional apoyo, por estar siempre y por su infinito amor

A Male, que me cuidó como a un hermano y siempre siempre estuvo para ayudarme personalmente y profesionalmente.

A la Dra. Rosa Erra-Balsells, por cada café compartido lleno de cultura. Por esas charlas en las que me enseñó a pararme cada vez mas firme frente al mundo.

A Leo, por su gran cariño, por ayudarme y bancarme en los momentos más críticos del desarrollo del presente trabajo de Tesis

A la Dra. Silvia Moreno, por su excelente predisposición y confiar siempre en mi como profesional

A Gaby, por compartir esa alegría diaria que hacían que sea la primer persona en querer saludar cada mañana.

A Martín Luong, por su inmensa capacidad de laburo, y predisposición a ayudar a todos y por su gran amistad

A Lucas, por el gran compañerismo y la amistad que logramos durante toda la etapa de formación doctoral. Por su gran cariño incondicional, y su tremendo talento en la cocina que no dudó en compartir.

A Romi, mi gran compañera de todo este gran trabajo, que estuvo siempre presente, ayudándome brindando los mejores consejos

A Marian, mi gran compañera y amiga de laboratorio y con quien compartí las mejores salidas del laboratorio

A Luchi, brillante compañera, con quien compartí de las mejores charlas y reflexiones

A Sergito, por su gran predisposición. Por compartir esa hermosa alegría y brindar escenas teatrales de primer nivel que hacían del ambiente laboral un lugar de disfrute.

A Vero Manzano, por su excelentísima predisposición. Por su alegría. Por su excelente humor. Por el inmenso cariño que me dio en los momentos más críticos. Por estar siempre.

A Nancy y Mica, por su gran predisposición, por el hermoso ambiente que generan en la secretaria del DQO y por ser tan tan amables

Al CEQUIBIEM, a sus excelentes integrantes, a Germán, Pía y Richard, por bancarme y ayudarme a lo largo todo mi trabajo de Tesis.

ÍNDICE

Resumen.....	5
Nuevas estrategias para el estudio de glicoconjugados: glicómica, glicoproteómica.	6
New strategies for glycoconjugate analysis; glycomics, glycoproteomics.....	8
Abreviaturas.....	10
Introducción.....	12
1. Polisacáridos de Bacteria.....	13
1.1 Generalidades.....	13
1.2 Clasificación de los polisacáridos.....	13
1.3 Fuentes de polisacáridos.....	15
1.4 Análisis estructural de polisacáridos.....	16
1.5 Estrategias para el marcado de azúcares:.....	19
1.6 Análisis de perfil de sustitución en polisacáridos.....	22
1.7 Degradación parcial de polisacáridos.....	23
1.8 Análisis de oligosacáridos por espectrometría de masa.....	24
1.9 Caracterización de polisacáridos por RMN.....	29
2. Glicoproteínas.....	33
2.1. Generalidades.....	33
2.2 Tipos de glicosilaciones.....	33
2.3 Glicoproteómica.....	35
2.4 Análisis glicómico.....	36
2.5 Análisis (glico)proteómico.....	37
2.6 Enriquecimiento de glicopéptidos mediante interacciones no-covalentes:.....	38
2.7 Enriquecimiento de glicopéptidos mediante interacciones covalentes:.....	39
2.8 Análisis del sitio de glicosilación.....	40
2.9 Glicoproteómica <i>top-down</i>	43
2.10 Herramientas bioinformáticas para el análisis de glicoproteínas.....	44

Resultados y Discusión	49
1. Sustancias poliméricas extracelulares en procariontes	51
1.1 Purificación y análisis de la composición	52
1.2 Determinación del peso molecular de EPO2.....	55
1.3 Análisis de EPO2 por espectroscopia de infrarrojo	56
1.4 Análisis por microscopia de barrido electrónico (SEM)	57
1.5 Estudios de metilación de EPO2.....	58
1.6 Análisis de oligosacáridos en EPO2	59
1.7 Análisis de EPO2 por RMN.....	65
1.7.1 Análisis del disacárido α -D-GlcpA-(1-3)-L-Fucp	65
1.7.2 Análisis de EPO2 O-desacetilado	68
1.8 Biosorción de metales en solución de EPO2	72
2. Proteínas Capa S.....	75
2.1 Determinación de la glicosilación en las proteínas capa S de las cepas de <i>L. kefir</i> no-agregantes.....	78
2.1.1 Determinación de la glicosilación de la proteína capa S de <i>L. kefir</i> CIDCA 83111 .	79
2.1.1.1 Determinación de la composición de los oligosacáridos	79
2.1.1.2 Análisis de los O-glicanos de <i>L. kefir</i> CIDCA 83111.....	80
2.1.1.3 Análisis del sitio de glicosilación en <i>L. kefir</i> CIDCA 83111	83
2.1.1.4 Análisis de N-glicosilación en la proteína capa S de <i>L. kefir</i> CIDCA 83111	92
2.1.2. Análisis glicoproteómico de la proteína capa S de <i>L. kefir</i> JCM 5818	99
2.1.2.1 Determinación de la composición de los oligosacáridos	99
2.1.2.2 Estudio de los glicopéptidos de <i>L. kefir</i> JCM 5818	100
2.1.2.3 Estudio N-glicoproteómico de la proteína capa S de <i>L. kefir</i> JCM 5818.....	106
2.2. Estudio de las glicoproteínas de capa S de cepas agregantes de <i>L. kefir</i>	116
2.2.1 Aislamiento de las glicoproteínas de capa S de <i>L. kefir</i> CIDCA 8348 y <i>L. kefir</i> CIDCA 8321.....	116
2.2.2 Determinación de la composición de azúcares de los O-glicanos.....	117
2.2.3 Caracterización por Espectrometría de Masa MALDI-TOF de los O-glicanos.	118
2.2.4 Análisis de glicopéptidos	119

3. Proteínas de clara de huevo.....	126
3.1 Identificación de la composición glicoproteica de CEW.....	128
3.2 Determinación de la glicosilación de ovotransferrina	135
Materiales y Métodos	146
Microorganismos.....	147
<i>Pseudomonas veronii</i>	147
<i>Lactobacillus kefirii</i>	147
Cultivo celular y aislamiento del EPS.....	148
Extracción de proteínas de Capa S	149
Cromatografía de intercambio iónico	149
Cromatografía de exclusión molecular	149
Obtención de patrones de oligosacáridos reducidos.....	149
O-desacetilación de EPO2	150
Fraccionamiento de oligosacáridos.....	150
Hidrólisis ácida	150
Análisis por cromatografía de intercambio aniónico (HPAEC-PAD).....	150
Espectroscopía de infrarrojo (FT-IR).....	151
Microscopía de barrido electrónico (SEM).....	151
Análisis de metilación.....	151
Cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa (GC-MS).....	152
Espectrometría de masa MALDI.....	152
Espectrometría de masa ESI-QTOF	152
Análisis por Resonancia Magnética Nuclear	152
Determinación de la capacidad de biosorción de metales	153
Electroforesis en gel de poliacrilamida	153
Tinción de geles con Azul de Coomassie.....	154
Tinción con Nitrato de Plata.....	154
β -eliminación reductiva.....	154
Digestión con PNGasa F.....	155
Cromatografía de afinidad por WGA-Sepharose	155
Análisis de N- glicosilación sitio específica.....	155
Obtención de glicopéptidos	156
Enriquecimiento de glicopéptidos	156

Análisis de péptidos y glicopéptidos por espectrometría de masa	156
Conclusiones	158
Trabajos Publicados.....	165
Referencias.....	166

Resumen

Nuevas estrategias para el estudio de glicoconjugados: glicómica, glicoproteómica.

Los glicoconjugados constituyen un extenso universo de estructuras y funcionalidades y por lo tanto su estudio estructural representa un importante desafío. La caracterización de las estructuras de glicoconjugados es fundamental para desentrañar las diversas funciones que cumplen los hidratos de carbono en un dado sistema, esto hace que exista actualmente una demanda creciente de este tipo de análisis.

El objetivo del presente trabajo consistió en avanzar en el desarrollo de nuevas metodologías que permitan caracterizar estructuralmente diferentes tipos de glicoconjugados, haciendo énfasis en el uso de técnicas de espectrometría de masa ESI-Orbitrap y MALDI-TOF-TOF.

En este contexto, este trabajo se desarrolló en tres etapas:

- 1- El estudio estructural del exopolisacárido de *Pseudomonas veronii* 2E utilizando técnicas tradicionales y combinándolas con un estudio glicómico por espectrometría de masa MALDI-TOF-TOF.
- 2- El estudio de la glicosilación de la glicoproteína Capa-S de diferentes cepas de *Lactobacillus kefir* avanzando en el desarrollo de técnicas glicoproteómicas utilizando nanoHPLC acoplado a espectrometría de masa ESI-Orbitrap.
- 3- El estudio de un sistema complejo de glicoproteínas mediante un abordaje *N*-glicoproteómico utilizando como modelo la clara de huevo, aplicando nanoHPLC acoplado a espectrometría de masa ESI-Orbitrap y herramientas bioinformáticas.

Entre los resultados obtenidos más interesantes se destacaron los siguientes:

- 1- Se determinó la presencia de una subestructura en el exopolisacárido producido por *Pseudomonas veronii* 2E que consiste en el disacárido α -D-GlcpA-(1-3)-L-Fucp, ramificando la cadena principal del glucano. Además de la caracterización estructural de éste glicopolímero, se estudió también la capacidad de este material para la remoción de metales disueltos en agua obteniéndose destacable capacidad de biosorción, principalmente frente a Fe(II).

- 2- El estudio glicoproteómico de las proteínas de capa-S permitió identificar *O*-glicosilación y por primera vez la presencia de *N*-glicosilación en glicoproteínas de *Lactobacillus*. Fue interesante determinar que la presencia de *N*-glicosilación podría constituir un motivo estructural de diferenciación entre las proteínas capa-S de las cepas agregantes respecto de las no agregantes de *L. kefir*.

- 3- El estudio del sistema glicoproteómico complejo de clara de huevo (*Gallus gallus*) permitió identificar nuevas glicoformas en la ovotransferrina, conteniendo fucosa y ácido siálico. Además, mediante la estrategia utilizada se describió por primera vez, la glicosilación sitio específica en proteínas de baja abundancia, destacando la alta capacidad de análisis que se obtiene por medio de la metodología empleada.

Palabras claves: glicómica, glicoproteómica, *Pseudomonas veronii* 2E, *Lactobacillus kefir*

New strategies for glycoconjugates analysis: glycomics, glycoproteomics

The glycoconjugates constitute a large universe of structures and functionalities; therefore, nowadays their structural study represents an important challenge. The ability to characterize glycoconjugate structures is essential to unravel the various functions that carbohydrates fulfill in a given system; in consequence, there is currently a growing demand for this type of analysis.

The aim of this work was the development of new methodologies that allow characterizing glycoconjugate structures from different sources, emphasizing the use of ESI-Orbitrap and MALDI-TOF-TOF mass spectrometry techniques.

In this context, the study was developed in three stages:

- 1- The structural study of the exopolysaccharide produced by *Pseudomonas veronii* 2E using traditional techniques and combining them with a glycomic study by MALDI-TOF-TOF mass spectrometry.
- 2- The glycosylation study of the S-layer glycoprotein obtained from different strains of *Lactobacillus kefir* focusing on the development of glycoproteomic techniques using nanoHPLC coupled to ESI-Orbitrap mass spectrometry.
- 3- The study of a complex glycoprotein system through an *N*-glycoproteomic approach using egg white from *Gallus gallus* as model, applying nanoHPLC coupled to ESI-Orbitrap mass spectrometry and bioinformatics tools.

Among the most interesting results obtained, it may be stand out:

- 1- The presence of a substructure in the exopolysaccharide produced by *Pseudomonas veronii* 2E consisting of an α -D-GlcpA-(1-3)-L-Fucp disaccharide, branching the glucan backbone. Beyond the structural characterization of this glycopolymer, its functionality was also tested herein, revealing the capacity of this material for the removal of metals dissolved in water, obtaining remarkable biosorption capacity, mainly against Fe(II).

- 2- The glycoproteomic study of the S-layer proteins allowed to identify *O*-glycosylation and for the first time the presence of *N*-glycosylation in *Lactobacillus* glycoproteins. It was interesting to suggest that the presence of *N*-glycosylation may constitute a structural pivot for the differentiation among S-layer proteins from the aggregating and non-aggregating strains of *Lactobacillus kefir*.

- 3- The study of the complex glycoproteomic system from chicken egg white (*Gallus gallus*) led to identify new glycoforms containing fucose and sialic acid in isolated ovotransferrin. In addition, the strategy used in this work enabled to characterize for the first time, the site specific and glycoform structures present in low abundant proteins, highlighting the high throughput analysis obtained using this methodology.

Keywords: Glycomics, Glycoproteomics, *Pseudomonas veronii* 2E, *Lactobacillus kefir*

Abreviaturas

ACN	acetonitrilo
ADN	ácido desoxirribonucleico
ARN	ácido ribonucleico
ATR	reflectancia total atenuada
BSA	albúmina sérica bovina
Calc	calculado
CG	cromatografía gaseosa
CID	disociación inducida por colisión
CMC	concentración micelar crítica
Da	dalton
DHB	ácido 2,5-dihidroxibenzoico
dHex	desoxihexosa
DO	densidad óptica
DOC	desoxicolato de sodio
DTT	ditiotreitol
EI	impacto electrónico
EM	espectrometría de masa
EPS	sustancias poliméricas extracelulares
ESI	ionización por electrospray
FT	transformada de Fourier
Fuc	fucosa
Gal	galactosa
GalOH	galactitol
GC	cromatografía gaseosa
Glc	glucosa
GlcOH	sorbitol
HCD	disociación por colisión de alta energía
HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperacil-etanosulfónico
Hex	hexosa
HexA	ácido hexurónico
HexNac	<i>N</i> -acetil hexosamina
HILIC	cromatografía líquida de interacciones hidrofílicas
HPAEC-PAD	cromatografía líquida de alta resolución de intercambio aniónico con detector de pulso amperométrico
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
IAA	iodoacetamida
IR	infrarrojo
MALDI	desorción/ionización laser asistida por matriz
Man	manosa
ManOH	manitol
MS/MS	espectrometría de masa tandem
MW	peso molecular

MWCO	corte de peso molecular
<i>m/z</i>	relación masa-carga
Obs	observado
PAS	ácido periódico-reactivo de Schiff
PTM	modificación post-traducciona
PM	peso molecular
PNGasa	péptido <i>N</i> -glicanasa
Rpm	revoluciones por minuto
SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
TFA	ácido trifluoroacético
THAP	2, 4, 6-trihidroxiacetofenona
TOF	tiempo de vuelo
TRIS	2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol
UV	ultravioleta
WGA	aglutinina de germen de trigo
z	carga iónica

Introducción

1. Polisacáridos de Bacteria

1.1 Generalidades

Los polisacáridos producidos por microorganismos, incluyendo, bacterias, hongos y levaduras representan una extensa fuente de biopolímeros de gran interés industrial (Sutherland, 2001). Los polisacáridos son las bio-macromoléculas de mayor diversidad estructural, con propiedades únicas que han captado creciente interés para aplicaciones biotecnológicas, debido a los altos niveles en los que son producidos (hasta 40 gL⁻¹) incluso con fuentes de carbono simples, y un amplio espectro de funcionalidades asociadas (Lin & Chen, 2007; Papinutti, 2010; Ravella *et al.*, 2010). Son utilizados industrialmente como espesantes, estabilizantes y agentes gelificantes en productos alimenticios. Más recientemente, se comenzaron a estudiar por sus potenciales aplicaciones biotecnológicas dado que han sido involucrados con actividades antitumorales, antioxidantes o prebióticas y en biorremediación (Gupta & Diwan, 2017; Liu *et al.*, 2010; Ramberg, *et al.*, 2010).

1.2 Clasificación de los polisacáridos

La biosíntesis y acumulación de los polisacáridos tiene lugar después de la fase de crecimiento exponencial de los microorganismos. Según su localización, estos biopolímeros pueden ser clasificados en tres grupos. Los polisacáridos citosólicos, proveen de fuente de carbono y energía a la célula. Los polisacáridos de pared, incluyendo péptidoglicanos y ácidos teicoicos, los cuales componen la pared celular, con funcionalidad principalmente estructural. El tercer grupo, los exopolisacáridos, que independientemente del origen de su biosíntesis, ya sea citosólica y luego secretados, o biosintetizados extracelularmente por enzimas de membrana, su localización final es extracelular donde desempeñan múltiples funciones (Donot *et al.*, 2012) (Tabla 1).

Tabla 1: Funcionalidad de los polisacáridos en el sistema celular de origen

Funcionalidad	Proceso
Adhesión	Protagonizan proceso de adhesión a superficies en sistemas bióticos y/o abióticos, etapa crucial para el desarrollo del biofilm.
Agregación celular	Facilitan la inmovilización de la población celular.
Retención de agua	La naturaleza hidrofílica de los polisacáridos permite mantener hidratado el biofilm evitando estrés por desecación.
Fuente de nutrientes	La acumulación de polisacáridos actúa como fuente de carbono, nitrógeno y fósforo, para ser utilizado por la comunidad bacteriana.
Barrera de protección	Confieren resistencia frente a la exposición a agentes tóxicos y contrarrestan la acción fagocítica de la respuesta inmune.
Sorción	La alta viscosidad y presencia de grupos funcionales cargados que proveen los polisacáridos facilitan la acumulación de nutrientes exógenos.
Anclaje de exo-enzimas	Los polisacáridos definen una red estructural para la retención y acumulación de exo-enzimas.

Según la fuerza con la que se encuentran unidos a la capa más externa de la célula, los polisacáridos se clasifican como: altamente ligados o débilmente ligados. Análogamente, estos mismos biopolímeros son llamados exopolisacáridos ligados, o solubles/limos, respectivamente. El origen de esa última clasificación y terminología se fundamenta en la resistencia que presenta cada especie de exopolisacárido para ser extraído del cultivo celular (Nielsen, 1999). Los polisacáridos ligados, también conocidos como capsulares, forman un gel de alta densidad y se encuentran en contacto directo con la superficie celular formando una cápsula. Esta estructura es la responsable de la antigenicidad en algunas bacterias patógenas. Los polisacáridos ligados, son conocidos como antígenos “K” o capsulares, definiendo el serotipado por la reactividad de anticuerpos específicos contra las células patógenas (Whitfield, 2006). Esto se observa en Enterobacteriaceae donde se identificaron más de 80 serotipos diferentes de *E. coli* basados en el antígeno de polisacárido capsular (Schembri *et al.*, 2004).

La abrumadora diversidad de estructuras de polisacáridos conduce a su categorización, basada en la composición, motivos estructurales y a la funcionalidad. Siguiendo la composición monomérica, los exopolisacáridos se clasifican como

homopolisacáridos y heteropolisacáridos y en función de la naturaleza de su composición química, como polisacáridos neutros o ácidos, pudiendo ser de estructura lineal o ramificada (Aspinall, 1983). Los homopolisacáridos contienen solo un tipo de monosacáridos. Los grupos más representativos de homopolisacáridos son los α -D-glucanos, β -D-glucanos, fructanos y poligalactanos. Por otra parte, los heteropolisacáridos se componen de diferentes monosacáridos y sus unidades repetitivas varían en tamaño que van desde disacáridos a heptasacáridos (Sutherland, 1988).

1.3 Fuentes de polisacáridos

Los polisacáridos pueden ser extraídos a partir de diversos recursos de biomasa, provenientes de organismos procariontes, algas, hongos, hasta organismos superiores como las plantas. Sin embargo, los glicopolímeros de origen bacteriano son preferidos tanto desde el punto de vista sustentable como económico, ya que sus procesos en escala industrial permiten altos rendimientos y procesos de menor tiempo, bajo condiciones de producción totalmente controladas comparado con los de origen vegetal y de algas. Los procesos de obtención de exopolisacáridos industriales que involucran bacterias son alcanzados en el orden de horas, mientras que, por el contrario, los procesos de obtención de polisacáridos de origen vegetal pueden tardar entre 3-6 meses y son altamente dependiente de factores geográficos y climáticos. Además, los procesos bacterianos presentan mayor flexibilidad frente al uso específico de sustratos y fuentes de luz que los que se requieren en las producciones de polisacáridos que involucran microalgas (Donot *et al.*, 2012).

Actualmente, los exopolisacáridos que se disponen comercialmente se utilizan como espesantes, bio-adhesivos, estabilizantes, gelificantes y probióticos en la industria alimentaria. Son utilizados en la industria cosmética (Freitas *et al.*, 2011) como emulsionantes, y estabilizantes en formulaciones. Recientemente, se han descrito polisacáridos con potenciales aplicaciones como biosorbentes y biofloculantes en el área de la biorremediación (Gupta & Diwan, 2017) del sector ambiental (Tabla 2).

Tabla 2: Polisacáridos comerciales, fuente de origen y principal composición.

Polisacárido	Organismo	Composición
Gelano	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	β -1,4-D-Glc, β -1,4-D-Rham, β 1,4-D-GlcA
Hialuronano	<i>P. aeruginosa</i> , <i>P. multocida</i>	β -1,4-D-GlcNAc, β -1,3-D-GlcA
Curdano	<i>Alcaligenes faecalis</i>	β -1,3-D-Glc
Levano	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Zymomonas mobilis</i>	β -2,6-D-Fruc
Xantano	<i>Xanthomonas campestris</i>	β -1,4-D-Glc, β -1,4-D-GlcA, α -1,2-D-Man
Alginato	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	β -1,4-D-ManA α -1,4-L-GulA
Pullulano	<i>Aureobasidium pullulans</i>	α -1,6-D-Glc, α -1,4-D-Glc
Celulosa	<i>Gluconacetobacter xylinus</i>	β -1,4-D-Glc
Dextrano	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	α -1,6-D-Glc

Continuamente son descritas nuevas estructuras de exopolisacáridos producidos por los diferentes taxones de microorganismos. Sin embargo, solo unos pocos han sido destacados con un valor comercial competente. La mayoría son excluidos principalmente por su elevado costo de producción. Esta problemática ha sido mejorada mediante abordajes vinculados al uso de sustratos más económicos como fuente de carbono y optimizando los rendimientos de producción mediante la selección de cepas por manipulación genética así como también optimizando los procesos de purificación o *downstream* (Rehm, 2010). Por el contrario, el hallazgo de polisacáridos con propiedades interesantes, que no se pueden encontrar en otras moléculas, permitiría indudablemente su utilización en aplicaciones de alto valor, por lo que la calidad del producto superaría totalmente el costo de producción (Nicolaus *et al.*, 2010).

1.4 Análisis estructural de polisacáridos

Definir las estructuras de los exopolisacáridos se ha convertido en un reto cada vez más importante, debido a los múltiples procesos biológicos en los que participan y a las destacadas propiedades que presentan estos materiales. La elucidación estructural de los polisacáridos es considerada un dificultoso desafío, debido al gran tamaño molecular de estos biopolímeros, y a su compleja naturaleza química, tanto estructural como para su manipulación experimental. El desarrollo de metodologías para la caracterización de polisacáridos ha quedado retrasado con respecto a otras biomacromoléculas como las proteínas y ácidos nucleídos, ya que, a diferencia de esas últimas moléculas lineales y

sintetizadas mediante moldes, los polisacáridos presentan una complejidad estructural significativamente superior, debido a los múltiples modos de enlace entre sus unidades monoméricas sumado a un elevado grado de polimerización. La alta complejidad estructural de los polisacáridos exige la necesidad de emplear una serie de múltiples herramientas ortogonales para probar características estructurales específicas, como la composición de monosacáridos, los tipos y posiciones de enlace, las disposiciones de monómeros así como la de los sustituyentes no-glicosídicos (Namchuk *et al.*, 2000).

El análisis estructural de los polisacáridos requiere de gran número de técnicas especializadas, que difieren significativamente de los métodos utilizados para la elucidación estructural de moléculas pequeñas y otros biopolímeros. Para caracterizar la estructura primaria de un polisacárido, se utilizan un gran número de técnicas que categoriza la información según:

- 1- La composición de monosacáridos, es decir, las distintas unidades monoméricas y sus relaciones molares.
- 2- Patrones de enlace: posiciones de enlaces glicosídicos
- 3- Tamaño del anillo: distinción de anillos furanosas y piranosas.
- 4- Configuración anomérica: configuración α o β del enlace glicosídico.
- 5- Secuencias de residuos de monosacáridos y unidades de repetición.
- 6- Sustituciones: posición y naturaleza de las modificaciones de los grupos OH.
Entre los mas predominantes se encuentran: lactilos, acetilos, formilos, succinatos, piruvatos, fosfatos, sulfatos, entre otros.
- 7- Distribución del peso molecular y del peso molecular promedio.

Es importante resaltar que previo al abordaje analítico estructural del polisacárido propiamente dicho, gran parte del estudio se centra en la purificación del biopolímero para poder aislar el material de los contaminantes provenientes de la matriz celular de origen del polisacárido. Es así que el primer paso para caracterizar un polisacárido requiere del diseño de estrategias para su aislamiento y del monitoreo de la purificación midiendo el contenido de azúcares totales, la composición, los niveles de ácidos urónicos, proteínas, lípidos, entre otros. En el siguiente esquema (Figura 1) se muestra un procedimiento general para la caracterización estructural de polisacáridos.

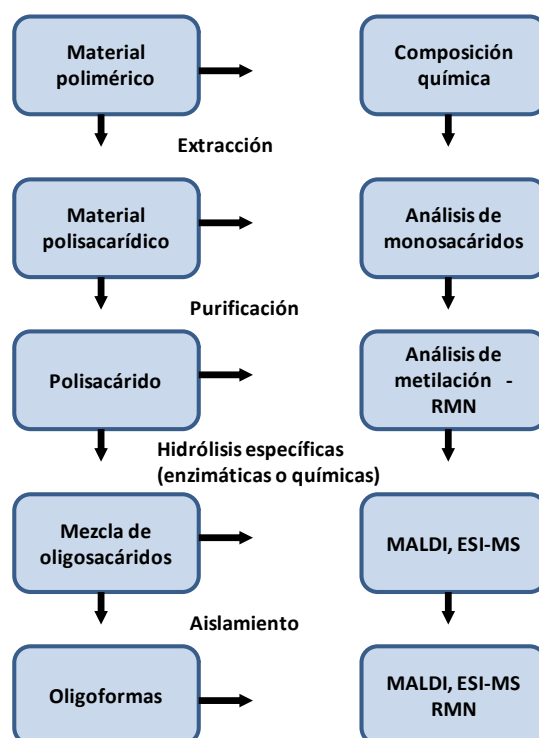


Figura 1: Esquema del procedimiento estándar para a caracterización estructural de un polisacárido y las técnicas mayormente utilizadas en los pasos correspondientes.

El análisis de la composición de monosacáridos es crítico para entender la estructura de los polisacáridos, ya que proporciona la primera pista para guiar el análisis estructural. Por ejemplo, los polisacáridos que contienen arabinosa y xilosa se asignan principalmente a la familia de arabinoxilanos, los polisacáridos compuestos de galactosa y manosa pertenecen principalmente al grupo galactomananos, los polisacáridos pécticos están constituidos por ácido galacturónico y monosacáridos neutros. Cada uno de estos grupos presenta características estructurales propias, tanto a nivel composición como en su perfil de sustitución.

El análisis de la composición de monosacáridos se divide en tres pasos: hidrólisis completa del biopolímero, separación y detección de los monosacáridos liberados. De forma general se describen tres aproximaciones para los tratamientos de hidrólisis ácida (Lindberg *et al.*, 1975). Hidrólisis de componentes lábiles, por ejemplo, el ácido siálico, usando ácido trifluoroacético (TFA) 0,1 M a 80 °C durante 30-60 minutos. Para polisacáridos con azúcares neutros se emplea condiciones de ácidos y temperatura más elevadas, TFA 2M, 4–5h, 100 °C. Para polisacáridos que contienen en su composición aminoazúcares y ácidos urónicos se utilizan condiciones aún más fuertes, HCl 4 M, 3–5 h, 100 °C.

Los monosacáridos liberados en la hidrólisis pueden ser identificados y cuantificados mediante diferentes técnicas, entre ellas, cromatografía de intercambio aniónico con detector de pulso amperométrico (HPAEC-PAD) (Zhang *et al.*, 2012), cromatografía de gases con detector de ionización llama (Xu *et al.*, 2017), cromatografía de fase reversa (Lv *et al.*, 2009), cromatografía líquida de interacciones hidrofílicas (Karlsson *et al.*, 2005) (HILIC) y electroforesis capilar (Mantovani *et al.*, 2018). La distinción clave para la elección entre estas técnicas se basa en si es factible o no la derivatización de los azúcares previo al análisis, ya sea tanto para facilitar su separación cromatográfica, como su detección. En este sentido, la técnica que lidera el análisis de la composición, es la cromatografía de intercambio aniónico HPAEC-PAD. Ésta se fundamenta en la capacidad que poseen los grupos hidroxilos de los azúcares de ionizarse a oxianiones cuando se emplea una fase móvil alcalina. En función de la estereoquímica y del número de grupos OH, los pKa de los monosacáridos pueden diferenciarse resultando en un distinto grado de afinidad con la fase estacionaria. Esta técnica además de conseguir la separación de monosacáridos, también permite el análisis de oligosacáridos intactos así como provenientes de hidrólisis parciales (Megherbi *et al.*, 2009). Este método no necesita derivatización y proporciona excelente resolución, con límites de detección en el orden de los nanogramos (Gege *et al.*, 2017).

Por el contrario, la cromatografía de gases, la cromatografía líquida de fase reversa y electroforesis capilar, son técnicas que requieren de la derivatización previa de los azúcares, ya sea para facilitar la separación o su detección. El mayor inconveniente del uso de múltiples etapas de derivatización no solo tiene impacto directo sobre el tiempo de análisis, sino también en la pérdida de la recuperación total, debido la conversión incompleta durante el proceso de derivatización, lo cual no se compatibiliza con el análisis de muestras biológicas costosas con baja concentración de azúcares.

1.5 Estrategias para el marcado de azúcares

Las técnicas de derivatización comúnmente empleadas para facilitar tanto la separación cromatográfica como la detección, utilizan principalmente la funcionalidad aldehído del extremo reductor de los azúcares, y la reactividad de los grupos hidroxilo.

Entre las reacciones más utilizadas para la derivatización de azúcares se encuentran: la aminación reductiva, adición de Michael, adición de hidracida y la permetilación.

En la reacción de derivatización por aminación reductiva (Figura 2) el grupo aldehído, reacciona por adición nucleofílica del grupo amino del ácido 2-aminobenzoico, a través de un intermediario del tipo imina, o base de Schiff, que por posterior reacción con un agente reductor, comúnmente utilizando NaBH_3CN , permite obtener la amina secundaria como producto de marcación.

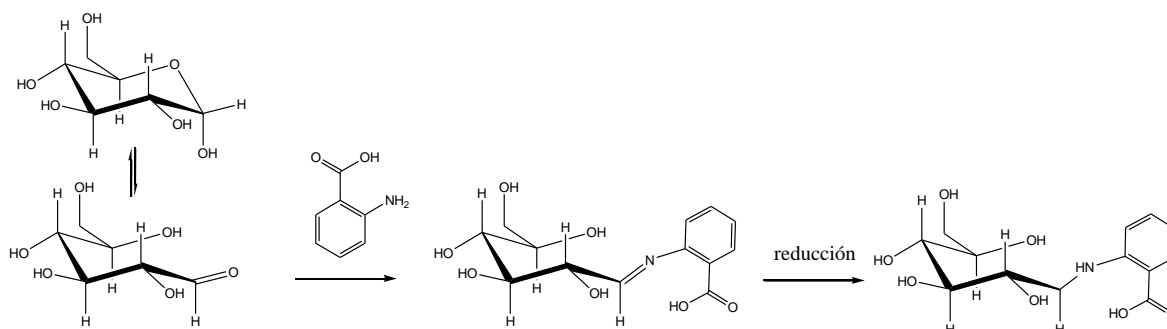


Figura 2: Reacción de aminación reductiva en glucosa utilizando el marcador ácido 2-aminobenzoico

Se ha descrito un extenso número de cróforos y fluoróforos para el marcado de azúcares, entre ellos, 2-aminobenzamida (2-AB), ácido 2-aminobenzoico (2-AA), 2-aminopiridina (PA), ácido 2-aminonaftaleno trisulfónico (ANTS), ácido 1-aminopireno-3,6,8-trisulfónico (APTS) (Anumula & Dhume, 1998; Merry *et al.*, 2002; Ruhaak *et al.*, 2010).

La derivatización puede llevarse a cabo a través de una reacción de adición de Michael bajo condiciones alcalinas utilizando como reactivo 1-fenil-3-metil-5-pirazolona (PMP) (Figura 3). La ventaja de esta técnica es que a diferencia del marcado por aminación reductiva que utiliza condiciones ácidas, en ésta, se utilizan condiciones básicas que previenen la hidrólisis de compuestos lábiles como ácido sialico (You *et al.*, 2008).

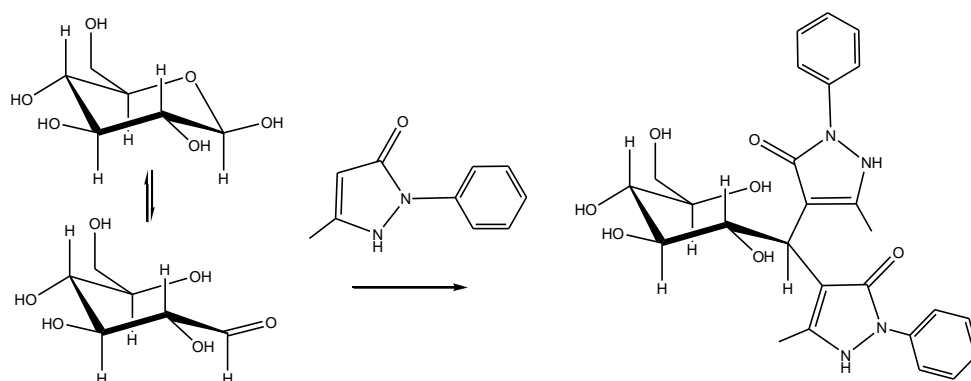


Figura 3: Reacción de adición de Michael para la marcación de glucosa con PMP

Otro procedimiento para la derivatización de azúcares se puede lograr mediante la reacción con hidracina (Figura 4). Lattova y Perreault (Lattova & Perreault, 2003), demostraron que la conversión de monosacáridos y oligosacáridos en las fenilhidrazonas correspondientes es cuantitativa y conveniente para su uso en espectrometría de masa ya que no se emplean ni se generan sales durante el proceso de derivatización, permitiendo el análisis a bajas concentraciones, del orden picomolar, para la identificación estructural por MALDI-MS y ESI-MS.

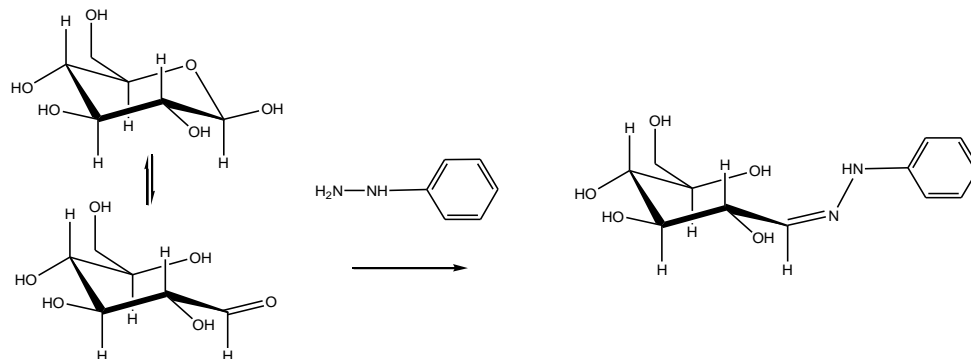


Figura 4: Reacción de glucosa con fenilhidrazina para obtener la fenilhidrazona como producto de marcación

Otra técnica de derivatización que permite trabajar con muestras de azúcares complejas y de baja concentración es la permetilación (Figura 5). Esta técnica convierte a los azúcares en especies hidrofóbicas apropiadas para el análisis por cromatografía en fase reversa acoplada a espectrometría de masa. La permetilación tiene como ventaja la capacidad de analizar azúcares tanto neutros como ácidos en modo de ionización positiva, y además, la espectrometría de masa tandem de azúcares permetilados permite abordar el análisis estructural a nivel de perfiles de sustitución (Guillard *et al.*, 2009).

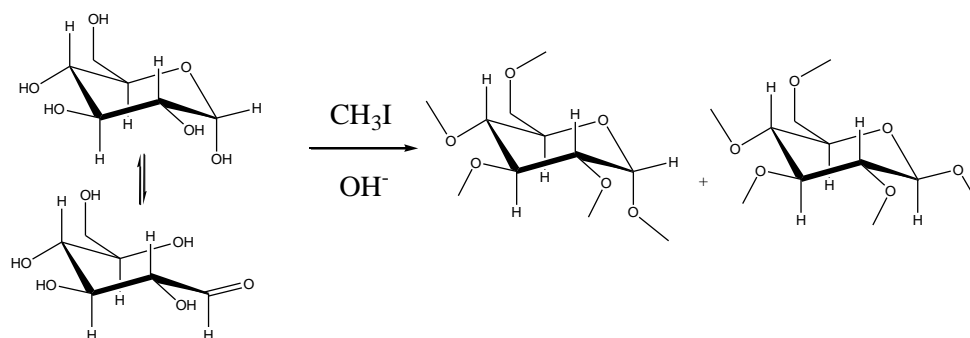


Figura 5: Reacción de derivatización para el análisis de azúcares permetilados.

1.6 Análisis de perfil de sustitución en polisacáridos

El perfil de sustitución de los polisacáridos, se estudia mediante el análisis de los Alditol Acetatos Parcialmente Metilados (PMAAs). Esta técnica permite determinar las posiciones de sustitución de cada uno de los monosacáridos presentes en el biopolímero, aunque no brinda información acerca de la secuencia estructural ni de la configuración anomérica de los enlaces glicosídicos (Anumula & Taylor, 1992; Ciucanu & Kerek, 1984a; Hakomori, 1964; Kim *et al.*, 2006).

El análisis por metilación (Figura 6) incluye la conversión de todos los grupos hidroxilo libres en metoxilos seguido de hidrólisis ácida total. La hidrólisis ácida solo escinde los enlaces glicosídicos dejando los enlaces de éter metilo intactos. Los monómeros hidrolizados se reducen y se acetilan para dar los productos volátiles PMMAAs, que se puede identificar y determinar cuantitativamente mediante cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa (Hakomori, 1964).

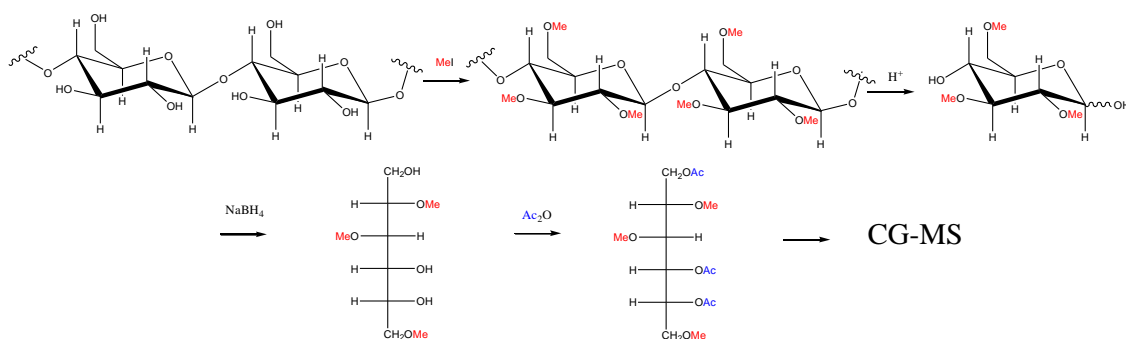


Figura 6: Esquema general de las reacciones para el análisis de PMAAs

Los patrones de fragmentación por impacto electrónico de los espectros de masas de los PPMAs están bien documentados para todos los patrones de enlace y en un gran número de monosacáridos conocidos (Björndal *et al.*, 1967). El patrón de sustitución de PMAA se puede determinar fácilmente según las siguientes reglas:

- Los fragmentos primarios derivan del clivaje del esqueleto principal del alditol.
- La carga siempre reside en el fragmento conteniendo el grupo metoxilo adyacente al sitio de clivaje
- La fragmentación esta favorecida entre carbonos adyacentes metoxi-sustituidos, por sobre la fragmentación que se da entre un carbono metoxi-sustituido adyacente a un carbono acetoxi-sustituido, y aun en mayor medida, por sobre las fragmentaciones que se originan entre dos carbonos adyacentes acetoxi-sustituidos.
- Fragmentaciones secundarias son las originadas por la pérdida de moléculas neutras de metanol y ácido acético.

1.7 Degradación parcial de polisacáridos

La secuenciación completa de la estructura primaria de heteropolisacáridos complejos es difícilmente abordable en su forma nativa. Para obtener información de la estructura de un polisacárido complejo, el biopolímero se degrada frecuentemente en unidades repetitivas de oligosacáridos, de manera controlada. Las mezclas de oligosacáridos resultantes son separadas y las fracciones mayoritarias obtenidas pueden analizarse más fácilmente por técnicas como espectrometría de masa MALDI y RMN. La caracterización estructural de los distintos oligosacáridos obtenidos por degradación parcial conducirá finalmente a la elucidación de la secuencia en la estructura primaria de los polisacáridos (Anumula & Dhume, 1998).

Existen dos grandes estrategias para la degradación de polisacáridos a mezclas de oligómeros: la degradación química y la degradación enzimática (Lindberg *et al.*, 1975). La degradación parcial de polisacáridos por metodologías químicas mayormente empleada, es la hidrólisis ácida, la cual se vale de las diferencias en la fuerza con las que se establecen las distintas uniones glicosídicas. Por ejemplo, los monosacáridos furanósicos y desoxi-azúcares establecen enlaces glicosídicos más débiles, los cuales puede ser hidrolizados hasta cinco veces más rápido que los enlaces glicosídicos entre

hexosas. Por el contrario, las uniones glicosídicas más difícilmente hidrolizables son las que establecen los residuos de ácidos urónicos y aminoazúcares.

A diferencia de la hidrólisis parcial por tratamientos ácidos, las endo-enzimas son capaces de identificar tipos de enlace específicos en los polisacáridos y producir una degradación controlada. Aunque el uso de enzimas para la hidrólisis parcial presenta grandes ventajas en polisacáridos mayormente lineales como por ej. el almidón, cuando se estudian polisacáridos más complejos el uso de enzimas para la degradación parcial se encuentra limitado debido tanto a la complejidad estructural como a la disponibilidad de la enzima específica.

1.8 Análisis de oligosacáridos por espectrometría de masa

La plataforma más tradicional para el análisis estructural de polisacáridos por espectrometría de masa implica la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masa (GC-MS) (Sims *et al.*, 2018). Sin embargo, el análisis por GC-MS requiere que los carbohidratos sean volátiles, lo que implica múltiples pasos de derivatización y requiere una gran cantidad de material para el análisis. Otros métodos, como la cromatografía de intercambio aniónico de alto pH con detección amperométrica pulsada, electroforesis capilar, separación por cromatografía líquida de alta resolución con detección UV, se utilizan para el perfil de monosacáridos (Grill *et al.*, 1993; Li *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 1992). Sin embargo, estos métodos están limitados a brindar información solamente respecto de la composición. Por otra parte, se han utilizado estrategias que emplean combinaciones de cromatografía de gases tradicional y resonancia magnética nuclear (RMN) para analizar los constituyentes de monosacáridos y las posiciones de enlace de los polisacáridos, pero son lentas y presentan baja sensibilidad (Amicucci, Nandita, & Lebrilla, 2019). La caracterización de los polisacáridos requiere el análisis de los componentes monosacáridos, sus enlaces asociados, ramificación y la naturaleza de las cadenas laterales poliméricas potenciales

El análisis estructural de carbohidratos por espectrometría de masa es un campo que se encuentra en pleno desarrollo, incluyendo entre otros, nuevos métodos de ionización y disociación de iones, avances en las separaciones cromatográficas, hibridación de técnicas de movilidad iónica entre otras técnicas de espectrometría de masa y diseño de programas informáticos (software) para la recolección e interpretación de datos (Amicucci *et al.*, 2019; Galermo *et al.*, 2018).

Sin duda, el continuo desarrollo de fuentes de ionización, elemento clave de los instrumentos de espectrometría de masa, revolucionó el empleo de esta técnica para el análisis de hidratos de carbono. Las fuentes de ionización más utilizadas para la caracterización estructural de oligosacáridos son MALDI (Hillenkamp *et al.*, 1991) y ESI (Fenn, 2002). El análisis de oligosacáridos por MALDI, consiste en el sembrado de la muestra de oligosacáridos (pudiendo utilizarse especies aisladas o mezclas), sobre una placa o *target*, conjuntamente con el agregado de la matriz. Cuando la muestra se encuentra cristalizada sobre el *target*, se irradia dentro de una cámara de ionización en alto vacío, con un láser de longitud de onda UV a la que la matriz absorbe, para luego transferir la energía a los analitos que serán desorbidos, ionizados y volatilizados (Hillenkamp *et al.*, 1991). Los hidratos de carbono pueden ser analizados en modo de ionización positivo o negativo dependiendo de su naturaleza estructural. En modo de ionización positivo se analizan fácilmente especies neutras, como aductos monocargados de H⁺, Na⁺ y en menor medida, K⁺. La desorción y volatilización está favorecida para especies con baja hidrofiliidad, es por ello que, comúnmente, para aumentar la sensibilidad del método, se reduce la polaridad de los azúcares por derivatización a los compuestos permetilados (Ciucanu, 2006). La principal ventaja que presenta la espectrometría de masa MALDI para el análisis de biopolímeros se basa en la predominante formación de iones moleculares monocargados, lo cual simplifica el análisis de los espectros de masas generados. En este contexto, dado que la mayoría de las muestras de polisacáridos son polidispersas con respecto al tamaño molecular, el uso de MALDI se impone sobre las técnicas ESI-MS, ya que éstas últimas producen múltiples señales a partir de un solo compuesto, debido a la generación de iones policargados, complejizando el análisis de los espectros (Hsu *et al.*, 2007).

La espectrometría de masa MALDI permite la detección de proteínas intactas (> 100000 Da) (Signor & Erba, 2013). Sin embargo, el estudio de polisacáridos mediante ésta técnica no ha conseguido alcanzar el desempeño del campo proteómico, por lo que el análisis de un polisacárido implica un proceso previo de hidrólisis para obtener oligosacáridos de menor tamaño. Para lograr el análisis de carbohidratos por MALDI, es de gran importancia la matriz utilizada para el análisis. Dado que la detección de masa MALDI hasta ahora se ha limitado a oligosacáridos de ~3,000 Da utilizando DHB como matriz, se encuentran en estudio para el análisis de polisacáridos nuevas matrices útiles para mayores campos de *m/z*. Por ejemplo, para oligosacáridos de mayor tamaño, la matriz 5-amino-2-mercapto-1,3,4-tiadiazol (Mirza *et al.*, 2004) se informó como una

matriz MALDI para el análisis de polisacáridos neutros con un peso molecular de hasta aproximadamente 5000 Da. Más recientemente, utilizando la matriz THAP, se detectó fácilmente un polisacárido neutro lineal con m/z superior a 47 kDa. Sin embargo, el análisis de polisacáridos intactos mediante MALDI aún requiere de la exploración de nuevas matrices (Hsu *et al*, 2007).

Durante el análisis de carbohidratos por espectrometría de masa tandem, es común notar que la fragmentación de oligosacáridos origina principalmente iones derivados de la ruptura de enlaces glicosídicos aunque también es posible observar iones generados por la ruptura de enlaces que conforman el anillo.

En la figura 7 se detalla la nomenclatura utilizada para identificar los fragmentos de azúcares y la estructura de los iones principales obtenidos en experimentos de MS/MS, adaptado de Domon, & Costello, C. E. (1988)

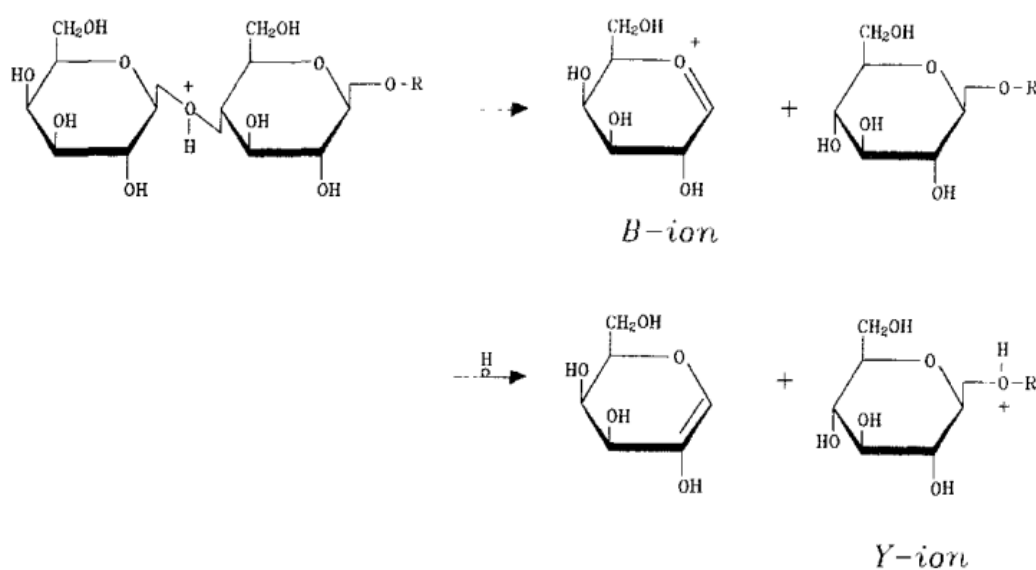


Figura 7: Representación esquemática de la nomenclatura utilizada para describir los iones originados durante la fragmentación de hidratos de carbono en espectrometría de masa. Adaptado de Domon & Costello, 1988.

Las técnicas de fragmentación suave, como la descomposición posterior a la fuente (PSD), generalmente no producen abundantes fragmentaciones de anillo, las cuales son más probables que se observan en los espectros de disociación inducida por colisión (CID) de alta energía. Para nombrar los iones de carbohidratos en espectrometría de masa tándem, existe una convención común que establece la nomenclatura seguida para

identificar los fragmentos de azúcares. Se definen dos series de iones según contengan o no el extremo reductor del oligosacárido precursor. La primera, la serie ABC, en la cual se definen los iones que no contienen el extremo reductor: Ai (fragmentación de enlaces de anillo), Bi y Ci (fragmentación del enlace glicosídico), y los iones que contienen el extremo reductor se etiquetan como Xj (fragmentación de enlaces de anillo), Yj y Zj (fragmentación del enlace glicosídico) (Domon & Costello, 1988). El subíndice i indica la posición del enlace glicosídico escindido contados desde el extremo no reductor y j se refiere la posición del enlace glicosídico escindido contado desde el extremo reductor (Figura 8A). El superíndice (por ejemplo, ^{0,2}A) especifica los enlaces de anillo particulares escindidos. Los iones de las cadenas laterales se complementan con una letra griega (α , β , γ) asignada con un peso decreciente de la cadena lateral (Figura 8B). Dependiendo de la ionización y la estructura del oligosacárido, los fragmentos de enlace glicosídico de una o más series (B, C, Y o Z) se forman predominantemente o incluso exclusivamente. Fragmentos adicionales (Figura 8C) que resultan de la "eliminación por reordenamiento" o las segmentaciones dobles características de los residuos unidos a 1,2 (E) o 1,3-unidos (D, F, G) y las "lactonas de azúcar" (H, W) son diagnósticos para el patrón de ramificación.

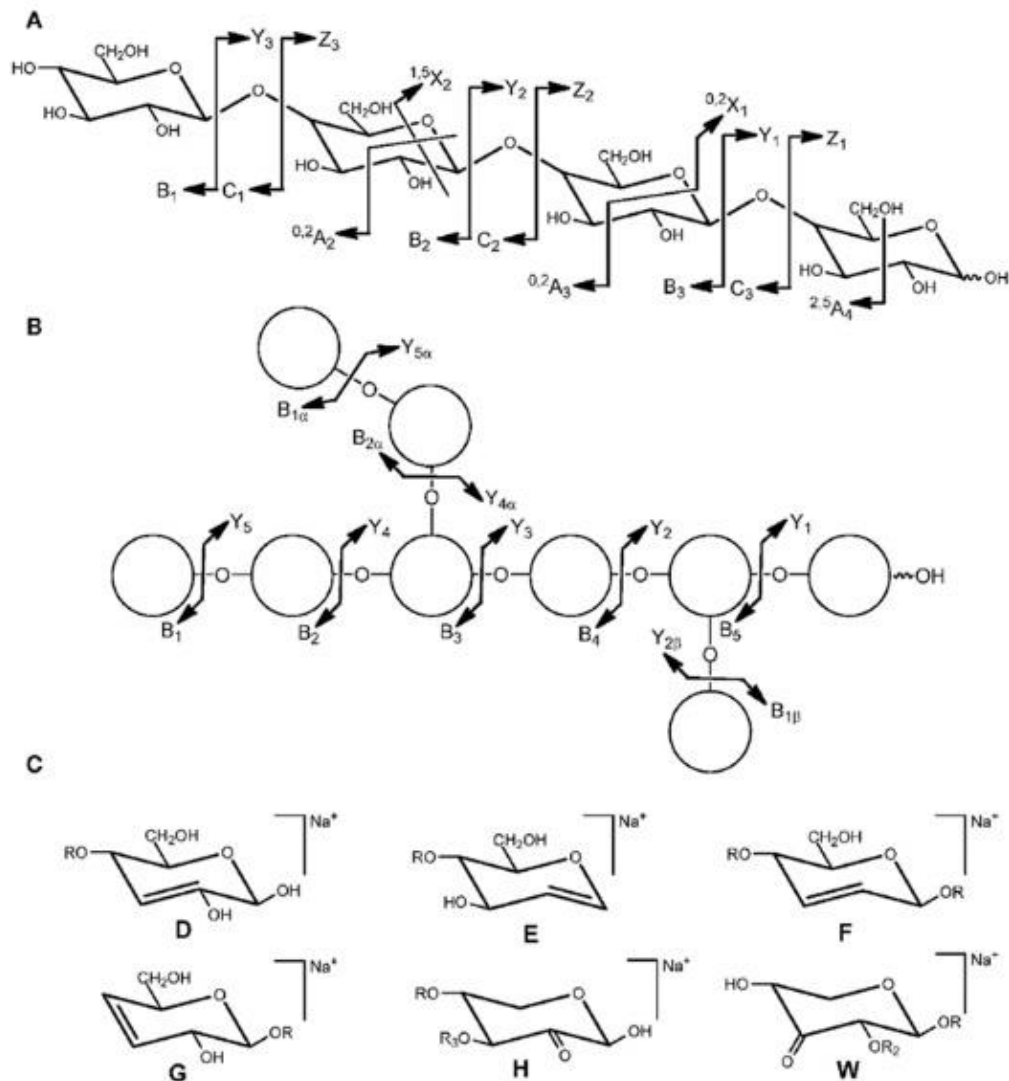


Figura 8: Nomenclatura establecida para la fragmentación de oligosacáridos lineales (A) y oligosacáridos ramificados (B) y estructura de iones de fragmentos (D – H, W) observados mediante “eliminación por reordenamiento” y división doble (C). R = residuo del esqueleto, R₂ = H o cadena lateral, R₃ = H o cadena lateral. Adaptado de Bauer, 2012.

La cuantificación de oligosacáridos por EM aún resulta difícil debido a que las eficiencias de ionización pueden diferir significativamente para los distintos oligosacáridos que componen el sistema en estudio. Con el fin de compensar estas diferencias, se utilizan patrones internos con propiedades casi idénticas a los analitos pero que difieren en su masa, en la práctica cumplida por el uso de estándares llamados isotopólogos. La cuantificación absoluta requiere estándares puros, pero está limitada por la gran variedad de posibles estructuras de oligosacáridos. Para la cuantificación relativa de los niveles de oligosacáridos individuales, cada muestra se derivatiza mediante una

etiqueta isotópica con una masa única. Un ejemplo es el etiquetado con deuterio durante la derivatización con 2-aminopiridina mediante aminación reductiva (Yuan *et al.*, 2005). Las muestras se agrupan y analizan por EM directamente o después de la separación. Cuando se utilizan los sistemas acoplados cromatografía-espectrometría de masa, el marcado con isótopos ^{13}C presenta mayor ventaja que el marcado con deuterio, ya que estos últimos pueden mostrar ligeras diferencias en el tiempo de retención durante la separación cromatográfica. (Zhang *et al.*, 2001).

1.9 Caracterización de polisacáridos por RMN

La espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear es, tradicionalmente, una de las técnicas más utilizadas para la elucidación estructural de polisacáridos ya que permite obtener información acerca del perfil de sustitución, la configuración anomérica, la relación molar entre los distintos residuos que componen el polisacárido y la caracterización de la secuencia de la estructura primaria del biopolímero (Duus *et al.*, 2000; Schievano *et al.*, 2017). El análisis de polisacáridos por RMN comprende el uso de espectros mono- (1D) y bidimensionales (2D). Los espectros 1D que aportan mayor información en polisacáridos son el ^1H and ^{13}C .

Los espectros de RMN ^1H permiten obtener información en tres niveles para el análisis estructural: desplazamiento químico, intensidad (integración) y distancia de acoplamiento espín-espín. Los espectros ^1H , en polisacáridos, presentan señales con un alto grado de superposición haciendo extremadamente compleja la asignación, ya que la mayoría de las señales de los protones se encuentran dentro de un rango de desplazamiento químico de 2 ppm (3–5 ppm). Sin embargo, algunas señales características se presentan bien resueltas, incluidas las de los grupos de protones anoméricos (4.4–5.5), acetilos (2.0–2.1) y metilos (1.2 ppm). Además, las configuraciones α y β se pueden identificar fácilmente, ya que los protones anoméricos α aparecen en la región de 5–6 ppm, mientras que los protones anoméricos β aparecen en el rango de 4–5 ppm (Agrawal, 1992).

Los espectros RMN de ^{13}C proporcionan picos bien resueltos, aunque su abundancia isotópica es menor y por lo tanto se requieren tiempos más largos de adquisición. Los carbonos anoméricos aparecen mayormente a desplazamientos entre 90–110 ppm, mientras que los carbonos no anoméricos están entre 60 y 85 ppm. Los carbonos correspondientes a monosacáridos α -anoméricos aparecen en la región de 95–101 ppm,

mientras que la mayoría de los carbonos de monosacáridos β -anoméricos aparecen entre 101 y 105 ppm. Los polisacáridos con desoxiazúcares como ramnosa y fucosa, presentan señales correspondientes a los grupos metilos entre 15-20 ppm, mientras que los sustituyentes acetilos se presentan en la zona de 20-25 ppm (Bock *et al.*, 1984).

Debido a la complejidad de la estructura molecular de los polisacáridos, la asignación completa por RMN requiere de experimentos RMN 2D. En esta clase de experimentos se pueden observar las correlaciones mononucleares a través de enlaces ^1H - ^1H (COSY, TOCSY), las correlaciones heteronucleares a través de enlaces ^1H - ^{13}C (HSQC, HMQC, HMBC) y las correlaciones a través de espacio entre ^1H - ^1H (NOESY, ROESY) (Blundell *et al.*, 2006).

Los experimentos COSY permiten observar las correlaciones ^1H - ^1H de corta distancia. El abordaje general para analizar espectros COSY en polisacáridos se inicia con el seguimiento de correlaciones a través del azúcar, por medio de resonancias aisladas, como la de los protones anoméricos (4.3–5.4 ppm) o metilos de 6-desoxiazúcares (1.2–1.4 ppm) y posteriormente unir las correlaciones secuenciales en el sistema de spin del monosacárido. Un experimento complementario que provee información de gran utilidad para el análisis de polisacáridos es el TOCSY, que proporciona la correlación total que se da entre todos los protones del sistema de spin de los monosacáridos. En la figura 9, se muestra a modo de ejemplo la complementariedad entre el espectro COSY y TOCSY para la asignación completa de los protones en un arabinogalactano (Price *et al.*, 2015). En el espectro TOCSY se pueden observar las correlaciones de tres sistemas de spin para un polisacárido de la familia arabinogalactano en el cual se distinguen cuatro sistemas de spin correspondientes a los residuos identificados como α -Araf (A, A', y A'') con desplazamientos a 6.01, 5.92 y 5.76 ppm respectivamente, y un residuo β -Galp a 5.10 ppm adquiridos en D₂O a 80 °C.

Las correlaciones entre los núcleos ^1H - ^{13}C provenientes de experimentos HSQC, HMQC y HMBC permite la asignación de los carbonos con sus relacionados protones, ya identificados en los experimentos COSY y TOCSY como se mostró en el ejemplo anterior. Los experimentos de correlación ^1H - ^{13}C proporcionan una mayor dispersión de los desplazamientos químicos para ^{13}C y además una mayor sensibilidad facilitando la elucidación estructural los polisacáridos por RMN.

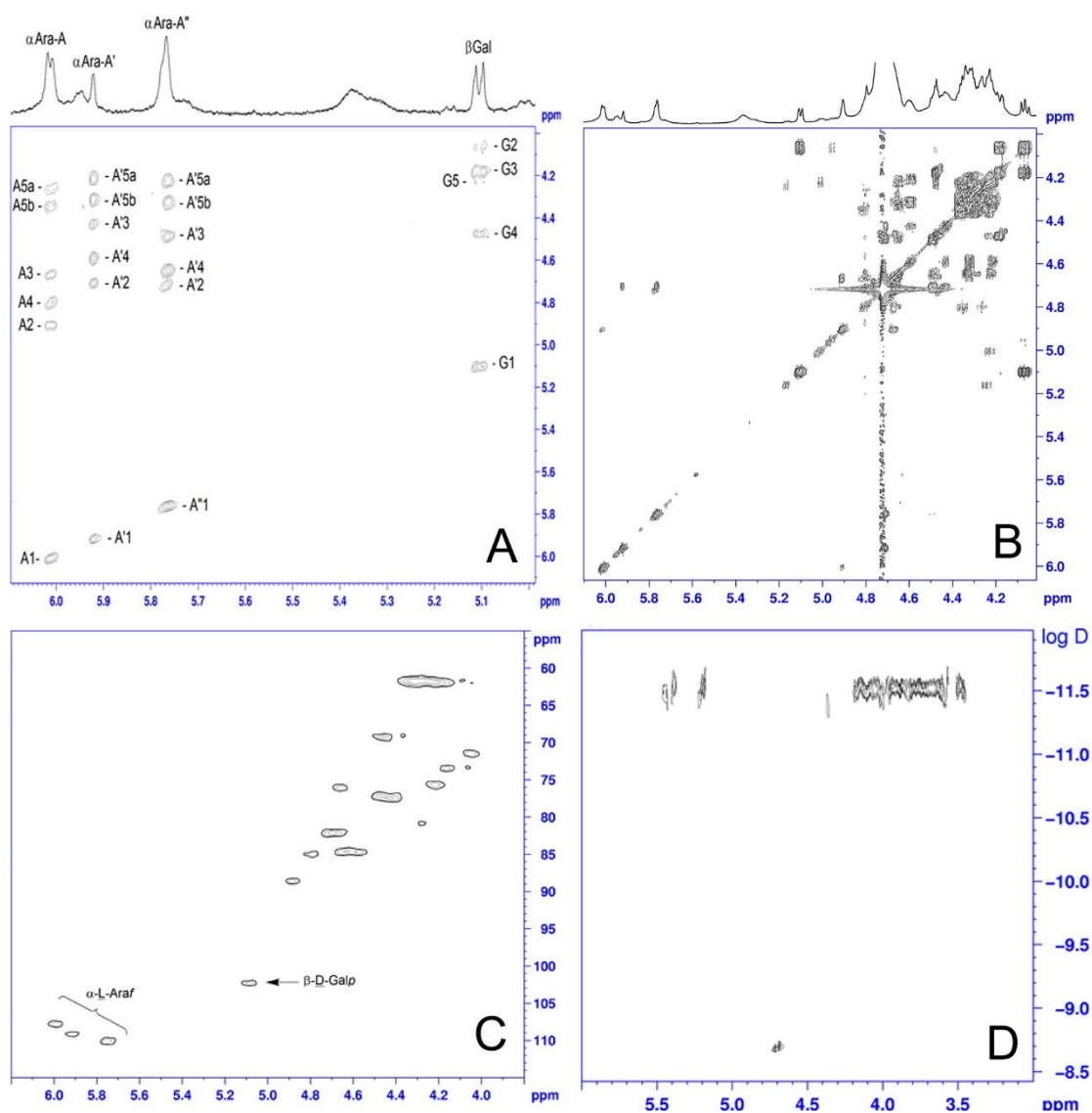


Figura 9: A- Espectro TOCSY y B- Espectro COSY, C- Espectro HSQC y D- Espectro COSY en D_2O a 80°C del polisacárido arabinogalactano proveniente de uvas. Adaptado de Price *et al.*, 2015.

Las correlaciones entre los núcleos ^1H - ^{13}C provenientes de experimentos HSQC, HMQC y HMBC permite la asignación de los carbonos con sus respectivos protones, ya identificados en los experimentos COSY y TOCSY como se mostró en el ejemplo anterior. Los experimentos de correlación ^1H - ^{13}C proporcionan una mayor dispersión de los desplazamientos químicos para ^{13}C y además una mayor sensibilidad facilitando la elucidación estructural los polisacáridos por RMN.

Con el conjunto de experimentos mencionados anteriormente, podría conseguirse la asignación completa de todos los desplazamientos químicos para los núcleos ^1H y ^{13}C . Pero para elucidar por RMN la secuencia o conectividad de los residuos en la estructura

molecular del polisacárido, se utilizan los experimentos HMBC, NOESY y ROESY (Guo & Ai, 2018).

Los experimentos HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Connectivity) proporcionan la correlación entre protones y carbonos por acoplamiento a larga distancia a través de enlace, con sensibilidad. Este experimento no solo confirma las asignaciones obtenidas por HSQC para un mismo residuo o monosacárido, sino que además permite identificar correlaciones de núcleos inter-residuales a través del enlace glicosídico. Por otro lado, los experimentos NOESY y ROESY permiten detectar correlaciones a través de espacio, entre núcleos cercanos tanto intra-residuales, por ejemplo entre sustituyentes no-osídicos (ej. acetilos) con protones del mismo anillo, o correlaciones inter-residuales (Casillo *et al.*, 2017).

2. Glicoproteínas

2.1. Generalidades

En los tres dominios de vida, toda célula, desde formas unicelulares hasta en sistemas de organización superiores, presentan sus superficies cubiertas de hidratos de carbono, tanto libres como asociados a lípidos y proteínas, es decir, como polisacáridos, glicolípidos y glicoproteínas, respectivamente. Los glicoconjugados, constituyen un extenso universo de estructuras y funcionalidades que representan un mayor desafío en su comprensión comparado con otras áreas de la biología celular. Así, abriéndose su propio camino, la glicobiología, es el estudio de la biosíntesis, estructuras, funciones y evolución de los glicoconjugados (Broussard & Boyce, 2019)

La glicosilación de proteínas es la modificación más diversa y compleja que se estima ocurre en el 40% de total de proteínas. Las glicosilaciones de proteínas, son eventos que pueden ocurrir de forma post-traducciona l o co-traducciona l aunque se refieran colectivamente como modificaciones post-traduccionales (PTMs), ya que las mayoría tienen lugar cuando la proteína se encuentra sintetizada y plegada (Nothaft & Szymanski, 2010).

La biosíntesis de los glicanos no está definida por moldes pre-existent s, tal cual ocurre en otras biomoléculas como, ADN, ARN y proteínas, sino que se basa en la actividad en cascada de un set de glicosiltransferasas específicas, haciendo que las glicoproteínas puedan encontrarse en la misma célula como un conjunto de glicofor mas, al cual se refiere como microheterogeneidad. Por otra parte, una misma proteína puede encontrarse glicosilada en forma diferente en un tejido respecto de otro, presentando macroheterogeneidad (Moremen *et al*, 2012).

2.2 Tipos de glicosilaciones

Los glicanos pueden encontrarse unidos covalentemente al grupo amida de residuos de Asn (*N*-Glicosilación), al hidroxilo de residuos de Ser y Thr (*O*-Glicosilación) y en casos más raros, al carbono C2 indólico del Trp a través de un enlace C-C (*C*-Manosilación) o al grupo sulfhidrilo en residuos de cisteínas (*S*-Glicosilación).

La *N*-glicosilación comprende la incorporación de un oligosacárido sobre un residuo de asparagina la cual se encuentra formando parte de un motivo o secuencia conservada

definida como Asn-X-Ser/Thr, donde X representa cualquier aminoácido excepto prolina. La glicosilación de asparaginas ubicadas por fuera de secuencias consenso solo ha sido reportada en raros casos. En sistemas eucariontes, la mayoría de las estructuras descritas de *N*-oligosacáridos comparten un motivo estructural definido por un pentasacárido denominado “core”, y en función de la composición de los residuos que se extienden sobre esta unidad, se clasifican en tres categorías: de alta manosa, híbridos o complejos (Figura 10). Sin embargo, en procariontes ha sido descrita una mayor variabilidad estructural de *N*-oligosacáridos que se encuentran por fuera de esta categorización (Figura 12) (Li *et al.*, 2016; Schäffer *et al.*, 2001; Tan *et al.*, 2015).

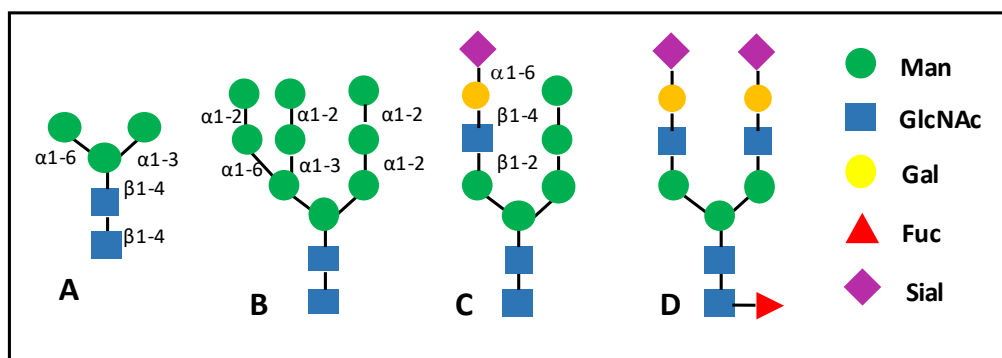


Figura 10: Representación esquemática de las estructuras de los *N*-oligosacáridos de eucariontes.

Por el contrario, la *O*-Glicosilación no está limitada a ocurrir sobre una secuencia proteica conservada, sino que presenta mayor variabilidad, tanto en el sitio de unión como al monosacárido que une el oligosacárido a la proteína, así como también respecto de la longitud estructural del mismo. No obstante, algunos motivos estructurales pueden clasificarse como, tipo-Mucina, los cuales se anclan en residuos Ser/Thr a través de una *N*-acetilgalactosamina (GalNAc) (Figura 11). Otro amplio rango de *O*-glicanos modifican residuos Ser/Thr mediante una unidad de *N*-acetilglucosamina (GlcNAc). Los proteoglicanos contienen residuos de serina modificados con glicosaminoglicanos (GAGA) *via* un residuo de xilosa. También se describen con menor frecuencia modificaciones de Ser/Thr mediante *O*-manosilación y *O*-fucosilación (Varky & Cummings, 2009).

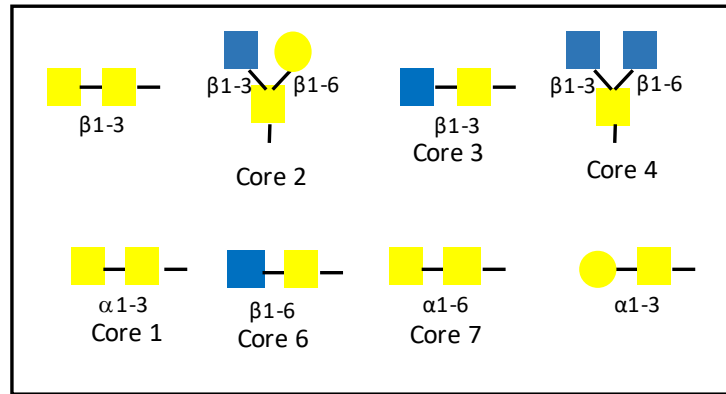


Figura 11: Estructuras núcleo o “core” de *O*-glicanos tipo-Mucina en sistemas eucariontes.

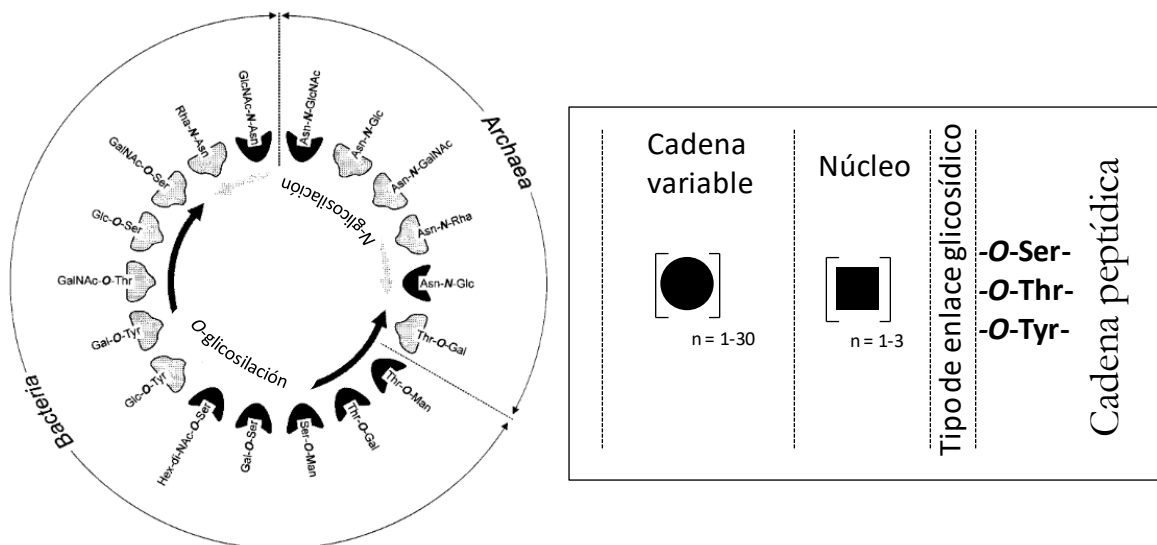


Figura 12: Esquema de las distintas glicosilaciones reportadas en sistemas procariontes (Dell *et al.*, 2010; Schäffer *et al.*, 2001) (panel izquierdo) y descripción estructural de los *O*-glicanos en procariontes (panel derecho).

2.3 Glicoproteómica

Muy distante de ser simples "decoraciones", las modificaciones postraduccionales de una proteína pueden definir la actividad, localización, el “turnover”, es decir, el balance entre el proceso de su síntesis y degradación, señalización, interacción con receptores, entre otras (Li *et al.*, 2016).

La glicómica se fusiona con la proteómica, dando lugar a un nuevo campo independiente, la glicoproteómica, la cual se encarga del estudio de la glicosilación, cubriendo un amplio espectro, que va desde una única entidad proteica purificada hasta el total de proteínas expresadas en un sistema celular específico, es decir, el

glicoproteoma. El análisis de glicoproteínas, requiere de la elucidación estructural de los oligosacáridos, desde su composición, la conectividad entre los distintos monosacáridos, el sitio de anclaje del glicano en la secuencia proteica, el nivel de ocupación del sitio modificado en el pool de proteínas expresadas, y la contextualización del evento de glicosilación en tiempo y espacio del sistema en las condiciones de crecimiento celular definidas respecto de un estado normal.

En sus comienzos, los hallazgos de las glicosilaciones se originaban de forma fortuita durante estudios de proteínas individuales con la ayuda de técnicas bioquímicas y moleculares estándar. El análisis directo de las modificaciones requería el aislamiento de la proteína en estudio en una cantidad casi impracticable para el estudio bioquímico. En la actualidad, el análisis de las glicoproteínas ha cambiado radicalmente ya que está liderado por la espectrometría de masa, y se encuentra abordado desde dos enfoques, el glicómico, que estudia las estructuras de los glicanos liberados de las proteínas, y el (glico)proteómico, centrado en la localización de los glicanos en la estructura proteica, así como también la cuantificación del nivel de glicosilación expresado en la proteína sitio-específico.

2.4 Análisis glicómico

El análisis glicómico comienza con la liberación de los oligosacáridos de la/las proteína/s purificadas a analizar. Los oligosacáridos pueden obtenerse según dos métodos, químicos y enzimáticos. La liberación enzimática de oligosacáridos se utiliza principalmente para el estudio de los *N*-glicanos, esto es debido a que, excepto raros casos, poseen un núcleo estructural común el cuál es reconocido por la enzima PNGasa F. El uso de enzimas para la liberación *O*-glicanos presenta mayores limitaciones debido a la diversidad estructural de este tipo de modificación. La enzima mayormente utilizada en glicómica para la liberación de *O*-glicanos es la *O*-glicosidasa, aunque solo tiene actividad hidrolítica sobre los oligosacáridos con estructuras derivadas de los Core 1 y Core 2. Por lo tanto, la liberación enzimática queda entonces delegada solo en los casos en los cuales se conozca la conectividad entre el oligosacárido y la proteína.

Los métodos químicos para la liberación de *O*-glicanos incluyen tratamientos en condiciones básicas (β -eliminaciones), y la hidrazinólisis. Los *O*-glicanos pueden ser liberados por bases diluidas como el hidróxido de sodio, (β -eliminación de Carlson), amoníaco o hidróxido de bario. El inconveniente con estos métodos es la degradación del

oligosacárido por una cascada de β -eliminaciones que se originan desde el extremo reductor del glicano liberado (*peeling*). Para evitar esta degradación, se incorporan reactivos al medio alcalino, con actividad sobre la función aldehído del extremo reductor del azúcar liberado. Se distinguen así, β -eliminaciones reductivas (Iyer & Carlson, 1971) y no reductivas (Huang *et al.*, 2001). En las primeras utilizan un agente reductor (NaBH_4) que convierte el monosacárido del extremo reductor a un alditol. Las del segundo tipo comprenden un abanico un poco más amplio de metodologías. Se ha descrito la liberación de *O*-glicanos utilizando amoníaco saturado con carbonato de amonio (Yu *et al.*, 2010). En este método, la formación de la glicosilamina del oligosacárido liberado previene el *peeling* y la reconversión al extremo reductor se consigue por hidrólisis con ácidos débiles como ácido acético o bórico. También se describen β -eliminaciones con etilamina, 70%, dimetilamina 40%, y con el complejo amoníaco-borano en solución de amoníaco (Hanisch *et al.*, 2001).

Por otra parte, la hidrazinólisis, permite la liberación de *O*-glicanos dejando intacto el extremo reductor. El mecanismo exacto de la reacción se desconoce, pero se ha propuesto que la liberación del oligosacárido podría proceder vía una β -eliminación inicial. El tratamiento con hidrazina también requiere la incubación con temperatura (60°C 4-6h). Los rendimientos de de-glicosilación alcanzados con esta técnica superan ampliamente a cualquiera de las β -eliminaciones no reductivas mencionadas anteriormente (Kisiel *et al.*, 2008).

2.5 Análisis (glico)proteómico

El análisis glicoproteómico se encuentra fuertemente liderado por la espectrometría de masa, que en función de los múltiples arreglos que se disponen las fuentes de ionización, celdas de inducción de fragmentación, y analizadores, sumado al acoplamiento con técnicas separativas como cromatografía líquida y electroforesis capilar, representan un sinnúmero de técnicas analíticas para el estudio de las glicoproteínas (Banazadeh *et al.*, 2017).

Tradicionalmente, en el análisis proteómico denominado *bottom-up* (Zhang *et al.*, 2013), las proteínas son primero digeridas mediante proteasas para generar (glico)péptidos. Luego de la proteólisis, la mezcla compleja es selectivamente enriquecida en glicopéptidos y analizada por la técnica de espectrometría de masa seleccionada.

La digestión enzimática del conjunto de proteínas, es comúnmente llevada a cabo utilizando tripsina, entre otras proteasas (Tsiatsiani & Heck, 2015), con actividad hidrolítica sobre el extremo carboxilo de lisinas (K) y argininas (R), aunque también son empleadas dobles digestiones con enzimas específicas que actúan sobre otros residuos (Tabla 3).

Tabla 3: Proteasas utilizadas para el análisis glicoproteómico

Proteasa	Familia	Sitio de clivaje	Posición de corte
ArgC	Cistein proteasa	R	C- terminal
AspN	Metaloproteasa	D	N- terminal
Quimotripsina	Serin proteasa	F, Y, L, W, M	C- terminal
GluC	Serin proteasa	D	C- terminal
LysC	Serin proteasa	K	C- terminal
LysN	Metaloproteasa	K	N- terminal
Pepsina	Aspartic proteasa	Y, F, W	C- terminal
Tripsina	Serin proteasa	R, K	C- terminal

Debido a que la ionización de glicopéptidos es desfavorable frente a péptidos, sumado a la baja abundancia de glicopéptidos en comparación con la cantidad de péptidos originados en la digestión, es necesario aumentar selectivamente la concentración de glicopéptidos. Existe un amplio abanico de técnicas que se emplean para tal fin. Las mismas pueden categorizarse en función de la naturaleza de las interacciones que se establecen para la separación, esto es, en interacciones covalentes y no covalentes.

2.6 Enriquecimiento de glicopéptidos mediante interacciones no-covalentes

En este tipo de metodología se destaca el enriquecimiento por lectinas (Mechref, *et al.*, 2008; Qiu & Regnier, 2005; Ruiz-May *et al.*, 2014). Las lectinas son proteínas con alta afinidad de unión hacia carbohidratos específicos. Común a cualquier formato de enriquecimiento por lectinas, los glicopéptidos que contienen el azúcar a ser reconocido, son retenidos en el sistema lectina-soporte, mientras que el conjunto de péptidos no glicosilados así como también los glicopéptidos sin el motivo estructural reconocido por la lectina, son eluidos sin retenerse. La fracción retenida es, en una etapa posterior, eluída utilizando monosacáridos o disacáridos específicos que compitan por el sitio de unión a

la lectina desplazando así los glicopéptidos de interés. En otros casos puede conseguirse la elución con medios ácidos que interrumpan la interacción ligando-lectina.

En 1990, Alpert (Alpert, 1990) introdujo el término HILIC (Cromatografía líquida de interacciones hidrofílicas), para denominar separaciones cromatográficas del modo Fase-Normal, en la cual se utiliza una fase estacionaria polar y un sistema de fase móvil de polaridad creciente. Mientras que en las separaciones tradicionales en modo fase-normal que rutinariamente utilizan los químicos orgánicos se emplean fases móviles de solventes orgánicos hidrofóbicos, o sea no miscibles con agua, en el modo HILIC, se utilizan mezclas de solventes orgánicos solubles en agua y un contenido acuoso medio del 45% v/v, mezclas que además de convenientes para ser acopladas a espectrometría de masa, son ortogonales a cromatografía de fase reversa. Una de las técnicas mayormente utilizadas es ZIC-HILIC (Alagesan *et al.*, 2017; Dedvisitsakul *et al.*, 2014; Pohlentz *et al.*, 2016), la cual utiliza como fase estacionaria un soporte zwitteriónico caracterizado por llevar cargas positivas y negativas que funcionalizan la superficie del soporte y establecen interacciones electrostáticas más débiles con el analito, comparado con fases estacionarias intercambiadores de cationes o aniones. Entre los numerosos soportes HILIC para la separación/enriquecimiento de glicopéptidos, el de mayor accesibilidad es el Cotton- HILIC (Selman *et al.*, 2011), el cual consiste en un soporte cuya matriz es de naturaleza sacarídica. La configuración de este sistema es del tipo SPE (extracción en fase sólida). Esta metodología conduce a purificaciones de glicopéptidos con elevada eficiencia y simpleza operacional. Otra metodología habitualmente utilizada para enriquecimiento de glicopéptidos emplea como fase estacionaria, Carbono Grafito Poroso (Ahn *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2014). Por medio de ésta, se han logrado purificar oligosacáridos de mezcla de sales y péptidos, así como también, enriquecimientos de alta calidad en mezclas no complejas de glicopéptidos.

2.7 Enriquecimiento de glicopéptidos mediante interacciones covalentes

Entre estas técnicas se encuentra el enriquecimiento por hidrazida (Klement *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2003; Zou *et al.*, 2008), agrupada en la categoría del tipo SPE y consiste en una serie de cuatro etapas. Primero se oxidan los cis-dioles vecinales de las glicoproteínas, a aldehídos utilizando periodato de potasio. En una segunda etapa, se forman las hidrazonas por reacción entre los aldehídos y el soporte funcionalizado con hidrazina, generándose así la inmovilización covalente de las glicoproteínas y por medio

de un lavado posterior, se eluyen las proteínas no inmovilizadas. En una tercera etapa, se digieren las proteínas inmovilizadas con *N*-glicanasa para hidrolizar los oligosacáridos y se eluyen las proteínas que quedaron liberadas por la acción proteolítica de la enzima. Esta metodología puede emplearse tanto para glicoproteínas como para glicopéptidos.

Otro método de enriquecimiento involucra la química de los ácidos borónicos (Wei *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2017; Zhou *et al.*, 2008), la cual puede ser empleada para capturar oligosacáridos con 1-2 *cis*-dioles para generar el éster cíclico. Esta reacción se vuelve reversible a pH ácido, medio en el cual, se liberan las glicoproteínas o glicopéptidos inmovilizados, con la ventaja de poder utilizar reactivos compatibles con espectrometría de masa.

2.8 Análisis del sitio de glicosilación

Las metodologías para la determinación de los sitios de glicosilación sobre la secuencia proteica dependen exclusivamente si el estudio se realiza sobre proteínas *N*-glicosiladas o en proteínas *O*-glicosiladas. Las primeras, sin mencionar raros casos reportados, tienen lugar sobre secuencias consenso, lo cual simplifica su abordaje. Los sitios de glicosilación estarán contenidos dentro de la secuencia NXS/T, por lo cual, conociendo la estructura primaria de la proteína, se conocen *a priori*, cuáles son los potenciales residuos de asparagina que podrían estar modificados. En este sentido, cuando se analizan glicopéptidos que contienen solo una secuencia consenso, el sitio de glicosilación queda definido cubriendo la identificación del péptido a través de la serie de iones b-y (Figura 13).

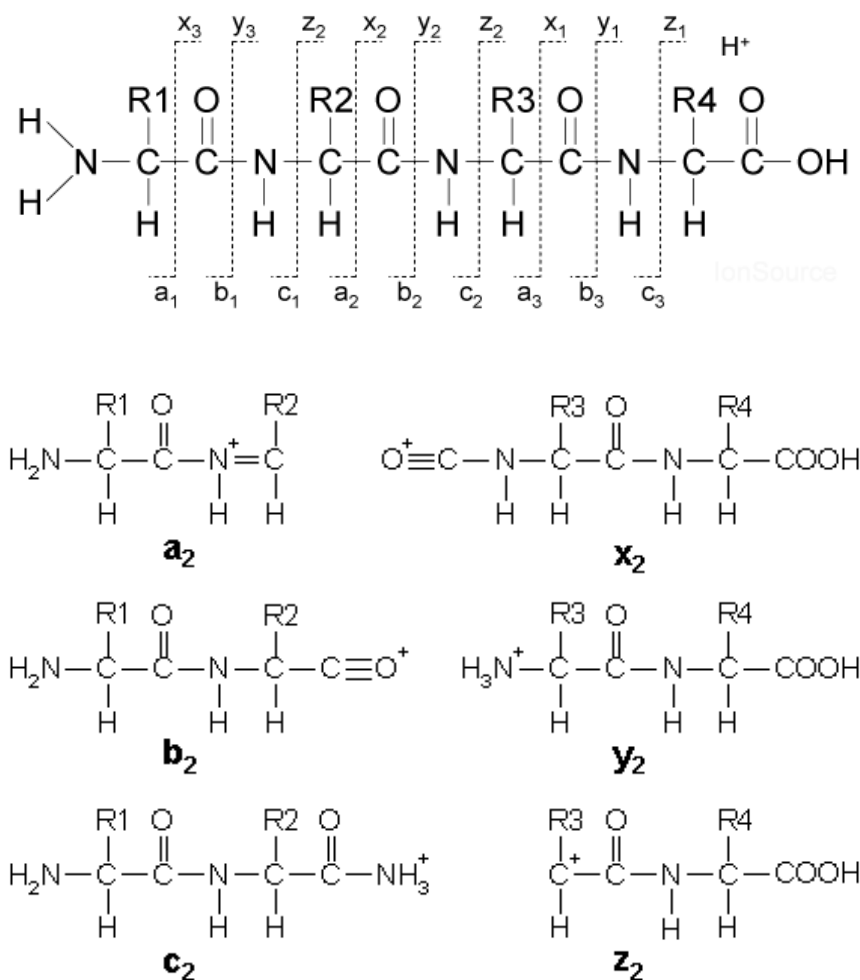


Figura 13: Estructuras de los iones obtenidos en MS/MS a partir del ión precursor.

El análisis requiere de una estrategia experimental adicional cuando el glicopéptido en estudio contiene más de una secuencia consenso, es decir, más de una asparagina potencialmente glicosilada ya que no se podría predecir cual/cuales son los sitios que contienen la modificación. En estos casos, el procedimiento frecuentemente adoptado para el mapeo sitio específico, se basa en tratar el glicopéptido con PNGasa F. Como resultado de la reacción de deglicosilación, la asparagina es convertida en ácido aspártico (Figura 14), introduciendo una diferencia de 0.984 Da, diferencia que puede ser detectada utilizando espectrometría de masa de alta resolución (Segu *et al.*, 2010). Una diferencia aún mayor (2.9882 Da) podría obtener mediante el marcado con ^{18}O del ácido aspártico resultante facilitando la asignación (Liu *et al.*, 2010).

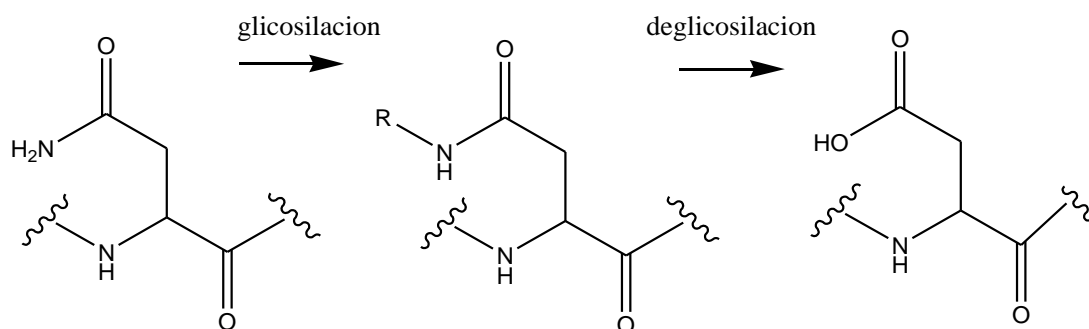


Figura 14: Representación esquemática de la conversión de asparagina en ácido aspártico luego de la reacción de de-glicosilación.

Es de notar que en proteínas *O*-glicosiladas, la de-glicosilación de los aminoácidos serina y treonina utilizando tratamientos con bases diluidas y calor, los convierte en sus correspondientes dehidro aminoácidos. En los tratamientos usando como base amoníaco, en la búsqueda de sitios modificados, una diferencia de 0.984 Da unidad se obtiene debido a la adición de Michael del amoníaco como nucleófilo sobre el aceptor de Michael dehidro aminoácido (Anzengruber *et al.*, 2014). Para facilitar la asignación, hay una variedad de metodologías para el mapeo sitio específico (Halfinger *et al.*, 2011) (Figura 15) que emplean diferentes combinaciones de nucleófilos y medios básicos con distinto grados de reactividad, siendo el resultado final, una mayor diferencia de masa del producto de adición respecto de las serinas y treoninas de partida. Los nucleófilos mayormente utilizados pertenecen al grupo de los tioles, entre ellos, β -mercaptoetanol, tiocolina, ditiotreitól. Los medios básicos mayormente utilizados son, dimetilamina, trimetilamina, amoníaco, hidróxido de bario o hidróxido de sodio.

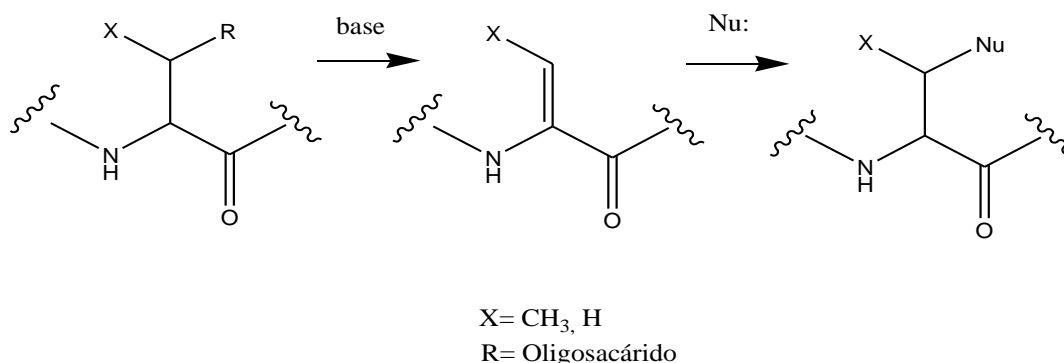


Figura 15: Representación esquemática de la reacción de deglicosilación de *O*-glicoproteínas

2.9 Glicoproteómica *top-down*

Originalmente, el estudio proteómico se presenta como una técnica de espectrometría de masa del tipo *bottom-up*, en el que las proteínas son digeridas por proteasas y la identificación de las proteínas presentes se basa en el reconocimiento de péptidos asociados a cada una de las proteínas presentes en el sistema de estudio, siendo como requisito estándar para definir la presencia de una proteína, determinar un mínimo de tres péptidos.

En glicoproteómica, dado que los glicopéptidos, son en promedio, mucho más grandes ($3 < PM < 10$ kDa) que sus contrapartes no modificadas, y que además requieren de aproximaciones cromatográficas y de fragmentaciones que se alejan de los estándares para proteómica, el estudio de glicopéptidos, es considerado dentro de la categoría de proteómica *middle-down* (Cristobal *et al.*, 2017).

En los últimos años, con el continuo desarrollo de las técnicas de ionización y de analizadores de alta resolución, la investigación en glicoproteómica ha alcanzado al estudio de glicoproteínas intactas permitiendo detectar diferentes proteoformas (Bourgoin-Voillard *et al.*, 2014) en condiciones nativas (Figura 16).

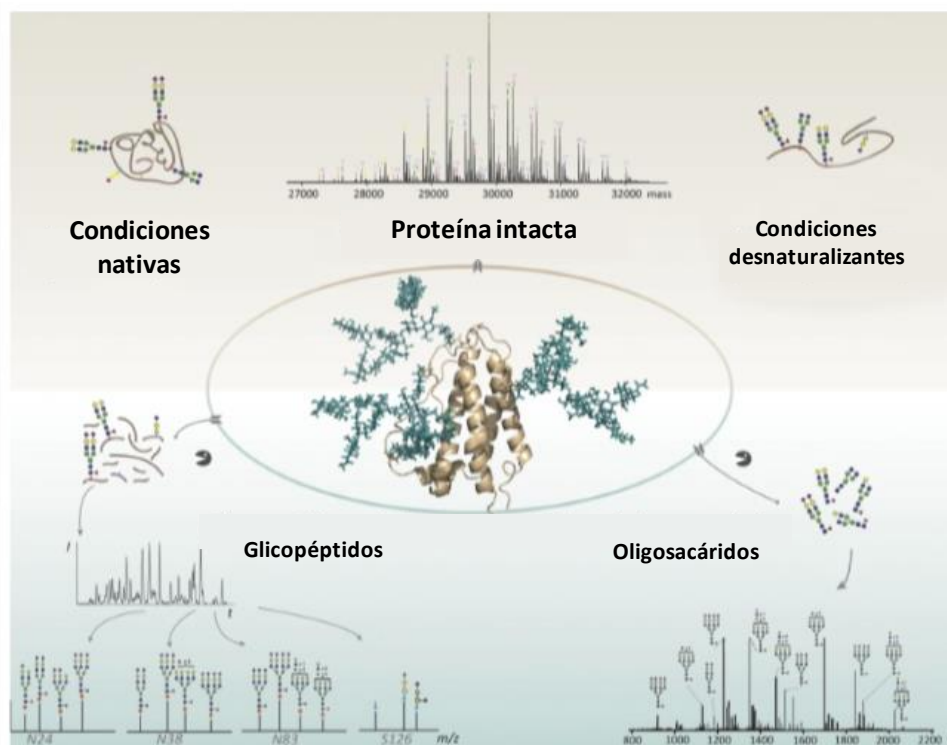


Figura 16: Representación esquemática de los diferentes abordajes glicoproteómicos.

Adaptado de Yang *et al.*, 2016.

El análisis en condiciones nativas, se considera de gran ventaja ya que provee una visión más directa de la abundancia relativa del total de las modificaciones de diferentes proteoformas distinguibles por espectrometría de masa (Yang *et al.*, 2016). Por ejemplo, el análisis de glicoproteínas en condiciones nativas, se ha utilizado para resaltar el perfil de pesos moleculares, es decir, la distribución de proteoformas, la cual da información acerca del tipo, abundancia y tamaño de la glicosilación. Otra ventaja del análisis de glicoproteínas nativas es la simplificación del tratamiento de la muestra, evitando el tratamiento con agentes desnaturalizantes, reductores y alquilantes, hecho que previene la pérdida de material durante las distintas etapas de la manipulación de la muestra y reduce posibles modificaciones químicas que se introducen en los aminoácidos durante los distintos tratamientos. Aun así, el análisis sitio-específico, la estructura, y la estequiometría en cada residuo modificado solo puede obtenerse por métodos *bottom-up*.

2.10 Herramientas bioinformáticas para el análisis de glicoproteínas

En comparación con la proteómica, las herramientas bioinformáticas destinadas al campo de la glicoproteómica se encuentran limitadas, y con notable grado de inmadurez, lo que obliga en última instancia a la revisión y anotación manual de espectros, para la interpretación de la información cruda del análisis por espectrometría de masa (Chalkley & Clauser, 2012; Dallas *et al.*, 2013). En un experimento estándar proteómico, las secuencias de proteínas son digeridas en péptidos, donde los sitios de corte dependen específicamente de la enzima seleccionada, siendo tripsina la más utilizada, la cual presenta como sitio de corte el extremo carboxilo de argininas y lisinas excepto que estén seguidas de prolina. La mezcla enriquecida en glicopéptidos se somete a una separación cromatográfica la cual se acopla a espectrometría de masa pudiendo analizarse según dos modos, DDA (Data Dependent Analysis/ Análisis Dependiente de Datos) DIA (Data Independent Analysis / Análisis Independiente de Datos), siendo el primero el mayormente utilizado (Kalli *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2018; Lin *et al.*, 2018). En el modo de análisis data-dependiente, se define un ciclo de análisis, que consta primero de un registro de iones precursores, los cuales originan un espectro denominado full MS, cubriendo un rango de m/z definido previamente al análisis, usualmente 400-2000 m/z . En una siguiente etapa, un determinado número de iones precursores son seleccionados (en función de la abundancia relativa) para ser individualmente fragmentados en una celda de colisión, y sus iones producto son analizados originando sus respectivos espectros de MS/MS, es así

como por cada ciclo de análisis se obtiene un espectro de full MS que representa la foto de todos los analitos que volatilizaron y ionizaron en la interface entre la separación cromatográfica y el analizador de masas. Subsecuentemente, se obtiene una serie de espectros MS/MS correspondientes a la fragmentación de los iones precursores seleccionados.

La disociación de los iones precursores se categoriza en función de las subestructuras que conjuntamente conforman los glicopéptidos (Ahmed, 2008). La fragmentación del esqueleto peptídico origina dos tipos de series de iones principales denominadas *b-y*, dependiendo de qué lado de la unión peptídica tenga lugar el corte, y dos series adicionales de menor abundancia iónica. (Figura 4). La fragmentación del oligosacárido genera la mayor abundancia relativa de iones, dado que las uniones glicosídicas son más lábiles que las uniones peptídicas. Por lo que idealmente se puede reconstruir la estructura del glicano a partir de fragmentos correspondientes a la porción sacarídica, conjuntamente con fragmentos de oligosacárido conteniendo parte peptídica (Figura 17), que originan una nueva serie de iones (serie Y).

La totalidad de los espectros generados durante el análisis, datos crudos o *raw data*, son analizados con herramientas bioinformáticas mediante previa definición del método de búsqueda o *pipeline* adecuado para el sistema de (glico)péptidos en estudio (Palmlblad *et al.*, 2019; Zeng *et al.*, 2016).

La herramienta bioinformática primero emula la digestión (*in-silico*) de la secuencia proteica, definiendo los sitios de corte por la enzima utilizada, generando una biblioteca de valores de *m/z* asociados a cada péptido, conjuntamente con los valores de *m/z* asociados a los fragmentos de cada uno de los mismos (Hu *et al.*, 2017). Todos estos datos son los que utilizará para comparar (mediante un intervalo de error de masa previamente definido y determinado por la resolución del analizador) con los datos experimentales. Además puede definirse información adicional sobre los iones precursores, incluyendo, valores calculados monoisotópicos, valores calculados promedio, distribución isotópica, abundancia relativa y otras características de la secuencia que serán utilizados para comparar con los datos experimentales (Guthals *et al.*, 2012).

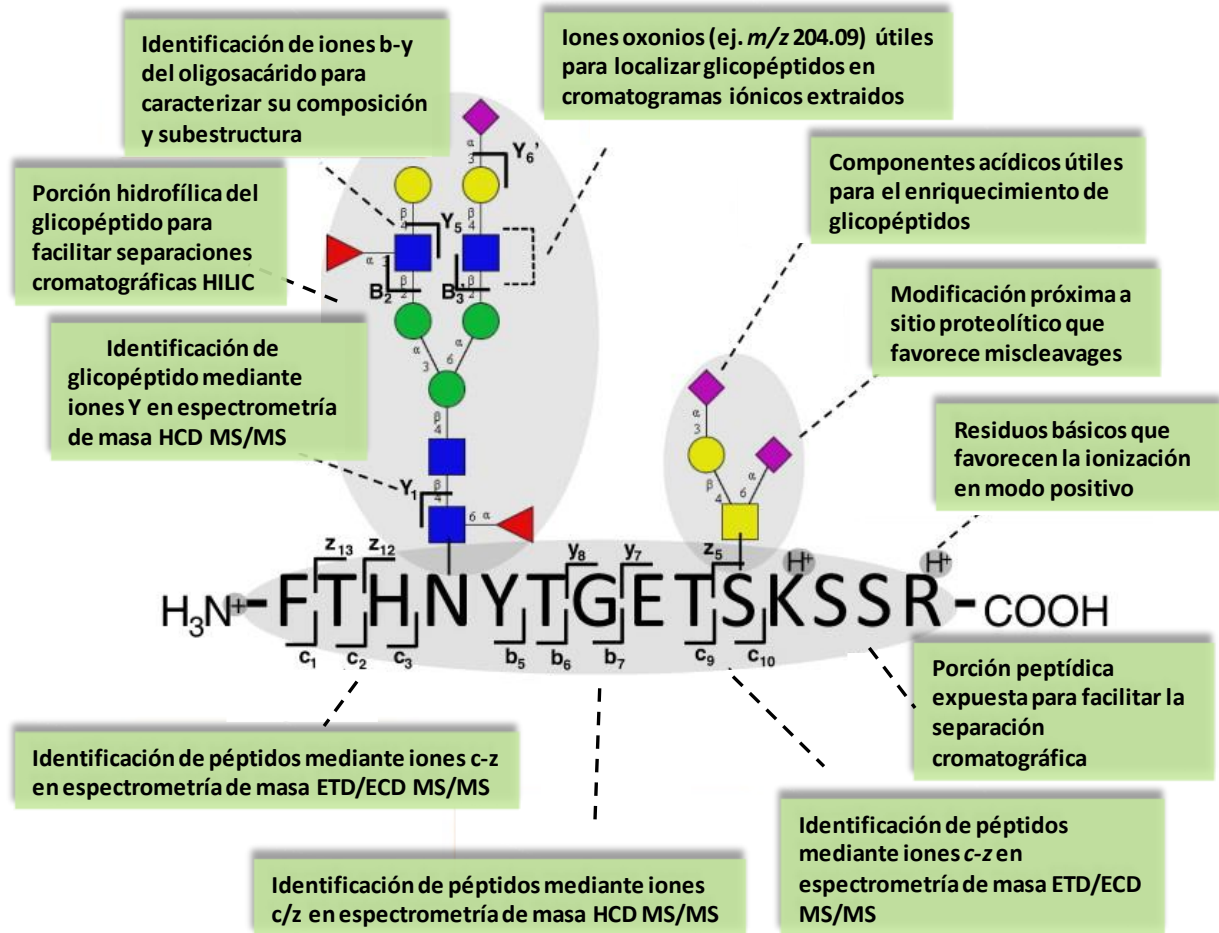


Figura 17: Resumen global de los distintos abordajes por espectrometría de masa para el análisis de glicopéptidos

Los datos crudos de experimentos dirigidos al análisis de glicopéptidos son especialmente complejos de abordar por varios motivos. En principio, la naturaleza química de esta clase de glicoconjugados dista considerablemente en función de los caminos de fragmentación, respecto del comportamiento de su contraparte, los péptidos puros, ya que la energía empleada para inducir la disociación no solo será distribuida sobre el esqueleto peptídico, sino también sobre las estructuras de los oligosacáridos originando caminos de fragmentación no conservados, y en consecuencia complicando la estandarización para el desarrollo de algoritmos informáticos. Por otro lado, otro factor que complejiza el análisis es el significativamente mayor tamaño de las moléculas de glicopéptidos, generalmente, entre 3 -10 kDa, hecho que dificulta encontrar el valor de m/z monoisotópico experimental y que queda generalmente por debajo de la línea de ruido, dado que las contribuciones debidas a isotopos de ^{13}C son más probables (Figura 18).

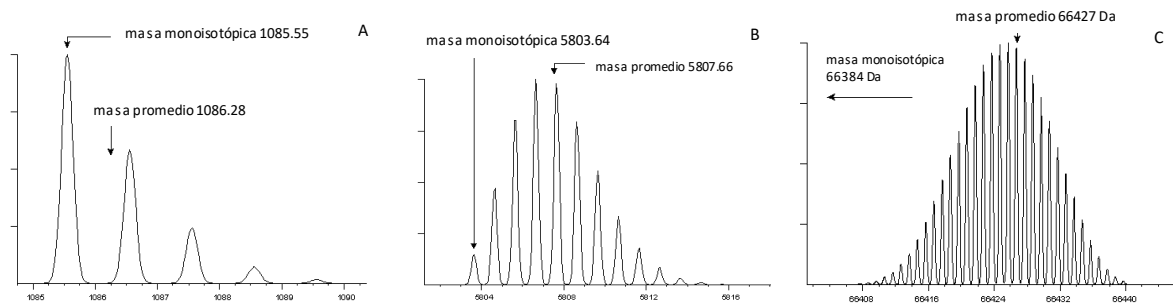


Figura 18: Espectros de masa ESI-Orbitrap de A) péptido HLKTEAEMK de peso molecular promedio 1086.28 Da, B) insulina de peso molecular promedio 5807.66 Da, C) Albúmina de suero bobino (BSA) de peso molecular promedio 66427 Da. Adaptado de MatrixScience.com/mass_accuracy

A este efecto, se suma el hecho de que la capacidad de resolución de los analizadores se ve disminuida a mayor peso molecular. Un detalle adicional que dificulta el análisis de glicopéptidos, a nivel resolución iónica, y que no debe dejar de tenerse en cuenta es la naturaleza hidrofílica de los glicanos que modifican los péptidos. Esta naturaleza hidrofílica impide la completa de-solvatación durante el proceso de volatilización-ionización, lo cual se traduce en un espectro de masa con alto grado de solapamiento entre distintas glicofomas debido a la retención diferencial de moléculas de agua. Otro evento que tiene lugar durante la ionización, que también contribuye al solapamiento de las señales y en consecuencia, a la complejidad del análisis, es la policarga (Xu *et al.*, 2018). Un glicopéptido puede ionizarse con una multiplicidad de cargas, dependiendo de la longitud del péptido, los aminoácidos que lo conforman y la extensión del oligosacárido que lo modifica. Las distintas glicofomas pueden presentarse con una alta variabilidad en la multiplicidad de carga, lo cual trae como consecuencia la sobrepoblación iónica del espectro obstaculizando el análisis, debido a la superposición de patrones isotópicos. Esto no solo produce un detrimento resolutivo sino también una dificultad en la asignación misma de la multiplicidad de carga en las señales menos abundantes. Por supuesto estos factores que afectan la resolución aumentan en forma exponencial cuando el péptido contiene más de un sitio de glicosilación.

Es de destacar que la pérdida de capacidad de análisis, y en consecuencia la incompleta identificación de glicopéptidos, no solo se ve incrementada debido a que existe un mayor número de especies presentes en el espectro full MS hecho que implica que no todas puedan ser seleccionada para una subsecuente fragmentación por MS/MS, sino que también, se propician eventos de co-fragmentación determinados por el co-

aislamiento que ocurre cuando más de una especie es filtrada en la ventana de selección con un valor de amplitud medio de m/z , típicamente, de 1.5 m/z (Leymarie & Zaia, 2012; Na & Paek, 2015).

Al momento de conducir el análisis automático, los factores anteriormente mencionados, si bien pueden sortearse en el estudio de muestras simples de proteínas purificadas, convierten el abordaje en extremadamente dificultoso para muestras complejas (conteniendo más de una proteína glicosilada) y, especialmente, cuando se encara el estudio del conjunto de las proteínas glicosiladas expresadas en un organismo determinado, es decir, el glicoproteoma.

Las herramientas bioinformáticas para el análisis glicoproteómico se encuentran en la plenitud de su desarrollo. Al momento se dispone un gran número de programas informáticos para la semi-automatización del análisis de datos crudos, entre ellos, Peptonist (Goldberg *et al.*, 2007), Glycopat 2.0 (Liu *et al.*, 2017), Byonic (Bern *et al.*, 2012), pGLYCO (Liu *et al.*, 2017), pero además de ser extremadamente caros, a la fecha, no es posible evitar la inspección manual al momento de realizar la identificación de glicopéptidos.

Resultados y Discusión

1. Caracterización estructural del exopolisacárido de *Pseudomonas veronii* 2E

Objetivos:

- Caracterizar estructuralmente el exopolisacárido mayoritario
- Estudiar la actividad de biosorción del material polisacarídico total presente en el EPS y del polisacárido purificado

1. Sustancias poliméricas extracelulares en procariontes

Los microorganismos producen una amplia variedad de macromoléculas que liberan al medio extracelular. Las sustancias poliméricas extracelulares (EPS) se definen como una matriz compleja compuesta por proteínas, polisacáridos, lípidos y ácidos nucleicos. Entre estos componentes, los polisacáridos son la proporción mayoritaria. Los polisacáridos que componen la matriz extracelular proveen diferentes beneficios a las células en el consorcio microbiano, incluyendo adhesión, protección y estructura. Permiten la adhesión tanto entre células como en superficies, facilitando la colonización en ambientes abióticos y bióticos, como tejidos animales, resistiendo las condiciones impuestas por el movimiento de fluidos que pudieran separar las células de la fuente de nutrientes (Limoli *et al.*, 2015). Los polisacáridos proveen protección contra una gran variedad de condiciones de estrés, como la desecación, temperatura, respuestas inmunes y alta concentración de sustancias tóxicas para la célula. Estos polímeros, además, dan estructura al biofilm, facilitando la estratificación de la comunidad bacteriana y estableciendo gradientes de nutrientes y sustancias de desecho (Sutherland, 2001). Además, los exopolímeros sirven como agentes biosorbentes al acumular nutrientes del ambiente y limitan el contacto con agentes tóxicos y sustancias de desecho.

Los polisacáridos presentes en el EPS son mayormente de naturaleza polianiónica, lo cual favorece la complejación de cationes metálicos que dan como resultado la inmovilización del metal dentro de la matriz exopolimérica. Estos complejos generalmente son el resultado de interacciones electrostáticas entre los ligandos metálicos y los componentes cargados negativamente de los biopolímeros. La eficiente capacidad de los biopolímeros presentes en los EPS han captado rápidamente la atención con el fin de establecer su papel como elementos centrales en la biorremediación de metales pesados (Wang *et al.*, 2006).

Pseudomonas es un género de bacterias Gram negativas de metabolismo aeróbico no formadores de esporas. Las distintas cepas de *Pseudomonas* han sido descritas con una gran diversidad metabólica lo cual destacan su capacidad de colonizar una gran variedad de nichos relacionándose de múltiples formas con las distintas formas de vida de su entorno. Por ejemplo, *P. putida* y *P. fluorescens* son especies que promueven el crecimiento de plantas, *P. syringae* es un patógeno vegetal que puede infectar un amplio

rango de especies de plantas. *P. aeruginosa* es un patógeno oportunista de humanos (Peix *et al.*, 2018).

Las distintas especies de *Pseudomonas* son metabólicamente muy diversas y por lo tanto son capaces de prosperar en una amplia diversidad de ambientes. La ubicuidad del género *Pseudomonas* y su capacidad para explotar una múltiple fuente de nutrientes refleja un interesante sistema de adaptación al ambiente. Tal comportamiento es favorecido por la presencia de plásmidos catabólicos en *Pseudomonas*, que codifican para enzimas involucradas en la degradación de una amplio espectro de compuestos, lo cual destaca este género para potenciales aplicaciones biotecnológicas en biorremediación (Wasi *et al.*, 2013).

Pseudomonas veronii 2E es una especie autóctona aislada de sedimentos extraídos de la cuenca del Río Reconquista (provincia de Buenos Aires; 34° 25'S, 58° 34'O). Esta bacteria fue seleccionada para ser estudiada debido a su gran tolerancia a altas concentraciones de metales pesados, a sus altos rendimientos en biomasa, a su elevada capacidad de biosorción a pH controlados y la habilidad de desarrollar films en superficies inertes que permiten la utilización de reactores fijos o de capas fluidas. La utilización de esta bacteria autóctona está siendo estudiada en el laboratorio de microbiología de la “Universidad Nacional de General Sarmiento (UNGS)” para el desarrollo de un biorreactor que permita el tratamiento de aguas contaminadas con metales (Vullo *et al.*, 2008).

1.1 Purificación y análisis de la composición

El material polimérico extracelular obtenido en el sobrenadante, después de la centrifugación total del cultivo celular de *Pseudomonas veronii* 2E, se trató con etanol a una concentración final del 65%, obteniéndose un precipitado mucoso. Este material se liofilizó y luego se lo sometió a un tratamiento secuencial con proteinasa K y DNAasa II, para eliminar proteínas y DNA extracelular presente en el EPS. El producto obtenido se liofilizó y posteriormente se dializó contra H₂O. En una purificación posterior, el tratamiento del EPS con el surfactante desoxicolato de sodio (DOC) al 0.75% de su concentración micelar crítica (CMC), permitió separar del medio, un material polisacárido soluble y un lipopolisacárido extracelular obtenido en el precipitado después de la centrifugación. El polisacárido soluble obtenido después del tratamiento con DOC, se dializó contra H₂O y después de su liofilización, se fraccionó mediante una

resina de intercambio iónico DEAE-Sepharose[®]. Se utilizó un gradiente en pasos desde 0 hasta 2 M NaCl en buffer Tris-HCl 0,02 M conteniendo urea 7 M pH 6,8. La purificación permitió obtener 4 fracciones: una fracción neutra eluida con 0 M NaCl (10 % m/m) y tres fracciones ácidas: 0.2 M NaCl (65 % m/m); 0.4 M NaCl (20 % m/m) y 0.6 M NaCl (5 % m/m), las cuales se identificaron como EPO1, EPO2, EPO3 y EPO4 respectivamente.

Cada una de las fracciones se sometió a hidrólisis total y se analizó la composición por HPAEC-PAD. La determinación se realizó empleando condiciones cromatográficas donde se resuelven monosacáridos neutros, y también en condiciones de separación de monosacáridos ácidos. Para la fracción EPO1, se determinó únicamente glucosa y manosa, como monosacáridos neutros (Figura 19A), y tal cual como se esperaba, por haber sido eluida a 0 M NaCl, no presentó monosacáridos ácidos en su composición (Figura 19E). En la fracción EPO2 se determinó glucosa y glucosamina como monosacáridos neutros (Figura 19B). Cuando esta misma fracción se estudió según su composición ácida, se detectó ácido glucurónico y un componente incógnita “X” que no coincidió con ninguno de los testigos comerciales disponibles (Figura 19F). El análisis de la composición de las siguientes fracciones (Figura 19C y 19D) mostró un perfil más complejo en su composición neutra mientras que la composición ácida se encuentra conservada para las tres fracciones EPO2, EPO3 (Figura 19G) y EPO4 (Figura 19H). Para identificar el componente ácido X, se procedió a una purificación del hidrolizado total por una microcolumna DEAE-Sepharose. Los componentes neutros de la muestra fueron lavados de la columna con solución acuosa pH 7 y la fracción retenida, eluida con solución acuosa de ácido acético 0.5 M. En la figura 20 se muestra el análisis del eluido por HPAEC-PAD en condiciones de separación de azúcares neutros (Figura 20A) y en condiciones donde se resuelven monosacáridos ácidos (Figura 20B).

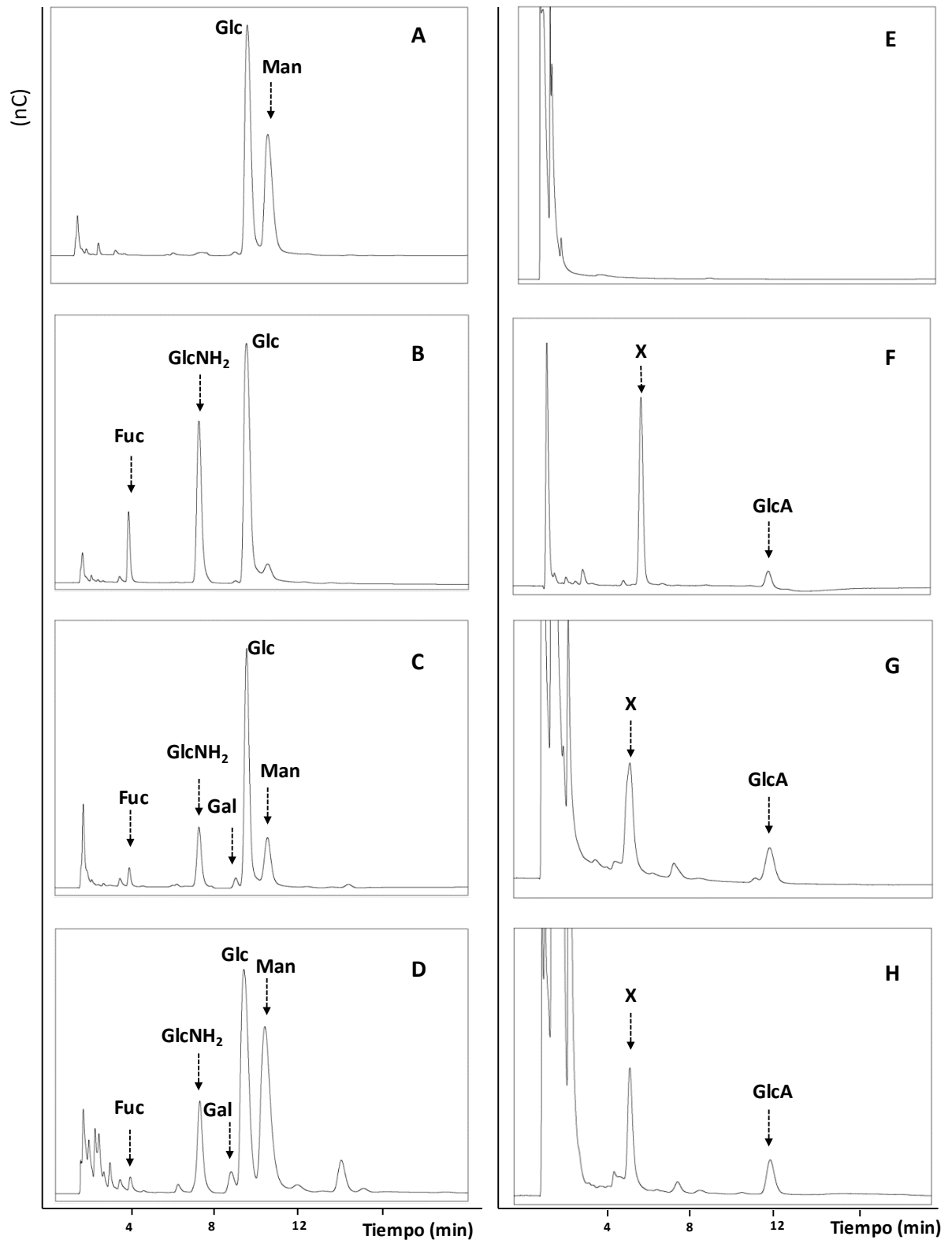


Figura 19: Análisis por HPAEC-PAD de la composición de monosacáridos neutros y aminoazúcares: A) EPO1, B) EPO2, C) EPO3, D) EPO4 y monosacáridos ácidos E) EPO1, F) EPO2, G) EPO3, H) EPO4.

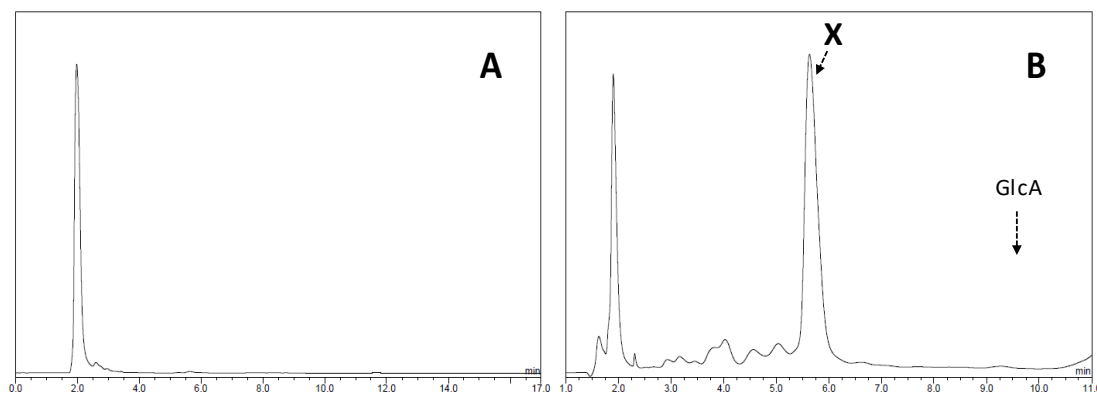


Figura 20: Análisis por HPAEC-PAD del componente ácido aislado por microcolumna DEAE-Sepharose. A) Monosacáridos neutros. B) Monosacáridos ácidos.

El componente X se analizó por espectrometría de masa ESI-QTOF en modo de ionización negativa (Figura 21). Este análisis permitió determinar que el producto obtenido corresponde a un disacárido compuesto por ácido hexurónico unido a un desoxiazúcar, evidenciando que el componente nombrado anteriormente como “X” presenta la estructura GlcA-Fuc de acuerdo con los azúcares componentes observados. Una vez determinada la composición para cada una de las fracciones, el estudio se focalizó en polisacárido EPO2.

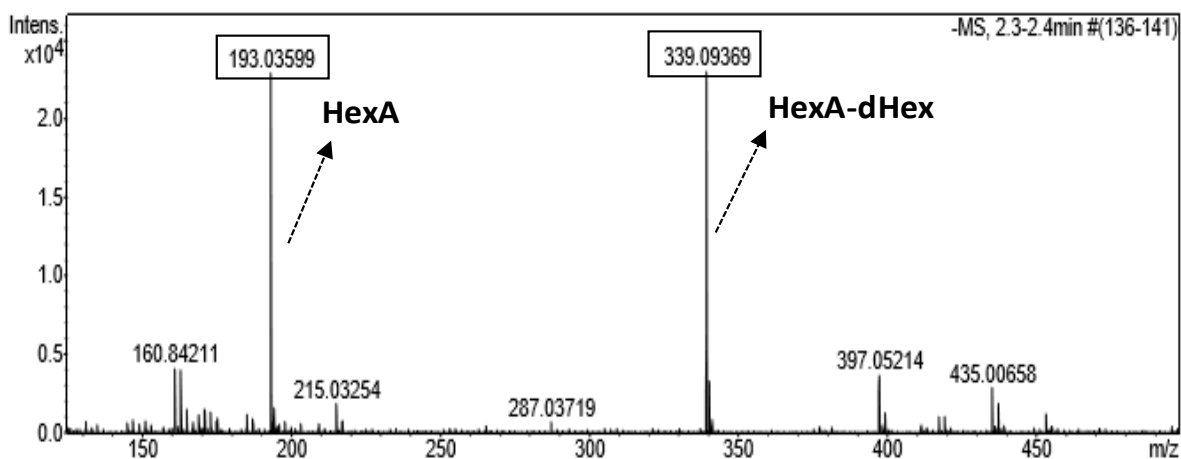


Figura 21: Espectro de masa ESI-QTOF del componente X de EPO2

1.2 Determinación del peso molecular de EPO2

La siguiente etapa de caracterización estructural consistió en el análisis del peso molecular de EPO2. Para ello, se realizó una cromatografía de exclusión por tamaño

molecular utilizando una columna de Sephacryl S-300 HR y calibrando con dextranos de 40.0; 80.7; 170.0 y 264.0 kDa. Por extrapolación del gráfico V_e versus $\log PM$, el peso molecular promedio del polisacárido EPO2 presentó un valor de $1,75 \cdot 10^5$ Da (Figura 22), ubicando a este glicopolímero dentro de la clase de polisacáridos de altos pesos moleculares. Se han descrito resultados similares para exopolisacáridos producidos por otras especies de *Pseudomonas*, por ejemplo: alginato, el polisacárido con mayor valor comercial producido por este género, presenta un peso molecular de $3 \cdot 10^5$ kDa. Dentro del género *Pseudomonas* se han estudiado otros exopolisacáridos de alto peso molecular: *Pseudomonas andropogonis* ($7.2 \cdot 10^5$ kDa), *Pseudomonas marginalis* ($1 \cdot 10^6$ kDa), *Pseudomonas gingeri* ($5 \cdot 10^6$ kDa), *Pseudomonas fluorescens* ($2 \cdot 10^6$ kDa), *Pseudomonas stutzeri* ($9 \cdot 10^5$ kDa), *Pseudomonas flavescens* ($3 \cdot 10^5$ kDa). Existen en la literatura descripciones de otros exopolisacáridos con valores similares de alto peso molecular y comercialmente disponibles son: gelano ($5 \cdot 10^5$ kDa), galactoPol ($1 \cdot 10^6$ kDa), hialuronano ($1-2 \cdot 10^6$ kDa) (Cescutti *et al.*, 1998; Fishman *et al.*, 1997; Maalej *et al.*, 2014).

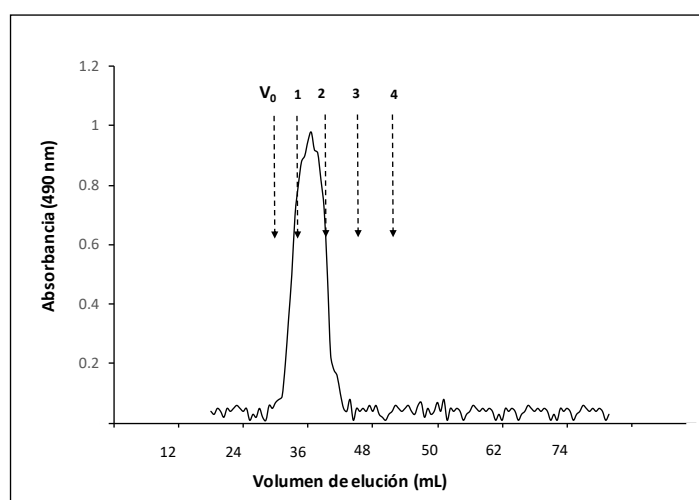


Figura 22: Análisis de EPO2 por cromatografía de exclusión molecular en columna Sephacryl S-300. Se indica como V_0 , 1, 2, 3, 4 el volúmen de elución de azul de dextrano y la serie de dextranos 40.0, 80.7, 170.0, 264.0 kDa.

1.3 Análisis de EPO2 por espectroscopia de infrarrojo

Se realizó el estudio de EPO2 por espectroscopia de infrarrojo (Figura 23), utilizando el modo de Reflectancia Total Atenuada (ATR). Este análisis permitió identificar las bandas más características de los polisacáridos, entre ellas, las bandas de absorción correspondiente a la tensión del enlace O-H a 3294.1 cm^{-1} , tensión asimétrica de los enlaces C-H a 2915.9 cm^{-1} , flexión en el plano de los enlaces C-H a 1371 cm^{-1} , C-

OH 1241 cm^{-1} . Además, se pudieron observar por espectroscopia de infrarrojo ATR, bandas de absorción correspondientes a motivos estructurales propios de la composición de EPO2, como la banda de absorción a 1620.2 cm^{-1} correspondiente a la tensión del enlace C=O del grupo carboxilo proveniente de GlcA, tensión del enlace N-H en residuos de GlcNAc a 1543.5 cm^{-1} .

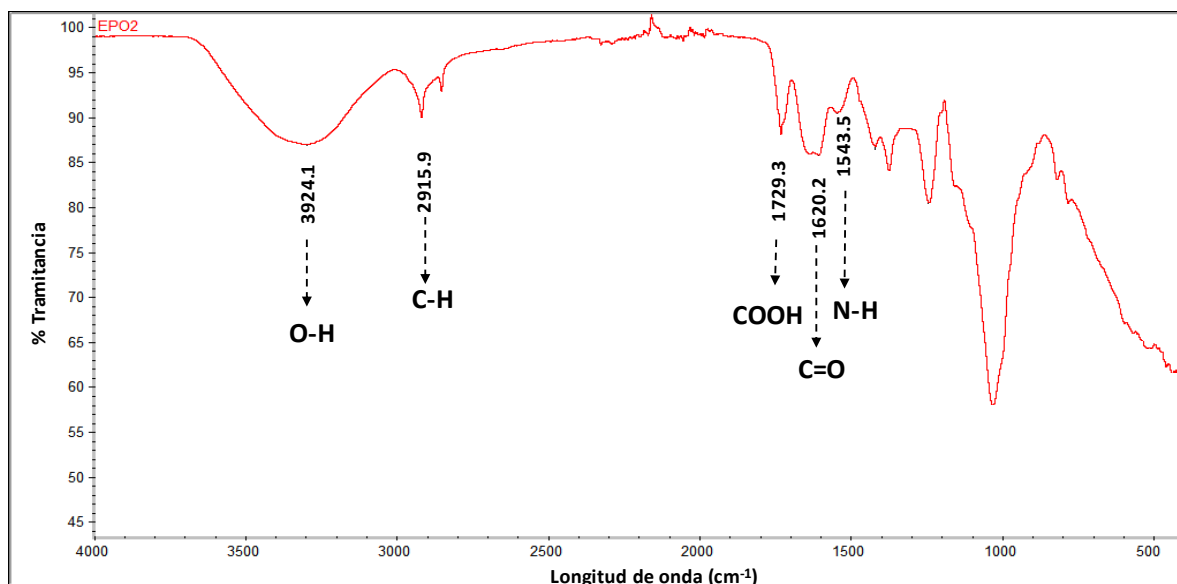


Figura 23: Espectro FT-IR del exopolisacárido EPO2.

1.4 Análisis por microscopia de barrido electrónico (SEM)

Los polisacáridos se utilizan en una amplia gama de aplicaciones derivadas de las ciencias médicas, de los alimentos y de los materiales. Su aplicabilidad es en parte consecuencia de sus propiedades específicas de superficie y la naturaleza de sus interacciones en las interfaces. Es por ello que la compleja variabilidad estructural de los polisacáridos requiere también del abordaje mediante técnicas de análisis de superficie. En este sentido, el exopolisacárido EPO2 se estudió mediante microscopía de barrido electrónico y se realizó la comparación de la topografía de EPO2 respecto del material de exopolisacárido de partida previo al fraccionamiento. El análisis del material sin fraccionar (Figura 24A, 24B) evidenció una mezcla de estructuras conformadas por regiones laminares, regiones de estructuras colapsadas y regiones porosas. La magnificación de esta última región permitió observar estructuras fibrilares nanométricas, con valores similares a los obtenidos de polisacáridos modelos mediante la técnica de

electrospun o electro-hilado (Rujitanaroj *et al.*, 2014). Por el contrario, y llamativamente, cuando se analizó el polisacárido puro EPO2, se detectó una morfología más homogénea, porosa y regular (Figura 24C, 24D) formada por fibras en el orden nanométrico.

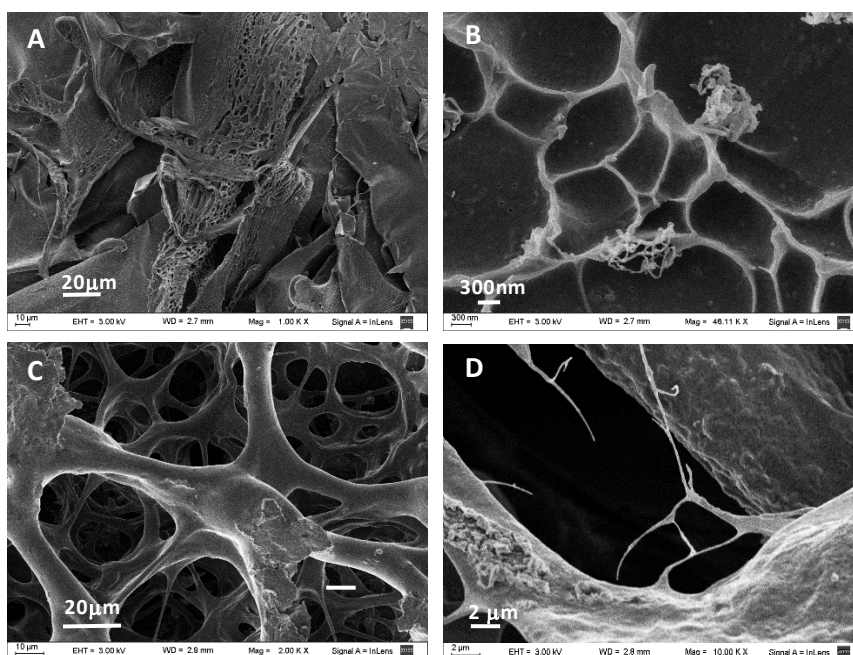


Figura 24: Microscopía SEM del material polimérico extracelular (A y B) y del polisacárido purificado EPO2 (C y D)

1.5 Estudios de metilación de EPO2

En una siguiente etapa de la caracterización de EPO2, se determinó el perfil de sustitución mediante el análisis de los alditol acetatos parcialmente metilados (PMMAs) por CG-EM. Mediante este método se determinó que EPO2 presenta unidades de GlcNAc_p terminales, unidades de glucosa sustituida en posición 4, unidades de glucosa 4,3-di-*O*-sustituida como puntos de ramificación y se encontró unidades de fucosa 3-*O*-sustituidas.

En la tabla 4 se muestra el perfil de sustitución, los iones principales que permitieron la asignación de los PMMAs y los tiempos de retención respectivos a cada uno de ellos. Un hecho interesante de destacar respecto de los exopolisacáridos producidos por especies de *Pseudomonas* aisladas de distintos ambientes poluidos, por ejemplo, *P. andropogenis*, *P. marginalis*, *P. gingeri*, *P. fluorecens*, *P. stutzeri*, *P. flavescens*, al igual que el presente polisacárido estudiado de *P. veronii*, comparten como motivo estructural principal, unidades de glucosa 3-*O* y 4-*O* sustituidas. Por otra parte, otro motivo estructural que relacionan los polisacáridos producidos por especies de

Pseudomonas es la presencia de desoxi-azúcares, como en *P. flavescens* y *P. marginalis*. Aún más, resulta muy interesante notar que las posiciones de sustitución descritas para el desoxiazúcar (en posición 3) (Cescutti *et al.*, 1998; Fishman *et al.*, 1997; Maalej *et al.*, 2014) coinciden con las descritas para el exopolisacárido de *P. veronii* indicando la presencia de transglucosidasas comunes en el género.

Tabla 4: Análisis de los PMMAs por CG-MS en el polisacárido EPO2

Monosacárido	Rt (min)	PMAAs	Unión	Fragmentos
Fucosa	19.5	1,3,5-Tri- <i>O</i> -acetil-2,4-di- <i>O</i> -metil-D-fucitol	→3)-Fuc-(1→	89,101,117,131,173
Glucosa	27.5	1,4,5-Tri- <i>O</i> -acetil-2,3,6-tri- <i>O</i> -metil-D-glucitol	→4)-Glc-(1→	87,101,117,129,143
Glucosa	32.2	1,3,4,5-Tetra- <i>O</i> -acetil-2,6-di- <i>O</i> -metil-D-glucitol	→3,4)-Glc-(1→	87,117,129,159,171
<i>N</i> -acetil-Glucosamina	42,5	1,5-Di- <i>O</i> -acetil-3,4,6-tri- <i>O</i> -metil-2-desoxi-2- <i>N</i> -metilacetamido-D-glucitol	GlcNAc-(1→	116,129,158,203,205

1.6 Análisis de oligosacáridos en EPO2

Para caracterizar la secuencia en la que se encuentran unidos los monosacáridos que componen el polisacárido, EPO2 se sometió a hidrólisis parcial, obteniéndose una mezcla de oligosacáridos, la cual fue estudiada en paralelo mediante las técnicas HPAEC-PAD y espectrometría de masa UV-MALDI-TOF. En la figura 25A, se muestra el cromatograma (color negro) obtenido para el análisis de los oligosacáridos por HPAEC-PAD, donde se puede observar una serie de oligoformas con número de unidades de polimerización creciente, derivadas de una fragmentación regular y conservada durante el proceso de hidrólisis parcial.

Resultados similares se evidenciaron cuando la mezcla de oligosacáridos se analizó por espectrometría de masa MALDI. En el espectro de masa que se muestra en la figura 25B, se puede observar un patrón de iones que da lugar a una serie de oligoformas, que corresponderían a un número de unidades repetitivas crecientes en el polisacárido EPO2. Además, se pudo determinar el valor de masa asociada a la unidad repetitiva, siendo este, 890 Da. El recuadro en la figura 25B muestra un segmento ampliado del espectro de masa entre los valores de m/z 1720-1880 que permitió evidenciar una variación de oligoformas relacionadas a cada uno de los iones de mayor abundancia, con diferencias de 42 Da, que corresponde a la presencia de grupos acetilos sustituyendo la unidad repetitiva de EPO2. Esta primera evidencia de la acetilación en EPO2, sumado a

su alto peso molecular permite explicar la alta viscosidad resultante en las soluciones acuosas del polisacárido (Li *et al.*, 2016).

Es importante resaltar que la abundancia relativa de los iones observados en el espectro de masa MALDI, no necesariamente presenta correlación con las concentraciones absolutas en la muestra, debido a que las oligoformas de menor masa/carga presentan mayor facilidad de ser ionizadas y volatilizadas obteniéndose, en consecuencia, señales de mayor abundancia relativa que las oligoformas de mayor tamaño en el espectro de masa.

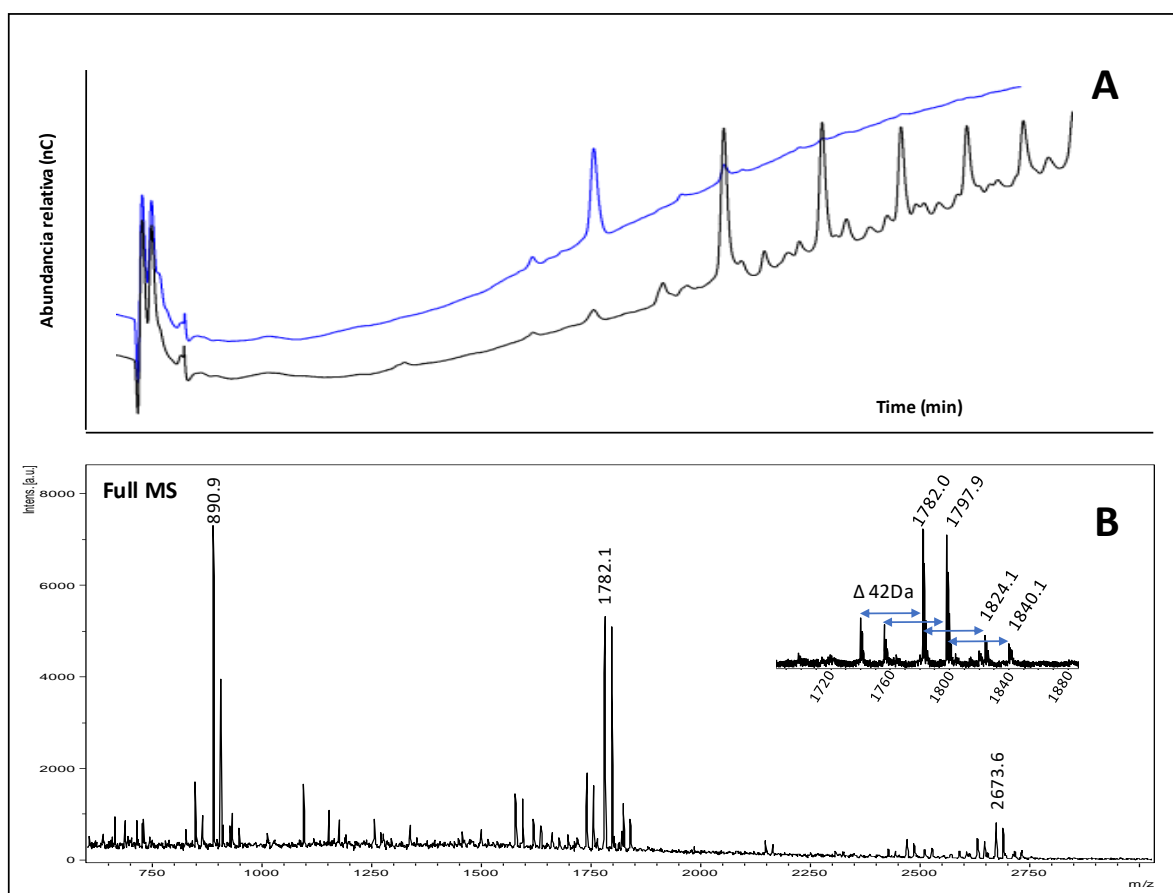


Figura 25: A) Análisis por HPAEC-PAD de la mezcla de hidrólisis parcial (Negro) y análisis de un oligosacárido aislado por columna de exclusión molecular Bio-Gel P-30 proveniente de la mezcla total de hidrólisis parcial (Azul). B) Espectro de masa MALDI de la mezcla total de hidrólisis parcial de EPO2.

La mezcla resultante de la hidrólisis parcial de EPO2, fue fraccionada mediante cromatografía de exclusión molecular en BioGel P-30. La elución de la columna fue monitoreada off-line por HPAEC-PAD. En la figura 25A (color azul), se muestra una de las fracciones obtenidas en la cual se observa mayoritariamente un oligosacárido aislado.

Esta fracción fue analizada por espectrometría de masa MALDI (Figura 26) y se determinó corresponde a un oligosacárido de m/z 1782.1 que correspondería a dos unidades repetitivas en EPO2.

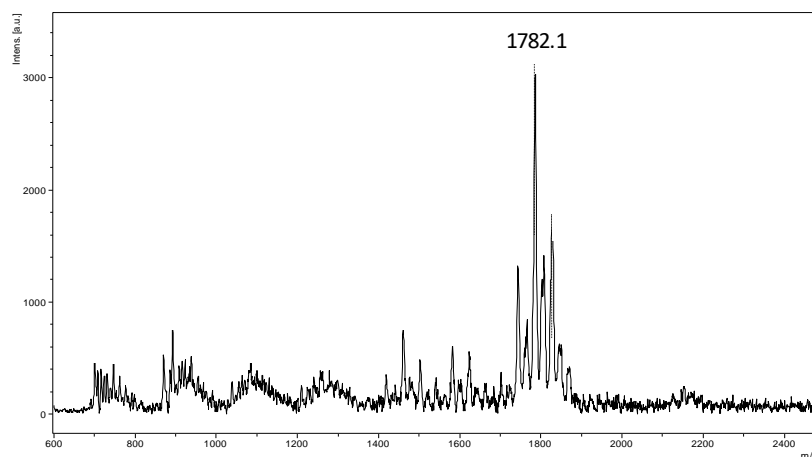


Figura 26: Espectro de masa MALDI del oligosacárido aislado por GPC.

Fue interesante notar que cuando se sometió a MS/MS al oligosacárido aislado m/z 1782.1, se obtuvo principalmente el producto de fragmentación m/z 890.9 (calc. m/z 890.2) correspondiente a la unidad repetitiva anteriormente mencionada (Figura 25A). Con el fin de confirmar la estructura de la unidad repetitiva, la mezcla de hidrólisis parcial de EPO2 se analizó por espectrometría de masa MALDI mediante experimentos de MS/MS.

Cuando se sometió a experimentos de MS/MS al ion m/z 1782.1 (Figura 27, Tabla 5) con una estructura correspondiente al aducto $[\text{Hex}_4\text{HexN}_2(\text{HexAdHex})_2\text{OAc}_3 + \text{Na}]^+$, se evidenció la presencia del ion m/z 1578.8 (calc. m/z 1578.4) atribuido a la pérdida de una unidad de hexosamina en concordancia con lo descrito en el análisis de PMMAs, como ramificación terminal en EPO2. Resultó interesante observar, además, que los grupos *N*-acetilos correspondientes a los residuos de hexosamina fueron mayormente removidos en las condiciones de hidrólisis ácida empleados para la obtención de oligosacáridos (Painter & Morgan, 1961).

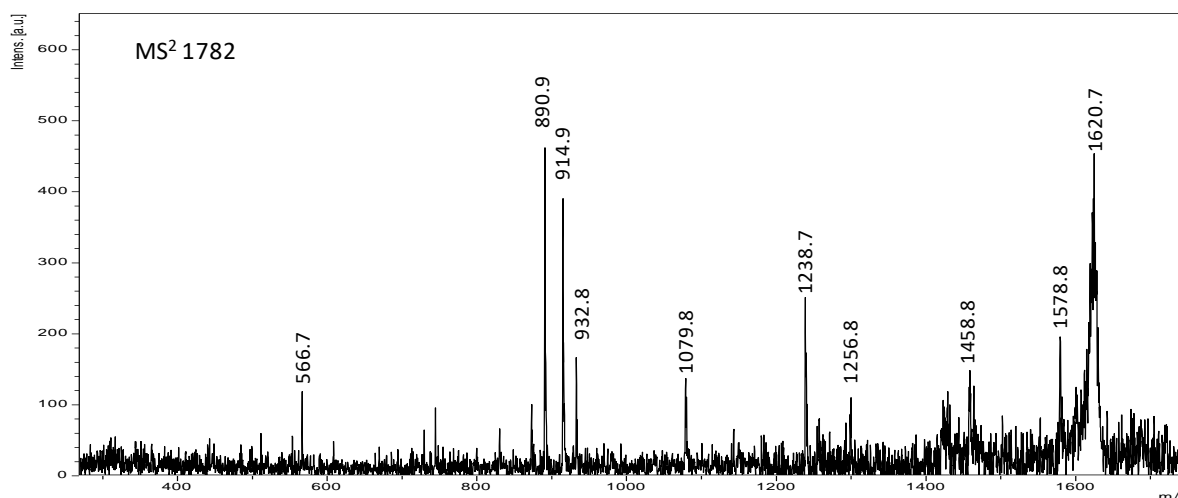


Figura 27: Espectro MS/MS del ion m/z 1782.1 de la figura 25B correspondiente al producto de hidrólisis parcial de EPO2

Tabla 5: Masas calculadas, experimentales y estructuras propuestas para los iones correspondientes al espectro MS/MS del ion m/z 1782.1 de la figura 27.

m/z calc.	m/z exp.	Estructura propuesta
1781.5	1782.1	Hex ₄ HexN ₂ HexA ₂ dHex ₂ OAc ₃ +Na ⁺
1620.4	1620.7	Hex ₄ HexN ₁ HexA ₂ dHex ₂ OAc ₃ +Na ⁺
1578.4	1578.8	Hex ₄ HexN ₁ HexA ₂ dHex ₂ OAc ₂ +Na ⁺
1458.4	1458.8	Hex ₃ HexN ₁ HexA ₂ dHex ₂ OAc ₃ +Na ⁺
1256.3	1256.8	Hex ₄ HexN ₁ HexA ₁ dHex ₁ OAc ₂ +Na ⁺
1238.3	1238.7	Hex ₄ HexN ₁ HexA ₁ dHex ₁ OAc ₂ -H ₂ O+Na ⁺
1079.3	1079.8	Hex ₃ HexA ₁ dHex ₂ OAc ₂ +Na ⁺
932.2	932.8	Hex ₂ HexN ₁ HexA ₁ dHex ₁ OAc ₂ +Na ⁺
914.2	914.9	Hex ₂ HexN ₁ HexA ₁ dHex ₁ OAc ₁ -H ₂ O+Na ⁺
890.2	890.9	Hex ₂ HexN ₁ HexA ₁ dHex ₁ OAc ₁ +Na ⁺
567.1	566.7	Hex ₁ HexA ₁ dHex ₁ OAc ₁ +Na ⁺
365.1	365.5	Hex ₂ +Na ⁺

Por otra parte, el ion m/z 1256.8 (calc. m/z 1256.3) (Figura 28, Tabla 6) correspondió a la pérdida del disacárido HexA-dhex del m/z 1578.8, en concordancia con la presencia de la unidad GlcA-Fuc en EPO2 determinada por ESI-EM. Finalmente, la presencia del ion m/z 932.8 (calc. m/z 932.2) indica la pérdida de dos unidades de hexosa del ion m/z 1256.8. En conjunto estas fragmentaciones indicarían que las unidades de *N*-

acetil-D-glucosamina, y el disacárido GlcA-Fuc, son ramificaciones alternadas de un esqueleto construido a partir de unidades de glucosa, es decir, un glucano.

La presencia del ion m/z 890.9 (cal. m/z 890.2) (Figura 25) correspondiente a la unidad repetitiva de EPO2 en el espectro MS/MS del ion 1782.1 confirma el comportamiento conservado de la fragmentación de EPO2.

El análisis conjunto de todos los experimentos de MS/MS (Figuras 27-29) permitió, además, localizar la *O*-acetilación sobre las unidades de fucosa. Por ejemplo, se puede observar en el espectro de MS/MS del ion m/z 1256.8 de la figura 29, tabla 7, el ión m/z 729.6 de estructura propuesta $\text{Hex}_2\text{HexA}_1\text{dHex}_1\text{OAc}_1+\text{Na}^+$, que por pérdida de la unidad terminal de HexA, da lugar al ión m/z 553.5 de estructura propuesta $\text{Hex}_2\text{dHex}_1\text{OAc}_1+\text{Na}^+$, el cual a su vez pierde la unidad $\text{dHex}_1\text{OAc}_1$ que corresponde a la fucosa acetilada. Por último, este ión se fragmenta dando lugar al ión m/z 365.3 de estructura propuesta Hex_2+Na^+ , correspondiente a dos unidades de glucosa de la cadena principal del glucano.

En las figuras 27-29 y las tablas correspondientes se observan otras señales que corresponden a fragmentaciones que confirman las estructuras propuestas.

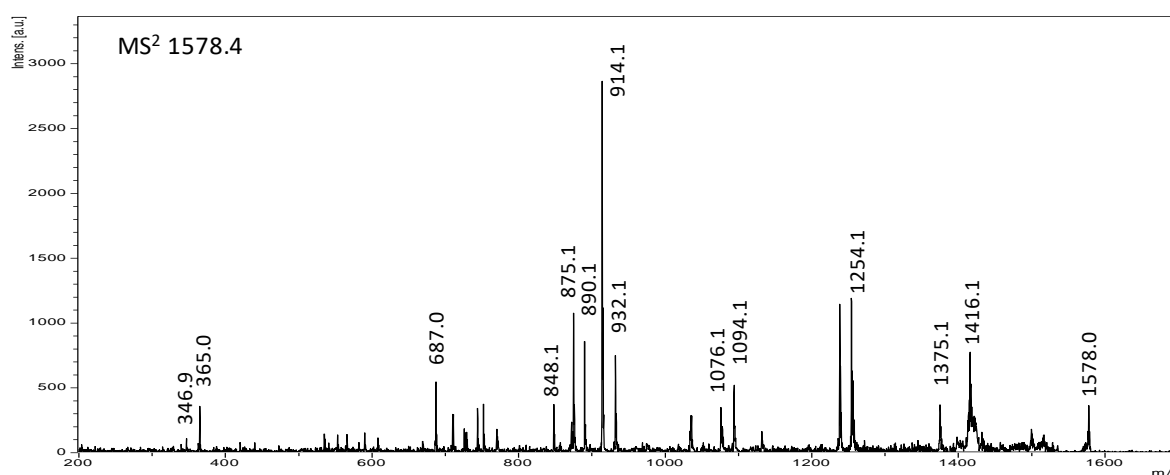


Figura 28: Espectro MS/MS del ion m/z 1578.4 de la figura 25B correspondiente al producto de hidrólisis parcial de EPO2.

Tabla 6: Masas calculadas, experimentales y estructuras propuestas para los iones correspondientes al espectro MS/MS del ion m/z 1578.4 de la figura 28

m/z calc.	m/z exp.	Estructura propuesta
1578.4	1578.0	Hex ₄ HexN ₁ HexA ₂ dHex ₂ OAc ₂ +Na ⁺
1416.4	1416.1	Hex ₃ HexN ₁ HexA ₂ dHex ₂ OAc ₂ +Na ⁺
1375.4	1375.1	Hex ₃ HexA ₂ dHex ₂ OAc ₁ +Na ⁺
1255.3	1254.1	Hex ₃ HexA ₂ dHex ₂ OAc ₂ +Na ⁺
1094.3	1094.1	Hex ₃ HexN ₁ HexA ₁ dHex ₁ OAc ₂ +Na ⁺
1076.3	1076.1	Hex ₃ HexN ₁ HexA ₁ dHex ₁ OAc ₂ -H ₂ O+Na ⁺
932.2	932.1	Hex ₂ HexN ₁ HexA ₁ dHex ₁ OAc ₂ +Na ⁺
914.2	914.1	Hex ₂ HexN ₁ HexA ₁ dHex ₁ OAc ₁ -H ₂ O+Na ⁺
890.2	890.1	Hex ₂ HexN ₁ HexA ₁ dHex ₁ OAc ₁ +Na ⁺
875.2	875.1	Hex ₃ HexA ₁ dHex ₁ OAc ₂ -2H ₂ O+H ⁺
848.2	848.1	Hex ₂ HexN ₁ HexA ₁ dHex ₁ +Na ⁺
687.1	687.0	Hex ₂ HexA ₁ dHex ₁ +Na ⁺
365.1	365.0	Hex ₂ +Na ⁺
347.0	346.9	Hex ₂ -H ₂ O+Na ⁺

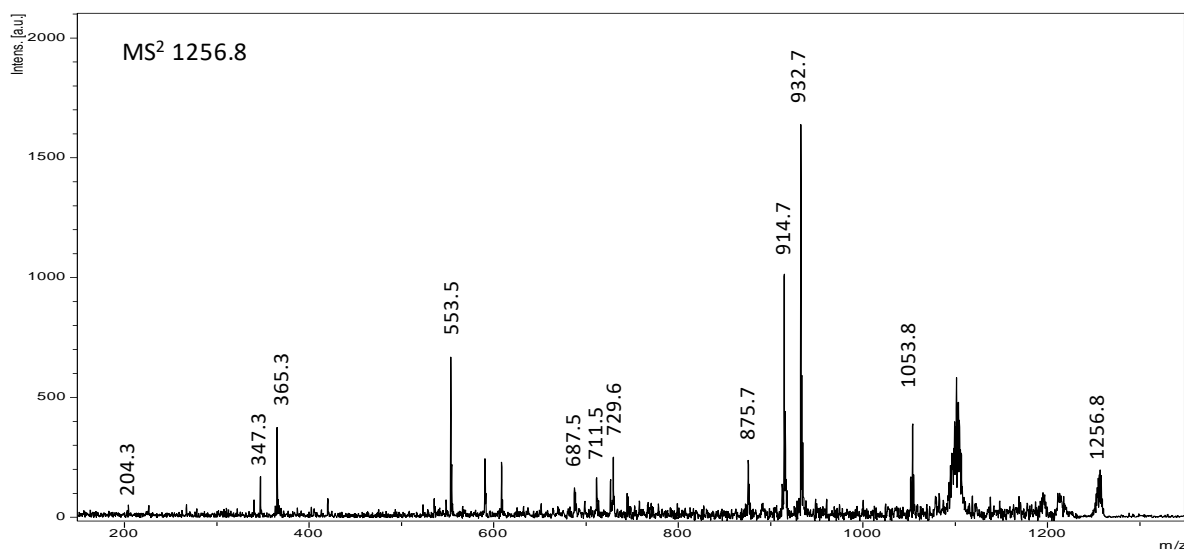
**Figura 29:** Espectro MS/MS del ion m/z 1256.8 de la figura 25B correspondiente al producto de hidrólisis parcial de EPO2

Tabla 7: Masas calculadas, experimentales y estructuras propuestas para los iones correspondientes al espectro MS/MS del ion m/z 1256.8 de la figura 29

m/z calc.	m/z exp.	Estructura propuesta
1256.3	1256.8	Hex ₄ HexN ₁ HexA ₁ dHex ₁ OAc ₂ +Na ⁺
1053.3	1053.8	Hex ₄ HexA ₁ dHex ₁ OAc ₁ +Na ⁺
932.3	932.7	Hex ₂ HexN ₁ HexA ₁ dHex ₁ OAc ₂ +Na ⁺
914.3	914.7	Hex ₂ HexN ₁ HexA ₁ dHex ₁ OAc ₁ -H ₂ O+Na ⁺
876.3	875.7	Hex ₃ HexN ₁ dHex ₁ OAc ₁ +Na ⁺
729.2	729.6	Hex ₂ HexA ₁ dHex ₁ OAc ₁ +Na ⁺
711.2	711.5	Hex ₂ HexA ₁ dHex ₁ OAc ₁ -H ₂ O+Na ⁺
687.2	687.5	Hex ₂ HexA ₁ dHex ₁ +Na ⁺
553.2	553.5	Hex ₂ dHex ₁ OAc ₁ +Na ⁺
365.1	365.3	Hex ₂ +Na ⁺
347.1	347.3	Hex ₂ -H ₂ O+Na ⁺
204.1	204.3	HexNa ⁺

1.7 Análisis de EPO2 por RMN

1.7.1 Análisis del disacárido α -D-GlcA-(1-3)-L-Fucp

Para completar el estudio estructural del exopolisacárido EPO2, se realizaron diferentes experimentos mediante espectrometría de resonancia magnética nuclear. En una primera aproximación se realizó el análisis por RMN del disacárido GlcA-Fuc aislado por cromatografía de intercambio iónico a partir de la hidrólisis parcial de EPO2 (Figura 20B)

En el espectro ¹H-NMR (figura 30A) se observan en la región de campo alto (δ 1.12 – 1.16), un par de señales pertenecientes al H-6 del residuo de fucosa. Cada una de estas señales corresponde a las configuraciones α y β en equilibrio. En la región anomérica se presentan tres señales a δ 5.19, correspondiente al H-1 de ácido glucurónico en configuración α y las señales a δ 5.14 y δ 4.52 correspondientes al H-1 de las formas α y β en equilibrio, del residuo de fucosa del extremo reductor.

El espectro ¹³C-NMR (Figura 30B) permitió identificar las tres señales anoméricas presentes en el disacárido. La señal correspondiente al C-1 del residuo de ácido

glucurónico (δ 100.6) y el par de señales correspondientes al C-1 del residuo de fucosa δ 92.14 y δ 95.96 en sus configuraciones α y β respectivamente. Además, se puede observar la señal del C-6 del grupo $-\text{COOH}$ (δ 173.08) y el par de señales del C-6 del grupo $-\text{CH}_3$ en el residuo de fucosa (δ 15.32 and 15.42) correspondientes a las configuraciones α and β en equilibrio respectivamente (Cescutti *et al.*, 1998). Es importante resaltar que durante el análisis del disacárido por RMN no pudieron detectarse las señales correspondientes a los acetilos localizados sobre el residuo de fucosa según los resultados obtenidos del análisis de oligosacáridos por espectrometría de masa, debido a que las condiciones de hidrólisis ácida empleadas para la obtención y aislamiento del disacárido, removieron dichos grupos. El análisis de los experimentos COSY y HSQC (Figura 30C y 30D) permitió la asignación total (Tabla 8) del disacárido confirmando la estructura α -D-GlcpA-(1-3)-L-Fucp presente como ramificación en EPO2.

Tabla 8: Desplazamientos químicos ^1H y ^{13}C del disacárido α -D-GlcpA(1-3)-L-Fucp de EPO2.

Residuo	Núcleo	Posición					
		1	2	3	4	5	6
GlcAp(α 1-	H	5.2	3.56	3.79	3.52	4.28	
	C	100.5	72.1	71.4	72.5	71.7	173.08
3)Fucp(α 1-	H	5.14	3.88	3..62	3.51	4.13	1.11
	C	92.1	71.2	81.0	71.5	66.2	15.3
3)Fucp(β 1-	H	4.52	3.57	3.87	3.55	3.81	1.16
	C	95.9	72.3	78.2	71.3	67.2	15.4

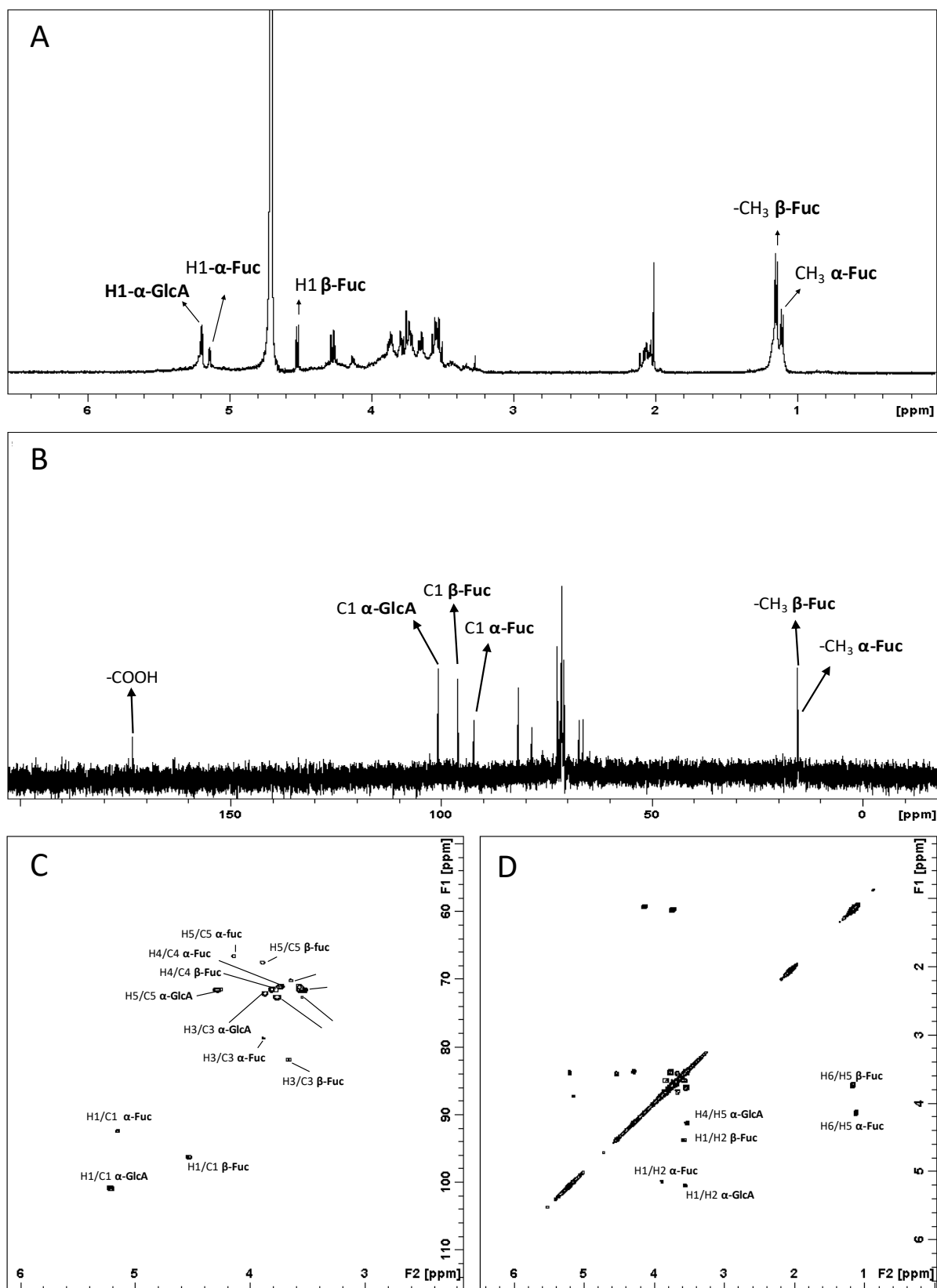


Figura 30: Espectros de RMN del disacárido α -D-GlcA(1-3)-L-Fucp de A) ^1H , B) ^{13}C , C) HSQC, D) COSY.

1.7.2 Análisis de EPO2 *O*-desacetilado.

A continuación, se realizó el estudio de EPO2 que fue sometido previamente a *O*-desacetilación en medio básico. En el espectro ^1H -RMN (Fig 31A) fue posible identificar a δ 1.19 la señal correspondiente al H-6 del residuo de fucosa, a δ 2.03 la señal correspondiente a $-\text{CH}_3$ de los grupos *N*-acetilos.

Por otra parte, el espectro ^{13}C -RMN (Fig. 31B) de EPO2, confirmó las señales esperadas para el grupo carboxilo del ácido glucurónico a δ 175.7 y los acetatos a δ 174.3; a δ 15.7 la señal del C-6 del residuo de fucosa y a δ 22.8 la correspondiente a los grupos acetilos. Además, se detectaron 4 señales de carbonos anoméricos correspondientes a cada uno de los residuos de la unidad estructural descritos durante el análisis por espectrometría de masa. Cada una de estas señales se nombró como A (δ 5.31), B (δ 4.45), C (δ 4.76) y D (δ 5.38) asignadas a los protones anoméricos de los residuos de glucosa, *N*-acetil-glucosamina, fucosa y ácido glucurónico respectivamente.

El espectro HSQC (Figura 32A) permitió la asignación de los 4 pares C-H anoméricos en la estructura de EPO2. La correlación δ 4.71/102.0 del residuo C corresponde a la unión 3-O de la unidad de β -fucosa sobre el esqueleto del glucano, mientras que la correlación δ 5.39/96.3 corresponde al residuo D de ácido glucurónico ya descrito como parte del disacárido α -D-GlcpA-(1-3)-L-Fucp. La correlación 5.31/99.2 corresponde a los residuos de glucosa del esqueleto principal de EPO2 correspondiente a un α (1-4) glucano (Wang *et al.*, 2017). Por último, la correlación δ 4.45/101.3 corresponde al residuo α -GlcNAc (B) en posición terminal. Además, mediante los experimentos TOCSY (Figura 32B y 32 D) fue posible detectar 4 sistemas de spin asignados a cada uno de los 4 residuos descritos en EPO2.

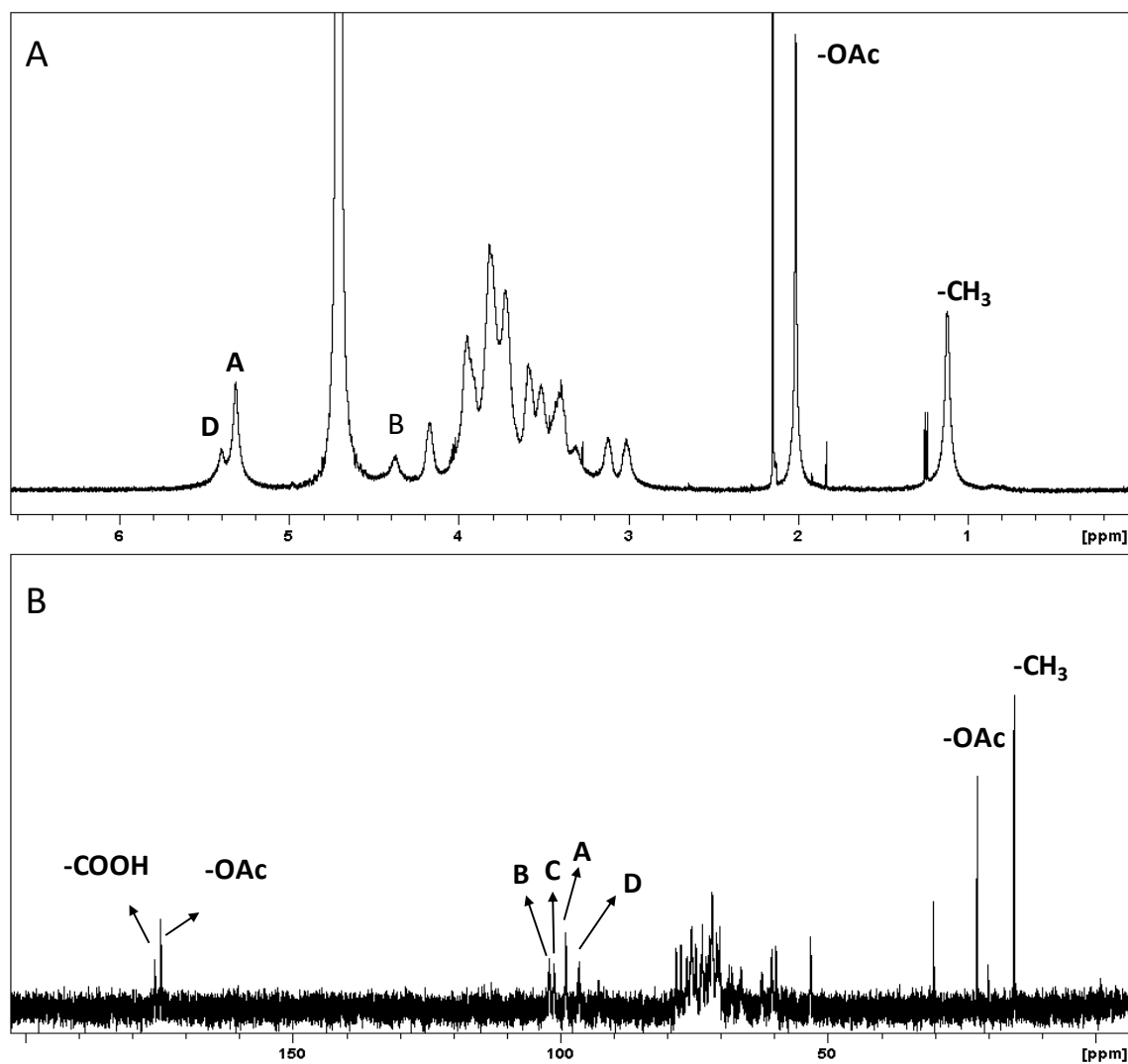


Figura 31: Espectros RMN monodimensionales del polisacárido EPO2. A) ^1H , B) ^{13}C

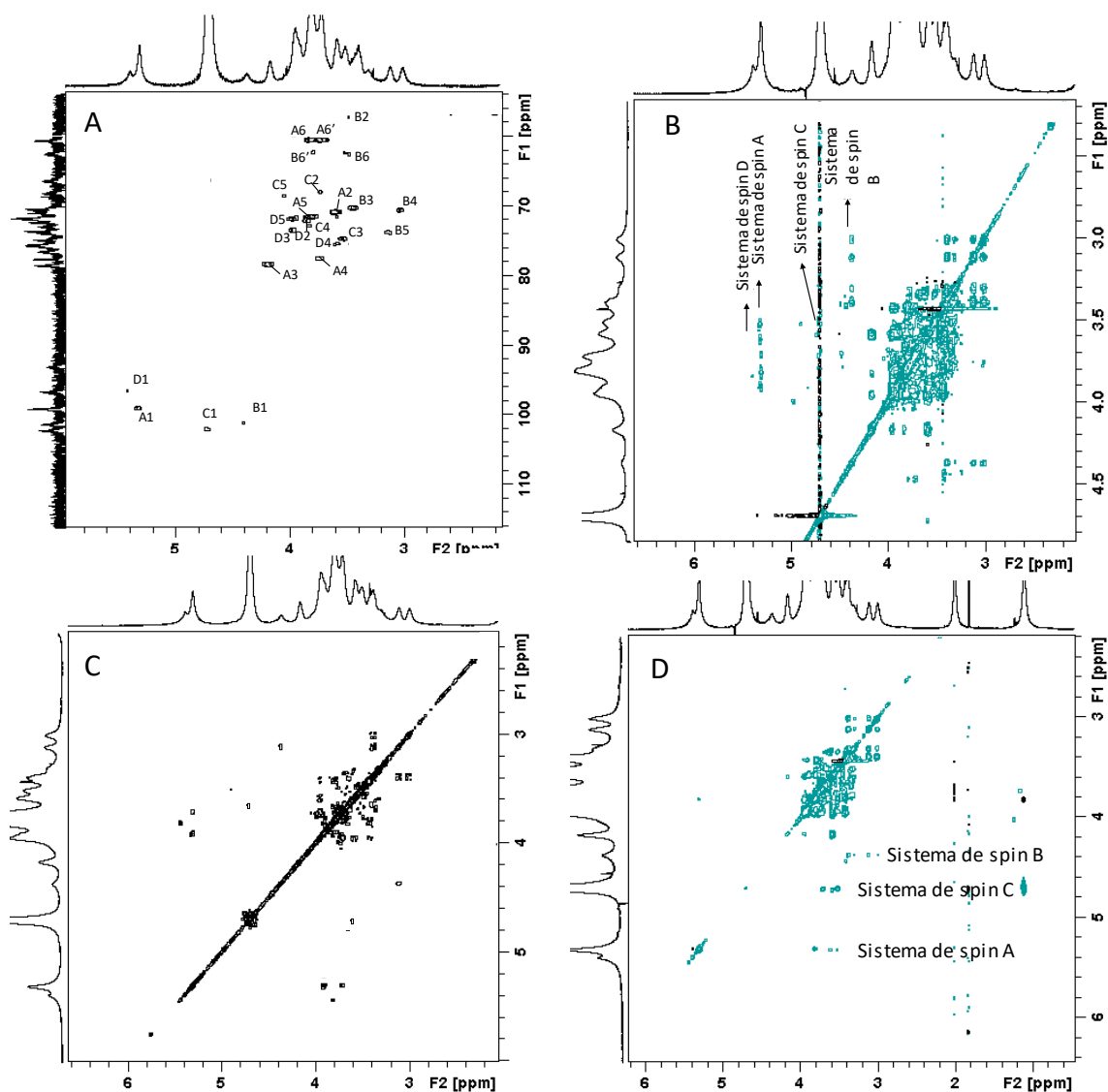


Figura 32: Espectros RMN bidimensionales de EPO2. A) HSQC, B y D) TOCSY, C) COSY.

Los resultados obtenidos mediante la caracterización de EPO2 por RMN, conjuntamente con los estudios realizados por espectrometría de masa, análisis de la composición y metilación permitieron postular el motivo estructural mayoritario del exopolisacárido como se muestra en la figura 33.

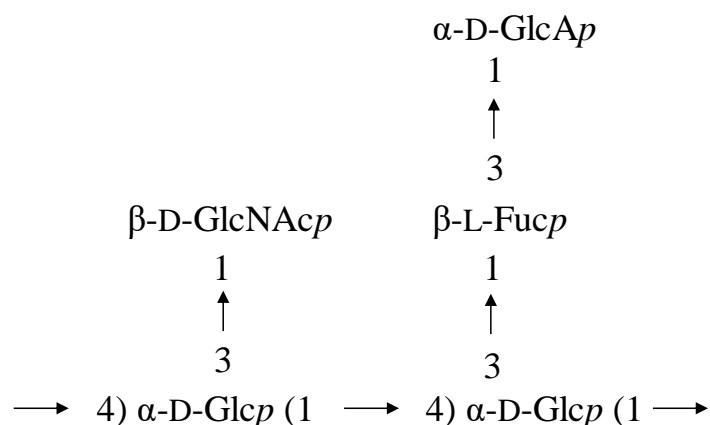


Figura 33: Estructura propuesta de la unidad repetitiva del polisacárido EPO2.

Dado que el sistema de spin A en configuración anomérica α , presentó un alto grado de solapamiento de sus señales, no fue posible realizar la completa asignación de sus señales por RMN.

El objetivo de trabajar con la muestra *O*-desacetilada era alcanzar una mayor resolución de los espectros. Sin embargo, este tratamiento no condujo significativamente a mejorar la calidad de los mismos debido a la menor concentración obtenida en las soluciones de polisacárido EPO2 como consecuencia del notorio aumento de las interacciones hidrofóbicas que aparecen luego del tratamiento de *O*-deacetilación, conduciendo a la precipitación del polisacárido a temperatura ambiente. Este mismo comportamiento fue descrito en otros polisacáridos conteniendo en su composición 6-desoxiazúcares. Se ha descrito que estos polisacáridos introducen interacciones hidrofóbicas entre las cadenas del biopolímero conduciendo finalmente a su parcial precipitación en agua y disminuyendo la concentración de polisacárido disuelto (Cescutti *et al.*, 2013).

En este contexto, la decoración del biopolímero con grupos acetilos favorece el mantenimiento en solución del polisacárido aumentando su solubilidad en agua. Sin embargo, la acetilación trae como consecuencia el aumento de la viscosidad de la solución del polisacárido, propiedad que facilita la estabilización del biofilm bacteriano. Por el contrario, la alta viscosidad juega un rol negativo durante el análisis por RMN a temperatura ambiente obstaculizando la completa asignación de las señales de este tipo de polisacáridos viscosos.

1.8 Biosorción de metales en solución de EPO2

Trabajos previos a esta tesis describían que el material polimérico extracelular (EPS) de *P. veronii* 2E, la fracción total de exopolisacáridos y también el lipopolisacárido aislado del EPS, presentan capacidad de biosorción de Cd (II) en solución. (Ferreira *et al.*, 2017). Recientemente, una estrategia que combina FT-IR con análisis estadístico multivariado permitió estudiar en células enteras, la interacción entre los grupos funcionales de los glicoconjugados expuestos en la superficie celular y la capacidad de biosorción de los metales Cd(II), Cu(II) y Zn(II) (Ferreira *et al.*, 2019).

En este contexto, se decidió estudiar la capacidad de biosorción de diferentes metales del polisacárido producido por *P. veronii* 2E, tanto en su forma purificada EPO2 como en el extracto polisacárido total, utilizando espectroscopia de absorción atómica. La capacidad de biosorción "q" se determinó en soluciones patrones de los metales Cu(II), Zn(II), Fe(II) y Pb (II). Los valores más altos de biosorción fueron determinados para Fe(II) y Pb(II) con valores de 20.57 mg/g y 10.20 mg/g respectivamente, seguido de Zn(II) y Cu(II) con valores de 6.09 mg/g y 4.6 mg/g respectivamente (Figura 34). La capacidad de biosorción también fue expresada en función del porcentaje de eficiencia de remoción del metal (Figura 35) siendo notable demostrar que se obtuvo un 70% de eficiencia de biosorción para Fe(II).

El análisis de biosorción sobre el extracto total de polisacárido presentó una capacidad de biosorción menor para todos los metales analizados, siendo sus correspondientes valores de q: Fe(II) 5.37 mg/g; Pb(II) 7.51 mg/g; Cu(II) 4.54 mg/g y Zn(II) 2.57 mg/g (Figura 34). Si bien éstos últimos valores de capacidad de biosorción fueron menores que los determinados para EPO2, ambos materiales se encuentran en el rango de valores de q descritos para polisacáridos biosorbentes (Naz *et al.*, 2015; Nowak *et al.*, 2019; Pavasant *et al.*, 2006; Shameer, 2016; Zhao *et al.*, 2014).

Es importante destacar que las capacidades de biosorción determinadas para EPO2 y de la fracción de polisacárido total son acompañadas de otras propiedades deseables de nuevos materiales estratégicos para el campo de la biorremediación. Entre estas características distintivas se encuentran la multiresistencia/tolerancia de *Pseudomonas veronii* 2E frente a ambientes altamente contaminados con metales en solución y más aún, la capacidad de este microorganismo a ser inmovilizado en superficies porosas inertes, característica altamente deseable en el desarrollo de nuevos procesos de tratamiento de efluentes (Vullo *et al.*, 2008).

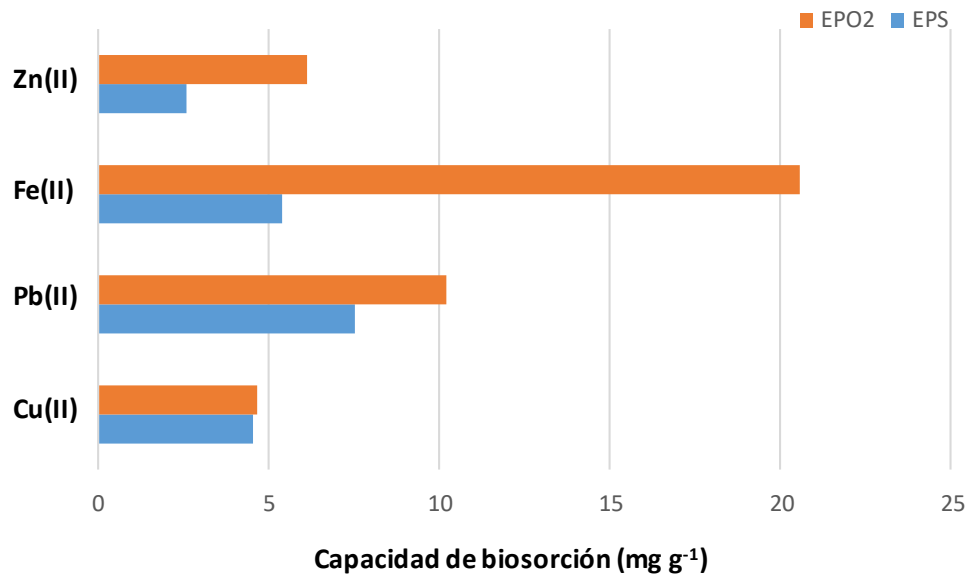


Figura 34: Capacidad de biosorción de los biopolímeros EPO2 y Extracto Total Polisacarídico expresada en mg g⁻¹ frente a los metales Cu(II), Zn(II), Fe(II) y Pb (II).

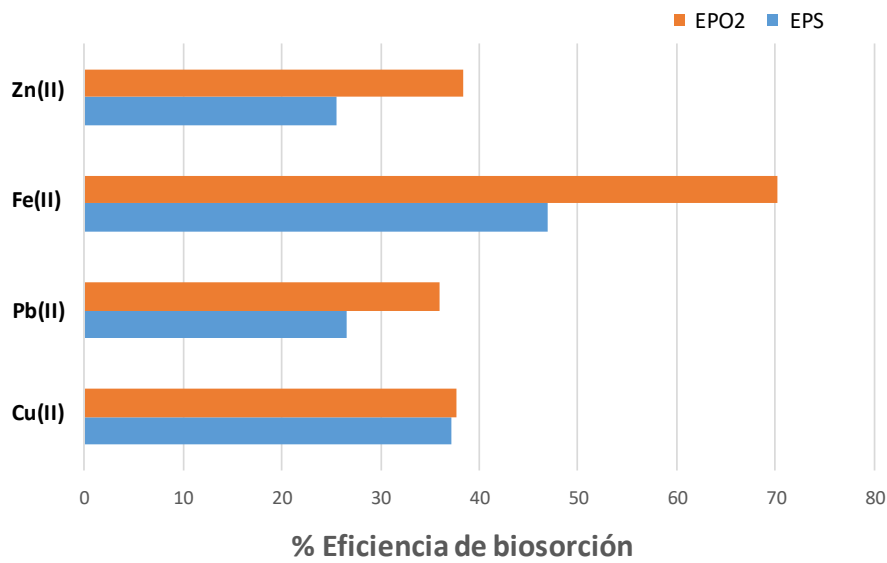


Figura 35: % de eficiencia de biosorción de los biopolímeros EPO2 y Extracto Total Polisacarídico, frente a los metales Cu(II), Zn(II), Fe(II) y Pb(II).

2. Estudio de la glicosilación de las proteínas capa S de *L. kefir*

Objetivos:

- Determinar la glicosilación de las proteínas capa S en cepas de comportamiento agregante y no agregante de *Lactobacillus kefir*.

2. Proteínas Capa S

En un gran número de especies de microorganismos pertenecientes tanto al dominio Bacteria como Archaea, se encuentra descrito un arreglo proteínico cristalino, conformando la envoltura o capa más superficial (denominada capa S) de la célula procarionte. Cuando esta estructura se presenta, alcanza valores superiores al 10% del total de la síntesis proteica (Bolla *et al.*, 2018). La capa S, generalmente, está compuesta por una misma proteína, que, según la especie, presenta un tamaño molecular entre 40 y 200 kDa. Los puntos isoelectricos descritos comprenden un amplio intervalo que van desde pI ácidos hasta básicos (4 – 10.5). Las proteínas capa S presentan una zona hacia el extremo N-terminal, cuya secuencia aminoacídica tiene un alto grado de conservación y una zona altamente variable hacia el extremo C-terminal. Uno de los atributos más destacables de las proteínas capa S es la capacidad de autoensamblarse, originando un arreglo de monocapa extendido con una simetría definida. Esta simetría puede ser cuadrada, oblicua o hexagonal. La celda unidad que conforma la capa S puede estar definida por una única o más unidades de proteína. La figura 36 resume las distintas simetrías descritas para capa S. La morfología de la capa S definida para cada especie de microorganismo comprende un rango de espesor que va de 5 a 10 nm y un tamaño de poro del orden de 1.5-8 nm (Schuster *et al.*, 2005).

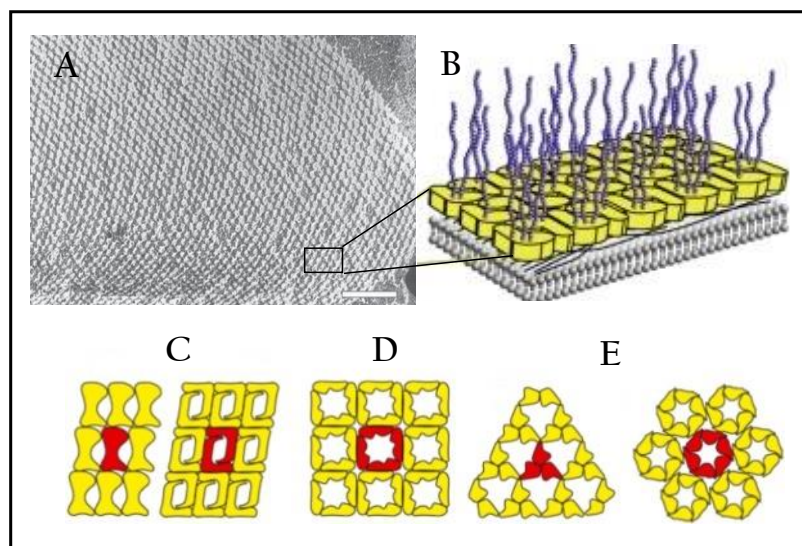


Figura 36: A) Microscopía de barrido electrónico de la capa S de *Thermoplasma thermohydrosulfuricus* (barra 100nm) B) Representación esquemática de la capa S, en color violeta se indica oligosacáridos modificando las proteínas capa S en color

amarillo. Simetría de la celda unitaria de la capa S: C) oblicua. D) Cuadrada E) Hexagonal (Sleytr *et al.*, 2014).

En la literatura se presentan múltiples funcionalidades asociadas a la capa S. Se reconoce que pueden funcionar por ejemplo como cubiertas protectoras, tamices moleculares, trampa de iones y otros nutrientes, promotores para la adhesión celular, inmunomoduladores, reconocimiento de superficies, factores de virulencia en organismos patógenos. En aquellas Archaea que poseen capa S como el componente exclusivo de la envoltura externa a la membrana citoplasmática, la red se involucra en la determinación de la forma celular y constituye una estructura que ayuda en el proceso de división celular (Sleytr *et al.*, 2014).

Las proteínas capa S poseen propiedades fisicoquímicas excepcionales que las convierten en una estructura organizativa única con un alto potencial de aplicación en diferentes áreas de la bionanotecnología, como la generación de vehículos generalmente reconocidos como seguros (GRAS) para la administración de fármacos y otras moléculas de importancia biomédica y biosensores (Ilk *et al.*, 2011). Además, las proteínas capa S pueden ser útiles como modelos para dirigir estrategias de estabilización, auto-organización y evolución funcional de las proteínas (Claus *et al.*, 2005).

En *Lactobacillus*, cuando se encuentran presentes, las proteínas capa S presentan una alta heterogeneidad estructural, y difieren de las de otros géneros de bacterias por sus menores pesos moleculares (25 – 70 kDa) y sus puntos isoeléctricos (9-10.5) más altos (Hynönen & Palva, 2013).

En proteínas capa S, la glicosilación es la modificación más frecuente. Un gran número de especies de *Lactobacillus* presenta capa S, sin embargo, solo se ha detectado que las proteínas están glicosiladas en *L. buchneri* (Anzengruber *et al.*, 2014), *L. helveticus* ATCC12046, *L. acidophilus* NCFM (Konstantinov *et al.*, 2008), *L. plantarum* 41021/252 (Möschl *et al.*, 1993) y varias cepas de *L. kefir* (Mobili *et al.*, 2009). A pesar de ello, la estructura de los glicanos que la modifican se ha estudiado solo para *L. buchneri* 41021/251 y CD034 (Åvall-Jääskeläinen & Palva, 2005). En este contexto, es importante destacar que la glicosilación de proteínas en procariontes se origina a través de múltiples sistemas biosintéticos, traduciendo así en una mayor complejidad estructural de las cadenas glicosídicas, en comparación con las descritas para organismos eucariontes, las cuales aparecen de manera conservada a lo largo de sus taxones filogenéticos.

Utilizando métodos basados en fenotipos y ácidos nucleicos, se han identificado y caracterizado diferentes cepas de *Lactobacillus kefir* aisladas de granos de kéfir

(Delfederico *et al.*, 2006; Garrote *et al.* 2001). Estas cepas mostraron diferencias en las propiedades de la superficie y el poder inhibitor *in vitro* contra microorganismos patógenos intestinales (Golowczyk *et al.* 2007). Así mismo, se identificó la presencia de capa S en diferentes cepas de *L. kefir*, se determinó su PM aparente por una electroforesis en gel SDS-PAGE y se evidenció la presencia de glicosilación por teñido de la banda de SDS-PAGE con reactivo de Schiff. Además se estudió la relación entre las proteínas que la constituyen y las propiedades de la superficie, entre ellas, adhesión a células Caco-2, autoagregación y hemaglutinación (Garrote *et al.*, 2004).

En el presente trabajo de tesis se abordó el estudio estructural de las glicoproteínas de capa S en cuatro cepas de características diferentes: *L. kefir* JCM 5818 y *L. kefir* CIDCA 83111, las cuales presentan un comportamiento de autoagregación y *L. kefir* CIDCA 8348 y *L. kefir* CIDCA 8321, las cuales presentan un comportamiento no-agregante. Este estudio comprendió para cada una de las cepas: la determinación del tipo de glicosilación, la identificación del sitio de unión de los glicanos en la secuencia de aminoácidos de la proteína, la composición de los oligosacáridos y sus tamaños moleculares. En la figura 37 se muestra el esquema de la metodología empleada para el estudio de la glicosilación de las proteínas capa S.

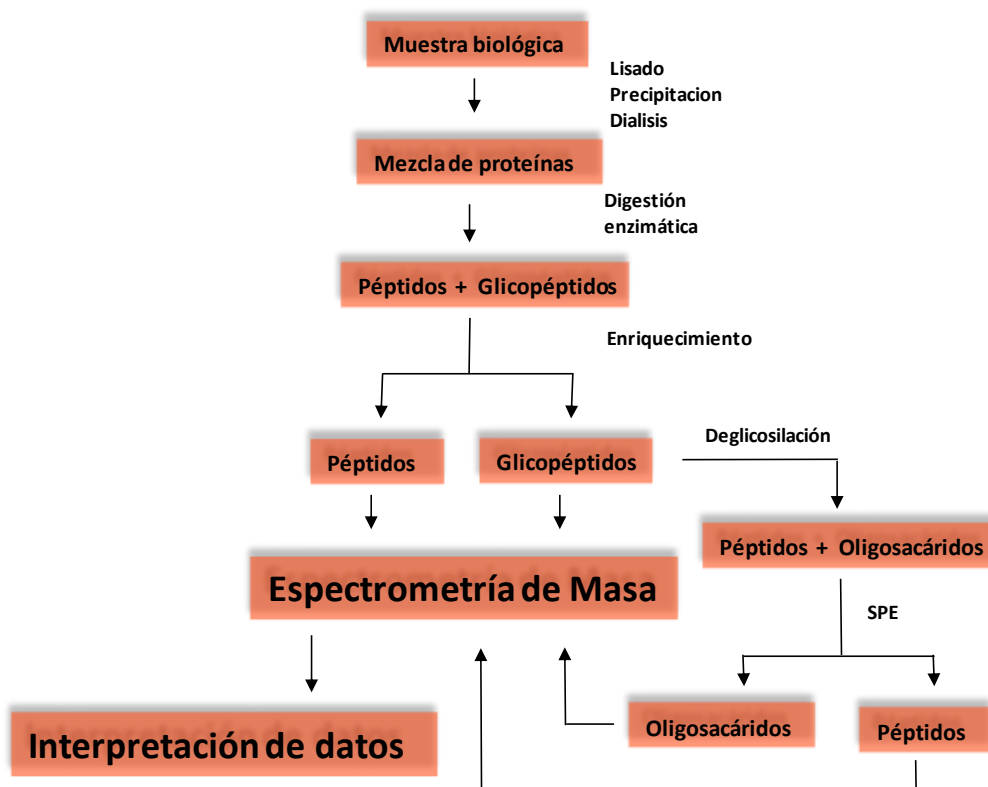


Figura 37: Esquema metodológico utilizado para el análisis glicoproteómico.

2.1 Determinación de la glicosilación en las proteínas capa S de las cepas de *L. kefir* no-agregantes.

Considerando que la glicosilación de estas proteínas podría tener influencia en el comportamiento de agregación en las distintas cepas de *L. kefir*, el estudio glicoproteómico fue dividido en dos etapas. En una primera etapa de análisis se procedió al estudio de las glicoproteínas capa S de las cepas de comportamiento no-agregante *L. kefir* CIDCA 83111 y *L. kefir* JCM 5818 (Malamud *et al.* 2017), mientras que en una segunda etapa se continuó con las proteína capa S de las cepas de comportamiento agregante *L. kefir* CIDCA 8321 y *L. kefir* CIDCA 8348.

En la figura 38 se muestran las secuencias de las proteínas a caracterizar en la presente sección. Antes de iniciar el estudio de la glicosilación propiamente dicho resultó interesante notar que sus secuencias se encuentran conservadas sobre extremo *N*-terminal, mientras que sobre el extremo *C*-terminal presentan marcadas diferencias en su composición y secuencia de aminoácidos, hecho que se presenta en común entre distintas especies de *Lactobacillus* (Malamud *et al.*, 2017).

```

1 MKKSLKKTLE AGVAALS FVA VAGVSSTNAS AKSYAKVTSN KALTSDATTR NVAVNGTNAL
61 YTKAGTLKGA KTVATKTTLA SLKNSKQGQK NFRAYRVATT NRGSVYYKVV SFDKTYRGWI
121 YGGKSVTAF A GGIASFNTTT APAAAKSASA SSASSASSAE QTTALTDAQK AATYKIKTAG
181 TANDGTATTY SYPAWTEYKK GRTVIDATPY ANDTFKVTDQ TTRTREGDLW VKIADTNATN
241 GQKINGWIKF SALTAQNPTP APAPIADNAV RLNFIDSQ GK TVKSIDYVKT GAKKGDTLGS
301 LTGPKTGTQD NFSWTLTKVV ADDLQSKIDN ALSGTGYSFN VSQYPSTLAQ AQTGSTVSLP
361 VTKGDVVYQT LKPYVATKDD VTSTHSLTPN SKSAGAFFKG SFDEGEGPKA THIDISQLVH
421 TDSDGKVDH TNSLPTVKAY IDSVAASDKD AALTSLNNTV KVYAANYLA PANINPSDLF
481 SGRGSAFSS QDVLNLYAKH STLNTLKSAT YPVFNADGTV KEWDQLNLNA TSANSSGTFGS
541 SPVQVVYTYG DGSVSDPFQ NGSSVNPLT PVPLTPLQ

```

```

1 MKKSLKKTLE AGVAALS FVA VAGVSSTNAS AKSYAKVTSN KALTTDATTR NVAVNGTNAL
61 YTKAGTLKGA KTVATKTTLA ALKNSKQGQK NFRAYRVATT NRGSVYYKVV SFDKTYRGWI
121 YGGKSVTAF A GGIASFNTTT APAAAKSASA SSASSASTE QTTALTDAQK NATYKIKTAG
181 TANDGTATTY TYPAWTEYRK GRTVTDATPY ANDTFKVTDQ TTRTREGDLW VKIADTNATN
241 GQKINGWIKY SALTATAQTP ATTPTPVAD NAVRVTFVDA SGKQVGKSFD YAKTGAAKGA
301 TLGTLSTVDG SYQWTLTDAQ KSDLKALINT ALDGTGYSFD LNNTANAAAL AQAKTGAETK
361 IAVTKGSIVY QQLTPYAQTS ASDTSITASK MSPIANTKND SVYQGEVNVK QDTDNKLPVG
421 GFTLKLSDVF NADGTFQKDD FKDALGTTKP GFKTTVSNYL NYVDTTGKDK TTTSAEVKAA
481 RVQDLNNAFA TAATTSYIAP ANLSFTDLFS GNGGATYSRN DVANYINGKA QLKTLKSSVY
541 PVVSDGNAT FNQYTFNFNS ANGGTFGSGA TRVVYTYGDP ATNVNYPTKT VSTTVSPFN

```

Figura 38: Secuencia aminoacídica de las proteínas capa S de *L. kefir* JCM 5818 (superior) y *L. kefir* CIDCA 83111 (inferior) (Malamud *et al.*, 2017).

2.1.1 Determinación de la glicosilación de la proteína capa S de *L. kefir* CIDCA 83111

2.1.1.1 Determinación de la composición de los oligosacáridos

Dado que la única capa S estudiada en *Lactobacillus*, (*L. buchneri*) presenta *O*-glicosilación (Åvall-Jääskeläinen *et al.*, 2005), para comenzar el estudio se investigó este tipo de glicosilación. Para ello, se realizó una electroforesis en gel SDS-PAGE del extracto para localizar la banda de PM aprox. 67 kDa (Figura 39) correspondiente a la glicoproteína capa S de de la cepa *L. kefir* CIDCA 83111. Dicha banda se cortó y se realizó la liberación de *O*-glicanos mediante β -eliminación reductiva.

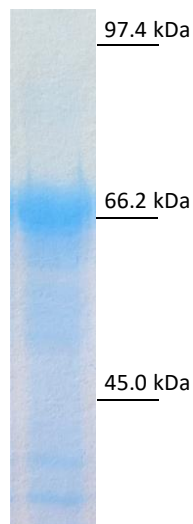


Figura 39: SDS-PAGE de la proteína capa S de la cepa *L. kefir* CIDCA 83111.

Los oligosacáridos obtenidos fueron sometidos a hidrólisis total y los monosacáridos componentes fueron analizados por HPAEC-PAD. Se utilizaron dos condiciones cromatográficas: 1- en las que se resuelven monosacáridos neutros y aminoazúcares y 2- en las que se resuelven alditoles. Se detectó glucosa como componente principal (Figura 40A). El análisis de alditoles permitió identificar sorbitol como monosacárido reducido, el cual corresponde al residuo que une el oligosacárido a la cadena peptídica. Esto se debe a que la liberación de los oligosacáridos fue realizada en condiciones reductivas (Figura 40B).

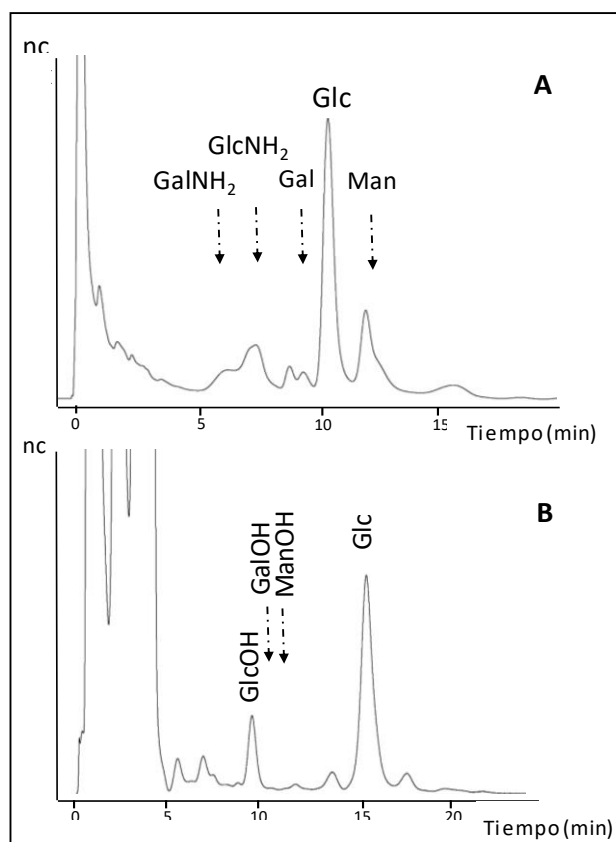


Figura 40: Análisis por HPAEC-PAD de los monosacáridos obtenidos por hidrólisis total de los oligosacáridos liberados por β -eliminación reductiva de la banda de gel correspondiente a la proteína capa S. A) Monosacáridos neutros B) Monosacáridos reducidos.

2.1.1.2 Análisis de los *O*-glicanos de *L. kefir* CIDCA 83111

Los *O*-glicanos de *L. kefir* CIDCA 83111 liberados mediante β -eliminación reductiva fueron también analizados por HPAEC-PAD y luego por espectrometría de masa UV-MALDI-TOF. El análisis llevado a cabo por HPAEC-PAD, permitió determinar oligosacáridos mayoritarios comprendidos entre 5 y 8 unidades de hexosa mediante comparación de tamaños moleculares con la serie de oligosacáridos obtenidos por hidrólisis de amilosa y posterior reducción (Figura 41)

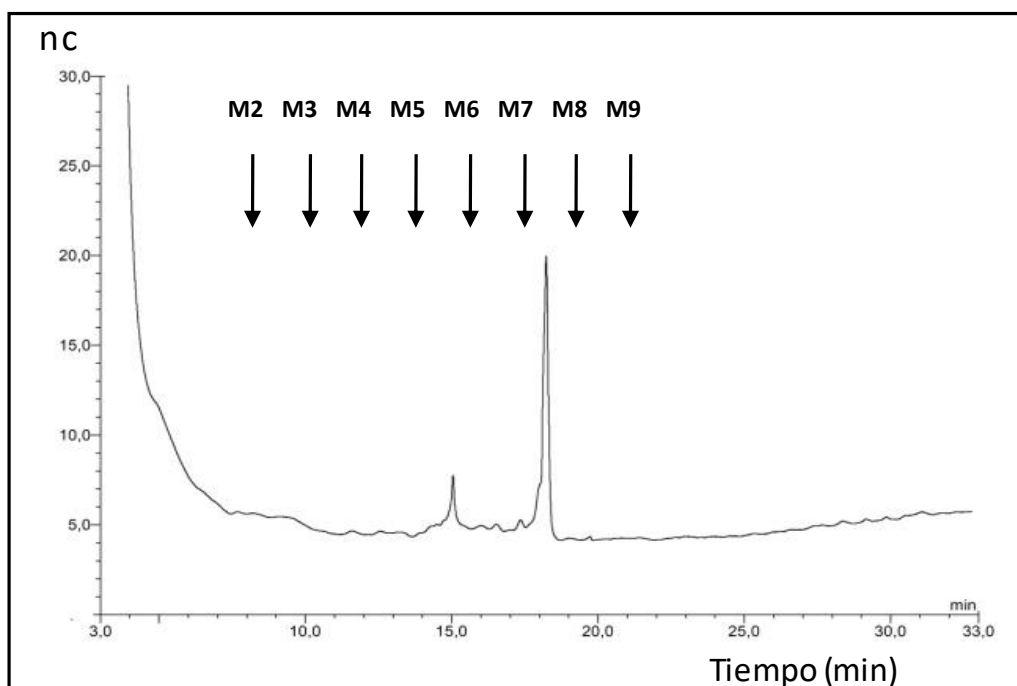


Figura 41: Cromatograma HPAEC-PAD de los *O*-glicanos de *L. kefir* CIDCA 83111. Se utilizaron testigos reducidos obtenidos por hidrólisis de amilosa conteniendo entre 2-9 unidades de glucosa (M2 a M9).

El estudio de los oligosacáridos mediante espectrometría de masa UV-MALDI-TOF se realizó utilizando los modos de ionización positivo y negativo. Cuando el análisis se realizó en modo positivo utilizando ácido 2,5-dihydroxibenzoico como matriz no se pudieron obtener espectros reproducibles. El uso de las matrices nor-harmano y THAP tampoco condujo a la obtención de espectros de calidad, por lo cual se decidió proceder a la utilización del modo de ionización negativo. En estas condiciones de análisis, fue muy interesante notar como inmediatamente se evidenciaron espectros poblados de iones, rápidamente identificados debido a que sus señales se encuentran distanciadas con diferencias de 162 Da correspondientes a una unidad de hexosa (Figura 42). La notable diferencia en el comportamiento de la muestra cuando se utilizó modo de ionización negativo respecto del modo de ionización positivo, sugirió que los *O*-glicanos presentasen una naturaleza acídica lo que le daría mayor facilidad de generación de aniones. Esta naturaleza acídica podría provenir de sustituciones con grupos como fosfato o sulfato o por la presencia de ácidos urónicos. En el espectro MALDI (Figura 42) fue posible identificar una serie de glicofomas mayoritarias entre las cuales, el ion principal m/z 829.0 (calc. m/z 829.2903 $C_{30}H_{53}O_{26}^-$) corresponde al oligosacárido reducido compuesto por cinco unidades de hexosas. La señal de m/z 667.0 (calc. m/z 667.2297, $C_{24}H_{43}O_{21}^-$)

corresponde al oligosacárido reducido constituido por cuatro unidades de hexosa. Por otra parte, el ion m/z 991.5 (calc. m/z 992.3432; $C_{36}H_{63}O_{31}^-$) corresponde a un oligosacárido con seis unidades de hexosa. Pero además, fue interesante observar otras señales minoritarias con una diferencia respecto de las señales mayoritarias de 176 Da, que fueron atribuidas a oligosacáridos conteniendo unidades de ácido hexurónico. Esto estaría de acuerdo con el hecho de que su ionización se encuentra favorecida en forma de aniones (Selman *et al.*, 2012). Por ejemplo, el ion m/z 1005.0 (calc. m/z 1005.3151; $C_{36}H_{61}O_{32}^-$) puede atribuirse a un oligosacárido de fórmula Hex₅HexA. También se detectaron dos señales adicionales en m/z 1167.0 (calc. m/z 1167.3680; $C_{42}H_{71}O_{37}^-$) y m/z 1328.4 (calc. m/z 1329.4208; $C_{48}H_{81}O_{42}^-$) correspondientes a la estructura Hex₆HexA y Hex₇HexA respectivamente. Con el fin de comprobar la presencia del ácido hexurónico evidenciado por espectrometría de masa MALDI, se procedió al análisis del hidrolizado total de los oligosacáridos obtenidos por β -eliminación de la proteína capa S de *L. kefir* CIDCA 83111 por HPAEC-PAD en condiciones de separación de azúcares ácidos. De esta manera, se observó una señal a tiempo de retención coincidente con un testigo ác. galacturónico (Figura 43).

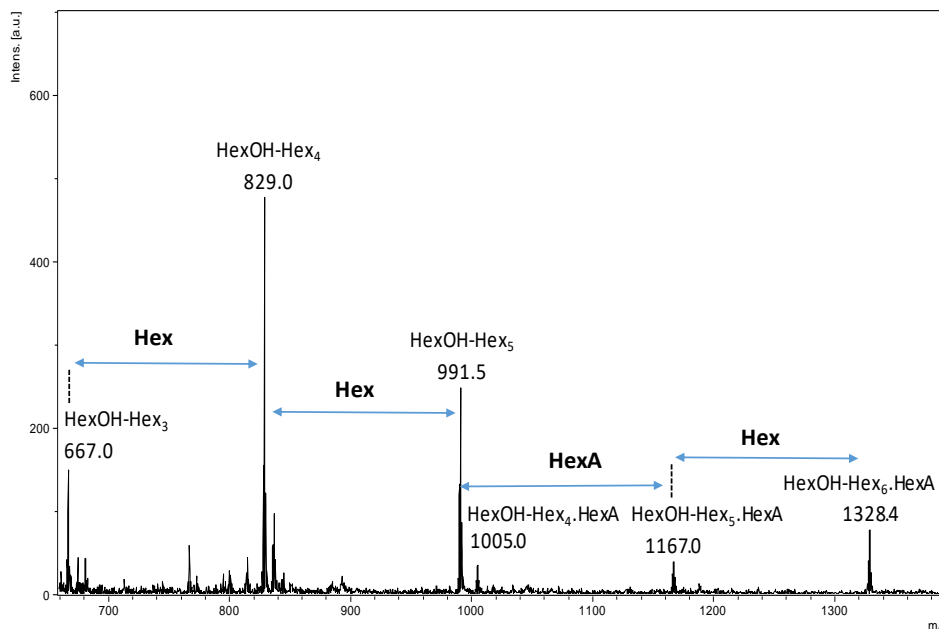


Figura 42: Espectro de masa MALDI-TOF en modo de ionización negativo de los O-glicanos liberados por β -eliminación reductiva de la proteína capa S de *L. kefir* CIDCA 83111.

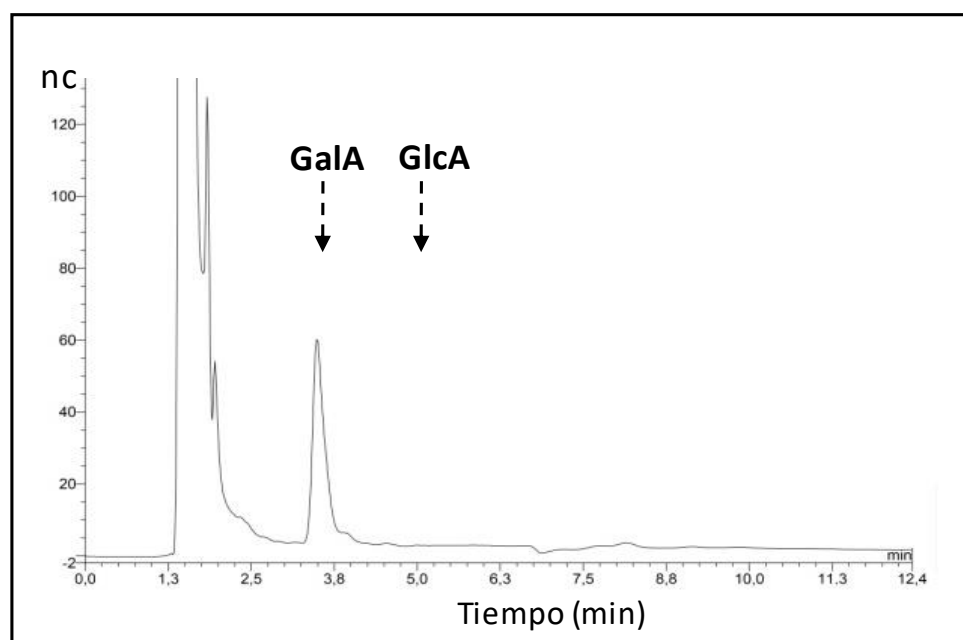


Figura 43: Cromatograma HPAEC-PAD en condiciones de separación de monosacáridos acídicos del producto de hidrólisis total de los *O*-glicanos de *L. kefir* CIDCA 83111.

2.1.1.3 Análisis del sitio de glicosilación en *L. kefir* CIDCA 83111

Luego de abordado el estudio glicómico de la proteína capa S de *L. kefir* CIDCA 83111 se procedió a determinar el sitio de unión de los mismos a la cadena proteica. Para ello, una banda de gel de electroforesis SDS-PAGE conteniendo la proteína aislada, se sometió a digestión con proteasas para obtener una mezcla de péptidos y glicopéptidos. Considerando que la *O*-glicosilación observada para esta glicoproteína presenta una notable diversidad estructural de glicanos, con el fin de obtener glicopéptidos de menor tamaño y así facilitar el análisis glicoproteómico, se sometió la proteína a una doble digestión enzimática, primero utilizando tripsina, la cual presenta actividad proteolítica sobre el extremo C terminal de residuos de arginina (R) y lisina (K) y luego con la proteasa Glu-C (V8) que corta uniones peptídicas sobre el extremo C terminal de residuos de ácido glutámico (E). La mezcla de digestión fue enriquecida en glicopéptidos mediante microtips Cotton-HILIC y la muestra enriquecida fue analizada por nanoHPLC-ESI-Orbitrap.

En la figura 44A se muestra el cromatograma de corriente iónica total de la fracción enriquecida en glicopéptidos. La búsqueda a través de los iones diagnósticos, m/z 163.06 y m/z 325.11 (Figura 44B-C), correspondientes a los iones oxonios Hex^+ y Hex_2^+ respectivamente, presentes en los espectros MS2, identificó una región del cromatograma (5-12 min) donde eluyen *O*-glicopéptidos. Así, por ejemplo, a $\text{Tr}=7.48$ min, fue

interesante notar en el espectro de masa, una serie de iones equiespaciados correspondientes a una familia de glicopéptidos conteniendo diferentes unidades de hexosa (Figura 44D).

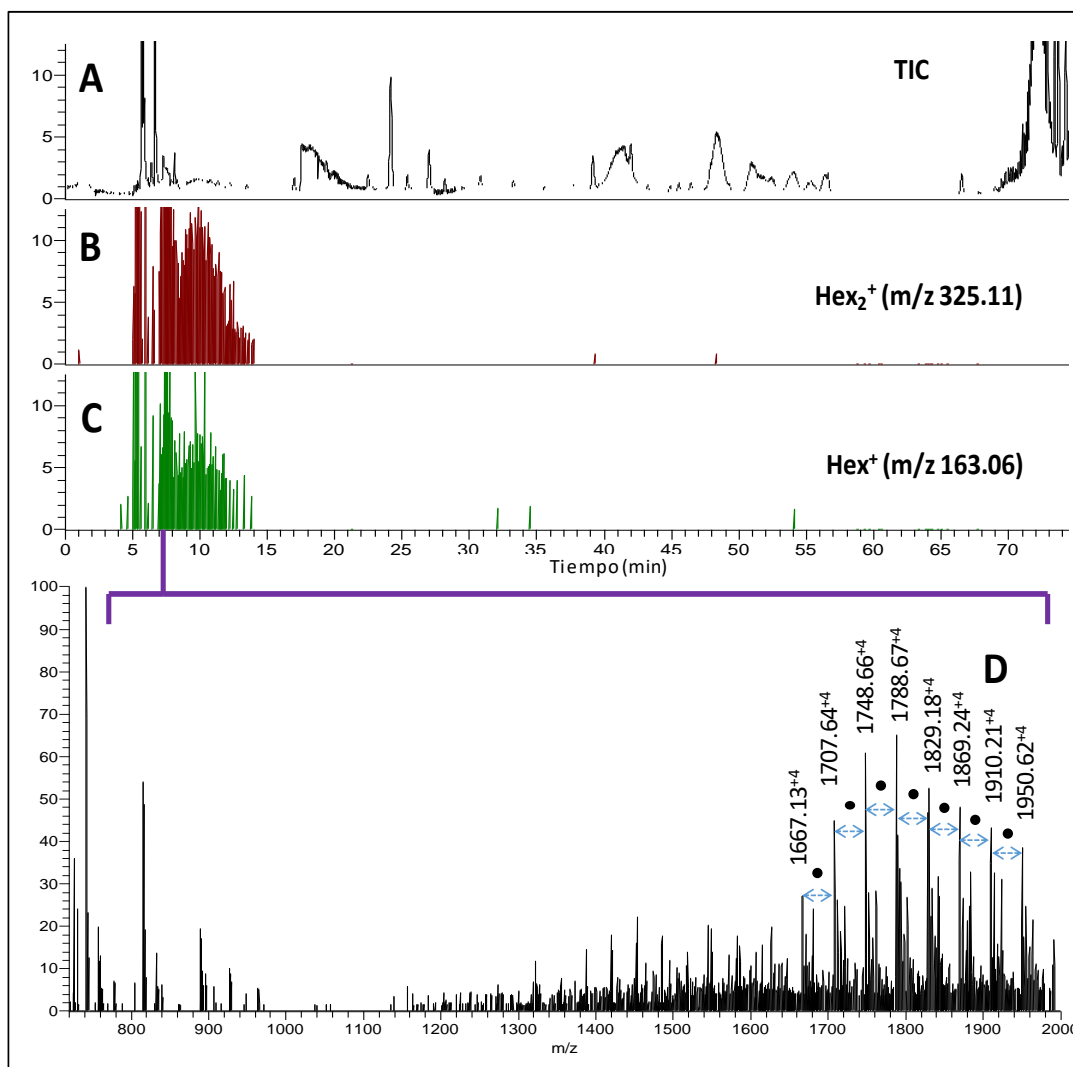


Figura 44: A) Cromatograma de corriente iónica total de la fracción enriquecida en glicopéptidos de *Lactobacillus kefir* CIDCA 83111 adquirido en modo de ionización positivo. Cromatograma iónico extraído para los iones B) m/z 325.11 [Hex_2]⁺ C) m/z 163.06 [Hex]⁺ D) Espectro MS a tiempo de retención 7.48 min. Hexosa: ●

Mediante el análisis de glicopéptidos por nanoHPLC-ESI-Orbitrap en el modo de ionización positivo, a tiempo de retención 5.64 min (Figura 44A) fue posible detectar una familia de glicofomas con carga $z = + 3$ (1653.24; 1707.60; 1761.62; 1816.31; 1869.99; 1924.00). La deconvolución manual de los iones permitió asignar estas señales a la glicosilación sobre el péptido $^{147}\text{SASASSASSASSTE}^{160}$ sustituido con 20 - 29 unidades de hexosa (Tabla 1). Se identificó, además, otra familia de glicopéptidos con carga $z =$

+4 a tiempo de retención 7.21 min (m/z 1667.38, 1707.39, 1748.15, 1788.92, 1829.18, 1869.70, 1910.21, 1950.97, 1991.49) asignada también, a la glicosilación sobre la misma secuencia, pero esta vez, sobre el péptido de mayor tamaño ($^{147}\text{SASASSASSASSTEQTTALTDAQK}^{170}$ conteniendo un sitio de corte saltado (miscleavage) por la proteasa GluC (V8) (utilizada en la doble digestión secuencial enzimática) y sustituido con 31 - 39 unidades de hexosa (Tabla 9). Fue interesante notar que el mayor tamaño del péptido favoreció principalmente su ionización portando una carga mayor ($z = +4$), respecto de los glicopéptidos que no contenían el miscleavage (salto del lugar de clivaje) (Figura 45B). Además, se pudo observar una familia de señales minoritarias con carga $z = 5$ las cuales pudieron ser asignadas al mismo péptido glicosilado con un máximo de 47 unidades de hexosa (Figura 46, ampliación).

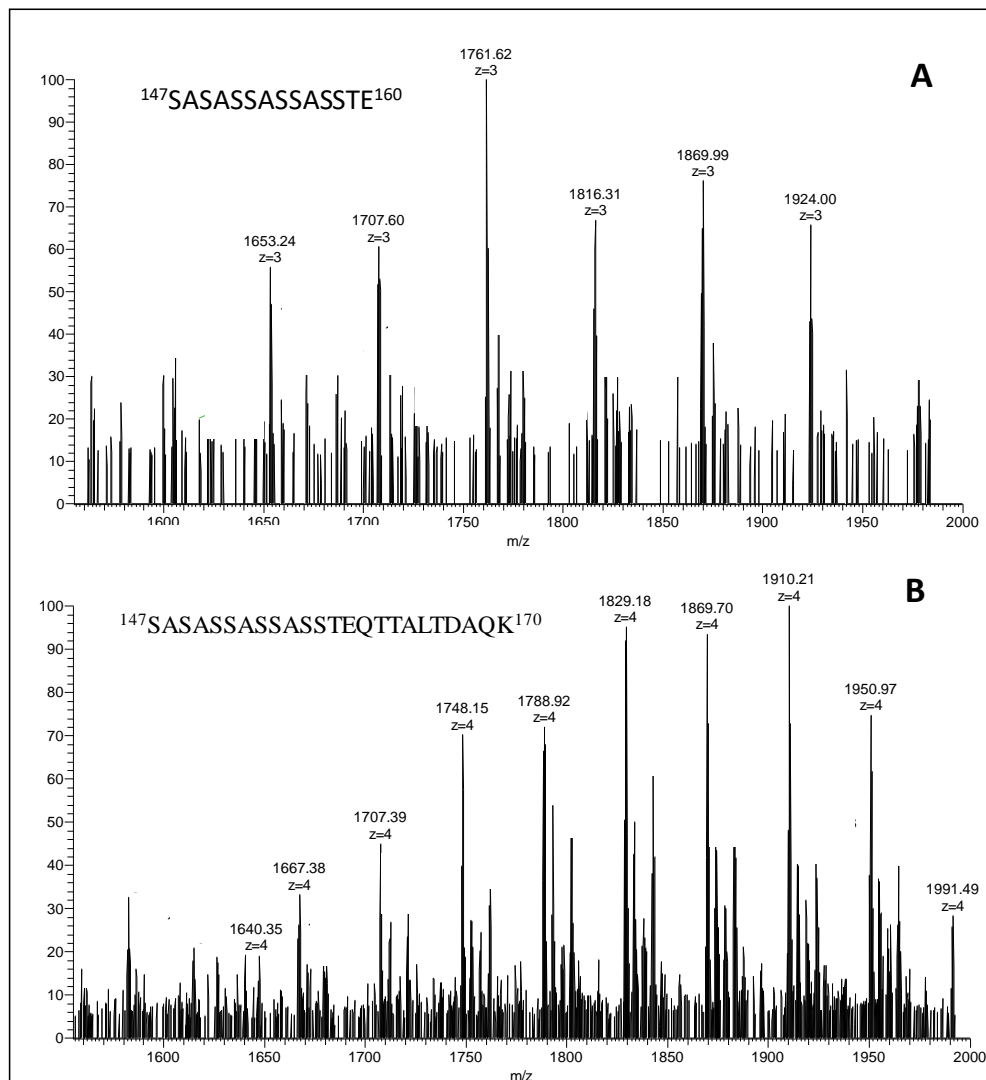


Figura 45: Análisis de glicopéptidos de la proteína capa S de *L. kefir* CIDCA 8311 A) $^{147}\text{SASASSASSASSTE}^{160}$ y B) $^{147}\text{SASASSASSASSTEQTTALTDAQK}^{170}$

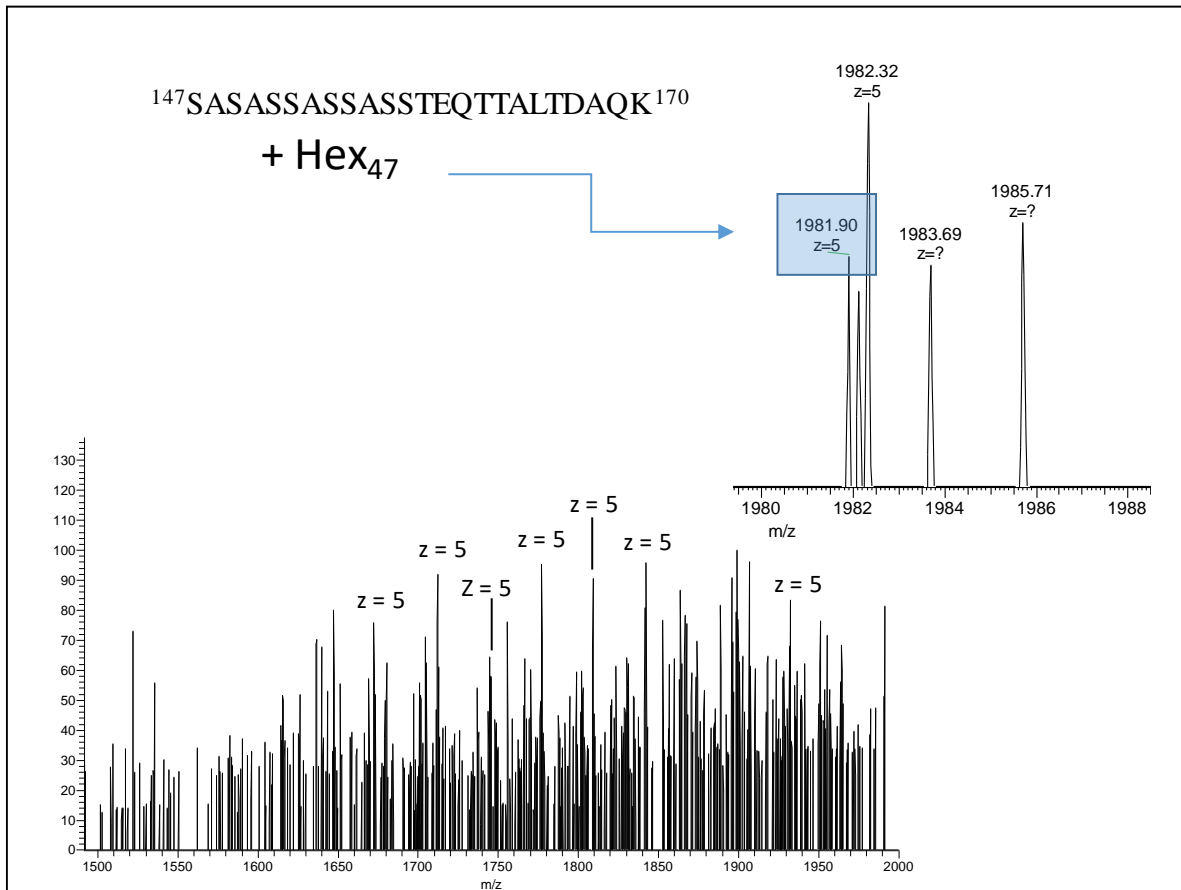


Figura 46: Espectro de masa ESI-Orbitrap evidenciando familia de glicopéptidos con $z = +5$. La ampliación muestra el glicopéptido de mayor tamaño asignado.

En una primera etapa, el estudio de *O*-glicopéptidos de *L. kefir* CIDCA 83111 fue realizado en el tradicional modo de ionización positivo. Sin embargo, considerando que el análisis por espectrometría de masa MALDI-TOF en modo de ionización negativo permitió identificar estructuras de *O*-glicanos conteniendo en su composición ácido galacturónico, se procedió entonces a realizar, de forma complementaria, el análisis de glicopéptidos por nanoHPLC-ESI-Orbitrap en modo de ionización negativo, el cual podría favorecer la ionización de las glicofórmulas acídicas. En la figura 47 se observan espectros de masas seleccionados (a mismos tiempos de retención) de glicopéptidos analizados en modo positivo (Figura 47A) y en el panel inferior (Figura 47B) la misma familia de glicopéptidos analizada en modo de ionización negativo. En la ampliación de la Figura 47B es interesante notar que las señales minoritarias corresponden a familias de glicopéptidos con oligosacáridos acídicos de estructura $\text{Hex}_{28-30}\text{HexA}_{1-3}$. Este resultado confirma además las estructuras identificadas durante el análisis MALDI-TOF de los oligosacáridos obtenidos por β -eliminación descritos anteriormente. Fue muy

interesante demostrar en el análisis de glicopéptidos de la proteína capa S de *L. kefir* CIDCA 8311 que la utilización del modo de ionización positivo facilitó la identificación de glicoformas neutras, mientras que el modo de ionización negativo hizo posible la identificación de glicoformas acídicas conteniendo ácido galacturónico, modificando el péptido 147-170 (Figura 47).

Adicionalmente, el análisis exhaustivo de toda la corrida cromatográfica en modo positivo y negativo permitió determinar también la presencia de otra familia de *O*-glicopéptidos eluyendo a $Tr = 5.45$ min, derivada del péptido, ⁴⁶⁹DKTTTSAE⁴⁷⁶, modificado con glicanos de estructuras variables entre Glc₂₋₉GlcA₂ (Figura 48). Fue interesante determinar en modo negativo la presencia del péptido 471-476 glicosilado confirmando este segundo sitio de *O*-sustitución.

En la tabla 9 se observa en detalle cada uno de las señales identificadas para cada uno de los *O*-glicopéptidos determinados en la proteína capa S de *Lactobacillus kefir* CIDCA 83111.

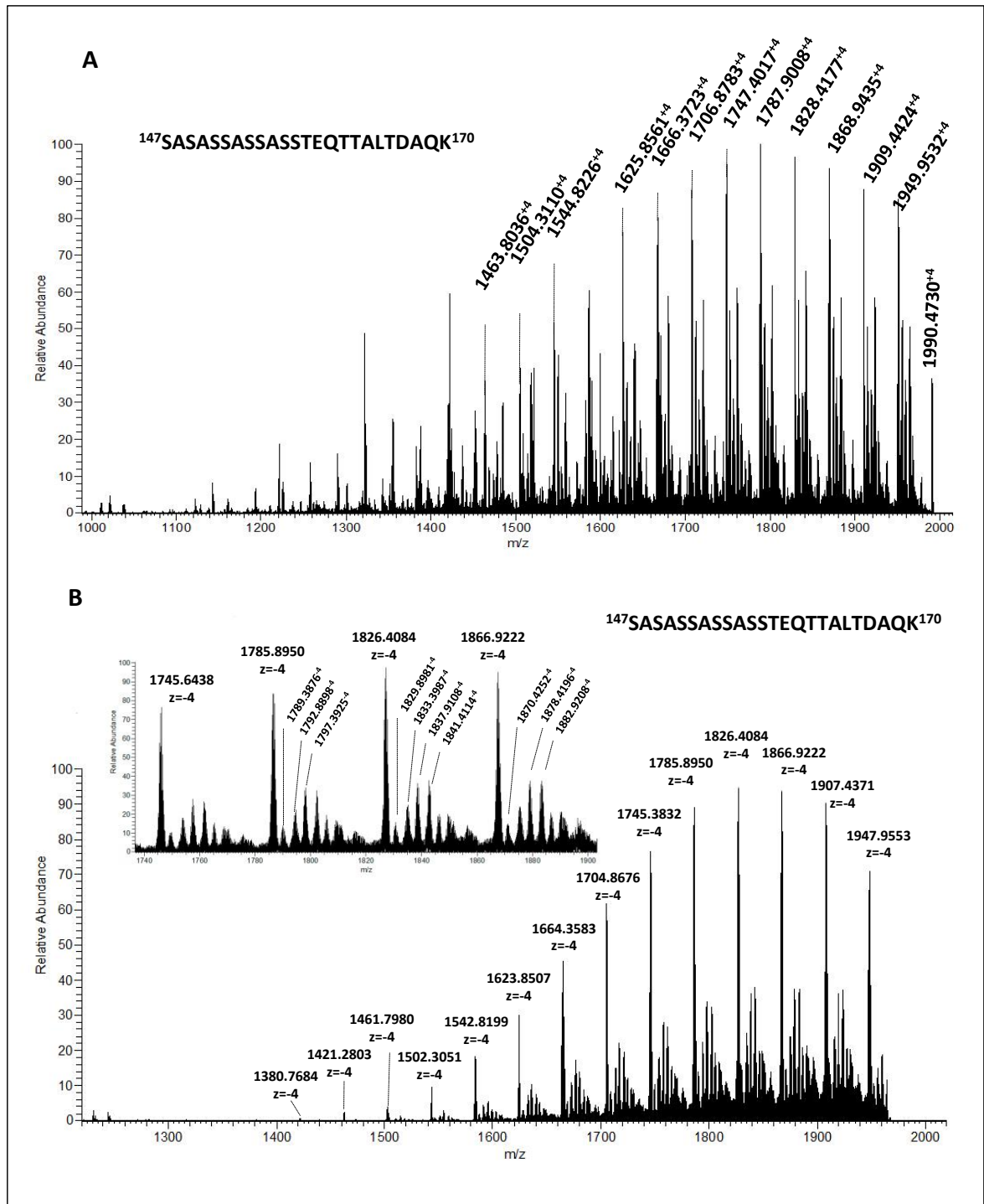


Figura 47: Análisis nanoHPLC-ESI-Orbitrap. Espectros de masa seleccionados a tiempo de retención $T_r = 8.42$ min de glicopéptidos analizados en modo positivo (A) y en modo negativo (B).

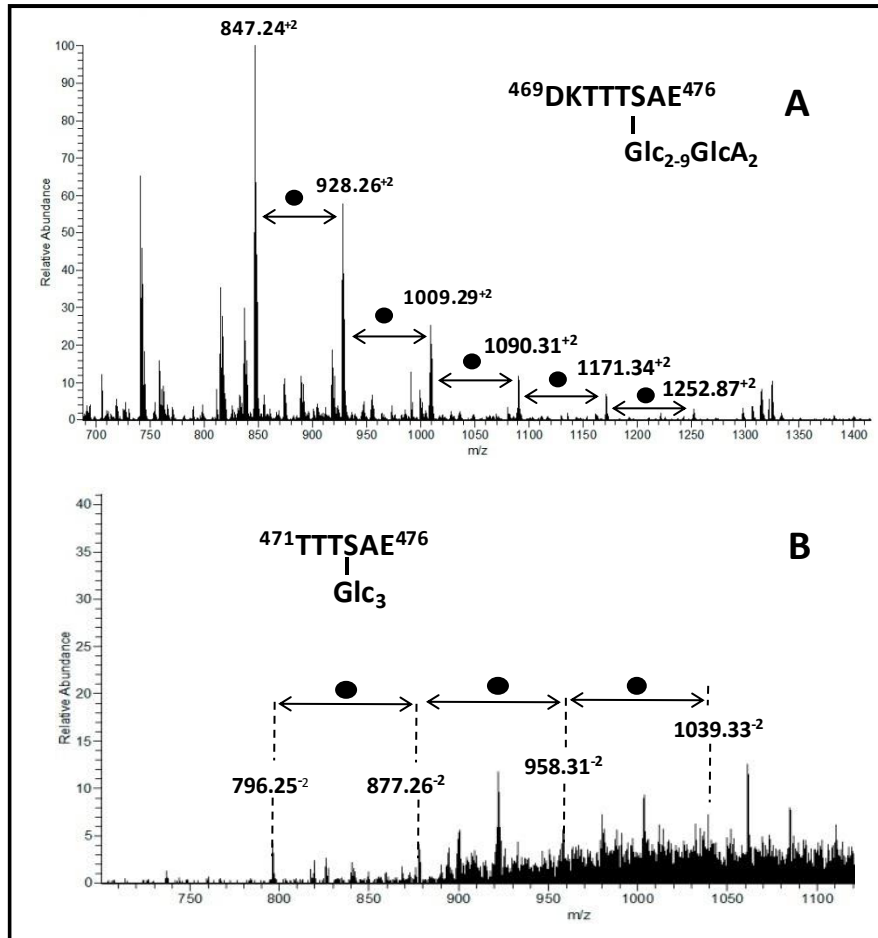


Figura 48: Análisis del péptido *O*-glicosilado $^{469}\text{DKTTTSAE}^{476}$ eluyendo a Tr: 5.45 min en modo de ionización positivo (A) y del péptido glicosilado $^{471}\text{TTTSAE}^{476}$ en modo negativo (B). Hexosa: ●

Tabla 9: Glicopéptidos identificados en la proteína capa S de *L. kefir* CIDCA 83111.

Péptido	Modificación	Carga	m/z calc.	m/z exp.	Error (ppm)
¹⁴⁷ SASASSASSASSTE ¹⁶⁰	Hex ₂₀	3+	1490.8611	1490.8721	7.37
	Hex ₂₁		1544.8787	1544.8824	2.37
	Hex ₂₃		1652.9139	1652.9221	4.94
	Hex ₂₄		1706.9315	1706.9264	-3.01
	Hex ₂₅		1760.9491	1760.9561	3.96
	Hex ₂₆		1814.9667	1814.9486	10.51
	Hex ₂₇		1868.9843	1868.9785	-3.12
	Hex ₂₈		1923.0019	1922.9988	-1.63
	Hex ₂₉		1977.0195	1977.0089	-5.38
	¹⁴⁷ SASASSASSASSTE ¹⁶⁰		Hex ₃₁	4+	1564.042875
Hex ₃₂		1604.556075	1604.5615		3.38
Hex ₃₃		1645.069275	1645.0615		-4.73
Hex ₃₄		1685.582475	1685.84		152.78
Hex ₃₅		1726.095675	1726.0867		-5.20
Hex ₃₆		1766.608875	1766.5977		-6.33
Hex ₃₇		1807.122075	1807.3851		145.55
Hex ₃₈		1847.635275	1847.6289		-3.45
Hex ₃₉		1888.148475	1888.4082		137.56
¹⁴⁷ SASASSASSASSTEQTALTDAQK ¹⁷⁰		Hex ₂₀	4+		1382.7828
	Hex ₂₁	1423.2960		1423.2928	-2.23
	Hex ₂₂	1463.8092		1463.8036	-3.81
	Hex ₂₃	1504.3224		1504.311	-7.56
	Hex ₂₄	1544.8356		1544.8226	-8.40
	Hex ₂₆	1625.8600		1625.8561	-2.41
	Hex ₂₇	1666.3752		1666.3723	-1.73
	Hex ₂₈	1706.8884		1706.8783	-5.90
	Hex ₂₉	1747.4016		1747.4017	0.07
	Hex ₃₀	1787.9148		1787.9008	-7.82
	Hex ₃₁	1828.4280		1828.4177	-5.62
	Hex ₃₂	1868.9412		1868.9435	1.24
	Hex ₃₃	1909.4544		1909.4424	-6.27
	Hex ₃₄	1949.9676		1949.9532	-7.37
	¹⁴⁷ SASASSASSASSTEQTALTDAQK ¹⁷⁰	Hex ₃₅		4-	1990.4808
Hex ₂₀		1380.7682	1380.7684		0.16
Hex ₂₁		1421.2814	1421.2803		-0.76
Hex ₂₂		1461.7946	1461.798		2.34
Hex ₂₃		1502.3078	1502.3051		-1.76
Hex ₂₄		1542.8210	1542.8199		-0.70
Hex ₂₆		1623.8454	1623.8507		3.25
Hex ₂₇		1664.3606	1664.3583		-1.37
Hex ₂₈		1704.8738	1704.8676		-3.62
Hex ₂₉		1745.3870	1745.3832		-2.16
Hex ₃₀		1785.9002	1785.895		-2.90
Hex ₃₁		1826.4134	1826.4084		-2.72
Hex ₃₂		1866.9266	1866.9222		-2.34
Hex ₃₃		1907.4398	1907.4371		-1.40
¹⁴⁷ SASASSASSASSTEQTALTDAQK ¹⁷⁰		Hex ₃₄	4-		1947.9530
	Hex ₂₉ HexA	1789.3950		1789.3876	-4.13
	Hex ₂₈ HexA ₂	1792.8898		1792.8851	-2.63
	Hex ₂₈ HexA ₂ +H ₂ O	1797.3925		1797.3877	-2.65
	Hex ₃₀ HexA	1829.9082		1829.8981	-5.52
	Hex ₂₉ HexA ₂	1833.4030		1833.3987	-2.36
	Hex ₂₉ HexA ₂ +H ₂ O	1837.9057		1837.9108	2.79
	Hex ₂₈ HexA ₃ +H ₂ O	1841.4005		1841.4114	5.92
	Hex ₃₁ HexA	1870.4214		1870.4252	2.03
	Hex ₃₀ HexA ₂	1878.4189		1878.4196	0.39
⁴⁶⁹ DKTTTSAE ⁴⁷⁶	Hex ₃₀ HexA ₂ +H ₂ O	2+	1882.9208	1882.9182	-1.36
	Hex ₃ HexA ₂		845.8219	845.7368	89.74
	Hex ₄ HexA ₂		926.8386	926.7651	79.29
	Hex ₅ HexA ₂		1007.865	1007.7856	78.77
	Hex ₆ HexA ₂		1088.8914	1088.8151	70.06
⁴⁷¹ TTTSAE ⁴⁷⁶	Hex ₅ HexA	2-	796.2734	796.2504	-28.88
	Hex ₆ HexA		877.2998	877.278	-24.85
	Hex ₇ HexA		958.3262	958.2607	-68.35
	Hex ₈ HexA		1039.3526	1039.2854	-64.66
	Hex ₅ HexA ₂ Na ₂		906.27174	906.2847	14.30
	Hex ₆ HexA ₂ Na ₂		987.29814	987.3111	13.13

La espectrometría de masa en modo de ionización negativo ha sido utilizada en el campo de la glicómica, principalmente con fuentes de ionización MALDI para el análisis de glicanos ácidos, como oligosacáridos sialilados y sulfatados (Han & Costello, 2013; Nishikaze, 2017; Papac *et al.*, 1996; Selman *et al.*, 2012; Thomsson *et al.*, 2010). Sin embargo, la utilización del modo de ionización negativo en el campo de la proteómica no ha sido explorada en profundidad. El abordaje proteómico tradicional se encuentra descrito en función del comportamiento de ionización y fragmentación de péptidos bajo la formación de iones cargados positivamente como oxonios o de protonación múltiple y, en consecuencia, los motores de análisis automáticos también están contruidos mediante algoritmos en base a la modalidad de ionización positivo. Esto es debido a que el principal obstáculo para implementar una estrategia ESI en negativo ha sido la espectrometría de masa en tándem (MS/MS). Someter los aniones peptídicos a disociación activada por colisión (CAD) produce mucha menos información que el mismo proceso para los cationes peptídicos. Los espectros MS/MS de aniones peptídicos están dominados por pérdidas de fragmentos neutros y de iones provenientes de fragmentos internos que resultan muy difíciles de interpretar (Bowie *et al.*, 2002; Brinkworth *et al.*, 2001; McAlister *et al.*, 2012; Nabetani *et al.*, 2006). En consecuencia, la obtención de datos mediante el análisis de péptidos en modo de ionización negativo es considerada de baja calidad con respecto al modo positivo. También se debe destacar como otro inconveniente, el hecho de que la fase móvil se ajusta para mejorar la separación cromatográfica mediante el agregado de ácido fórmico o trifluoroacético (Shibue *et al.*, 2005). La base conjugada del ácido interactúa (como par iónico) con residuos de péptidos cargados positivamente (de las cadenas laterales básicas Lys, Arg e Hys, o un grupo α -amino libre). El uso de estos ácidos no solo neutraliza los grupos cargados positivamente, disminuyendo así la hidrofilia del péptido, sino que aumentan aún más la afinidad de los péptidos por la fase estacionaria en separaciones cromatográficas en fase reversa. Por otra parte, el uso de estos aditivos provocan el detrimento de la eficiente ionización negativa bajo las mismas condiciones operativas que el análisis en modo positivo y a la vez que se favorecen fenómenos como la descarga en corona, el arco eléctrico (Cech & Enke, 2001; Nišavić *et al.*, 2017).

Si bien el análisis de glicanos ácidos por espectrometría de masa UV-MALDI-TOF en modo de ionización negativo, ha demostrado ser de alta eficacia, en el campo glicoproteómico, esta estrategia para el análisis de glicopéptidos aún se encuentra muy limitada (Guerrero *et al.* 2015). Es en este contexto, que la utilización del modo de

ionización negativo para el análisis de glicopéptidos resultó desafiante, pero al mismo tiempo conveniente, para el análisis de glicopéptidos de la proteína de capa S de *Lactobacillus kefir* 83111, lo cual permitió identificar glicofomas ácidas, que en modo de ionización positivo no pudieron resolverse. Los resultados destacan la potencialidad de esta estrategia para el análisis de glicopéptidos, en particular, cuando se encuentra complementada con otras técnicas de espectrometría de masa como las que utilizan fuentes de ionización MALDI.

2.1.1.4 Análisis de *N*-glicosilación en la proteína capa S de *L. kefir* CIDCA 83111

A pesar de que no existían en la literatura descripciones de la presencia de *N*-glicosilación en proteínas de *Lactobacillus*, al observar la secuencia peptídica de la glicoproteína capa S de la cepa *L. kefir* CIDCA 83111 se podían determinar 10 sitios potenciales de *N*-glicosilación (Asn-X-Ser/Thr). Por lo tanto, se decidió investigar la presencia de este tipo de modificación. Para ello, en una primera etapa, se cortó una banda de gel de electroforesis SDS-PAGE conteniendo a la proteína capa S de *L. kefir* CIDCA 83111 y se la digirió con PNGasa F. Los *N*-glicanos liberados fueron purificados y analizados por HPAEC-PAD. En la figura 49 se puede observar el cromatograma correspondiente al análisis de los *N*-oligosacáridos donde un oligosacárido eluye a un tiempo de retención similar al correspondiente del clásico núcleo (core) *N*-glicosídico (GlcNAc₂Man₃). También fue posible evidenciar un perfil de glicofomas de mayor tamaño con menor abundancia.

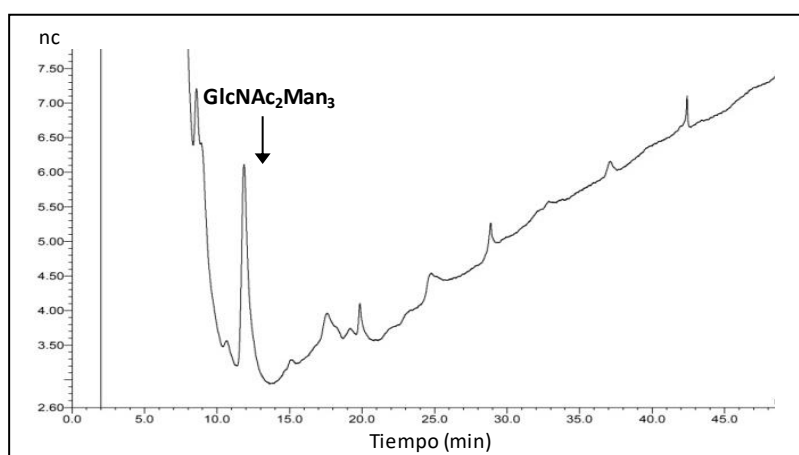


Figura 49: Cromatograma HPAEC-PAD de los *N*-glicanos de la proteína capa S de *L. kefir* CIDCA 83111 obtenidos por liberación enzimática utilizando PNGasa F.

Luego de confirmar que se liberaban oligosacáridos con PNGasa F, enzima específica para hidrolizar cadenas *N*-glicosídicas, se procedió al análisis de *N*-glicopéptidos. Para ello, en el experimento de nanoHPLC-ESI-Orbitrap descrito anteriormente se buscaron a lo largo de la corrida cromatográfica, los iones diagnóstico en los espectros MS/MS, provenientes de los residuos HexNAc que comúnmente componen los *N*-glicanos. Fue muy interesante notar en los cromatogramas iónicos extraídos en función de los iones oxonios reporteros correspondientes a c) m/z 204.09 [HexNAc]⁺; d) m/z 168.07 [HexNAc-2H₂O]⁺, e) m/z 138.05 [HexNAc-CH₆O₃]⁺ (Mechref, 2012) claramente tres zonas donde eluyen *N*-glicopéptidos (Figura 50) a tiempos de retención: 5-8 min.; 26-30 min y 48-55 min.

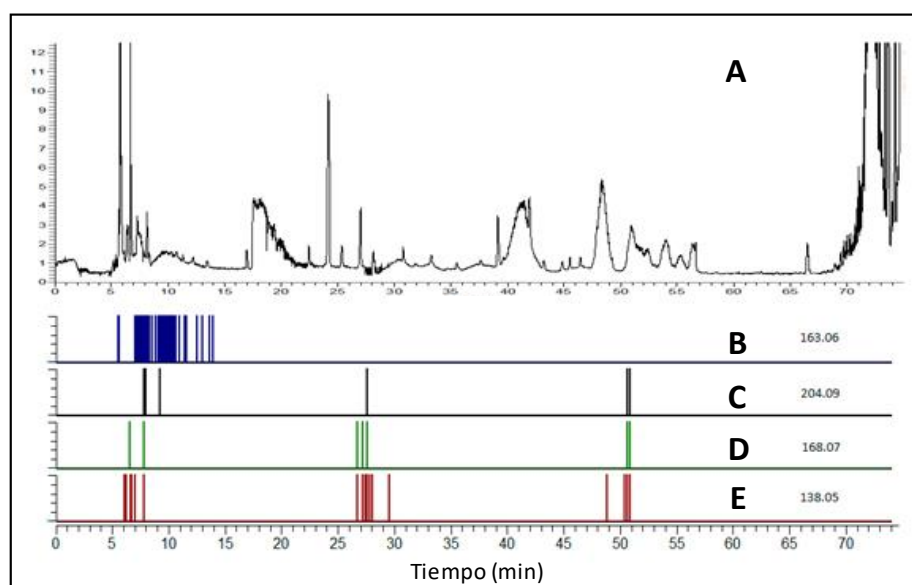


Figura 50: Análisis de glicopéptidos de SLP de *L. kefir* CIDCA 83111. a) Cromatograma de corriente iónica total. Cromatogramas iónicos extraídos en función de los iones oxonios reporteros correspondientes a b) m/z 163.06 [Hex]⁺ c) m/z 204.09 [HexNAc]⁺; d) m/z 168.07 [HexNAc-2H₂O]⁺, e) m/z 138.05 [HexNAc-CH₆O₃]⁺ (Mechref, 2012).

Siguiendo la misma estrategia utilizada para el análisis de *O*-glicopéptidos, la deconvolución manual de los iones precursores conteniendo fragmentos de *N*-glicanos en sus correspondientes espectros de MS2 permitió identificar la presencia dos sitios de glicosilación en residuos de asparaginas contenidas en la secuencia canónica NXS/T.

Dado que los glicopéptidos pueden adquirir múltiples cargas y que en el modo de ionización positiva pueden protonarse y/o sodiarse, obstaculizando el análisis de espectrometría de masa, decidimos realizar primero una inspección manual de los espectros adquiridos en el modo de iones negativos. Para ello, luego de la digestión *in*

silico de la proteína, para obtener los valores de masa de los péptidos, se sumaron los valores de masa de los oligosacáridos que los modificaban y se obtuvieron finalmente una lista teórica de glicopéptidos que se utilizó luego para rastrear estos valores de m/z en los espectros de masa obtenidos en el análisis nanoHPLC-ESI-Orbitrap. Como se esperaba, a un tiempo de elución de 7.58 min, resultó fácil detectar una señal de m/z 1130.5466⁻¹ y la señal de m/z 564.7698⁻², atribuidas al péptido ²³³IADTN²³⁷ATNGQK²⁴³ en sus formas monocargada y policargada respectivamente (Figura 51). Junto a estas señales, se observó una serie de iones en menor abundancia con $z = -2$ que coincidieron con distintas glicoformas modificando el sitio N²³⁷. La señal a m/z 921.9228⁻² corresponde al péptido modificado con el oligosacárido de estructura HexNAc₂-Hex-dHex, el ion a m/z 1296.0752⁻² corresponde a la adición de dos hexosas, dos unidades de HexNAc más una molécula de H₂O a esta última y el ión m/z 1319.0042⁻² corresponde al péptido mencionado modificado con el oligosacárido HexNAc₂Hex₅dHex₂. Resultó interesante encontrar una señal correspondiente al péptido no glicosilado, lo cual sugiere solo una ocupación parcial de este sitio de *N*-glicosilación.

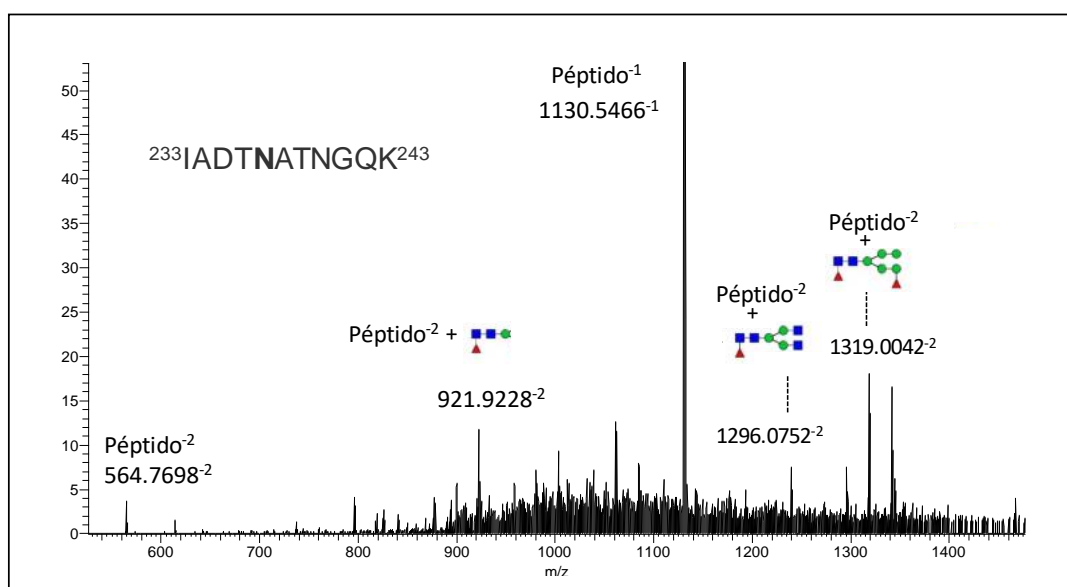


Figura 51: Espectro de masa ESI-Orbitrap a tiempo de retención: 7.58 min adquirido en modo de ionización negativo.

En el análisis nanoHPLC-ESI adquirido en el modo de ionización positivo, tal como se muestra en la figura 52, solo pudieron asignarse dos señales en esta región: una correspondiente al péptido desnudo con $z = +2$ (m/z 566.7837) y una correspondiente al mismo péptido sustituido con dos unidades de HexNAc más H₂O (m/z 778.8825).

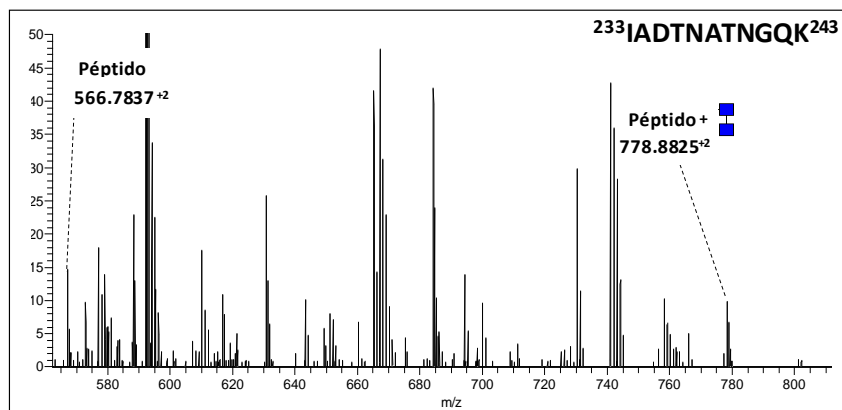


Figura 52: Espectro de masa ESI-Orbitrap en modo de ionización positivo obtenido al tiempo de retención: 7.58 min.

Además, mediante el uso de búsquedas automáticas de glicopéptidos (Tabla 10), el péptido conteniendo un sitio de corte salteado (miscleavage) por la proteasa tripsina, $^{233}\text{IADTN}^{237}\text{ATNGQKINGWIK}^{249}$ también fue encontrado modificado con la glicofoma HexNac₂dHex al tiempo de elución de 56.51 min. La inspección manual de esta región mostró una señal con $z = + 3$ a m/z 804.7286 que coincide con el péptido mencionado modificado con un oligosacárido de estructura HexNac₂-Hex y se detectó también, la señal m/z 873.4028 asignada al glicopéptido modificado con el oligosacárido HexNac₂Hex₂ (Figura 53). Fue muy interesante, además, encontrar que la deconvolución de los *N*-glicopéptidos permitió determinar que los glicanos identificados se hallaron mayormente en sus formas truncadas y con presencia de desoxihexosa.

En la figura 54 se muestran los espectros de MS/MS de iones principales que contienen el fragmento diagnóstico 204.09 que confirmaron la glicosilación de los péptidos identificados.

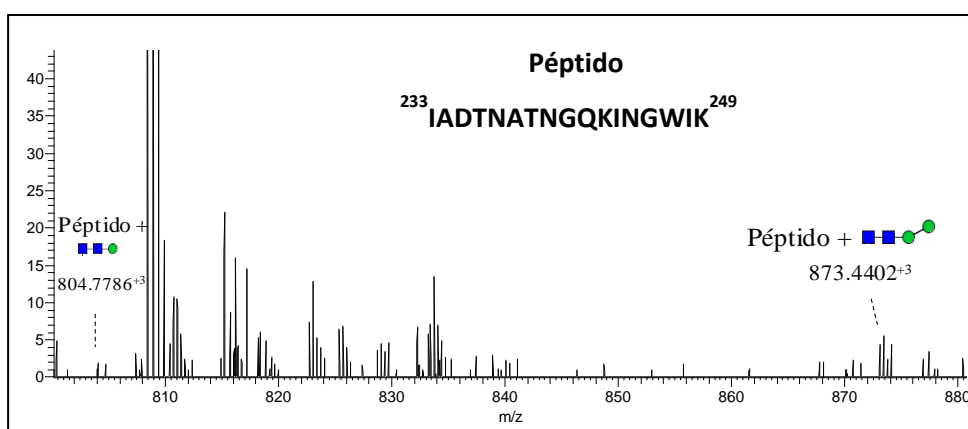


Figura 53: Espectro de masa ESI-Orbitrap en modo de ionización positivo obtenido al tiempo de retención: 56.51 min.

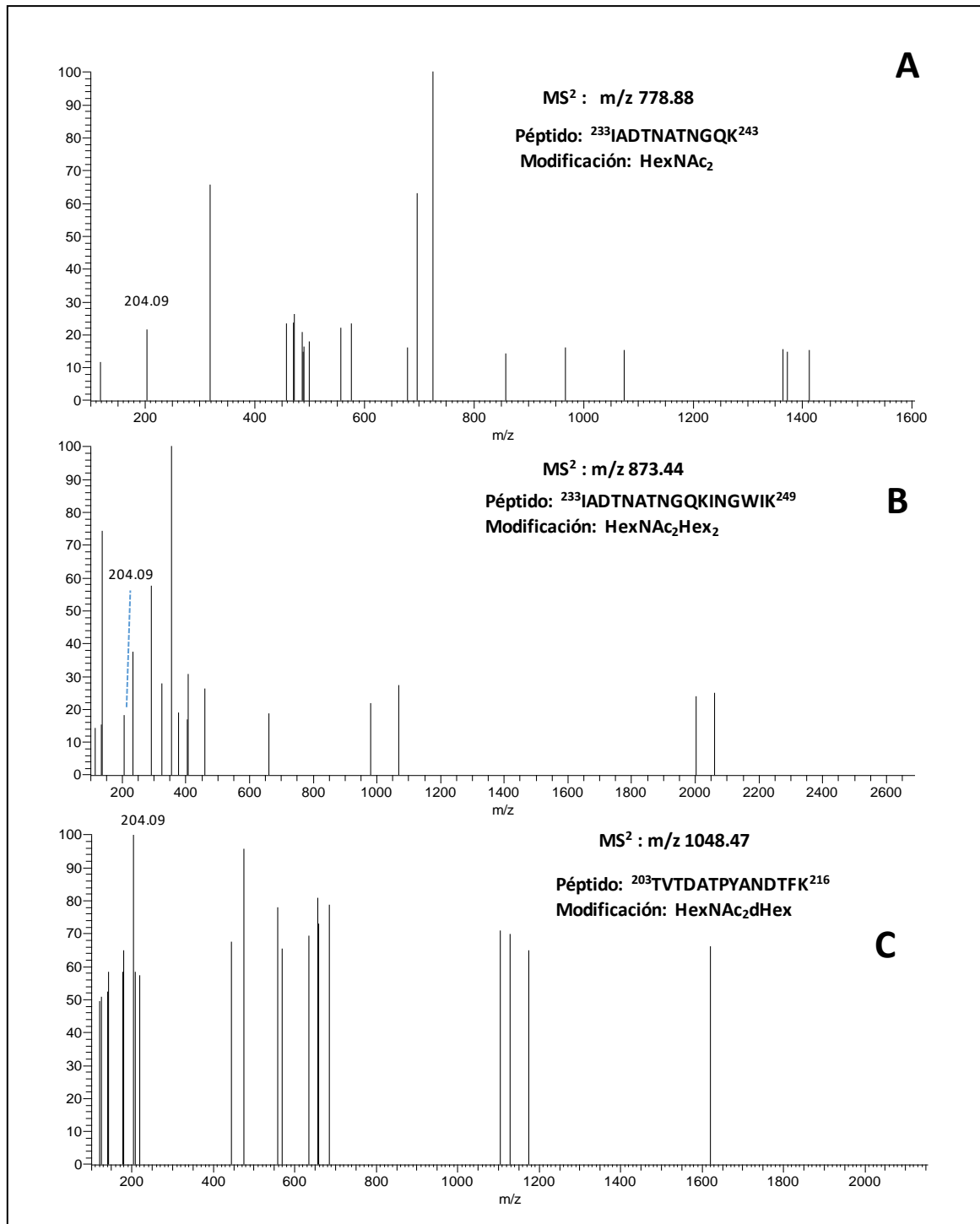


Figura 54: Espectros de MS2 seleccionados de glicopéptidos conteniendo el ión diagnóstico de *N*-glicosilación m/z 204.09. A) péptido: $^{233}IADTNATNGQK^{243}$ b) péptido: $^{233}IADTNATNGQKINGWIK^{249}$ C) péptido $^{203}TVTDATPYANDTFK^{216}$ eluidos a los Tr: 7.58 min, 56.1 min y 51.6 min respectivamente.

Tabla 10: Péptidos identificados mediante la búsqueda automática SequestH de la proteína capa S de *L. kefir* CIDCA 8311

Péptido	Modificación	Carga	MH+ [Da]	ΔM [ppm]	RT [min]
GSIVYQQLTPYAQTSASDTSITASK		3	2617.3044	1.98	47.86
YSALTATAQTPATTPVADNAVR		3	2518.2829	1.8	42.33
SVTAFAGGIASFNTTAPAAAK		2	2054.0559	0.27	52.35
ALINTALDGTGYSFDLNNTANAAALQAK		3	2909.4691	1.75	56.35
AGTANDGTATTYTPAWTEYR		2	2310.0310	0.03	50.97
TTVSNYLNLYVDTTGK		2	1675.8184	0.61	50.75
GATLGLSTVDGSYQWTLTDAQK		3	2413.1919	1.55	54.15
LSDFNADGTFQK		2	1441.6973	1.01	46.62
VVYTYGDPATNVNYPTK		2	1901.9291	0.59	40.44
TVTDATPYANDTFK		2	1543.7284	0.59	37.51
TTVSNYLNLYVDTTGKDK		3	1918.9416	1.2	53.63
QDTDNKLPVGGFTLK		3	1632.8602	0.59	54.01
NDSVYQGEVNVK		2	1351.6495	0.52	30.78
ALTTDATTR		2	949.4948	-0.15	6.61
DALGTTKPGFK		2	1134.6157	0.32	50.74
IADTNATNGQK		2	1132.5604	1	5.57
QTTALTDAQK		2	1076.5585	0.23	6.57
TTTSAEVK		2	836.43614	0.15	0.28
MSPIANTK		2	861.44969	-0.25	6.96
VTFVDASGK		2	923.48308	-0.26	10.70
LPVGGFTLK		2	931.5612	0.03	52.76
TVSTTVSPFN		2	1052.5256	-0.21	24.73
EGDLWVK		2	846.43596	0.38	14.07
SASASSASSASSTE		2	1229.5148	1.61	5.84
DDFKDALGTTKPGFK		3	1639.8328	0.1	54.17
AGTANDGTATTYTPAWTE		2	1990.8644	-1.07	35.20
NDSVYQGE		2	911.37413	-0.01	8.06
TVTDATPYANDTFKVDQTTR		3	2345.1291	1.48	51.61
SASASSASSASSTEQTALTDAQK		3	2287.0535	0.13	24.63
IAVTKGSIVYQQLTPYAQTSASDTSITASK		3	3129.6353	1.23	53.97
SVTAFAGGIASF _n TTAPAAAK	HexNAc(2)dHex	3	2606.2620	-3.84	52.77
ALTTDATTRNVAVNGTNALYTK		3	2295.1990	2.18	51.61
IADTNATNGQKINGWIK	HexNAc(2)dHex	4	2948.4110	3.92	56.51

En el análisis de la segunda región donde eluyen *N*-glicopéptidos, a $R_t = 30.02$ min (Figura 55), se detectó una señal con $z = -2$ (m/z 770.3560) correspondiente al péptido $^{203}\text{TVTDATPYAN}212\text{DTFK}^{216}$. También fue posible asignar la señal m/z 1046.4855 al péptido 203–219 sustituido con el oligosacárido HexNAc₂dHex. Para asegurar la estructura del glicopéptido, se procedió al mismo análisis, pero ahora utilizando el modo de ionización positivo (Figura 56). Como se esperaba, se detectaron las señales correspondientes con $z = +2$ (m/z 772.0980 y m/z 1048.4679).

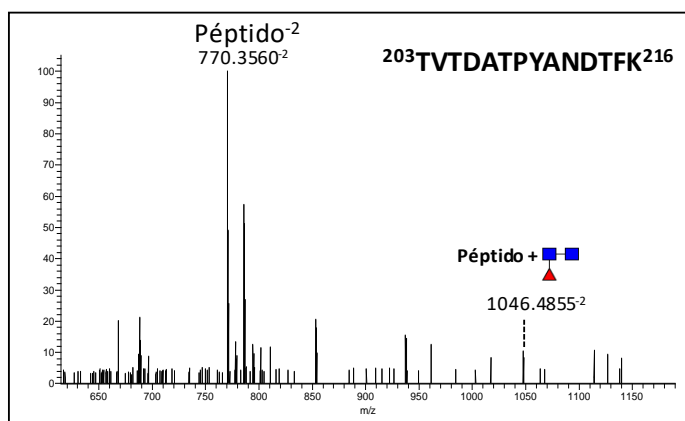


Figura 55: Espectros de masa seleccionado del péptido *N*-glicosilado $^{203}\text{TVTDATPYAN}^*\text{DTFK}^{216}$ adquirido en modo de ionización negativo.

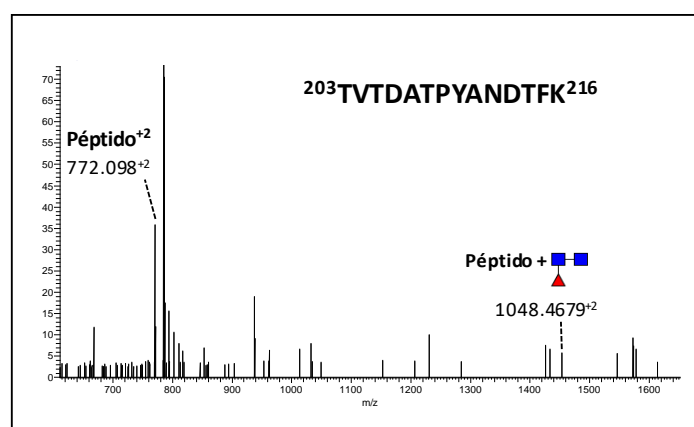


Figura 56: Espectros de masa seleccionado del péptido *N*-glicosilado $^{203}\text{TVTDATPYAN}^*\text{DTFK}^{216}$ adquirido en modo de ionización positivo.

Finalmente, en la tercera región donde eluyen *N*-glicopéptidos, a tiempo de retención = 30.02 min (Figura 50), la búsqueda automática utilizando SequestH (tabla 10) permitió identificar el péptido $^{125}\text{SVTAFAGGIASFNTTTAPAAK}^{146}$ glicosilado con un oligosacárido de estructura HexNAc₂Hex pero, la baja abundancia de las señales correspondientes impidió la detección de fragmentos diagnóstico en el espectro MS/MS.

Tabla 11: *N*-glicopéptidos identificados en la proteína capa S de *L. kefir* CIDCA 83111.

	Glicopéptido			Oligosacárido	Péptido
	Rt (min)	m/z	carga		
<i>N</i> -Glicosilación	7.58	1295.92	2-	NAcGlc ₂ Man ₃ Fuc	IADTNATNGQK
	54.33	922.79	3+	NAcGlc ₂ Fuc	IADTNATNGQKINGWIK
	30.02	1047.51	2-	NAcGlc ₂ Fuc	TVTDATPYANDTFK
	30.02	1049.52	2+	NAcGlc ₂ Fuc	TVTDATPYANDTFK
	51.91	998.49	3+	NAcGlc ₂ Man ₃	SVTAFAGGIASFNTTTAPAAK

En el estudio de la *N*-glicosilación de la proteína capa S de *L. kefir* CIDCA 83111, resultó muy interesante demostrar la complementariedad de los modos de ionización positivo y negativo para la identificación de glicopéptidos en baja abundancia. Durante el análisis de éste tipo de señales minoritarias, es común que los correspondientes espectros MS/MS no proporcionen la información suficiente para caracterizar completamente la identidad del péptido, por lo cual, la combinación de los dos modos de ionización contribuye a la confirmación de glicopéptidos considerando que los errores atribuidos a sus *m/z* en los espectros MS1 se encuentren en el orden de los 5 ppm. En la tabla 11 se muestran a modo de resumen los *N*-glicopéptidos identificados.

Los resultados obtenidos del estudio nanoHPLC-ESI de los *N*-glicopéptidos, conjuntamente con el análisis HPAEC-PAD de los *N*-glicanos liberados mediante la hidrólisis enzimática utilizando PNGasa F, permitieron confirmar la presencia de este tipo de glicosilación en *L. kefir* CIDCA 83111, modificación que no había sido descrita anteriormente en proteínas capa S del género *Lactobacillus*.

2.1.2. Análisis glicoproteómico de la proteína capa S de *L. kefir* JCM 5818

2.1.2.1 Determinación de la composición de los oligosacáridos

El estudio de la glicosilación de la proteína capa S de *L. kefir* JCM 5818 se comenzó con la determinación de la composición de los oligosacáridos. Para ello, se realizó la liberación de *O*-glicanos mediante β -eliminación reductiva sobre la banda de gel SDS-PAGE de PM aprox 67 kDa (Figura 57) correspondiente a la glicoproteína capa S de *L. kefir* JCM 5818.

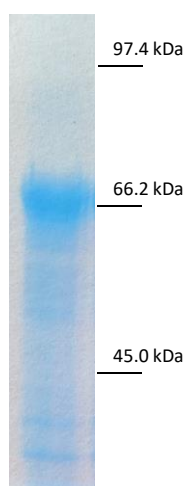


Figura 57: SDS-PAGE de la proteína capa S de la cepa *L. kefir* JCM 5818.

Los oligosacáridos obtenidos fueron sometidos a hidrólisis total y los monosacáridos componentes fueron analizados por HPAEC-PAD en forma análoga al estudio realizado con la cepa anteriormente descrita. De esta forma se detectó glucosa como componente principal (Figura 58A). El análisis de alditoles permitió identificar sorbitol como monosacárido reducido, el cual corresponde al residuo que une el oligosacárido a la cadena peptídica. (Figura 58B). No fue posible detectar componentes ácidos por HPAEC-PAD.

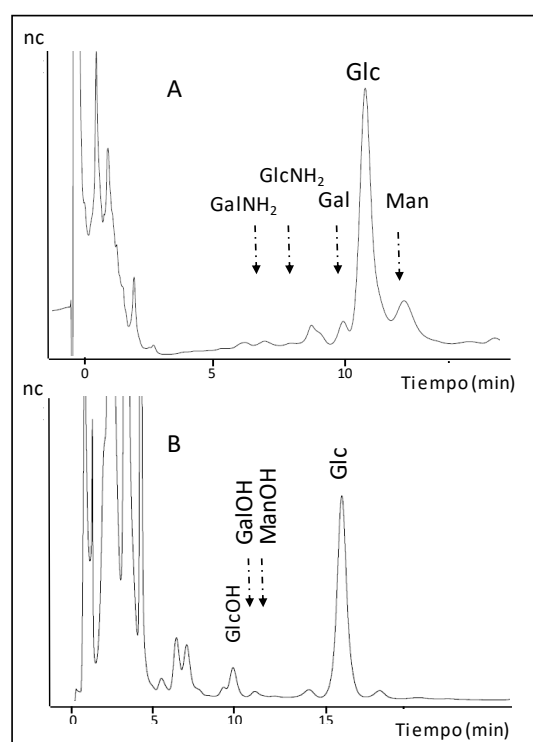


Figura 58: Análisis por HPAEC-PAD de los monosacáridos obtenidos por hidrólisis total de los oligosacáridos liberados por β -eliminación reductiva de la banda de gel correspondiente a la proteína capa S. A) Monosacáridos neutros B) Monosacáridos reducidos.

2.1.2.2 Estudio de los glicopéptidos de *L. kefir* JCM 5818

La banda de gel conteniendo la proteína capa S de *L. kefir* JCM 5818 aislada, fue sometida a digestión trípica, seguida del enriquecimiento en glicopéptidos utilizando HILIC-SPE. La fracción enriquecida en glicopéptidos se analizó como en el caso anterior, por nanoHPLC-ESI-Orbitrap. Como se puede observar en la figura 59, el análisis del cromatograma iónico extraído en función de los iones oxonios correspondientes a m/z

163.06 [Hex]⁺, m/z 325.11 [Hex₂]⁺, m/z 487.16 [Hex₃]⁺, m/z 649.21 [Hex₄]⁺ muestra una región en la cual coinciden señales características de péptidos *O*-glicosilados.

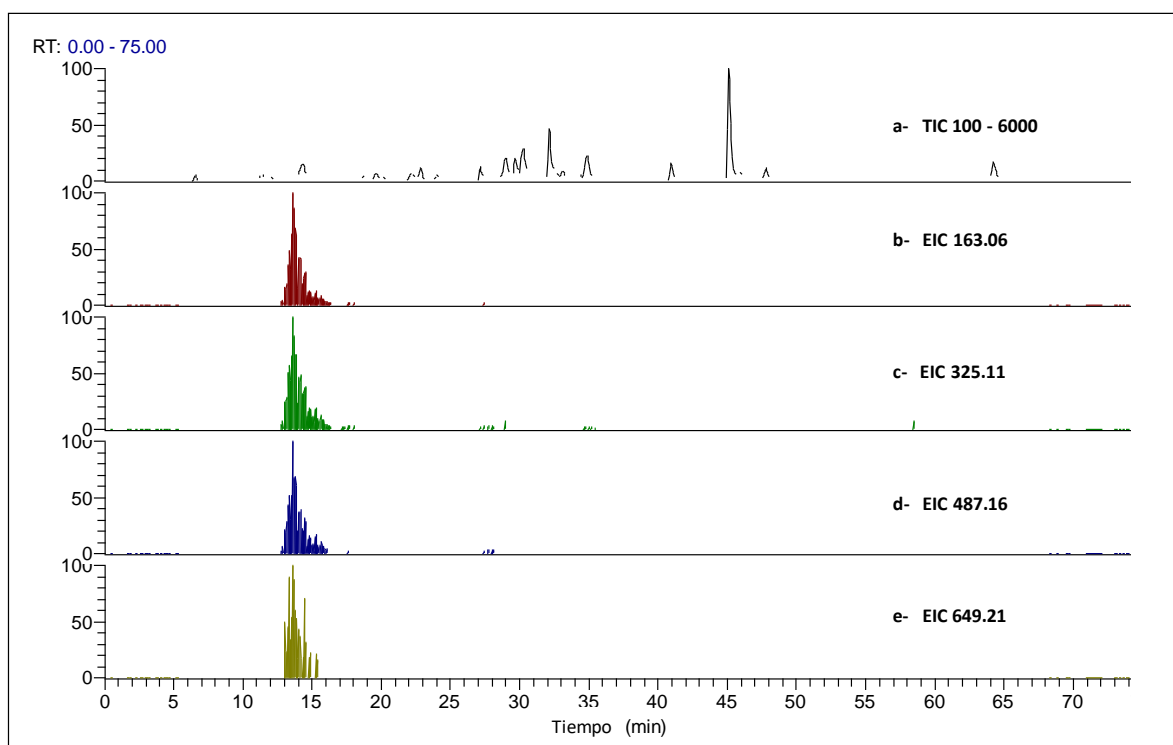


Figura 59: a) Cromatograma corriente iónica total de la mezcla de digestión triptica enriquecida en glicopéptidos de la proteína capa S de *L. kefir* JCM 5818. Cromatogramas iónicos extraídos en función de los iones oxonios correspondientes a b) 163.06 [Hex]⁺, c) m/z 325.11 [Hex₂]⁺, d) m/z 487.16 [Hex₃]⁺, e) m/z 649.21 [Hex₄]⁺

Con el fin de localizar el sitio de glicosilación, y dado que en este caso los espectros obtenidos fueron de óptima calidad, la estrategia aquí empleada consistió en la identificación en los espectros MS/MS de iones de la serie *b* - y provenientes de la fragmentación del glicopéptido. Para ello, primero se filtraron del total de espectros MS/MS generados en el análisis nanoHPLC-ESI-Orbitrap, aquellos espectros que contenían iones reporteros o diagnóstico de azúcares, descartando aquellos que no los presentaban. Sobre el total de espectro filtrados y contemplando los tiempos de retención asociados a cada uno, se procedió a recabar información proveniente de la identidad del péptido. Ha sido descrito que cuando se emplea la fragmentación inducida por colisión de alta energía (CID-HCD) en los experimentos de MS/MS, las uniones glicosídicas son más lábiles que las uniones peptídicas, por lo tanto, es frecuente obtener espectros de masa poblados mayormente por fragmentos del oligosacárido, mientras que los fragmentos peptídicos se presentan en baja abundancia o a nivel ruido (Segu & Mechref,

2010). Sin embargo, notablemente, en el presente análisis, se logró un alto nivel de cobertura de fragmentación de péptidos mediante la detección de iones provenientes de las series *b* - *y* del péptido glicosilado (Figura 60). Aún más, fue posible detectar fragmentos del tipo *Y*, los cuales se definen por la conservación del total del esqueleto peptídico con sucesivas pérdidas de los monosacáridos que componen el glicano, hasta encontrar en última instancia, el fragmento correspondiente al péptido habiendo perdido de forma completa el glicano, ión comúnmente denominado péptido desnudo. En conjunto, la información recabada de los espectros MS/MS, permitió unívocamente, la asignación de la glicosilación sobre el péptido 147-170. La deconvolución de estos iones permitieron atribuir a las señales eluyendo a tiempos de retención 10-14 min al péptido $^{147}\text{SASASSASSASSASSAEQTTALTDAQK}^{170}$, sustituido con de 10 a 35 unidades de glucosa.

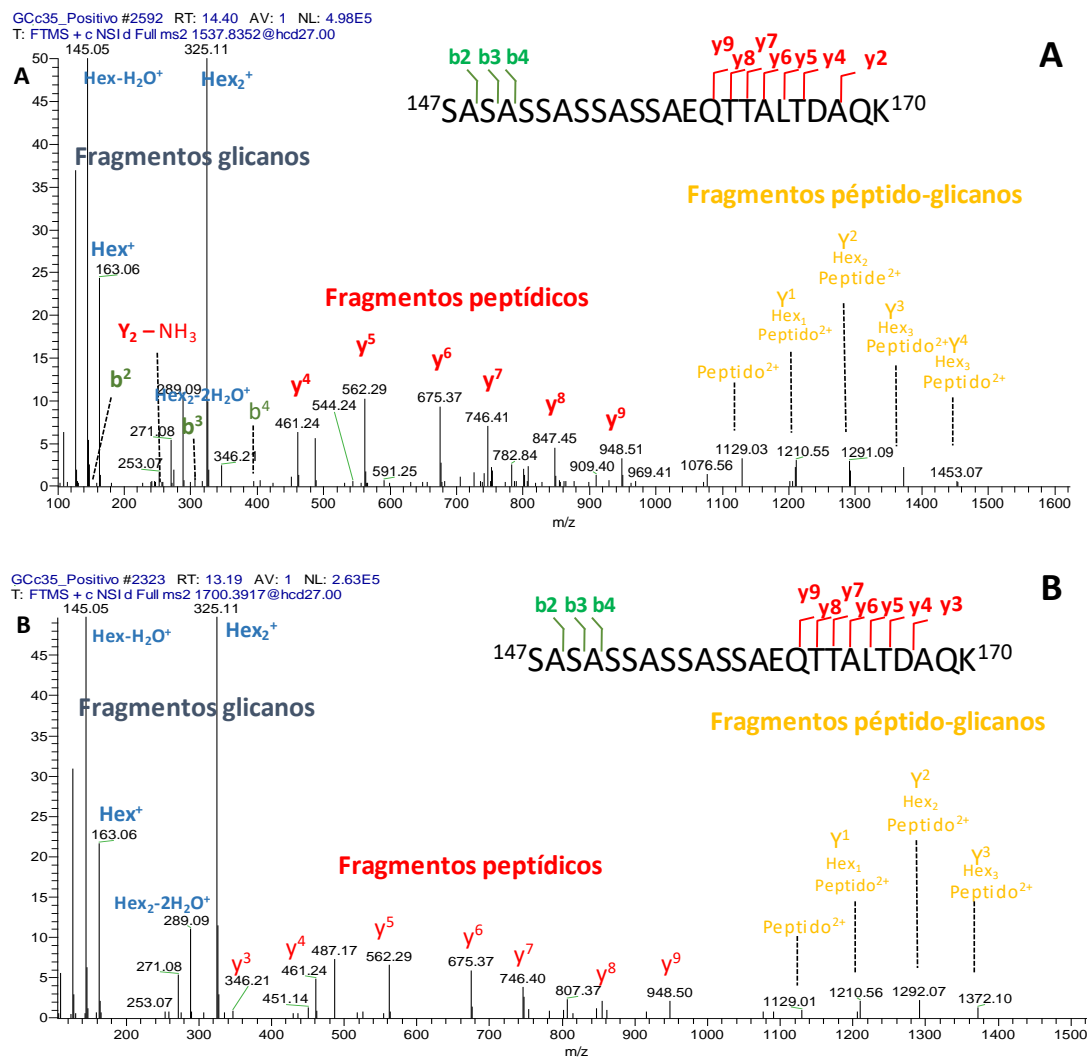


Figura 60: Espectros MS2 de glicopéptidos seleccionados de *L. kefir* JCM 5818 A) m/z 1537.83⁺⁴ B) m/z 1700.39⁺⁴ eluidos a Tr = 14.40 y 13.19 min respectivamente.

Otro hallazgo interesante durante el análisis nanoHPLC-ESI-Orbitrap de los *O*-glicopéptidos de la proteína de capa S de *L. kefir* JCM 5818, fue la capacidad de resolución de las diferentes glicofomas del péptido 147-170. En las condiciones de separación cromatográfica empleadas para el análisis de glicopéptidos se utilizó una columna de fase reversa, que como es conocido define la separación de la mezcla en función de las interacciones no polares que se establecen entre los péptidos y la fase estacionaria. Sin embargo, tal como se muestra en la figura 61, la porción sacarídica del glicopéptido presenta un rol destacado en la separación cromatográfica. En la figura 61, se evidencia claramente que la elución de los *O*-glicopéptidos identificados se basa en la naturaleza hidrofílica de los glicanos que modifican el péptido, y, por lo tanto, eluyen primero las glicofomas de mayor tamaño, respecto de las de menor tamaño. En este sentido, el oligosacárido actúa disminuyendo la capacidad de retención del glicopéptido con respecto a la retención del mismo péptido no glicosilado. Estos resultados permitieron identificar la glicosilación en el péptido 147-170 conteniendo un solo residuo de hexosa, co-eluyendo con el péptido sin glicosilar (Figura 62). Esta observación permitió elucidar que el sitio de modificación no se encuentra completamente ocupado, es decir, que en la capa S de *L. kefir* JCM 5818, co-existen (aunque minoritariamente) un conjunto de proteínas capa S no *O*-glicosiladas conjuntamente con sus formas glicosiladas. Resultó interesante además notar que las señales atribuidas a glicopéptidos de mayor tamaño presentaron mayores valores de carga, mientras que los glicopéptidos de menor tamaño presentaron menores valores de carga, por lo cual, la presencia del glicano en el péptido podría tener un efecto estabilizador de carga en el glicopéptido.

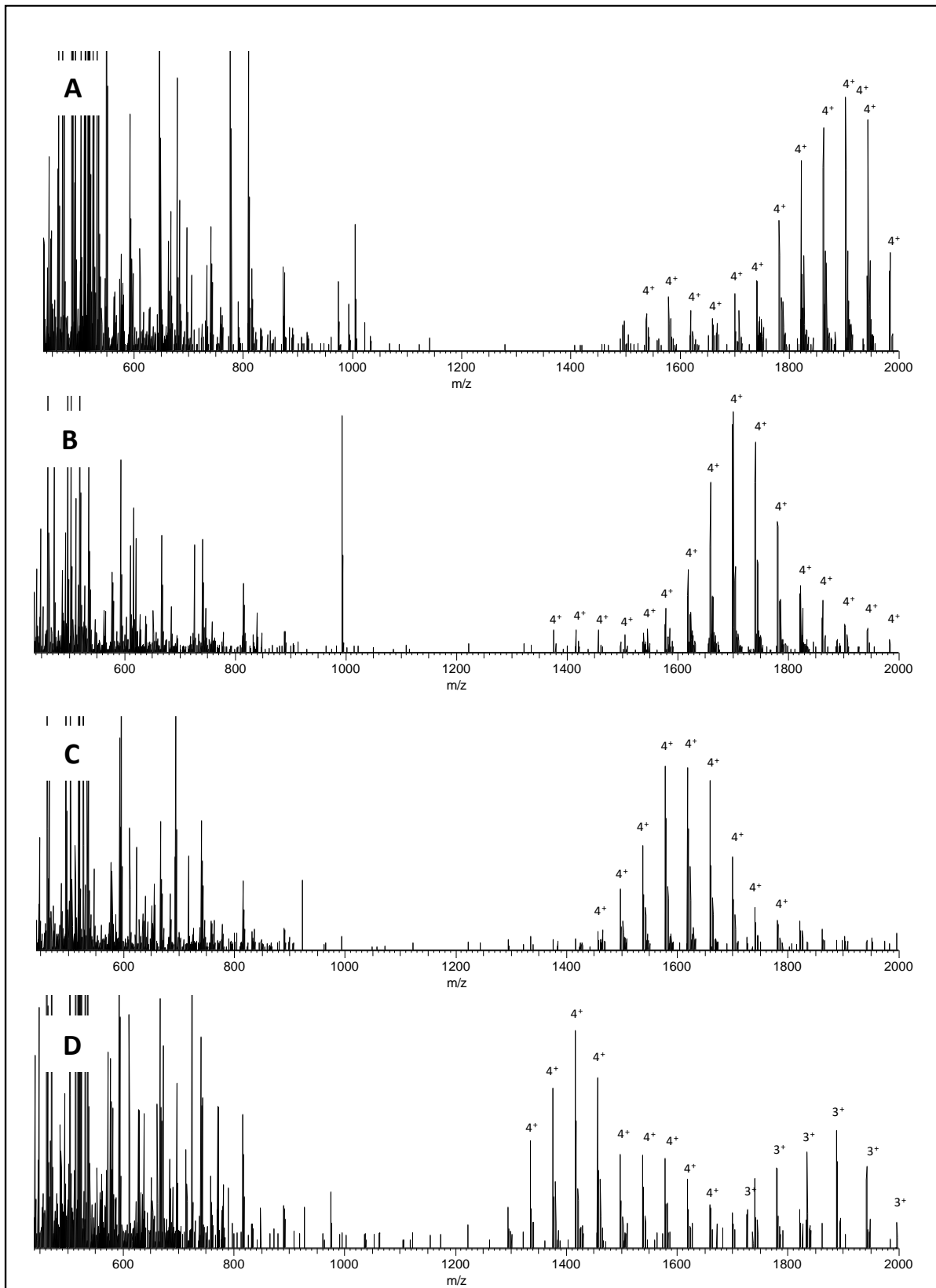


Figura 61: Espectros MS1 de las distintas glicofomas del péptido *O*-glicosilado $^{147}\text{SASASSASSAEQTTALTDAAK}^{170}$ con $z + 4$ seleccionados a los tiempos de retención: A) (a) 10.04 min, (b) 10.53 min, (c) 11.87 min, (d) 12.41 min conteniendo entre 18 a 36 residuos de hexosa.

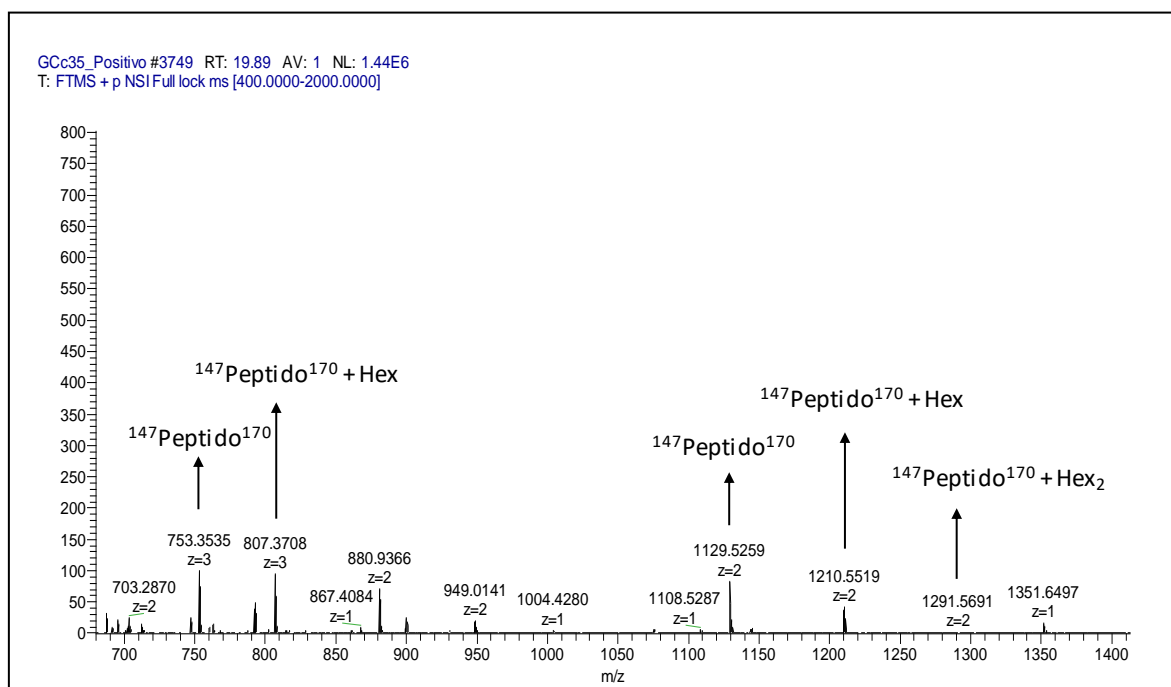


Figura 62: Espectro MS1 a Tr = 19.89 min de la fracción enriquecida en glicopéptidos obtenida de la digestión triptica de la proteína capa S de *L. kefir* JCM 5818.

La secuencia SSASSASSA fue identificada previamente como un motivo de glicosilación característico en *L. buchneri*, con cuatro residuos de serina dentro de la secuencia SS¹⁵²AS¹⁵⁴S¹⁵⁵AS¹⁵⁷SA sustituida en promedio con siete residuos de glucosa (Anzengruber *et al.*, 2014). En la cepa *L. kefir* CIDCA 83111, en el presente trabajo de tesis, fue posible determinar la presencia de glicosilación sobre el mismo motivo peptídico, pero a diferencia de la glicoproteína de la capa S de *L. buchneri*, se sustituye en promedio con 8 residuos de glucosa y se encuentra decorada con ácido galacturónico. Además, en dicha cepa fue posible determinar otro sitio de *O*-glicosilación, el péptido 471-476, sustituido con oligosacáridos de estructura Glc₅₋₈GalA₂.

En este caso, la cepa *L. kefir* JCM 5818 presenta el péptido análogo (147-170) conteniendo el motivo SSASSASSA *O*-glicosilado en promedio, con ocho unidades de hexosa similares a *L. buchneri*. Sin embargo, a diferencia de *L. kefir* CIDCA 83111, estos glicopéptidos están compuestos solo por unidades de glucosa.

2.1.2.3 Estudio *N*-glicoproteómico de la proteína capa S de *L. kefir* JCM 5818

Teniendo en cuenta un trabajo reciente en el cual se describe que el tratamiento con PNGasa F de la proteína capa S de *L. kefir* JCM 5818 modifica sus propiedades biológicas, específicamente modifica la unión al receptor celular DC-SIGN (Molécula de adhesión celular no asociada a integrina específica de célula dendrítica) involucrado en la adhesión e infección de varias familias de bacterias patógenas humanas (Prado Acosta *et al.*, 2016), y que la cepa anteriormente estudiada presentaba *N*-glicosilación, se llevaron a cabo un conjunto de experimentos para determinar la *N*-glicosilación de la proteína capa S en esta cepa.

En primer lugar se llevó a cabo una purificación por afinidad, del extracto de la proteína de la capa S a Aglutinina de Germen de Trigo (WGA-Sepharosa). La figura 63 muestra el perfil SDS-PAGE del fraccionamiento por medio de la columna de lectina. Se observa en la calle 2 la banda correspondiente a la proteína capa S antes de pasar por la columna de lectina y en la calle 1 la fracción eluída específicamente de la lectina con *N*-Acetil-glucosamina donde se encuentra una banda en la zona de PM correspondiente a la proteína capa S.

Con el fin de asegurar la identidad de la proteína (Figura 63, calle 1) de PM aprox. 67 kDa retenida en WGA, la banda correspondiente se cortó, se digirió con tripsina y se sometió a análisis de nanoHPLC acoplado a espectrometría de masa (Figura 64). La identificación de proteínas utilizando una búsqueda automática, permitió confirmar que la proteína retenida en la lectina es la proteína de capa S ac A0A1C3S3I4, de esta forma sugiriendo que la misma se encuentra *N*-glicosilada (Tabla 12A). La identificación de la proteína se logró con una cobertura del 46% del total de su secuencia proteica, mediante la identificación de 22 péptidos correspondientes la proteína capa S (Tabla 12B).

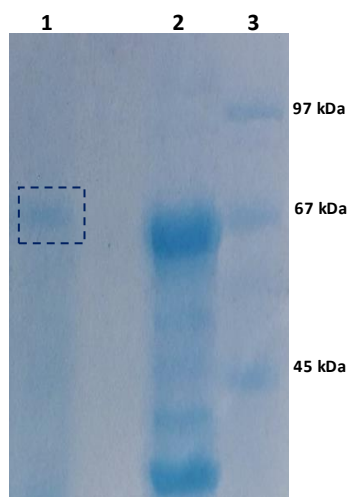


Figura 63: Análisis por SDS-PAGE del fraccionamiento por columna de WGA-Sepharosa de la proteína capa S de *L. kefir* JCM 5818. 1: fracción eluída específicamente con GlcNAc. 2: extracto total de capa S. 3: marcadores de peso molecular.

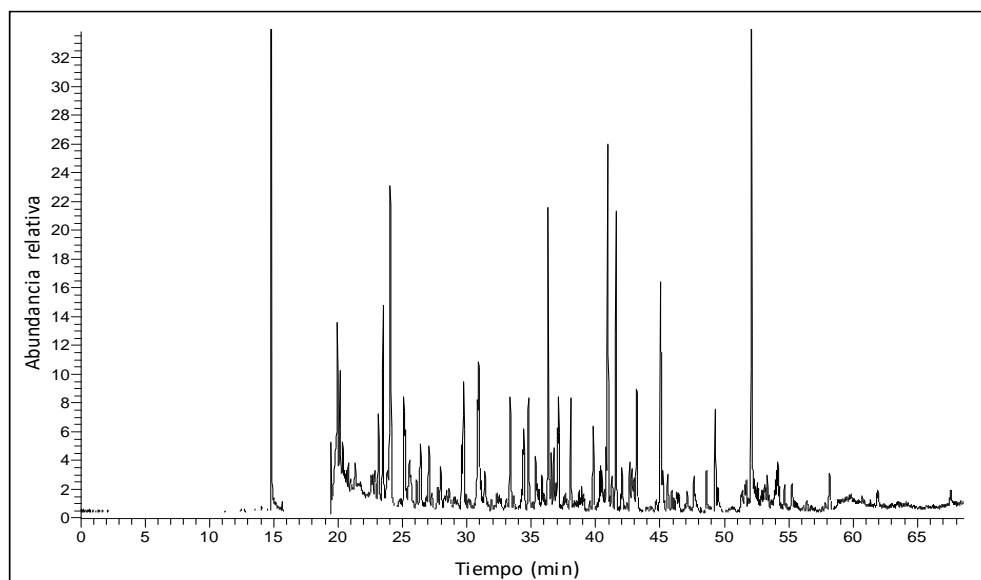


Figura 64: Cromatograma nanoHPLC-ESI-Orbitrap de la mezcla de digestión trípica de la proteína capa S de *L. Kefiri* JCM 5818 retenida en WGA.

Tabla 12: Identificación automática de proteínas (A) y péptidos (B) en la mezcla de digestión trípica de la fracción retenida en la lectina WGA

A)

Proteína IDs	# péptidos identificados	Cobertura [%]	Score
A0A1C3S3I4	22	47.6	323.31

B)

Péptido	MH ⁺ [Da]	Carga	Score
AGTANDGTATTYSYPAWTEYKK	2395.0968	3	13.13
ALTSDATTR	934.47197	2	70.03
ATHIDISQLVHTDSDGK	1835.9014	2;3;4	93.50
ATHIDISQLVHTDSDGKVDHTNSLPTVK	3128.5738	4;5	51.10
AYIDSVAASDKDAALTSLNNTVK	2366.1965	2;3;4	60.74
DAALTSLNNTVK	1245.6565	2	129.34
DDVTSTHSLTPNSK	1500.7056	2;3	73.88
FSALTAQNPTPAPAPIADNAVR	2221.1491	2;3	90.46
GDTLGLSLTGPK	1044.5451	2	29.54
GDVVYQTLKPYVATK	1680.9087	2;3	27.72
GSAFSSQDVLNLYLAK	1598.794	2	76.76
GSFDEGEGPK	1021.4353	2	18.63
HSTLNTLK	912.50288	2	12.53
LNFIDSQGK	1020.524	2	85.86
SAIYPVFNADGTVK	1480.7562	2	39.00
SVTAFAGGIASFNTTAPAAAK	2053.048	3	25.62
TGTQDNFSWTLTK	1497.71	2	36.94
TREGDLWVK	1102.5771	2	16.20
TVIDATPYANDTFK	1554.7566	2	28.28
TVIDATPYANDTFKVDQTR	2356.1547	3	17.15
VTDQTR	819.40865	2	9.24
VVADDLQSK	973.50803	2	23.35

Una vez evidenciada la presencia de *N*-glicosilación en esta proteína, se desarrolló una técnica diferente de la descrita anteriormente para determinar los sitios de sustitución. La banda de gel que se retuvo en la lectina, se cortó y se dividió en pequeños segmentos y se sometió a digestión con PNGasa F para liberar los *N*-glicanos

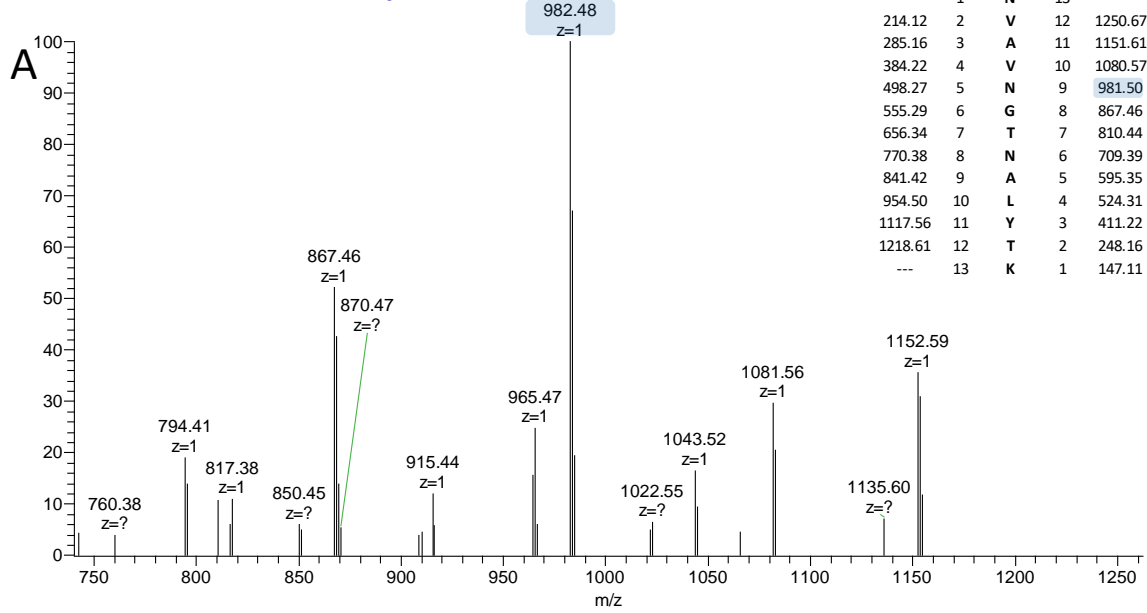
Es conocido que durante la reacción enzimática de liberación de *N*-oligosacáridos, se produce la desamidación de los residuos de asparagina que se encuentran glicosilados. Por lo tanto dichos residuos son convertidos en ácido aspártico (Palmisano *et al.*, 2012). Como resultado, el péptido modificado presenta un aumento de masa de 0,984 Da que es posible determinar por espectrometría de masa de alta resolución.

En base a esta estrategia, luego de la liberación enzimática de los *N*-oligosacáridos, el gel SDS-PAGE conteniendo la proteína capa S deglicosilada, se digirió con tripsina y la mezcla de péptidos resultante se analizó mediante nanoHPLC-ESI-Orbitrap. Dado que podría ocurrir desamidación química espontánea durante el tratamiento de la muestra con PNGasa F y para evitar asignaciones erróneas, se consideró

el porcentaje de espectros MS/MS en los que se observaba la conversión asparagina/ácido aspártico. Para esto, se utilizó como base de conversión espontánea asparagina/ácido aspártico, al péptido de referencia FSALTAQNPTPAPAPIADNAVR, obtenido como resultado de la misma digestión enzimática de la proteína capa S, que presenta asparaginas no glicosiladas ya que no tienen la secuencia consenso. A este péptido de referencia, mediante la búsqueda automática estándar de proteómica, se lo encontró 11 veces no modificado y 4 veces modificado (Tabla 13B). Por lo cuál, para la determinación de *N*-glicositos, se definió una tasa de conversión inversa respecto del péptido de referencia, es decir, una relación péptido modificado/péptido no modificado ≥ 2.7 .

Por medio de esta estrategia, se pudieron determinar dos sitios de *N*-glicosilación. El primero, ubicado en el péptido NVAVN⁵⁵GTNALYTK, el cual fue encontrado 8 veces modificado y 3 veces no modificado. El segundo, ubicado en el péptido DAALTSLN⁴⁵⁷NTVK, el cual fue encontrado 6 veces modificado y solo 1 vez no modificado (Tabla 13A). La Figura 65 muestra ejemplos de MS2 para la asignación de los *N*-glicositos. Se puede observar en color el primer residuo conteniendo la modificación asparagina/ácido aspártico el cual se evidencia por un aumento de la masa de 0.9846 Da. En el inset se observa la digestión *in silico* del péptido correspondiente y resaltado en azul la diferencia de masa en la señal conteniendo el residuo de Asn convertido a Asp.

GC_CN #7586 RT: 31.11 AV: 1 NL: 2.86E4
 T: FTMS + c NSI d Full ms2 683.3548@hcd30.00 [12]



GC_CN #8147 RT: 32.94 AV: 1 NL: 7.65E4
 T: FTMS + c NSI d Full ms2 624.3284@hcd30.00 [12]

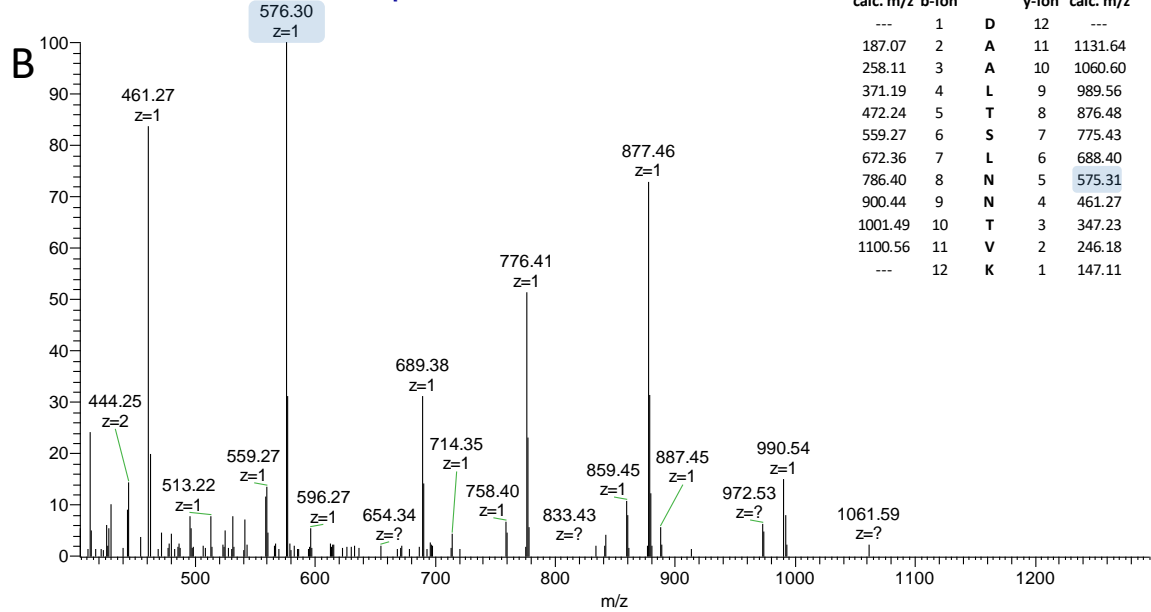


Figura 65: Espectros MS/MS seleccionados de péptidos conteniendo como modificación la conversión de asparagina en ácido aspártico ($\Delta m/z$ 0.9846 Da). A) péptido NVAVN⁵⁵GTNALYTK m/z 683.35. B) péptido DAALTSLN⁴⁵⁷NTVK m/z 624.38. En el inset se observa la digestión *in silico* del péptido correspondiente y resaltado en azul la diferencia de masa en la señal conteniendo el residuo de Asn convertido a Asp.

Tabla 13: Análisis de *N*-glicositos. Péptidos identificados en búsqueda automática utilizando el programa Proteome Discoverer (Thermo) a distintos tiempos de retención a lo largo de toda la separación cromatográfica, conteniendo la modificación Asp/Asp. A) identificación de péptidos conteniendo *N*-glicositos, B) identificación de péptidos utilizado como referencia.

A)

Péptido	Sitio de modificación	Carga	m/z [Da]	MH+ [Da]	RT [min]
NVAVnGTNALYTK	N5(Asn->Asp)	3	455.9048	1365.6999	27.33
NVAVnGTNALYTK	N5(Asn->Asp)	2	683.3542	1365.7012	29.99
NVAVnGTNALYTK	N5(Asn->Asp)	2	683.3544	1365.7017	30.50
NVAVnGTNALYTK	N5(Asn->Asp)	2	683.3541	1365.7011	31.11
NVAVnGTNALYTK	N5(Asn->Asp)	2	683.3548	1365.7023	31.64
NVAVnGTNALYTK	N5(Asn->Asp)	2	683.3527	1365.6982	29.36
NVAVnGTNALYTK	N5(Asn->Asp)	2	683.3530	1365.6989	27.29
NVAVnGTNALYTK	N5(Asn->Asp)	3	455.9046	1365.6994	26.45
NVAVNGTNALYTK	-	2	682.8645	1364.7218	27.73
NVAVNGTNALYTK	-	2	682.8632	1364.7192	28.29
NVAVNGTNALYTK	-	2	682.8631	1364.7189	28.81
DAALTSlnNTVK	N8(Asn->Asp)	2	624.3284	1247.6495	32.93
DAALTSLnTVK	N8(Asn->Asp)	2	624.3278	1247.6484	34.61
DAALTSLnTVK	N8(Asn->Asp)	2	624.3284	1247.6495	32.93
DAALTSlnNTVK	N8(Asn->Asp)	2	624.3278	1247.6484	34.61
DAALTSLnTVK	N8(Asn->Asp)	2	624.3297	1247.6522	33.45
DAALTSlnNTVK	N8(Asn->Asp)	2	624.3297	1247.6522	33.45
DAALTSlnNTVK	-	2	623.8356	1246.6641	35.15

B)

Péptido de referencia	Modificación	# identificaciones
FSALTAQNPTPAPAPIADNAVR	1xAsn->Asp [N]	4
FSALTAQNPTPAPAPIADNAVR	-	11

Una vez determinados los *N*-glicositos, se procedió a determinar las estructuras de los *N*-glicanos unidos a la proteína de la capa S de *L. kefir* JCM 5818. En este caso también se varió la estrategia utilizada.

La banda de gel de SDS-PAGE conteniendo la glicoproteína en estudio, fue tratada con PNGasa F. Los *N*-oligosacáridos liberados, fueron fueron permetilados y analizados por nanoHPLC-ESI-Orbitrap. Como se observa en la figura 66, los cromatogramas iónicos extraídos en función de los iones oxonios reporteros, en este caso permetilados, m/z 464.24 (HexNac-Hex⁺) y m/z 189.11 (dHex⁺) permitieron detectar una familia de *N*-glicanos permetilados complejos que eluyen entre Rt 38-45 min.

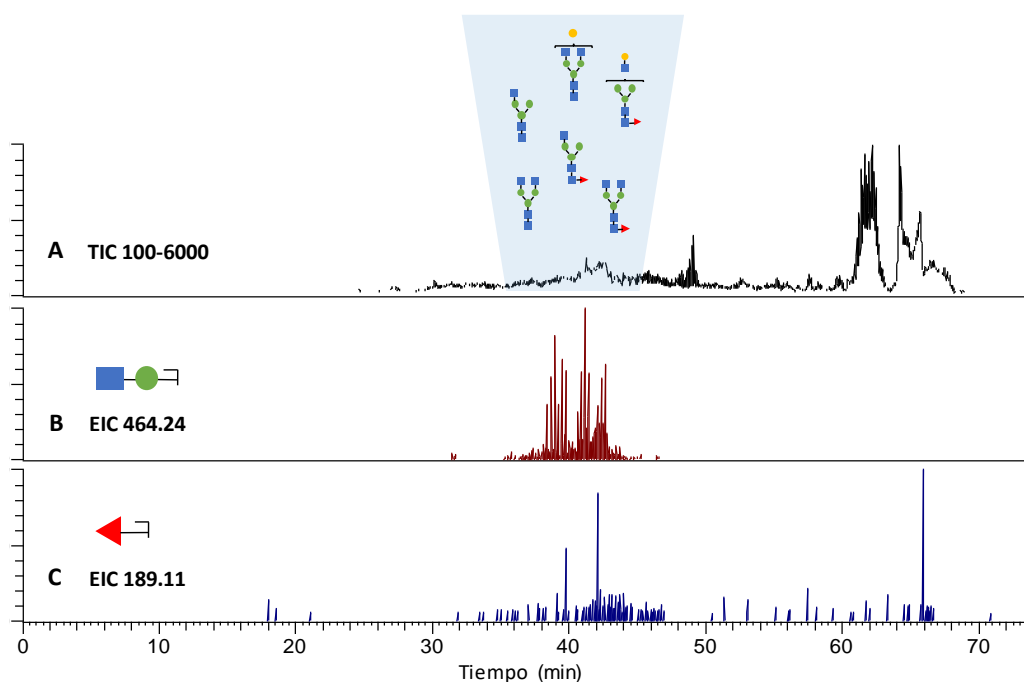


Figura 66: A) Cromatograma de corriente iónica total de *N*-glicanos permetilados de *L. kefir* JCM 5818. Cromatograma iónico extraído en función de los iones oxonios permetilados correspondientes B) m/z 464.24 (HexNac-Hex⁺) C) m/z 189.11 (Fuc⁺)

En la tabla 14 se indican las estructuras principales detectadas. La Figura 67 y 68 se muestran ejemplos de espectros MS/MS de iones que confirman las estructuras determinadas.

Tabla 14: *N*-glicanos permetilados de la glicoproteína capa S de *L. kefir* JCM 5818 identificados por nanoHPLC-ESI-MS de los.

<i>N</i> -glicano	m/z M ⁺² (calc.)	m/z M ⁺² (obs.)	Error (ppm)
HexNac ₄ -Hex ₅ -dHex	1111.5749	1111.5746	0.27
HexNac ₄ -Hex ₄ -dHex	1009.525	1009.5243	0.69
HexNac ₃ -Hex ₄ -dHex	886.9618	886.9614	0.17
HexNac ₄ -Hex ₃ -dHex	907.4751	907.4769	1.98
HexNac ₄ -Hex ₅	1024.5303	1024.5303	0.00
HexNac ₄ -Hex ₄	922.4804	922.4775	3.14

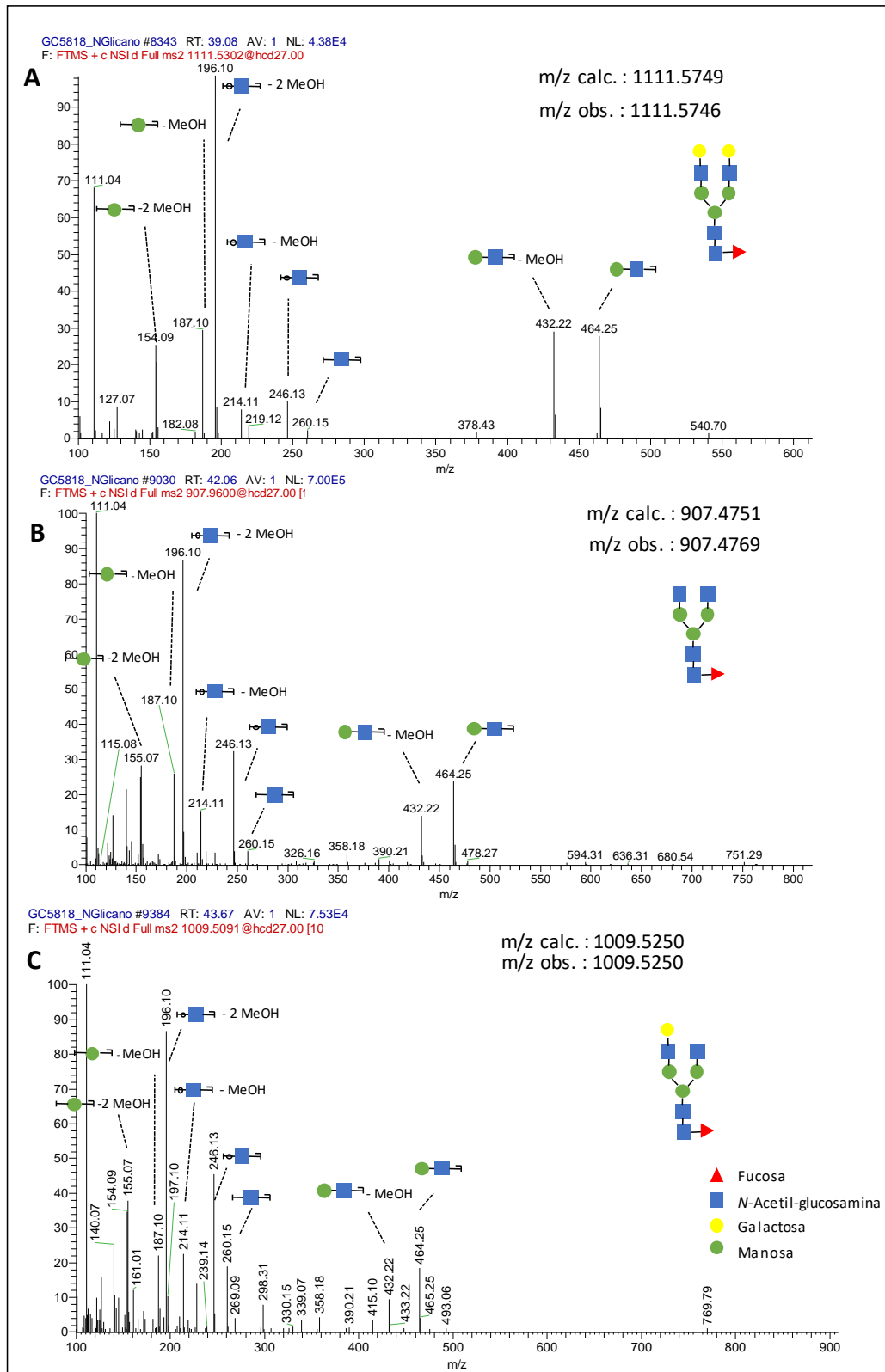


Figura 67: Espectros MS/MS seleccionados de *N*-glicanos permetilados. A) *m/z* 1111.57, B) *m/z* 907.47, C) *m/z* 1009.52, a tiempos de retención 39.08, 42.06 y 43.67 min respectivamente.

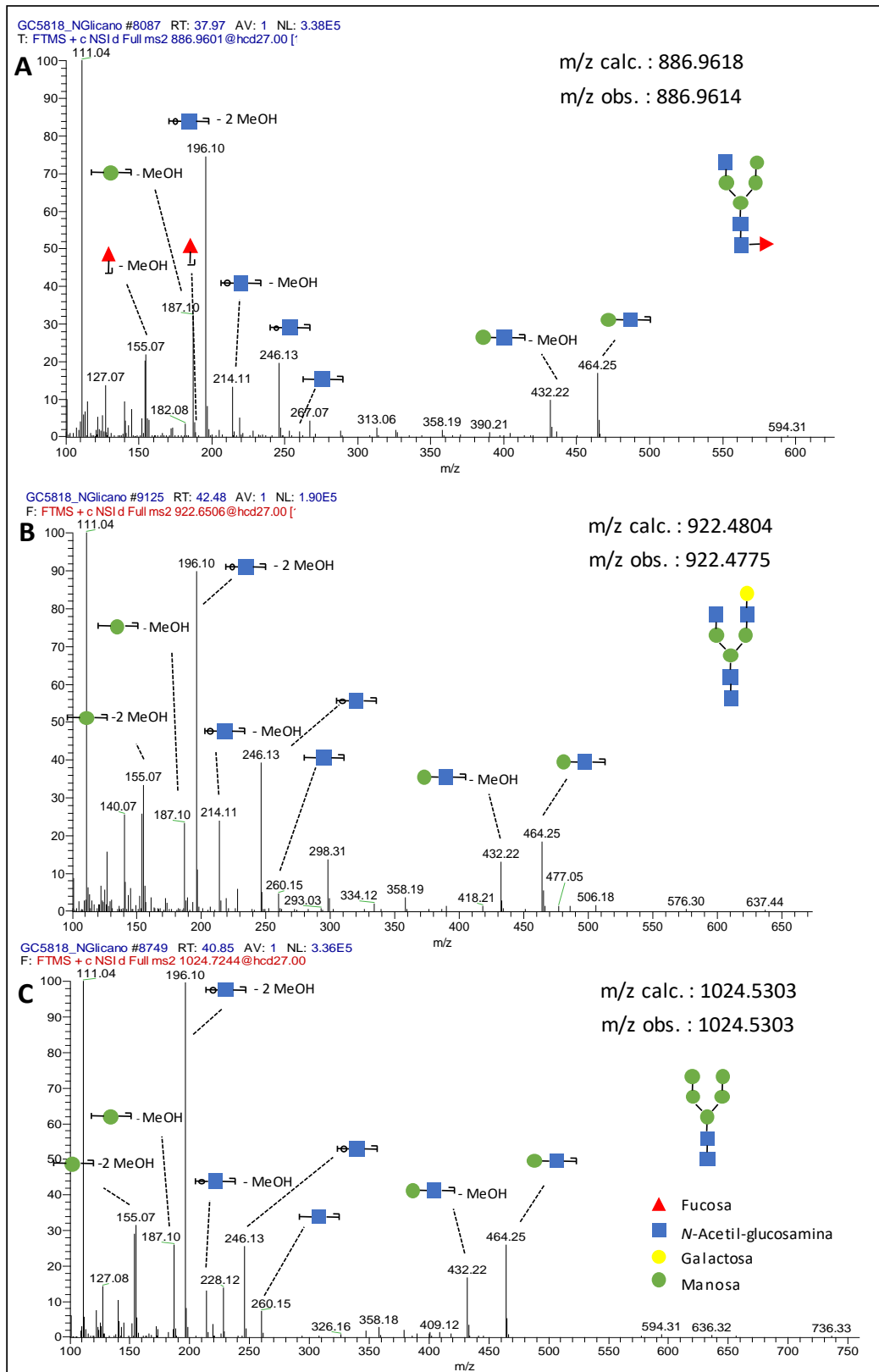


Figura 68: Espectros MS/MS seleccionados de *N*-glicanos permetilados. A) m/z 886.96, B) m/z 922.48, C) m/z 1024.53, a tiempos de retención 37.97, 42.48 y 40.85 min respectivamente.

Por otra parte, a modo de confirmación, los *N*-glicanos permetilados fueron también analizados utilizando MALDI-TOF MS en modo positivo utilizando DHB como matriz. El análisis permitió corroborar las estructuras propuestas (Figura 69)

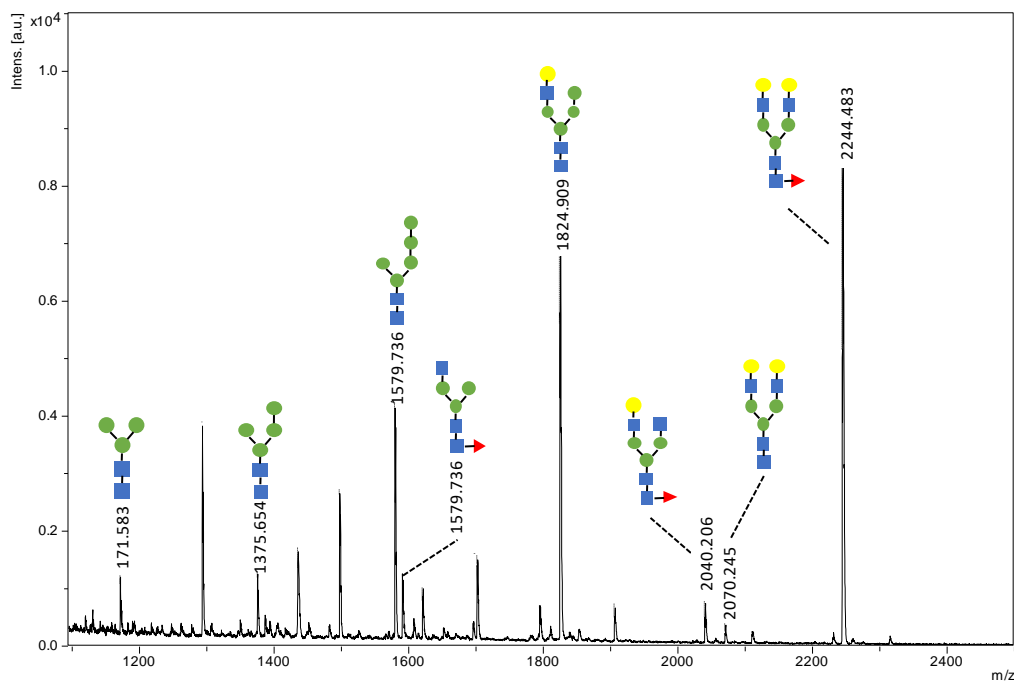


Figura 69: Espectro MALDI-TOF de *N*-glicanos permetilados de la proteína capa S de *L. kefir* JCM 5818.

Tabla 15: *N*-glicanos permetilados de la glicoproteína capa S de *L. kefir* JCM 5818 identificados por MALDI-TOF.

<i>N</i> -glicano	m/z M^{+2} (calc.)	m/z M^{+2} (obs.)	Error (Da)
HexNac ₄ -Hex ₅ -dHex	2244.124	2244.483	0.36
HexNac ₄ -Hex ₅	2070.035	2070.245	0.21
HexNac ₄ -Hex ₄ -dHex	2040.025	2040.206	0.18
HexNac ₃ -Hex ₅	1824.909	1824.909	0.00
HexNac ₃ -Hex ₄ -dHex	1590.798	1590.799	0.00
HexNac ₄ -Hex ₃ -dHex	1579.7826	1579.736	0.04
HexNac ₂ -Hex ₄	1375.683	1375.654	0.02
HexNac ₂ -Hex ₃	1171.583	1171.583	0.00

2.2. Estudio de las glicoproteínas capa S de cepas agregantes de *L. kefir*

El estudio de glicosilación se continuó con las glicoproteínas capa S de las cepas *L. kefir* CIDCA 8348 y *L. kefir* CIDCA 8321, ambas presentando un comportamiento de auto-agregación. Las proteínas capa S de éstas cepas habían sido secuenciadas previamente (Malamud *et al.*, 2017) y fue interesante notar que ambas cepas comparten la misma secuencia proteica (Figura 70).

```

1  MKKSLKKTFL AGVAALSFVA VAGVSSSNAS AKSYAKVTSN KALTDDATTR NVAVNGTTAL
61 YTKAGTLKGA KTVATKTTLA GLKNSKQGQK NFRAYRVAT NRGSVYYKVV SFDKTYRGWI
121 YGGKSVTAF GGIASFNTTT APAAANSASA SSASSASSAE QTTALTDAQ AATYKIATG
181 TANDGTQVTY TYPAWTEYKK GRVITDSTPY KDATFKITDQ TVRTREGDLW VKIAATDSAN
241 AKANGWIKFS ALKVATPAPT TTPVADNAVR INFNDPSGKQ IATLDYVKS NAAKGTTLGSL
301 QPVKNAAGNI TGYQWQLDSS TSDLQAKVDA ALHGTGYAFN VQNNQSVLAQ SKTGSTITLS
361 IAKGDTVYQT LTPTAYNIKT QGQAQSLKPN PALVNTKISK SVLSTKVPAD TTNGTPELDF
421 SLLIDANGAQ TNPLKKTVD YVGT DSTQQA KKLQAINDAV ATEAAKYYP IANLQATDLF
481 SSKGSSFS NDMVTYINKH SNLQTLNSPV YPVFNADGSV AHWAQFKFTA QTAYAGSFGQ
541 TAPVNVLYSY DPSTAVTTAL PTYSPTGYNF FA

```

Figura 70: Secuencia aminoacídica de las proteínas de capa S de *L. kefir* CIDCA 8348 y *L. kefir* CIDCA 8321 (Malamud *et al.*, 2017).

2.2.1 Aislamiento de las glicoproteínas capa S de *L. kefir* CIDCA 8348 y *L. kefir* CIDCA 8321

La caracterización de las glicoproteínas se inició utilizando un enfoque glicómico. Para ello, el extracto total de proteína capa S de cada una de las cepas se analizó por electroforesis SDS-PAGE y se reveló con azul de Coomassie (Figura 71).

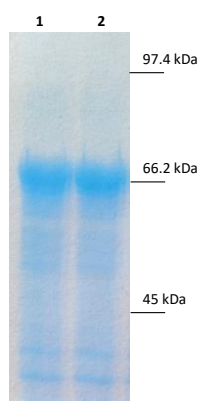


Figura 71: Análisis SDS-PAGE de las glicoproteínas cepas *L. kefir* CIDCA 8348 (calle 1) y *L. kefir* CIDCA 8321 (calle 2).

2.2.2 Determinación de la composición de azúcares de los *O*-glicanos

Posteriormente, las bandas de gel de aprox. 67 kDa correspondientes a la proteína capa S de cada cepa, fueron cortadas y sobre cada una se realizó la β -eliminación reductiva para liberar los oligosacáridos unidos en forma *O*-glicosídica. Los oligosacáridos liberados fueron desalados y en una etapa posterior sometidos a hidrólisis total. Los hidrolizados se analizaron mediante HPAEC-PAD.

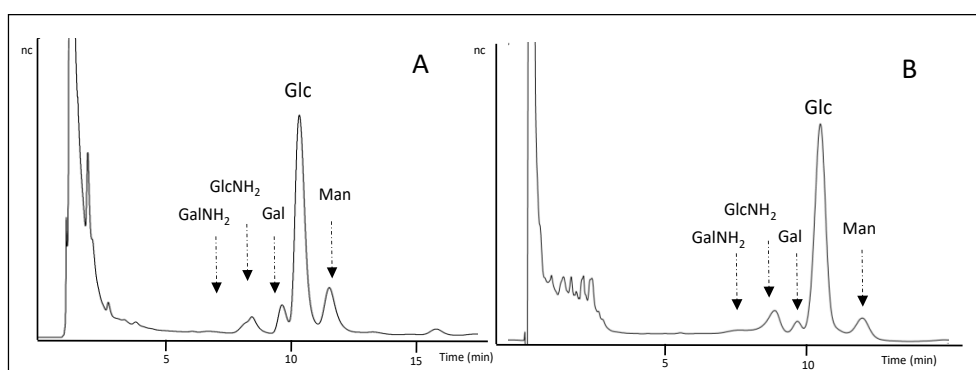


Figura 72: Análisis por HPAEC-PAD de los monosacáridos obtenidos por hidrólisis total de los oligosacáridos obtenidos por β -eliminación de las proteínas capa S de A) *L. kefir* CIDCA 8348 y b) *L. kefir* CIDCA 8321.

En ambas cepas se determinó glucosa como azúcar componente mayoritario (Figura 72). El hidrolizado total también fue analizado en condiciones donde se resuelven monosacáridos ácidos (Figura 73).

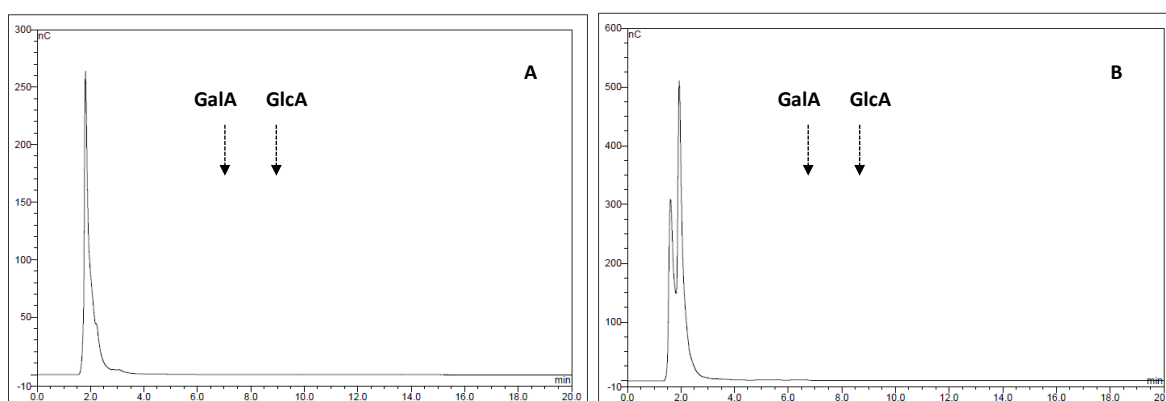


Figura 73: Análisis por HPAEC-PAD de los monosacáridos ácidos obtenidos por β -eliminación reductiva e hidrólisis total. A) Proteína capa S de *L. kefir* CIDCA 8348 y b) Proteína capa S de *L. kefir* CIDCA 8321.

No se evidenciaron señales en los cromatogramas obtenidos, lo cual demuestra la naturaleza neutra de los oligosacáridos. A continuación, se determinó el residuo

monosacárido mediante el cual se encuentra unido el glicano a la cadena polipeptídica. Para ello, se analizaron los hidrolizados totales por HPAEC-PAD en condiciones donde se resuelven alditoles, para determinar el primer residuo del oligosacárido unido a la cadena peptídica. Este análisis mostró la presencia de sorbitol lo que indicó que el glicano se encuentra unido a la cadena peptídica a través de un residuo de glucosa (Figura 74).

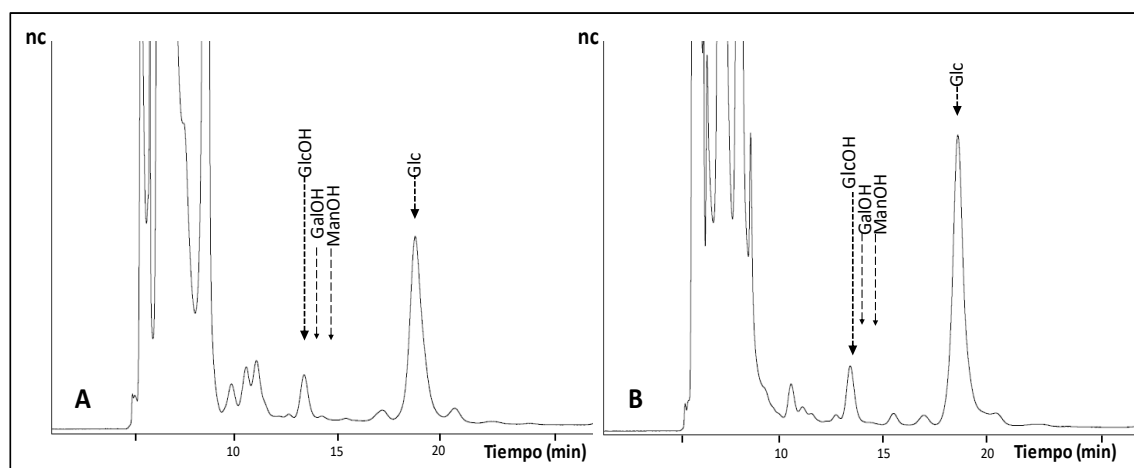


Figura 74: Análisis por HPAEC-PAD de los alditoles obtenidos por β -eliminación reductiva e hidrolisis total. A) Proteína capa S de *L. kefir* CIDCA 8348 y b) Proteína capa S de *L. kefir* CIDCA 8321.

2.2.3 Caracterización por Espectrometría de Masa MALDI-TOF de los *O*-glicanos.

En una siguiente etapa, los *O*-glicanos liberados mediante β -eliminación reductiva fueron permetilados y analizados por espectrometría de masa UV-MALDI-TOF. Si bien los *O*-glicanos fueron analizados en ambos modos de ionización y con diferentes matrices, en este caso sólo se obtuvieron espectros reproducibles cuando los mismos se adquirieron en modo positivo y las mejores señales fueron obtenidas utilizando ácido 2,5-dihidroxibenzoico como matriz. Así, fue posible detectar oligosacáridos conteniendo de 3 a 11 unidades en la muestra correspondiente a *L. kefir* CIDCA 8321 y de 3 a 12 unidades en la de *L. kefir* CIDCA 8348 (Figura 75).

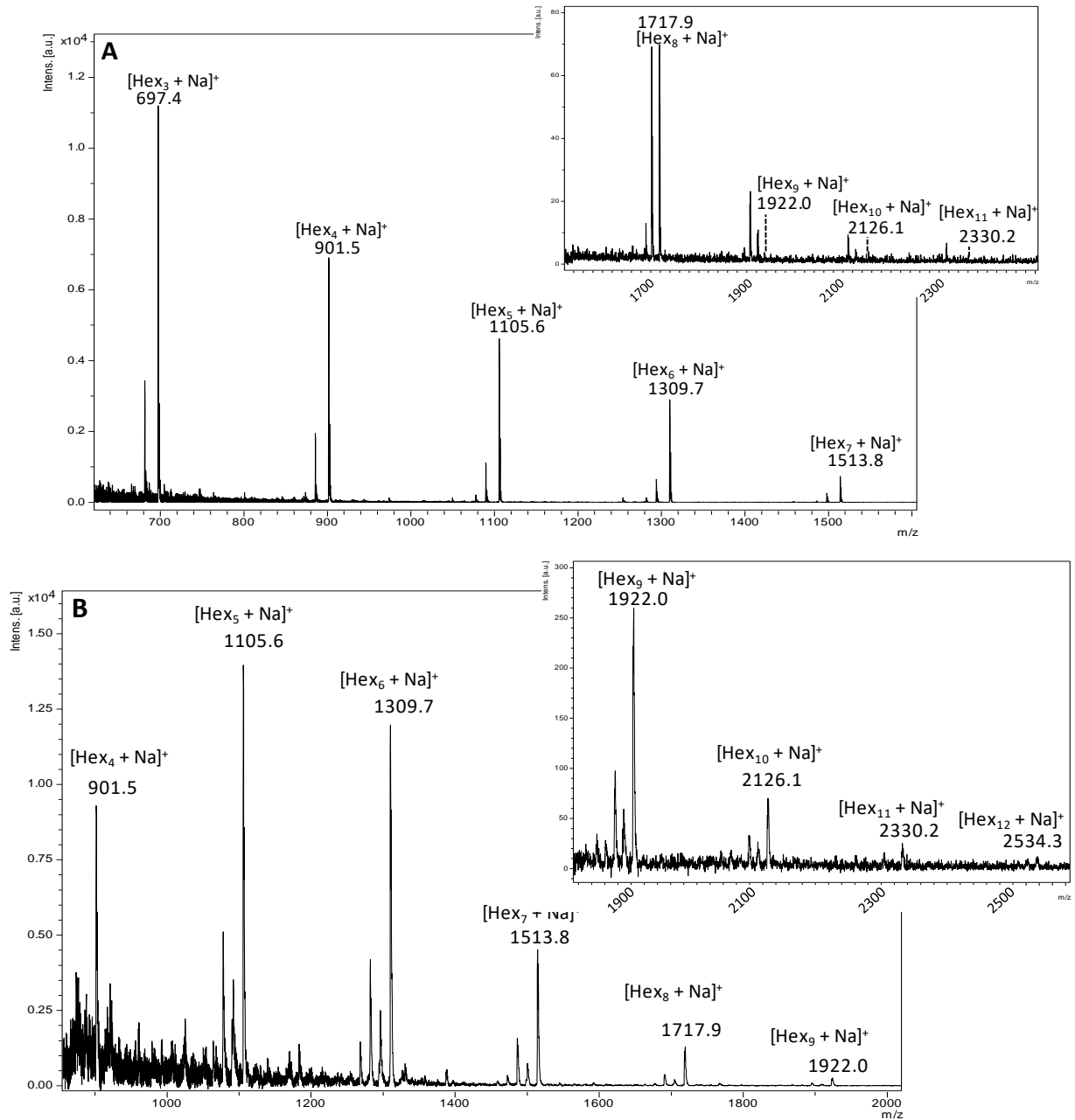


Figura 75: Espectros de masa UV-MALDI-TOF de los *O*-glicanos permetilados obtenidos por β -eliminación reductiva de las proteínas de capa S de: A) *L. kefir* CIDCA 8321. El inset muestra una magnificación entre m/z 1600-2400, B) *L. kefir* CIDCA 8348. El inset muestra una magnificación entre m/z 1800-2600.

2.2.4 Análisis de glicopéptidos

Una vez caracterizados los *O*-glicanos en las proteínas capa S de *L. kefir* CIDCA 8348 y *L. kefir* CIDCA 8321, se procedió a determinar la localización de la *O*-glicosilación en la secuencia proteica mediante el análisis de glicopéptidos. Para ello, se cortaron las bandas de geles de electroforesis SDS-PAGE de aprox. 67 kDa, correspondiente a las glicoproteínas capa S de cada cepa (Figura 71) y se sometieron posteriormente a digestión enzimática utilizando tripsina como proteasa. Se realizó el enriquecimiento en glicopéptidos utilizando cromatografía Cotton-HILIC en cada una de las muestras y las fracciones enriquecidas fueron analizadas por HPLC-ESI-Orbitrap. En las figuras 76 y 77 se observan los cromatogramas iónicos totales y los cromatogramas iónicos extraídos en función de los iones reporteros m/z 163.06 y 204.09 correspondientes a los oxonios Hex^+ para las cepas *L. kefir* CIDCA 8321 y *L. kefir* CIDCA 8348 respectivamente.

En ambas muestras de glicopéptidos, fue interesante observar que a los 38.72 min de la separación cromatográfica (Figura 78A y 79A), eluyen familias de glicopéptidos multicargados, de carga +4 hasta +7.

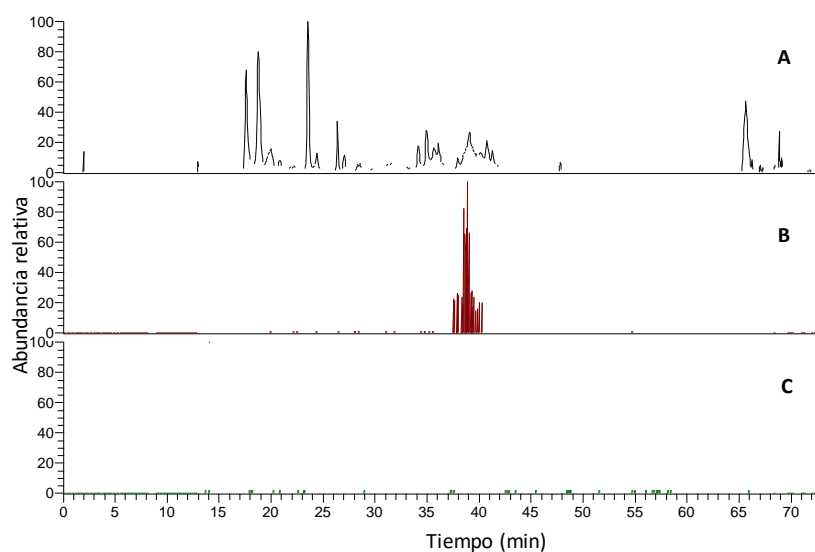


Figura 76: A) Cromatograma corriente iónica total de la mezcla de digestión triptica enriquecida en glicopéptidos de la proteína capa S de *L. kefir* CIDCA 8321. Cromatograma iónico extraído en función del ion oxonio Hex^+ 163.06 (B) y HexNAc^+ 204.09 (C)

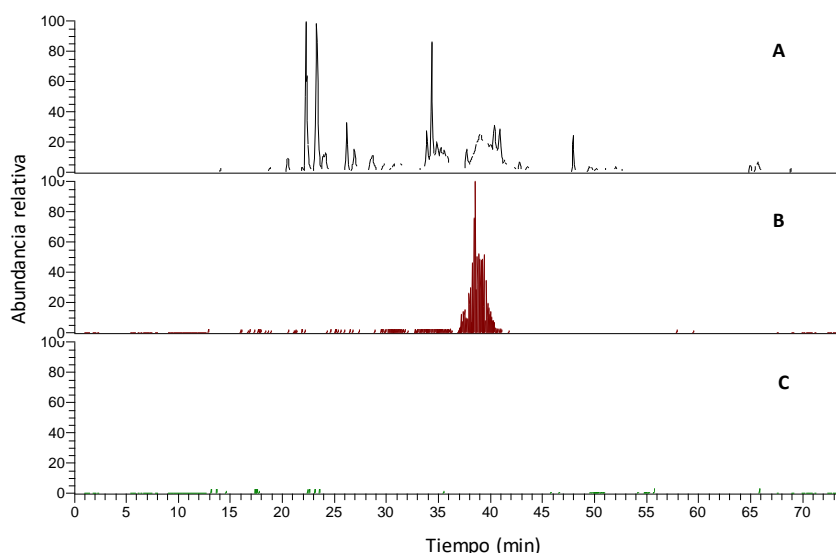


Figura 77: A) Cromatograma corriente iónica total de la mezcla de digestión trípica enriquecida en glicopéptidos de la proteína capa S de *L. kefir* CIDCA 8348. Cromatograma iónico extraído en función del ion oxonio Hex⁺ 163.06 (B) y HexNAc⁺ 204.09 (C)

En los espectros correspondientes se puede observar para una misma familia policargada, el equiespaciado de las señales entre iones (figuras 76A y 77A) Dicha distancia entre iones corresponde a la diferencia de unidades de hexosas que modifican el péptido. Los experimentos de MS2 de los iones más abundantes (Figura 78B y 79B) mostraron que las señales obtenidas corresponden al péptido 125-170 conteniendo el motivo SASASSASSA descrito como secuencia de *O*-glicosilación en las proteínas capa S de *L. kefir* anteriormente descritas. La deconvolución de cada uno de los iones permitió identificar hasta un máximo de 26 unidades de hexosa modificando dicho péptido. Fue interesante notar que ambas cepas presentaron un mismo patrón de glicosilación sobre el péptido 125-170.

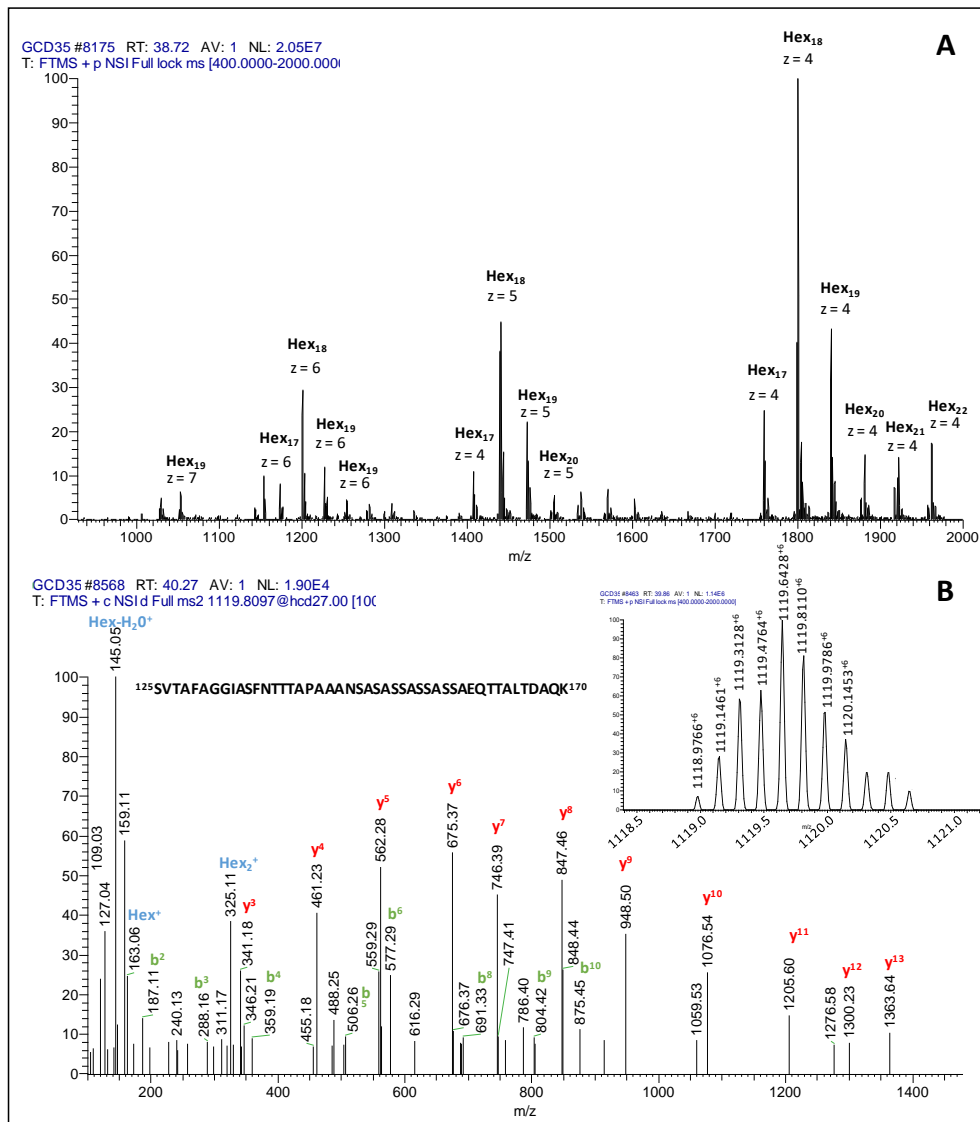


Figura 78: Espectro de masa ESI-Orbitrap de la fracción enriquecida en glicopéptidos proveniente de la proteína-capa S de *L. kefir* CIDCA 8348. A) Espectro full MS a 38.72 donde se observan las familias de glicopéptidos con carga +4, +5, +6 y +7, B) Espectro MS/MS del ión m/z 1119.8097⁺⁶ a 40.27 min, con la asignación de iones Y en rojo, b en verde y unidades de Hexosas en azul. En el inset se observa el espectro full MS ampliado en el rango de masas 1118.4-1121.

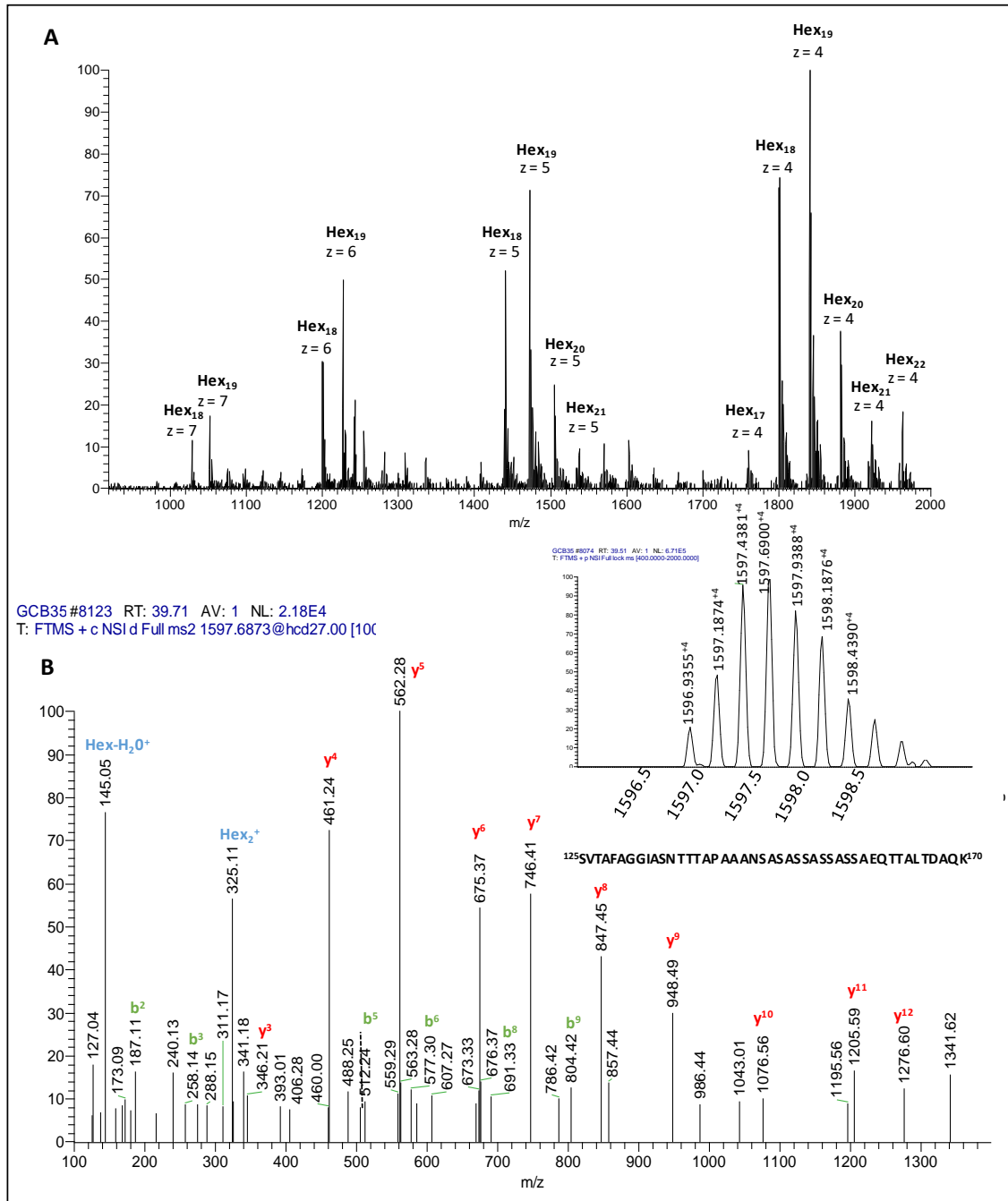


Figura 79: Espectro de masa ESI-Orbitrap de la fracción enriquecida en glicopéptidos proveniente de la proteína capa S de *L. kefir* CIDCA 8321. A) Espectro full MS a 39.12 min mostrando las familias de glicopéptidos con carga +4,+5, +6 y +7 B) Espectro MS/MS del ión m/z 1597.6873⁺⁴ con la asignación de iones Y en rojo, b en verde y unidades de Hexosas en azul. En el inset se observa el espectro full MS ampliado en el rango de masas 1595.5 -1599.5

En los últimos años, los sistemas de glicosilación bacterianos se encuentran profundamente investigados debido a la creciente frecuencia con la que se los encuentran responsables de numerosos procesos biológicos.

En este caso, y en función de los resultados obtenidos con las otras cepas, se buscaron iones reporteros de *N*-glicosilación. (por ej. HexNAc⁺). Sin embargo, fue interesante notar, que en ningún caso fue posible obtener resultados cuando se extrajeron los cromatogramas iónicos en función de iones reporteros de *N*-glicosilación (Figura 37C y 38C). La ausencia de este tipo de glicosilación diferencia marcadamente a las glicoproteínas en estudio de las proteínas capa S caracterizadas anteriormente en las cepas no agregantes.

Por otra parte, resulta interesante el hecho que *L. kefir* CIDCA 8348 y *L. kefir* CIDCA 8321 presenten en la proteína capa S la misma secuencia proteica y el mismo tipo y localización de los *O*-glicanos a pesar de ser cepas diferentes.

En el presente trabajo, fue posible elucidar el *O*- y *N*-glicoma de las proteínas capa S en cepas de comportamiento agregante y no-agregante de *Lactobacillus kefir*. Los hallazgos descriptos sobre la *N*-glicosilación de las proteínas de capa S de *L. kefir* CIDCA 83111 y *L. kefir* JCM 5818 constituyen la primera descripción de la presencia de *N*-glicosilación en el género *Lactobacillus*. Es importante, además, destacar que únicamente se encontró presencia de *N*-glicosilación en las proteínas capa S de las cepas de comportamiento no agregante, lo cual abre un nuevo interrogante sobre el rol de los *N*-glicanos en este comportamiento. Asimismo, resulta muy interesante notar la gran variabilidad de glicosilación que presentan las proteínas de capa S en el género *Lactobacillus*. El rol específico de los glicanos que modifican estas proteínas necesita aún de mayor exploración con el fin de correlacionar las bioactividades atribuidas a estos microorganismos reconocidos como probióticos. Por otra parte, el conocimiento estructural de los carbohidratos que modifican estas proteínas cumplirá un rol fundamental en la comprensión de las funcionalidades asociadas a la capa S en *Lactobacillus kefir*.

3. Análisis del glicoproteoma de clara de huevo

Objetivos:

- Determinar la glicosilación del conjunto de proteínas total pertenecientes al sistema complejo de glicoproteínas de clara de huevo y comparar con el análisis de la glicosilación de ovotransferrina como modelo de proteína aislada.
- Desarrollar estrategias para el análisis del alto caudal de datos provenientes de sistemas glicoproteicos analizados por ESI-Orbitrap-EM.

3. Proteínas de clara de huevo

Como un intento de avance en el tipo de estudio por EM, nos propusimos analizar, como ejemplo de sistema proteico complejo, la clara de huevo de gallina (CEW), para determinar las ventajas y limitaciones de la *N*-glicoproteómica en comparación con otras técnicas.

La demanda de proteínas requeridas dentro del sector industrial alimentario está en aumento como consecuencia del desarrollo de nuevos productos alimenticios, aditivos y suplementos dietarios, los cuales son diseñados a medida para satisfacer requerimientos nutricionales específicos tanto para el consumo humano como también destinados hacia el consumo animal. En este contexto, los ingredientes derivados de proteínas de huevo son los que mayor atención han captado para respaldar el crecimiento del mercado de alimentos (Miranda *et al.*, 2015; Réhault-Godbert *et al.*, 2019; van den Heuvel *et al.*, 2018).

Las proteínas del huevo se distribuyen proporcionalmente entre la clara de huevo (CEW) y la yema. La clara de huevo es un complejo sistema proteico conformado por 88% de agua, 10.5% de proteína cruda (Birghila *et al.*, 2015) (factor Kjeldahl de 6.25) y 0.5% de carbohidratos (Gilbert, 1971). Hasta 1989, solo se conocían 13 proteínas en la clara de huevo, algunas de las cuales no se habían caracterizado completamente (Li-Chan & Nakai, 1989). Sin embargo, durante las últimas décadas, gracias a los avances en técnicas proteómicas (D'Ambrosio *et al.*, 2008; Guérin-Dubiard *et al.*, 2006; Mann, 2007; Mann & Mann, 2011) y proteómica comparativa (Hu *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2015; Omana *et al.*, 2011; Qiu *et al.*, 2013; Qiu *et al.*, 2012a; Qiu *et al.*, 2012b; Wang *et al.*, 2012) se han descrito un gran número de estudios intentando elucidar la composición proteica y las modificaciones post-traduccionales de las proteínas de clara de huevo.

La clara de huevo es rica en glicoproteínas que revisten al embrión y se presume que actúan protegiéndolo de infecciones microbianas (Burley & Vadehra, 1989). Las principales proteínas de CEW, incluidas la ovoalbúmina, ovomucoide, ovomucina y la ovotransferrina se encuentran glicosiladas. Aunque la composición proteínica de la clara de huevo pareciera simple en una primera aproximación, el alto grado de glicosilación que sufren estas proteínas lo convierten en un sistema de alta complejidad estructural. La *N*-glicosilación desempeña un papel importante en la estructura y las propiedades de las

proteínas del huevo. Estas modificaciones están involucradas en procesos como la reducción de la viscosidad de la clara del huevo, la alergenicidad del huevo, propiedades antibacterianas y la protección del embrión (Benedé et al., 2015; Mine & Yang, 2008; Offengenden & Wu, 2013; Sun *et al.*, 2017). Además, la glicosilación, ha sido descrita como un modulador de las propiedades antifúngicas y antioxidantes (Balzarini, 2006; Bulet *et al.*, 1995; Deepak *et al.*, 2003).

Estudios recientes relacionados a la *N*-glicosilación de la clara de huevo de gallina permitieron identificar 71 sitios de *N*-glicosilación en un conjunto de 26 proteínas de clara de huevo (Geng *et al.*, 2017).

Entre las glicoproteínas de CEW, la ovotransferrina, una de las proteínas de mayor abundancia, se encuentra muy descrita en la literatura en función de los beneficios nutricionales que esta proteína aporta en la dieta, estableciendo una relación directa entre el consumo de huevos y la salud humana (Wu & Acero-Lopez, 2012). La ovotransferrina es una proteína glicosilada monomérica de 76 kDa y con un punto isoeléctrico de 6,8 (Hu *et al.*, 2007). Es miembro de la familia de proteínas con actividad ligante de hierro, controlando el nivel de metal libre en los fluidos biológicos y en consecuencia con capacidad de prevenir la supervivencia bacteriana en procesos de retención de hierro evitando su disponibilidad para el crecimiento de patógenos (Huopalahti *et al.*, 2007). La retención de hierro ha sido también asociada con actividades antivirales y antioxidantes (Giansanti *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2012).

Un gran número de trabajos describen la relación entre el consumo de huevo y la alergenicidad derivada a las proteínas presentes en la clara de huevo. La alergia al huevo puede definirse como una reacción adversa de naturaleza inmunológica inducida por las proteínas del huevo e incluye la alergia mediada por anticuerpos IgE, así como otros síndromes alérgicos como la dermatitis atópica y la esofagitis eosinofílica, que son trastornos mixtos de IgE y mediada por células. La alergia alimentaria mediada por IgE, también conocida como alergia alimentaria tipo I, representa la mayoría de las respuestas inducidas por alimentos y se caracteriza por la presencia de anticuerpos IgE específicos de alérgenos. Se han identificado cinco proteínas alérgicas principales del huevo del pollo doméstico (*Gallus domesticus*); estos se designan Gal d 1-5. La mayoría de las proteínas alérgicas del huevo se encuentran en la clara de huevo, incluyendo ovomucoide (Gal d 1, 11%), ovoalbúmina (Gal d 2, 54%), ovotransferrina (Gal d 3, 12%) y lisozima (Gal d 4, 3.4%). Aunque la ovoalbúmina (OVA) es la proteína más abundante

presente en la clara de huevo de gallina, se ha demostrado que el ovomucoide (OVM) es el alérgeno dominante en el huevo (Caubet & Wang, 2011; Cooke & Sampson, 1997).

Dado que el 32-38% de los pacientes con alergias al huevo son sensibles a la ovotransferrina, diferentes estudios han sido conducidos para determinar la glicosilación de ésta proteína analizando el perfil de los *N*-glicanos así como también los sitios de glicosilación (Hwang *et al.*, 2014a; Hwang, *et al.*, 2014b).

Mediante un enfoque más global, y con la necesidad de considerar el rol de proteínas de menor abundancia en eventos de alergenicidad, las proteínas de huevo se han estudiado utilizando diferentes enfoques tanto proteómicos como glicómicos, sin embargo, hasta la fecha no se ha informado ningún estudio detallado glicoproteómico a fin de recabar información estructural sobre los sitios de glicosilación conjuntamente con los glicanos que los modifican. La caracterización de los glicopéptidos, además, brinda como información adicional una comprensión más profunda de la glicosilación ya que permite elucidar la microheterogeneidad asociada a cada sitio de glicosilación.

En este contexto, el objetivo del presente trabajo es describir una metodología de análisis glicoproteómico de mayor alcance sobre el total de las proteínas de clara de huevo con el fin de obtener información valiosa para una mejor comprensión de los atributos biológicos de las glicoproteínas que pueden conducir a nuevos métodos de procesamiento apropiados que consideren los efectos adversos para la salud y ampliar sus aplicaciones nutraceuticas en la industria alimentaria.

3.1 Identificación de la composición glicoproteica de CEW

Con el objetivo de determinar el glicoproteoma de CEW, las proteínas de clara de huevo fueron estudiadas utilizando nanoHPLC acoplado a espectrometría de masa ESI-Orbitrap-HCD. El análisis fue conducido mediante dos abordajes, el primero, realizado sobre el material total obtenido como extracto después de la precipitación de proteínas de CEW, y el segundo, sobre una proteína aislada utilizando como modelo de glicoproteína, ovotransferrina.

Para caracterizar el glicoproteoma, CEW fue disuelta en agua, las proteínas fueron precipitadas con TCA y digeridas en solución con tripsina. Se realizó un enriquecimiento de glicopéptidos por cromatografía Cotton- HILIC y la fracción de glicopéptidos enriquecidos fue analizada por nanoHPLC-ESI-Orbitrap.

Las secuencias proteicas del proteoma de CEW se obtuvieron de la base de datos UNIPROT y las proteínas fueron identificadas con el programa de búsqueda automática Proteome Discoverer 2.1. La búsqueda de glicopéptidos fue realizada utilizando un programa semi-automático en base a los iones diagnóstico y a los sitios consenso NXS/T y corroborados con el programa Byonic™ (ProteinMetrics). En la Figura 80A se muestra el cromatograma del análisis ESI-Orbitrap de CEW. Es interesante notar en los cromatogramas iónicos extraídos en función de los iones m/z 204.08 y 366.13 correspondientes a los iones oxonios de HexNAc⁺ y HexNAcHex⁺ respectivamente muestran un continuo de glicopéptidos que eluyen prácticamente en la totalidad de la separación cromatográfica, lo cual evidencia la complejidad del sistema glicoproteómico CEW.

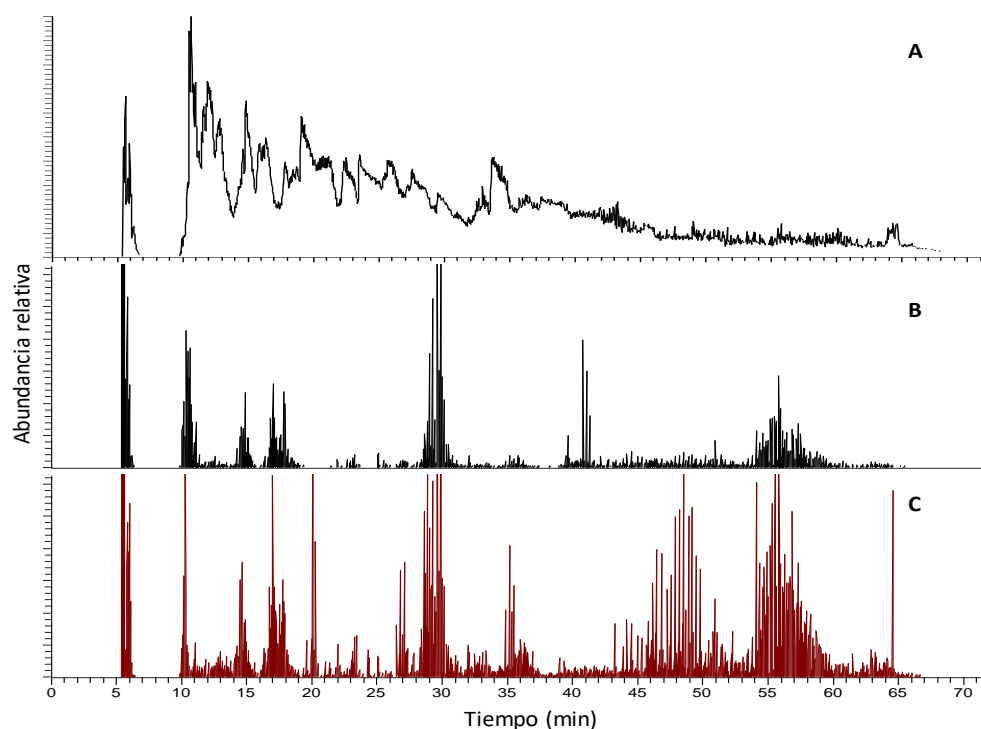


Figura 80: Análisis nanoHPLC-ESI-Orbitrap de CEW. A) Cromatograma de corriente iónica total. Cromatograma iónico extraído en función los iones B) HexNAc⁺ m/z 204.08 y C) HexNAcHex⁺ m/z 366.13

El análisis del extracto proteico de CEW condujo a la identificación de un total de 34 proteínas (Tabla 16), de las cuales 19 de ellas fueron identificadas glicosiladas (Tabla 17). Dentro de este último grupo, 6 de las glicoproteínas identificadas en este trabajo (Heat shock cognate 71 kDa protein, Vimentin (Fragment), |E1BY93| Uncharacterized

protein, Transforming growth factor beta-2 proprotein, ITA6_CHICK Integrin alpha-6, VIT2_CHICK Vitellogenin-2), representan dentro de la composición total de CEW el grupo de proteínas de menor abundancia. Este resultado constituye la primera descripción de la glicosilación de las proteínas de baja abundancia en CEW.

Tabla 16: Proteínas identificadas en el extracto de CEW, porcentaje de cobertura del total de la secuencia proteica y número total de aminoácidos

Proteína ID	Cobertura %	# AA
P01012 OVAL_CHICK Ovalbumin	95.1	386
P02789 TRFE_CHICK Ovotransferrin	79.9	705
Q98UI9 MUC5B_CHICK Mucin-5B	29.7	2108
P01005 IOVO_CHICK Ovomuroid	84.8	210
P01014 OVALY_CHICK Ovalbumin-related protein Y	70.1	388
P20740 OVOS_CHICK Ovostatin	29.1	1473
P10184 IOV7_CHICK Ovoinhibitor	64.2	472
I0J173 I0J173_CHICK OvoglobulinG2 type BB	56.5	439
P00698 LYSC_CHICK Lysozyme C	79.6	147
Q8JIG5 Q8JIG5_CHICK Alpha-1-acid glycoprotein	46.3	203
Q9YGP0 Q9YGP0_CHICK Clusterin	36.6	448
P01013 OVALX_CHICK Ovalbumin-related protein X (Fragment)	36.6	232
P02752 RBP_CHICK Riboflavin-binding protein	37.8	238
F1NBL0 MUC6_CHICK Mucin-6 (Fragment)	10.6	1185
Q8AV77 Q8AV77_CHICK Hep21 protein	49.5	107
P21760 EXFAB_CHICK Extracellular fatty acid-binding protein	33.2	178
P01038 CYT_CHICK Cystatin	38.9	139
Q90WR3 Q90WR3_CHICK Hemopexin (Fragment)	15.7	261
P02701 AVID_CHICK Avidin	36.2	152
F1NCY6 F1NCY6_CHICK Uncharacterized protein	9.36	342
A0A146J3H1 A0A146J3H1_CHICK Protein TENP	4.33	439
Q8JGM4 QSOX1_CHICK Sulfhydryl oxidase 1	3.77	743
P01875 IGHM_CHICK Ig mu chain C region	3.81	446
U6C3W5 U6C3W5_CHICK EW135	3.14	987
Q5G8Y9 Q5G8Y9_CHICK Apolipoprotein D	3.17	189
O73885 HSP7C_CHICK Heat shock cognate 71	4.02	646
F1NSM7 OC116_CHICK Ovocleidin-116	0.81	743
Q49MC1 Q49MC1_CHICK Vimentin (Fragment)	9.94	161
Q49MC0 Q49MC0_CHICK Vimentin (Fragment)	8.14	258
E1BY93 E1BY93_CHICK Uncharacterized protein	6.96	158
B6V1G0 B6V1G0_CHICK Ovomuroid	8.10	210
P30371 TGFB2_CHICK Transforming growth factor beta-2 proprotein	1.70	412
P26007 ITA6_CHICK Integrin alpha-6	1.31	1072
P02845 VIT2_CHICK Vitellogenin-2	0.22	1850

Tabla 17: Análisis de la glicosilación del sistema glicoproteico CEW.

Proteína	Peptido	Glicano	Obs. m/z	Carga	Obs. m/z	Calc. m/z	Error (ppm)
P02789 Ovotransferrin	TAGWVIPMGLIHN ⁴⁹² R	HexNAc(4)Hex(3)	955.11	3	2863.31	2863.31	-1.1
		HexNAc(5)Hex(3)	1022.80	3	3066.40	3066.39	1.2
		HexNAc(6)Hex(3)	1090.49	3	3269.47	3269.47	-1.0
P01012 Ovalbumin	YN ²⁹³ LTSVLMAMGHTDVFSANLSGISSAESLK	HexNAc(2)Hex(5)	1504.35	3	4511.05	4510.05	-0.5
		HexNAc(2)Hex(6)	1558.03	3	4672.09	4672.10	-1.1
		HexNAc(3)Hex(5)	1179.03	4	4713.12	4713.13	-1.8
		HexNAc(4)Hex(4)Fuc(1)NeuAc(1)	1298.83	4	5192.31	5191.31	0.4
		HexNAc(4)Hex(5)	1229.80	4	4916.20	4916.21	-0.8
		HexNAc(5)Hex(4)	1240.06	4	4957.22	4957.23	-2.9
		HexNAc(5)Hex(5)	1280.57	4	5119.29	5119.28	0.8
		HexNAc(6)Hex(3)Fuc(1)NeuAc(1)	1359.86	4	5436.42	5435.41	1.8
		HexNAc(5)Hex(3)	1183.20	3	3547.60	3547.59	2.4
		HexNAc(6)Hex(3)	1250.89	3	3750.67	3750.67	1.2
P01014 Ovalbumin-related protein Y	YN ²⁹³ LTSILMALGMTDLFSR	HexNAc(6)Hex(4)	1304.91	3	3912.72	3912.72	0.4
		HexNAc(6)Hex(4)NeuAc(1)	1402.28	3	4204.84	4203.82	3.3
R9TNA6 Ovalbumin-related protein X	AN ¹¹⁴ YSLR	HexNAc(6)Hex(3)	1115.72	4	4459.88	4459.89	-0.3
		HexNAc(2)Hex(3)	808.35	2	1615.696	1615.69	0.4
		HexNAc(5)Hex(4)	796.33	3	2386.985	2386.98	-0.4
		HexNAc(6)Hex(3)	1214.51	2	2428.013	2428.01	0
		HexNAc(6)Hex(4)	1295.53	2	2590.05	2590.06	-2.7
		HexNAc(2)Hex(3)	842.85	2	1684.70	1684.70	-2.3
P01005 OVO_CHICK Ovomucoïd	FPN ³⁴ ATDK	HexNAc(3)Hex(3)	944.39	2	1887.78	1887.78	-1.8
		HexNAc(3)Hex(4)	1025.42	2	2049.83	2049.83	-1.9
		HexNAc(4)Hex(3)	1045.93	2	2090.86	2090.86	1.2
		HexNAc(5)Hex(3)	765.32	3	2293.94	2293.94	1.3
		HexNAc(6)Hex(3)	833.01	3	2497.02	2497.02	0.5
FPN ³⁴ ATDKEGK	FPN ³⁴ ATDKEGK	HexNAc(2)Hex(3)	666.95	3	1998.86	1998.86	-0.4
		HexNAc(3)Hex(3)	734.65	3	2201.94	2201.94	0.2
		HexNAc(3)Hex(4)NeuAc(1)	885.70	3	2655.09	2655.09	0.8

Tabla 17: Análisis de la glicosilación del sistema glicoproteico CEW (continuación)

Proteína	Péptido	Glicanos	Obs. m/z	Carga	Obs. m/z	Calc. m/z	Error (ppm)
P01005 OVO_CHICK_Ovomucoid		HexNAc(4)Hex(3)	802,35	3	2405,02	2405,02	-1,5
		HexNAc(4)Hex(4)	856,36	3	2567,07	2567,08	-1
		HexNAc(4)Hex(4)NeuAc(1)	953,40	3	2858,17	2858,17	0,5
		HexNAc(4)Hex(5)NeuAc(1)	1007,41	3	3020,22	3020,23	-0,6
		HexNAc(5)Hex(3)	870,04	3	2608,10	2608,10	-0,3
		HexNAc(5)Hex(4)	924,06	3	2770,16	2770,16	0
		HexNAc(5)Hex(4)NeuAc(1)	1021,09	3	3061,25	3061,25	0,8
		HexNAc(6)Hex(4)	991,75	3	2973,24	2973,24	1,2
		HexNAc(6)Hex(4)NeuAc(1)	1088,78	3	3264,33	3264,33	-0,1
		HexNAc(7)Hex(4)	1059,44	3	3176,31	3176,31	-0,6
		HexNAc(6)Hex(3)	1340,09	4	5357,33	5358,33	0,6
		HexNAc(2)Hex(2)	941,05	3	2821,13	2821,13	2,1
		HexNAc(2)Hex(3)	995,07	3	2983,18	2983,18	-0,1
		HexNAc(4)Hex(3)	1130,45	3	3389,33	3389,34	-1,7
P20740 OVOS_CHICK_Ovostatin		HexNAc(5)Hex(3)	1198,15	3	3592,42	3592,42	0,2
		HexNAc(6)Hex(3)	1265,84	3	3795,50	3795,50	-1,0
		HexNAc(2)Hex(3)	1083,14	3	3247,40	3247,40	-2,0
		HexNAc(4)Hex(3)	1218,52	3	3653,56	3653,56	-1,7
		HexNAc(3)Hex(4)Fuc(1)NeuAc(1)	1392,95	3	4176,82	4176,85	-6,1
		HexNAc(5)Hex(4)Fuc(2)	1171,47	2	2341,93	2341,94	-4,8
		HexNAc(5)Hex(4)NeuAc(1)	1170,97	2	2340,93	2340,92	3,0
		HexNAc(6)Hex(4)Fuc(2)	849,01	3	2545,02	2545,02	-1,3
		HexNAc(6)Hex(6)NeuAc(2)	1580,11	2	3159,21	3159,20	4,0
		HexNAc(6)Hex(3)	1227,03	2	2453,04	2453,04	2,6
		HexNAc(5)Hex(3)Fuc(1)	968,89	2	1936,78	1936,78	2,4
		HexNAc(6)Hex(3)Fuc(1)	713,96	3	2139,86	2139,86	1,1
		HexNAc(6)Hex(4)Fuc(1)	767,97	3	2301,90	2301,91	-3,3
		HexNAc(7)Hex(3)Fuc(1)	1171,97	2	2342,94	2342,93	2,4
Q98U19 MUC5B_CHICK_Mucin-5B	TCIIN ¹⁸⁴ K	HexNAc(6)Hex(3)	1227,03	2	2453,04	2453,04	2,6
		HexNAc(5)Hex(3)Fuc(1)	968,89	2	1936,78	1936,78	2,4
F1NBL0 MUC6_CHICK_Mucin-6	N303R	HexNAc(6)Hex(3)Fuc(1)	713,96	3	2139,86	2139,86	1,1
		HexNAc(6)Hex(4)Fuc(1)	767,97	3	2301,90	2301,91	-3,3

Tabla 17: Análisis de la glicosilación del sistema glicoproteico CEW (continuación)

Proteína	Péptido	Glicanos	Obs. m/z	Carga	Obs. m/z	Calc. m/z	Error (ppm)
[Q8JIG5] Alpha-1-acid glycoprotein		HexNAc(2)Hex(3)	927,91	2	1854,81	1854,82	-0,2
		HexNAc(3)Hex(3)	1029,45	2	2057,89	2057,89	-0,1
		HexNAc(4)Hex(3)	1130,99	2	2260,97	2260,97	-0,8
		HexNAc(5)Hex(3)	1232,53	2	2464,06	2464,05	2,8
		HexNAc(5)Hex(4)	876,04	3	2626,10	2626,11	-0,5
		HexNAc(6)Hex(3)	1334,08	2	2667,15	2667,13	5,5
		HexNAc(6)Hex(4)	1415,10	2	2829,19	2829,19	1,5
		HexNAc(6)Hex(4)NeuAc(1)	1040,76	3	3120,27	3120,28	-3,5
		HexNAc(8)Hex(4)	1079,12	3	3235,34	3235,34	-1,2
		HexNAc(6)Hex(3)	713,96	3	2139,86	2139,86	0,4
[N ⁹⁷ SSK		HexNAc(7)Hex(3)	781,65	3	2342,94	2342,93	1,5
		HexNAc(8)Hex(4)	903,36	3	2708,07	2708,07	0,7
		HexNAc(6)Hex(3)	1437,30	3	4309,88	4308,84	7,6
		HexNAc(9)Hex(3)	1018,41	3	3053,22	3053,21	3,1
[Q9YGF0]Q9YGF0_CHICK Clusterin	N ²⁷⁵ FSTDR	HexNAc(2)Hex(1)Fuc(1)	909,06	3	2725,15	2725,15	1,5
	IPYVGFHGAN ³⁹ EITTCER	HexNAc(5)Hex(9)Fuc(1)	1228,16	3	3682,48	3682,47	3,0
[P01875] Ig mu chain C	N ¹³⁰ ASILCQTR	HexNAc(4)Hex(5)NeuAc(2)	1089,77	3	3267,30	3267,31	-2,4
		HexNAc(5)Hex(6)NeuAc(2)	1211,48	3	3632,43	3632,44	-4,3
		HexNAc(4)Hex(4)Fuc(2)NeuAc(1)	964,91	4	3856,63	3856,65	-5,9
[U6C3W5] EW135	TVQLRLVN ¹³² GTDHCGR	HexNAc(7)Hex(3)	1158,52	3	3473,55	3473,55	1,1
	LLQDFFGKELN ³⁶⁰ K	HexNAc(4)Hex(4)Fuc(1)	1055,44	2	2109,87	2109,87	1,3
[O73885] Heat shock cognate 71 kDa protein (*)	KELN ³⁶⁰ K	HexNAc(8)Hex(6)	1034,083	3	3100,24	3100,23	0,4
		HexNAc(5)Hex(8)Fuc(4)	1224,17	3	3670,49	3670,49	0,2
	N ⁴⁷⁷ TIPTK	HexNAc(7)Hex(6)Fuc(1)	1105,46	3	3314,36	3314,37	-1,1
		HexNAc(6)Hex(4)NeuAc(2)	1047,08	3	3139,23	3139,22	2,3
	N ⁵⁸⁴ QTAEK	HexNAc(6)Hex(4)NeuAc(2)	1047,08	3	3139,23	3139,22	2,9

Tabla 17: Análisis de la glicosilación del sistema glicoproteico CEW (continuación)

Proteína	Péptido	Glicanos	Obs. m/z	Carga	Obs. m/z	Calc. m/z	Error (ppm)
F INSM7 OC 16_CHICK Ovocleidin-116	N ⁶² QTQVK	HexNAc(6)Hex(6)	970,07	3	2908,19	2908,18	1,1
		HexNAc(6)Hex(3)Fuc(1)NeuAc(1)	953,73	3	2859,18	2859,18	0,6
		HexNAc(7)Hex(6)	1037,76	3	3111,27	3111,26	1,9
		HexNAc(8)Hex(6)	1105,46	3	3314,35	3314,34	3,0
		HexNAc(9)Hex(4)	1065,11	3	3193,32	3193,32	2,9
Q49MC0 Vimentin (Fragment) (*)	QIQSLTCEVDALKGSN ¹²⁹ ESLER	HexNAc(2)Hex(3)	1090,50	3	3269,49	3269,48	3,1
E B Y93 Uncharacterized protein (*)	EN ⁷³ ISDPTSPLR	HexNAc(9)Hex(6)Fuc(1)	1392,57	3	4175,70	4174,71	-1,8
P30371 Transforming growth factor beta-2 proprotein (*)	N ¹³⁹ ASNLVK	HexNAc(6)Hex(6)NeuAc(2)	1173,48	3	3518,42	3518,40	3,8
		HexNAc(7)Hex(8)	1155,13	3	3463,38	3463,40	-4,8
		HexNAc(7)Hex(8)NeuAc(1)	1252,16	3	3754,48	3754,49	-4,2
P26007 ITA6_CHICK Integrin alpha-6 (*)	NSN ⁴⁷ VTFYLLSTTK	HexNAc(9)Hex(4)Fuc(1)	1056,47	4	4222,84	4222,84	-0,2
P02845 VIT2_CHICK Vitellogenin-2 (*)	VAN ¹⁰⁹ aK	HexNAc(4)Hex(3)Fuc(2)	1011,43	2	2021,85	2021,85	0,1
		HexNAc(4)Hex(4)Fuc(2)	728,64	3	2183,91	2183,91	0,9
		HexNAc(5)Hex(4)Fuc(2)	796,33	3	2386,99	2386,99	0,2
		HexNAc(6)Hex(3)Fuc(2)	1214,51	2	2428,01	2428,01	0,5

3.2 Determinación de la glicosilación de ovotransferrina

Por otra parte, la muestra de CEW fue analizada mediante electroforesis en geles SDS-PAGE (Figura 81). Con el objetivo de caracterizar la glicosilación utilizando el modelo de proteína aislada, la banda de gel de PM aprox.74 kDa coincidente con la ovotransferrina se cortó, se digirió con tripsina y se analizó por nanoHPLC-ESI-Orbitrap.

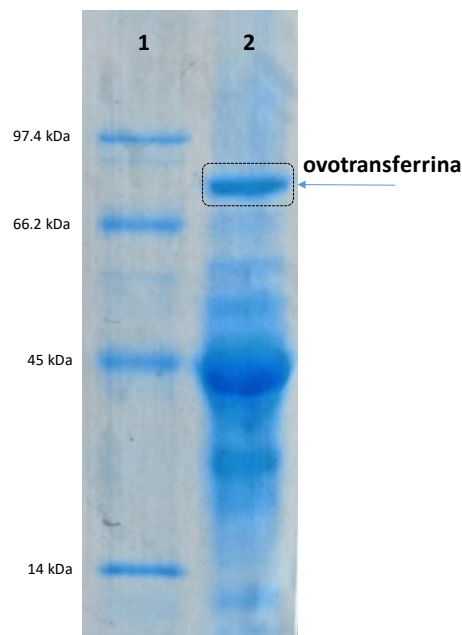


Figura 81: Análisis en SDS-PAGE del extracto de CEW. Calle 1: marcadores de peso molecular. Calle 2: extracto de proteínas de CEW.

En la Figura 82A se observa el cromatograma del análisis ESI-Orbitrap de la banda de ovotransferrina aislada. Es interesante notar en los cromatogramas iónicos extraídos (Figura 82B-C) en función de los iones m/z 204.08 y 366.13 correspondientes a los oxonios de HexNAc^+ y HexNAcHex^+ respectivamente, la región del cromatograma donde eluyen glicopéptidos. Es importante notar el amplio intervalo en el cual eluyen glicopéptidos, lo cual indica el alto grado de glicosilación de la ovotransferrina.

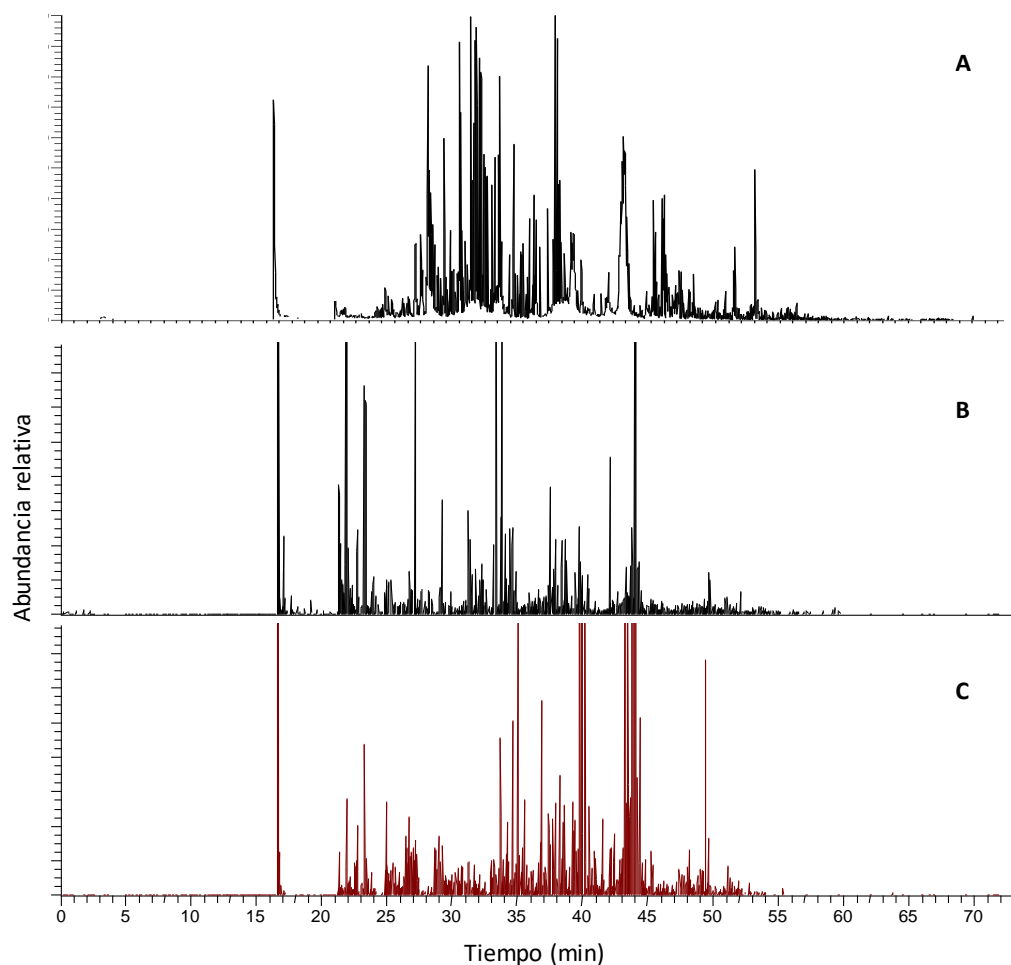


Figura 82: Análisis por nanoHPLC-ESI-Orbitrap de ovotransferrina aislada A) Cromatograma de corriente iónica total. Cromatograma iónico extraído en función los iones reporteros B) m/z 204.08 y C) m/z 366.13

Los resultados obtenidos durante el análisis de CEW mostraron, para ovotransferrina una cobertura del 80.6 % para la secuencia aminoacídica correspondiente (Tabla 18). Notablemente, utilizando como material de estudio, la proteína aislada por SDS-PAGE, se logró la identificación de péptidos con una cobertura similar (80.3%) para esta proteína en comparación de cuando la misma fue analizada como parte del extracto total sin previa purificación por SDS-PAGE.

Tabla 18: Determinación de la glicosilación de Ovotransferrina aislada, sitios de modificación y las glicofomas correspondientes

Péptido	Glicano	Obs. <i>m/z</i>	Carga	Obs. <i>m/z</i>	Calc. <i>m/z</i>	Error (ppm)
FGVN ⁶³⁷ GSEK	HexNAc(5)Hex(3)	780.33	3	2338.97	2338.97	1.0
	HexNAc(6)Hex(3)	1271.53	2	2542.05	2542.05	0.8
	HexNAc(6)Hex(4)	902.04	3	2704.10	2704.10	0.7
	HexNAc(7)Hex(3)	915.71	3	2745.12	2745.12	-2.0
TAGWVIPMGLIHN ⁴⁹² R	HexNAc(2)Hex(3)	825.06	3	2473.16	2473.15	3.4
	HexNAc(2)Hex(4)	873.74	3	2619.21	2619.21	1.0
	HexNAc(2)Hex(5)	927.76	3	2781.27	2781.27	0.1
	HexNAc(3)Hex(3)	887.42	3	2660.24	2660.24	0.5
	HexNAc(3)Hex(4)	941.44	3	2822.29	2822.30	0.0
	HexNAc(3)Hex(5)	1000.79	3	3000.35	3000.34	2.6
	HexNAc(3)Hex(6)Fuc(1)	827.87	4	3308.46	3308.45	2.1
	HexNAc(4)Hex(3)	955.11	3	2863.32	2863.32	-0.8
	HexNAc(4)Hex(4)	1513.19	2	3025.37	3025.37	-0.2
	HexNAc(4)Hex(5)	797.61	4	3187.43	3187.42	0.8
	HexNAc(4)Hex(6)	1117.16	3	3349.48	3349.48	0.7
	HexNAc(5)Hex(3)	1022.80	3	3066.40	3066.40	0.2
	HexNAc(5)Hex(3)Fuc(1)NeuAc(1)	1168.53	3	3503.56	3503.55	3.3
	HexNAc(5)Hex(4)	1076.82	3	3228.45	3228.45	-0.7
	HexNAc(5)Hex(4)NeuAc(1)	1173.85	3	3519.54	3519.55	-2.5
	HexNAc(5)Hex(5)	1136.17	3	3406.50	3406.50	1.7
	HexNAc(5)Hex(5)Fuc(1)	1184.86	3	3552.56	3552.56	0.8
	HexNAc(6)Hex(3)	1090.50	3	3269.48	3269.48	-0.6
	HexNAc(6)Hex(3)Fuc(1)NeuAc(2)	1333.24	3	3997.70	3997.73	-5.3
	HexNAc(6)Hex(4)	1144.51	3	3431.53	3431.53	-0.7
	HexNAc(6)Hex(4)Fuc(1)	1193.20	3	3577.58	3577.59	-1.0
	HexNAc(6)Hex(4)NeuAc(1)	1241.54	3	3722.61	3722.63	-3.3
	HexNAc(6)Hex(5)	899.15	4	3593.59	3593.58	0.9
HexNAc(7)Hex(3)	1736.78	2	3472.55	3472.56	-1.1	
HexNAc(7)Hex(4)	1212.21	3	3634.61	3634.61	1.1	

Estos resultados indican que la identificación de la ovotransferrina fue consistente en ambos análisis, asegurando la calidad de los resultados obtenidos cuando la muestra se analiza desde el extracto proteico total y resaltando que es posible lograr la identificación de la proteína sin necesidad de introducir pasos previos de purificación en el tratamiento de la muestra.

El análisis de la ovotransferrina aislada por SDS-PAGE permitió identificar dos sitios de *N*-glicosilación sobre las asparaginas N⁴⁹² y N⁶³⁷. En la tabla 18 se muestra el

análisis de la glicosilación sitio específica, las glicofomas asociadas y los errores correspondientes.

En este caso se determinó la presencia del péptido 634-641 modificado en N⁶³⁷ glicosilado con glicofomas del tipo HexNAc₅₋₇Hex₃₋₄, mientras que el péptido 480-493 modificado en N⁴⁹² presentó un patrón de glicofomas más heterogéneo. Sobre este segundo sitio se pudieron determinar 25 glicofomas entre las cuales fue posible identificar la presencia de desoxihexosa y ácido siálico en su composición, motivos estructurales que no han sido descritos previamente como componentes de los *N*-glicanos de ovotransferrina. En la figura 83 y 84 se observan espectros MS/MS de glicopéptidos seleccionados, donde se evidencia tanto las fragmentaciones que conducen a la identificación de la secuencia del péptido, como así también las principales fragmentaciones del *N*-glicano.

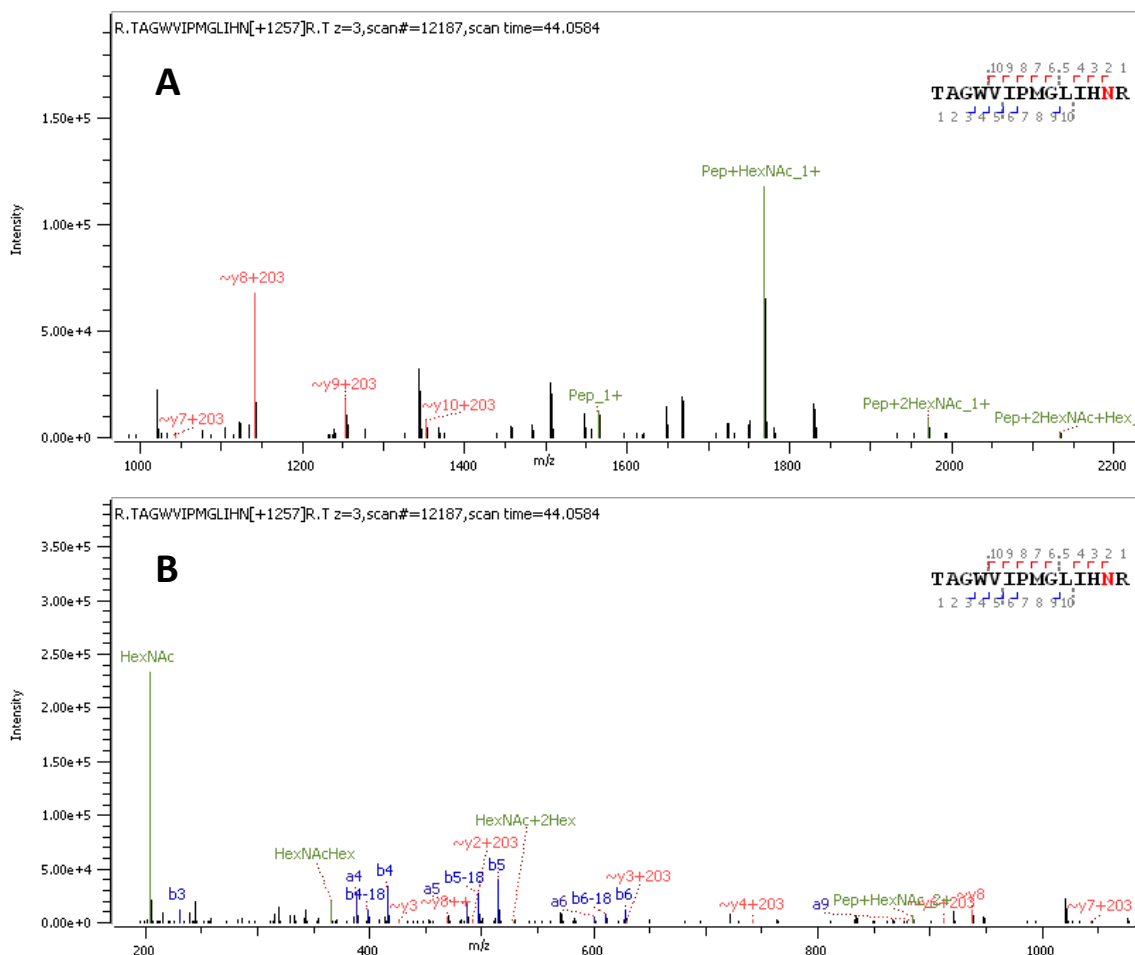


Figura 83: Espectros MS/MS de glicopéptidos seleccionados de ovotransferrina correspondientes al ión m/z 941.43⁺³ a tiempo de retención : 44.05 min A) Ampliación m/z 1000-2200 B) Ampliación m/z 200-1050.

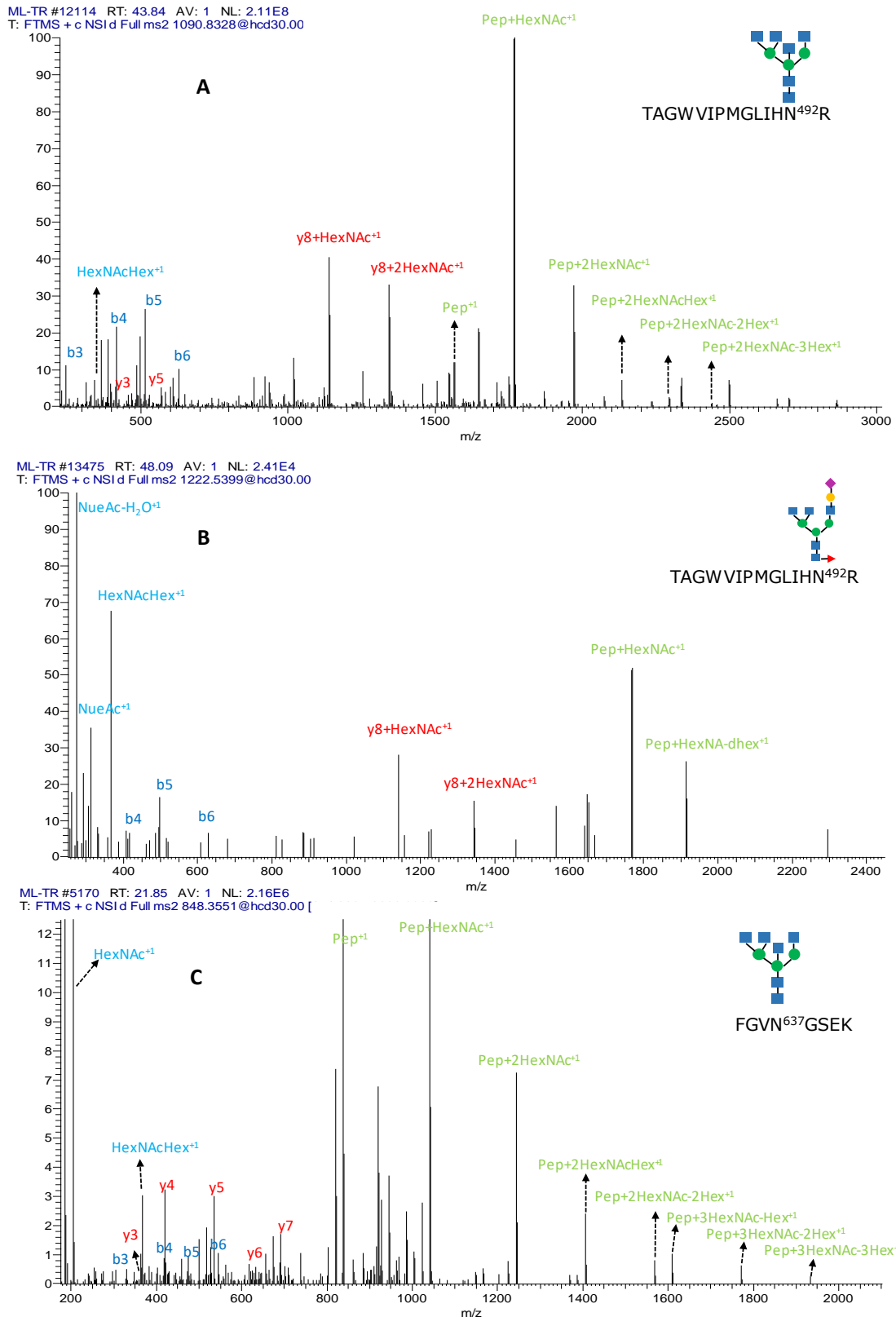


Figura 84: Espectros MS/MS de glicopéptidos seleccionados de ovotransferrina. A) m/z 1090.83 B) m/z 1222.54 C) m/z 848.35.

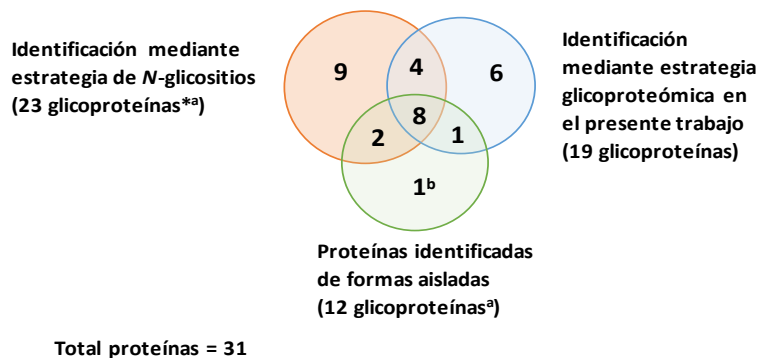
Cuando se estudió la glicosilación de ovotransferrina en la muestra compleja de CEW, pudo ser determinado únicamente el sitio de glicosilación N492 con tres

glicofomas diferentes asociadas al mismo sitio. Mediante esta estrategia, solo se hallaron las glicofomas mayoritarias probablemente debido a la baja eficiencia de ionización de los glicopéptidos en comparación con los péptidos no modificados, lo cual conlleva a una baja relación señal-ruido para estas especies cuando la muestra es una mezcla compleja. Este hecho afecta la selección de los iones de glicopéptidos para ser sometidos a experimentos MS/MS cuando se opera en modo de análisis DDA (análisis dependiente de la información), perdiéndose la información de los iones de menor abundancia.

En un estudio previo conducido por el grupo de Geng (Geng *et al.*, 2017), para la identificación de sitios de N-glicosilación en CEW se empleó una estrategia diferente, la cual consiste en determinar los residuos de Asparagina convertidos en residuos de ácido Aspártico como resultado de la reacción de deglicosilación enzimática. Así fueron identificados los sitios de glicosilación N492 y N637 y un tercer sitio N212 el cual no pertenece a una secuencia consenso NXT/S. Si bien esta última estrategia permitió la identificación de los dos sitios glicosilados, N492 y N637, la principal desventaja respecto de la metodología utilizada en el presente trabajo, se centra en la pérdida de información a nivel de la estructura de glicanos, la cual presentan un rol fundamental en las propiedades biológicas de la glicoproteína.

Por otra parte, se han empleado diferentes abordajes estrictamente glicómicos para caracterizar glicoproteínas de CEW aisladas. En el estudio realizado por el grupo de Jiang (Jiang *et al.*, 2014), los N-glicanos de ovotransferrina fueron derivatizados isotópicamente y analizados usando cromatografía líquida de interacción hidrofílica acoplado a espectrometría de masa tándem ESI (HILIC-MS/MS). Mediante esta metodología se determinaron 16 estructuras de N-oligosacáridos, incluyendo 1 estructura del tipo core (3.18 %), 3 estructuras del tipo híbridos (5.42 %) y 12 estructuras de N-glicanos complejos (91.4 %). Otro estudio realizado (Hwang *et al.*, 2014), utilizando un sistema Waters™ Alliance 2690 equipado con un detector de fluorescencia y acoplado a espectrometría de masa, permitió identificar en ovotransferrina, 6 glicofomas características de las cuales eran: 2 estructuras truncadas, 1 de tipo complejo y 3 oligosacáridos de tipo híbrido. Sin embargo, ninguno de los abordajes anteriormente mencionados permitió identificar estructuras minoritarias con desoxihexosa y ácido sialico en su composición, lo cual respalda la profundidad del análisis utilizado en el presente trabajo de tesis.

La comparación entre los resultados obtenidos por Geng *et al.* (2017) utilizando el análisis sitio específico y abordaje glicoproteómico detallado en el presente trabajo y teniendo en consideración solo los resultados obtenidos utilizando tripsina como proteasa, para la digestión enzimática, el estudio glicoproteómico aquí descrito permitió identificar 19 glicoproteínas mientras que el análisis sitio específico sólo permitió identificar 14 glicoproteínas, de las cuales 6 fueron identificadas por ambos abordajes. Además, el enfoque glicoproteómico utilizado reveló 6 glicoproteínas de baja abundancia, siendo el presente trabajo la primera descripción de la glicosilación en estas proteínas. La figura 85 muestra un resumen del número total de glicoproteínas identificadas utilizando el abordaje sitio específico (Geng *et al.*, 2017), las proteínas de CEW descritas de forma aisladas (Asperger *et al.*, 2015; Davis *et al.*, 1969; DeLange & Huang, 1971; Geng *et al.*, 2015; Hart-Smith & Raftery, 2012; Harvey *et al.*, 2000; Hwang *et al.*, 2014; Mann *et al.* 2002; Nishio *et al.*, 2014; Offengenden *et al.*, 2011; Piskarev *et al.*, 1989; Réhault-Godbert *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2015) y el número total de proteínas de CEW identificadas mediante la metodología descrita en el presente trabajo. Además, las figuras 86, 87 y 88 muestran ejemplos seleccionados de espectros MS/MS obtenidos durante la identificación de glicopéptidos de CEW.



- Dos de las proteínas identificadas mediante la estrategia de N-glicositios no se encontraron disponibles en la versión actualizada de la base de datos UNIPROT tanto por nombre de proteína como a través de su número identificador y en consecuencia no fueron consideradas en la comparación de resultados
- ^a La proteína lisozima no fue considerada para la comparación de resultados debido a que su glicosilación no ocurre sobre la secuencia consenso.
- ^b Nishio et al., 2014.

Figura 85: Resumen comparativo del número total de glicoproteínas identificadas mediante los diferentes enfoques revisados en el presente trabajo.

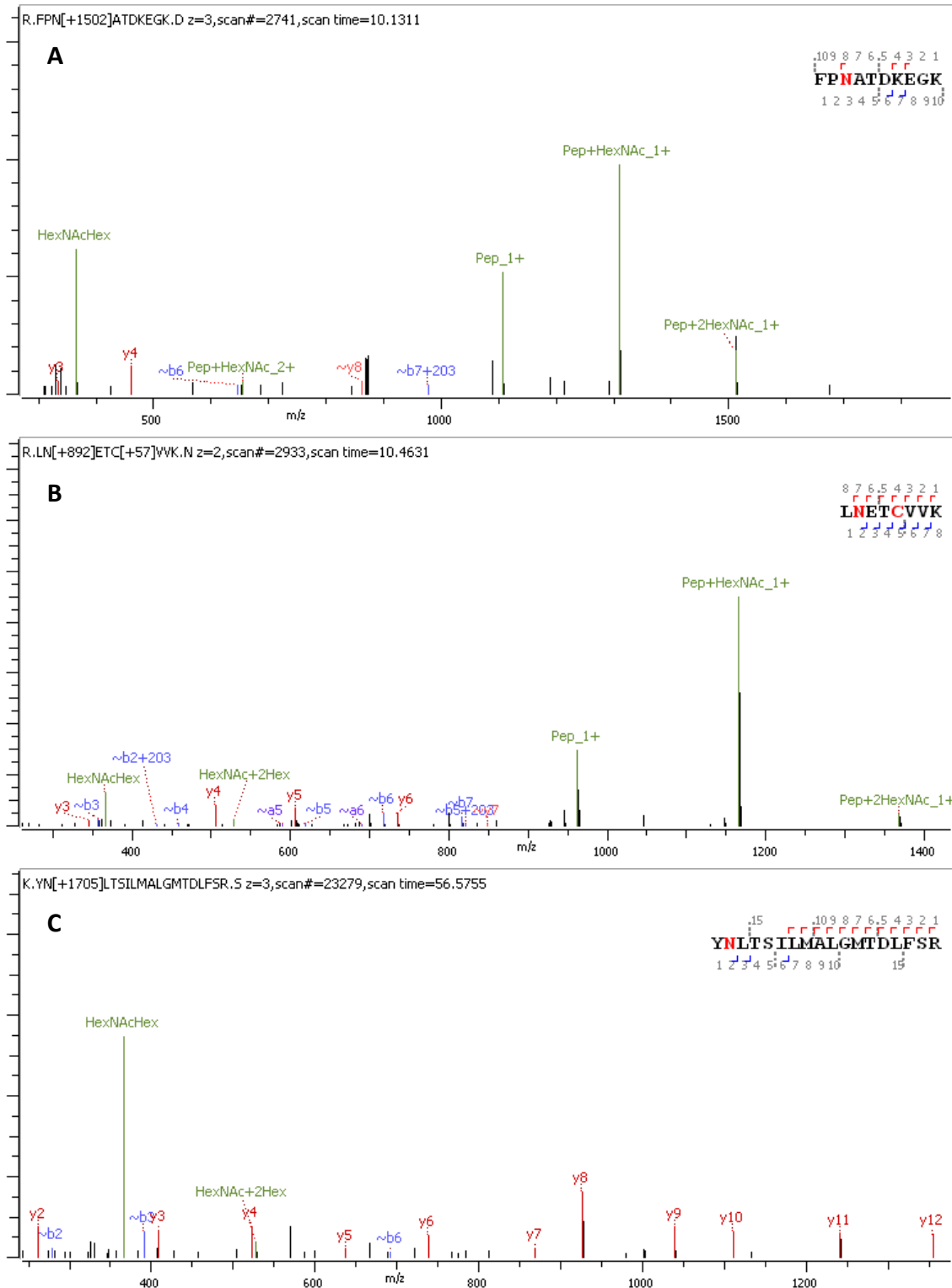


Figura 86: Espectros MS/MS seleccionados para los glicopéptidos de correspondientes a la glicosilación de las proteínas A) Ovomucoide, B) glicoproteína alfa-1-ácida C) Proteína Y relacionada a Ovalbumina

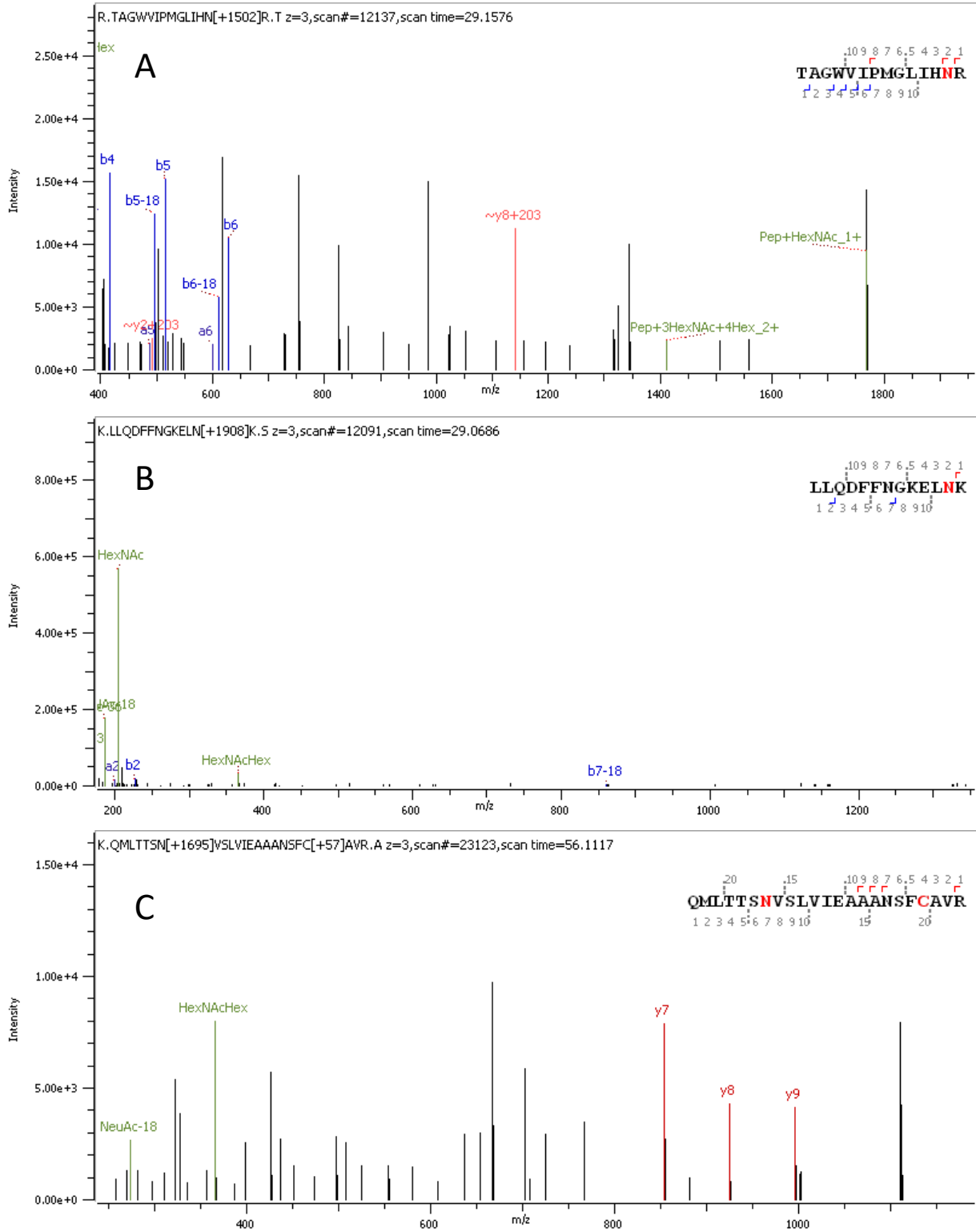


Figura 87: Espectros MS/MS seleccionados para los glicopéptidos de correspondientes a la glicosilación de las proteínas A) Ovotransferrina, B) vimentina C) Ovostatina.

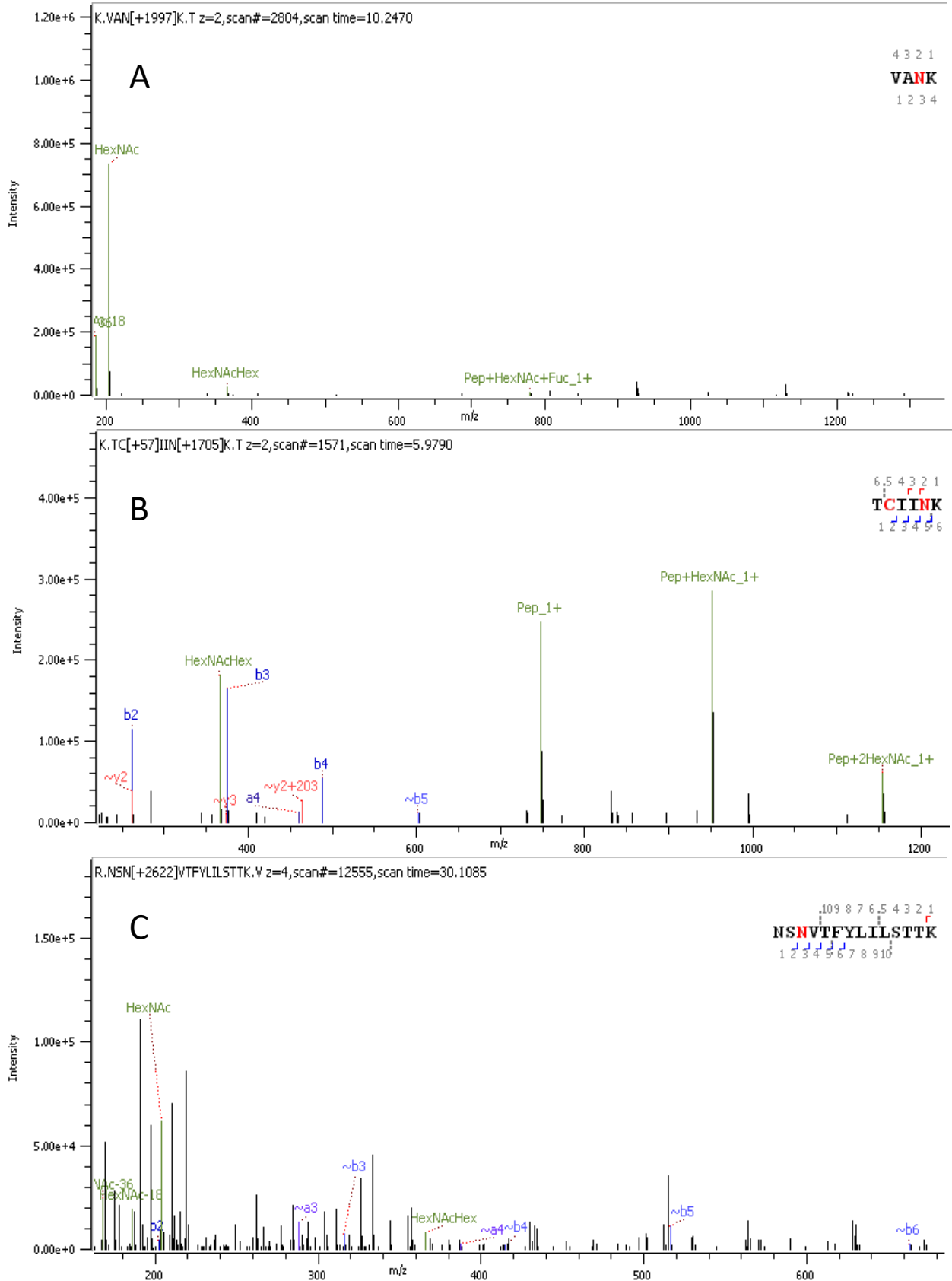


Figura 88: Espectros MS/MS seleccionados para los glicopéptidos de correspondientes a la glicosilación de las proteínas A) Vitelogenina, B) mucina 5B C) Integrina.

Los puntos más importantes a destacar sobre la metodología puesta a punto para la determinación de la glicosilación de CEW a nivel glicoproteoma se centra principalmente en la gran capacidad de análisis integrado que permite elucidar en simultaneo los sitios de glicosilación conjuntamente con la información estructural de los glicanos asociados a cada péptido modificado. Por lo tanto, a pesar de que información minoritaria pudiera perderse en el análisis de sistemas glicoproteicos complejos, la información obtenida mediante esta estrategia representa un abordaje altamente valioso que permite expandir la comprensión de funcionalidades, bioactividades y la alergenicidad derivada de las glicoproteínas presentes en CEW, lo cual contribuiría al desarrollo de nuevos métodos de procesamiento de CEW que impliquen una potencial reducción de los efectos adversos durante su consumo. Por otra parte, es igualmente importante agregar que esta metodología involucra un procesamiento simple del material de partida traduciéndose en menores tiempos de análisis, lo que lo hace útil para ser utilizado en otros sistemas glicoproteicos complejos.

Materiales y Métodos

Microorganismos

Pseudomonas veronii

Los cultivos y el aislamiento del EPS de *Pseudomonas veronii* 2E, fueron realizados por el grupo de la Dra. Diana Vullo del Área Química, Instituto de Ciencias, Universidad Nacional de General Sarmiento.

Pseudomonas veronii 2E es una bacteria autóctona aislada de sedimentos asociados a la Cuenca del río Reconquista, en la región metropolitana de Buenos Aires. Esta bacteria fue identificada por secuenciación de ARN-r 500 pb.

La cepa bacteriana fue seleccionada por su capacidad de retención de los metales pesados Cd(II), Zn(II) y Cu(II) y de biotransformar Cr(VI) en sistemas acuosos (Garavaglia *et al.*, 2010; Vullo *et al.*, 2008).

Lactobacillus kefir

Los cultivos y la fracción de glicoproteínas capa S fueron provistos por el grupo de la Dra. María de los Angeles Serradell de la Cátedra de Microbiología, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata (UNLP) La Plata.

Para el análisis de glicoproteínas se utilizaron cepas de *Lactobacillus kefir* aisladas a partir de gránulos de kefir y la cepa de colección (Japanese Collection of Microorganisms) *Lactobacillus kefir* JCM 5818 (Reiken, Japan), todas caracterizadas utilizando métodos basados en fenotipos y ácidos nucleicos (Delfederico *et al.*, 2006; Garrote *et al.*, 2001). Las distintas cepas fueron cultivadas en medio de Man-Rogosa-Sharpe (MRS) (DIFCO, Detroit, USA) a 37°C durante 48 h en condiciones aeróbicas. El estudio de la glicosilación de capa S se abordó sobre cuatro cepas de características diferentes: *L. kefir* JCM 5818 y *L. kefir* CIDCA 83111, las cuales presentan un comportamiento de autoagregación y las cepas *L. kefir* CIDCA 8348 y *L. kefir* CIDCA 8321, las cuales presentan un comportamiento no-agregante

Cultivo celular y aislamiento del EPS

P. veronii 2E se cultivó a 25°C en medio M9 (g L⁻¹: 7.3 K₂HPO₄, 3.0 KH₂PO₄, 6.6 NH₄Cl, 3.3 NaCl, y 14 g L⁻¹ glicerol suplementado con 0.1 de extracto de levadura). En un primer etapa, *P. veronii* 2E fue pre-cultivada en 50 mL M9-glycerol at 25 °C y 120 rpm hasta alcanzar la fase exponencial. Luego, 10 mL de este cultivo fueron transferidos a un siguiente proceso de cultivo dando un total de 100 mL de medio de cultivo M9 – glicerol e incubado en las mismas condiciones que el pre-cultivo durante 48 h. Se utilizó como control negativo el mismo medio sin inoculación. En todos los casos, la biomasa fue determinada por densidad óptica (DO) 600nm.

El cultivo se centrifugó a 7000 g y el material polimérico extracelular soluble presente en el sobrenadante se precipitó mediante el agregado de 2.2 volúmenes de etanol 95% incubando a temperatura ambiente durante 16 h. El proceso de precipitación fue repetido tres veces. El EPS fue dializado contra agua calidad milliQ utilizando membrana de celulosa (Sigma-Aldrich, MWCO 12.500 Da) para remover impurezas de bajo peso molecular. En una siguiente etapa de purificación se trató el EPS con DNAasa durante 4 h a 32 °C en buffer 50 mM Tris pH 7.5, suplementado con 10 mM MgCl₂. Posteriormente, se agregó Proteinasa K, incubando a 32 °C durante 16 h. La reacción enzimática se terminó calentando la solución a 60 °C durante 1 h, y luego se centrifugó a 7000 g durante 20 min a 4 °C. La fracción soluble del EPS, fue nuevamente precipitada con etanol, como se describió anteriormente y dializada contra agua calidad milliQ.

El material obtenido fue sometido a una siguiente etapa de purificación mediante el tratamiento con desoxicolato de sodio (DOC) a 0.75 CMC (concentración micelar crítica) en buffer Tris 0.05 M conteniendo 0.1 M NaCl. El medio fue incubado durante 15 min a 65 °C. La mezcla fue enfriada en baño de hielo y se agregó ácido acético a una concentración final de 1% (v/v). Finalmente, la mezcla se centrifugó en frío a 20000 g durante 5 min. El precipitado obtenido conformado por el sistema DOC conteniendo la fracción lipopolisacáridica del sistema fue separado del material sobrenadante conteniendo la fracción del polisacárido de interés. Éste último fue dializado primero contra buffer 4 mM Tris conteniendo 10% (v/v) de etanol, luego contra agua destilada y finalmente contra agua ultrapura.

Extracción de proteínas Capa S

Las proteínas de capa S fueron extraídas del cultivo celular usando LiCl 5 M (Carasi *et al.*, 2012). Brevemente, 100 mL de cultivo celular de cada cepa de *Lactobacillus kefir* fueron centrifugados a 10,000 *g* a 10 °C durante 10 min, y el pellet celular obtenido se lavó con buffer PBS, KH₂PO₄ 0.144 g/l, NaCl 9 g/L, Na₂HPO₄ 0.795 g/l, pH 7.2. El pellet fue resuspendido en 5 M LiCl hasta alcanzar una suspensión de OD₅₅₀ = 25 y se incubó en agitación (300 *g*, 4 °C, 60 min). La mezcla se centrifugó a 16,000 *g*, 10 °C durante 30 min y el sobrenadante se filtró con membrana de tamaño de poro de 0.45 µm (Millipore, USA). La solución resultante se dializó en membrana de celulosa (SpectraPor membrane tube, MWCO 6000–8000, Spectrum Medical Industries) contra PBS conteniendo 0.05% (v/v) Tween 20 durante 24 h a temperatura ambiente, y luego se continuó la diálisis contra H₂O.

Cromatografía de intercambio iónico

Se realizó la purificación del extracto total de polisacárido mediante cromatografía de intercambio iónico utilizando la fase DEAE-Sepharose Fast-flow en columna (2 × 15 cm) equilibrada con buffer 50 mM Tris–HCl conteniendo 7 M urea (pH 7.2). La purificación se realizó empleando un gradiente en pasos de concentración creciente de NaCl 0-2M en el mismo buffer de equilibrado, a un flujo de 1 mL min⁻¹. La elución de la columna fue monitoreada mediante la determinación de azúcares totales utilizando el método colorimétrico Fenol-sulfúrico (DuBois *et al.*, 1956). Las fracciones de interés fueron seleccionadas, dializadas contra agua ultrapura y finalmente liofilizadas.

Cromatografía de exclusión molecular

Se realizó una cromatografía en columna de Sephacryl S-300 HR (1.5 × 80 cm) equilibrada con buffer 20 mM Tris–HCl conteniendo 0.2 M NaCl a un flujo constante de 1.5 mL min⁻¹. La calibración de la columna se realizó utilizando una serie de dextranos de: 40.0, 80.7, 170.0, 264.0 kDa y determinando el volumen vacío y volumen final con patrones de azul de dextrano y glucosa respectivamente.

Obtención de patrones de oligosacáridos reducidos

Los oligosacáridos de distinto grado de polimerización utilizados como testigos para el análisis por HPAEC-PAD se obtuvieron mediante el hidrolizado de maltosa

(Sigma) utilizando como condiciones de hidrólisis 1N TFA a 100 °C durante 30 min. La mezcla de oligosacáridos obtenida se llevó a seco y posteriormente se trató con una solución de NaOH 0.05 M conteniendo 1 M NaBH₄ durante 16 h a temperatura ambiente. El producto de reacción fue purificado en micro-columna de resina DOWEX 50X (H⁺) (Fluka). La solución resultante fue co-evaporada tres veces con metanol conteniendo ácido acético 2% v/v.

O-desacetilación de EPO2

Los grupos *O*-acetilos del polisacárido EPO2 (20 mg) fueron selectivamente removidos utilizando solución de amoníaco 12.5% a 37 °C durante 16 h. Luego la solución se dializó contra H₂O utilizando una membrana de MWCO 12.5 kDa Spectra/Por[®] (Repligen) y por último se liofilizó (Perepelov *et al.*, 2018).

Fraccionamiento de oligosacáridos

Los oligosacáridos fueron fraccionados en una columna de Biogel P-30 (1.5 × 80 cm), equilibrada con buffer acetato de amonio 200 mM a pH 7 y eluída en el mismo buffer. La elución de la columna fue monitoreada off-line por HPAEC-PAD y espectrometría de masa MALDI.

Hidrólisis ácida

Para la de terminación de azúcares componentes se utilizó una hidrólisis total en TFA 2N durante 4 h a 100 °C.

Para la obtención de oligosacáridos se utilizó una hidrólisis parcial en 1N TFA a 100 °C durante 30 min.

Análisis por cromatografía de intercambio aniónico (HPAEC-PAD)

Se utilizó un equipo DX-500 Dionex Bio LC (Dionex Corp.) acoplado a un detector de pulso amperométrico.

Para el análisis de azúcares componentes se utilizó una columna Carbopack PA-20 y la correspondiente pre-columna utilizando A) para el análisis de monosacáridos neutros y aminoazúcares 18 mM NaOH, flujo de 0.4 mL min⁻¹; B) para monosacáridos acídicos 50 mM NaOH /10 mM NaAcO, flujo de 0.4 mL min⁻¹.

Para el análisis de alditoles se utilizó una columna CarboPack MA1 y la correspondiente pre-columna, con 400 mM NaOH como eluyente y un flujo de 0.4 mL min⁻¹.

Para el análisis de oligosacáridos se utilizó la columna microbore CarboPack P100 y la correspondiente pre-columna con un gradiente de 80-500 mM NaAcO en 25 mM NaOH durante 50 min y equilibrado previa a cada corrida durante 15 min en las condiciones iniciales, flujo de 0.25 mL min⁻¹.

Espectroscopía de infrarrojo (FT-IR)

El espectro infrarrojo fue registrado en el equipo Nicolet iS50 (Thermo Scientific®) en el modo de reflectancia total atenuada (ATR). El espectro fue adquirido utilizando el software Omnic version 9.8. Los parámetros de adquisición fueron: barrido de espectro: 4000–400 cm⁻¹; número de acumulaciones: 16; resolución: 4 cm⁻¹, a temperatura ambiente. Se utilizó como control la adquisición en ausencia de muestra, exponiendo la celda al aire en las mismas condiciones.

Microscopía de barrido electrónico (SEM)

Se realizaron en un microscopio de barrido electrónico Zeiss Supra-40 a diferentes valores de magnificación. Previo al análisis las muestras fueron liofilizadas y sometidas a platinado.

Análisis de metilación

El polisacárido EPO2 (0.5 mg) se disolvió en DMSO y se trató con NaOH en forma de polvo obtenido tras mortear rápidamente lentejas de NaOH, a fin de evitar su hidratación. La suspensión obtenida fue sonicada durante 50 min a 45 °C. La reacción de metilación se realizó con tres agregados de yoduro de metilo a intervalos de 20 minutos sonicando en baño termostatzado a 20 °C. La reacción se cortó con el agregado de agua. (Ciucanu & Kerek, 1984b; Pettolino *et al.*, 2012) El producto de metilación se hidrolizó con 2 M TFA a 100°C durante 4 horas. La mezcla de hidrólisis se liofilizó y se redujo con NaBH₄ 1M en medio básico 1M NaOH. El producto fue desalado con la resina DOWEX 50 (H+) y luego co-evaporada con metanol en medio ácido. El producto de reacción seco fue posteriormente acetilado en anhídrido acético durante 2 horas a 100 °C para obtener finalmente los alditol acetatos parcialmente metilados (PMMAs)

Cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa (GC-MS)

El análisis de los PMMAs fue realizado en un cromatógrafo Shimadzu GC-17 con una columna ZB-5 acoplado a un espectrómetro de masa GCMSQP 5050A operando a 70 eV. Flujo de Helio: 0.8 mL min⁻¹, temperatura del inyector: 270 °C. Su utilizó un programa desde 160 °C a 220 °C con una rampa de 1 °C min⁻¹, y luego hasta 250 °C a una velocidad de 2°C min⁻¹. Los espectros de masas fueron adquiridos en un rango de 40-500 m/z. La identificación de los PMMAs se realizó comparando los espectros promediados de cada señal, con los espectros depositados en la base de datos actualizada del CCRC (Centro de Investigación de Carbohidratos Complejos) (<https://www.crcr.uga.edu/specdb/ms/pmaa/pframe.html>).

Espectrometría de masa MALDI

Se utilizó un equipo UltraFlex II MALDI-TOF (Bruker Daltonics GmbH) con una placa MTP 384 Polished steel (Bruker Daltonics GmbH) y ácido 2,5 dihidroxibenzoico (DHB) como matriz, en una relación matriz-analito 1:1. El sistema fue operado a través del programa FlexControl 3.0 (Bruker Daltonics GmbH). Los espectros fueron adquiridos en modo de ionización positiva y negativa. El equipo fue calibrado utilizando una mezcla Peptide Calibration Standard II (Bruker Daltonics GmbH) (Bradiquinina 1-7 757.3992, Angiotensina II 1046.5418, Angiotensina I 1296.6848, Sustancia P 1347.7354, Bombesina 1619.8223, ACTH clip 1-17 2093.0862, ACTH clip 18-39 2465.1983, Somatostatina 28 3147.4710), β-ciclodextrina 1135.0, γ- ciclodextrina 1297.1

Espectrometría de masa ESI-QTOF

Se utilizó un equipo microTOF-Q II (Bruker Daltonics GmbH) en modo de ionización negativa.

Análisis por Resonancia Magnética Nuclear

La muestra (10 mg) se solubilizaron en 0.5 mL D₂O 99.9 %, y se liofilizó en tres ciclos seguidos. Se utilizó un equipo Bruker Avance II 500 de 125.77 (¹³C) y 500.13 (¹H) MHz, equipado con una Probe de 5-mm. Los espectros fueron adquiridos a 25°C y calibrados con acetona como estándar interno con los desplazamientos químicos 31.1 ppm (¹³C), 2.22 ppm (¹H). Los experimentos realizados ¹³C, ¹H, HSQC, HSQC, COSY y TOCSY fueron adquiridos utilizando las secuencias de pulsos estándares.

Determinación de capacidad de biosorción de metales

Se utilizaron soluciones stock de metal: $ZnCl_2$ en buffer HEPES 20mM pH 7.5 buffer; $Pb(NO_3)_2$ en buffer acetato pH 5.5; $CuSO_4 \cdot 6H_2O$ en buffer acetato 20 mM pH 5.5 y $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ en buffer acetato 20 mM pH 4. Se utilizaron soluciones acuosas del polisacárido (7-8 mg/mL) conteniendo 1.5 mM de la sal del metal correspondiente. Las soluciones de polisacárido conteniendo el metal en estudio fueron incubadas con agitación durante 24 h a temperatura ambiente. El polisacárido fue separado mediante diálisis utilizando Sep-Pack Ultrafree® MC MWCO 30 kDa por centrifugación a 10,000 rpm. La concentración de metal remanente se analizó por espectroscopía de absorción atómica (Shimadzu AA6800 AAS) y la capacidad de biosorción se calculó como la diferencia entre la concentración de la solución obtenida luego de la separación del polisacárido, respecto de la concentración inicial.

$$q \text{ (mg g}^{-1}\text{)} = V (C_i - C_f)/m$$

Donde q es la capacidad de biosorción, V es el volúmen de la solución expresado en litros, C_i y C_f son las concentraciones inicial y final respectivamente expresadas en $mg L^{-1}$ y m es la masa de polisacárido expresada en g.

La eficiencia de biosorción de metales se calculó según:

$$\%E = 100 \times (C_i - C_f) / C_i$$

Electroforesis en gel de poliacrilamida

Los extractos proteicos fueron analizados en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10 % en condiciones desnaturizante (Laemmli, 1970) en un equipo BioRad Mini-Protean II (BioRad Laboratories) a voltaje constante (110 V) con marcadores de peso molecular LMW Marker kit (GE Healthcare). Se utilizaron los marcadores de peso molecular fosforilasa b (97.4 kDa) albumina (66.2 kDa) Ovoalbumina (45 kDa), anhidrasa carbonica (30 kDa), inhibidor de tripsina (20.1 kDa) y α -lactoalbumina (14.4 kDa). La concentración de muestra sembrada fue aproximadamente 30 μ g, determinada por la técnica colorimétrica de Bradford (Bradford 1976).

Tinción de geles con Azul de Coomassie

Los geles de SDS-PAGE fueron fijados en 30% (v/v) EtOH, 2% (v/v) ácido fosfórico durante 30 min. Se lavaron durante 20 min con solución 2% (v/v) ácido fosfórico (x 3) y luego se incubaron con solución 18% (v/v) MeOH, 17% (w/v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2% (v/v) ácido fosfórico durante 5 h. Se adicionó Coomassie Coloidal G-250 hasta concentración de 0.05% m/v y se incubó hasta aparición de bandas coloreadas. Se realizaron sucesivos lavados con agua bidestilada hasta desaparición del color de fondo.

Tinción con Nitrato de Plata

Los geles SDS-PAGE fueron fijados en MeOH 50%, CH_3COOH 10% durante 10 min, se lavaron con H_2O durante 10 min y se incubaron en solución de 10% glutaraldehído durante 15 min. Posteriormente, se realizaron dos lavados con H_2O durante 30 min y se incubaron durante 15 min con solución NaOH 0.02M, NH_3 0.5M, AgNO_3 0.8 % m/v. Luego se realizó un lavado con H_2O durante 10 min y se incubaron rápidamente con solución reveladora (formaldehído 0.037%, ácido cítrico 0.1 mg mL^{-1}) hasta aparición de bandas. La reacción se detuvo incubando el gel en solución de ácido acético al 10% y finalmente se lavó con H_2O durante 30 min.

β -Eliminación reductiva

La banda de gel SDS-PAGE conteniendo la proteína, se cortó y se dividió en porciones (aproximadamente 2x2 mm). Las porciones se lavaron en forma secuencial con ACN y buffer NH_4HCO_3 50 mM. Seguidamente se sometieron a β -eliminación reductiva en una solución de NaOH 0.05 M conteniendo NaBH_4 1 M durante 16 h en baño a 50 °C. La solución conteniendo los *O*-glicanos liberados fue separada, liofilizada, y resolubilizada en H_2O . Los productos de reacción fueron purificados en micro-columna de resina DOWEX 50X (H^+) (Fluka) La solución resultante fue co-evaporada tres veces con metanol conteniendo ácido acético 2% v/v.

Digestión con PNGasa F

La banda de gel SDS-PAGE conteniendo la proteína fue cortada y dividida en porciones más pequeñas (aproximadamente 1x1 mm), lavadas en forma secuencial con ACN y buffer NH_4HCO_3 50 mM, y digeridas con la PNGasa F (New England's BioLabs) en relación enzima/muestra 1:100 en buffer NH_4HCO_3 50 mM, pH 7.8 a 37 °C durante 16 h. La enzima fue separada por filtración en Sep-Pack Ultrafree McFilter (Mr 5000), y la mezcla de oligosacáridos fue liofilizada y solubilizada en ácido fórmico 1 % (v/v) a temperatura ambiente durante 40 min. Finalmente la muestra fue liofilizada.

Cromatografía de afinidad por WGA-Sepharose

Se utilizó una por microcolumna (Ghosh *et al.*, 2004) de WGA-Sepharose (Sigma) de 1 mL. La columna se equilibró con buffer Tris 20 mM pH 7.5 (3 x 5 mL) conteniendo 0.5 M NaCl, 1 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 . Se sembró la muestra (50 uL) conteniendo 60 ug de extracto proteico se dejó en contacto 2 h y se eluyó con buffer Tris 20 mM pH 7.5 conteniendo 1M NaCl, 1mM CaCl_2 , 1mM MgCl_2 (3 x 10 mL). Las proteínas retenidas se eluyeron con el mismo buffer conteniendo 0.5M *N*-Acetil-D-Glucosamina (3 x 5 mL). La fracción retenida se dializó contra H_2O utilizando una membrana de MWCO 3.5 kDa Spectra/Por® (Repligen).

Análisis de *N*- glicosilación sitio específica.

La banda de gel SDS-PAGE correspondiente a la proteína fue cortada y dividida en pequeñas porciones (1x1 mm aproximadamente) y sometida a *N*-deglicosilación utilizando la enzima PNGasa F (Zhu *et al.*, 2014). Se retiró el sobrenadante y las porciones de gel fueron lavadas en forma secuencial con ACN y buffer NH_4HCO_3 50 mM. Luego, se trataron con 10 mM DTT en 50 mM NH_4HCO_3 a 55 °C durante 30 min. Se lavaron con ACN y se procedió a la alquilación con 55 mM IAA en 50 mM NH_4HCO_3 durante 20 min a temperatura ambiente, en oscuridad. Se lavaron con 50 mM NH_4HCO_3 durante 10 min seguido de ACN durante 5 min, y por último se llevaron a seco en SpeedVac. La digestión se realizó con tripsina en relación 1:100 enzima:muestra en buffer NH_4HCO_3 50 mM, pH 7.8 e incubando a 37 °C durante 16 h. Finalmente, la mezcla de digestión enzimática fue liofilizada y resuspendida en 50 uL de H_2O y desalada en SPE-C18 en un microtip. La microcolumna se lavó con 300 uL de ACN 70%, y 300 uL de H_2O conteniendo 0.1% TFA. Posteriormente, se sembró la muestra en la microcolumna y se

lavó con 200 uL de H₂O conteniendo 0.1% TFA. Los péptidos retenidos fueron eluidos con 300 uL ACN al 65%, se liofilizaron y se conservaron a -20 °C hasta su análisis por espectrometría de masa ESI-Orbitrap.

Obtención de glicopéptidos

La banda de gel SDS-PAGE conteniendo la proteína fue cortada, dividida en porciones más pequeñas (aproximadamente 1x1 mm) y lavada en forma secuencial con ACN y buffer NH₄HCO₃ 50 mM y se trataron con 10 mM DTT en 50 mM NH₄HCO₃ a 55 °C durante 30 min. Se lavaron con ACN y se procedió a la alquilación con 55 mM IAA en 50 mM NH₄HCO₃ durante 20 min a temperatura ambiente, en oscuridad. Las porciones de gel se lavaron con 50 mM NH₄HCO₃ durante 10 min seguido de ACN durante 5 min, y por último se llevaron a seco en SpeedVac. La digestión se realizó con la proteasa (tripsina y/o GluC V8) en relación 1:200 enzima/muestra en buffer NH₄HCO₃ 50 mM, pH 7.8 e incubando a 37 °C durante 16 h. Finalmente, la mezcla de digestión enzimática fue liofilizada.

Enriquecimiento de glicopéptidos

La mezcla resultante de la digestión triptica se enriqueció en glicopéptidos utilizando la técnica de *Cotton-HILIC* (Selman *et al.*, 2011). La mezcla se solubilizó en 50 uL de ACN 85% - H₂O 15%, y se sembró en un cartucho de SPE-HILIC equilibrado en la misma solución. Se lavó con 25 uL de ACN 85% - H₂O 14% - 1% TFA y la fracción enriquecida en glicopéptidos se eluyó con 25 uL H₂O. Esta última fracción se liofilizó y previo al análisis por espectrometría de masa se solubilizó en 5 uL ACN 50% - 49% H₂O - 1% TFA.

Análisis de péptidos y glicopéptidos por espectrometría de masa

Se utilizó un equipo nanoLC 1000 acoplado a un espectrómetro de masa EASYSpray QExactive (ThermoScientific) con analizador Orbitrap y celda de colisión HCD. Se utilizó la columna EasySpray-PepMap RSLC C18. La separación se realizó con un gradiente lineal de 5% a 35% de solvente B en 75 min, a un flujo de 300 nL/min (fase móvil A: H₂O - ácido fórmico 0,1%; fase móvil B: ACN - ácido fórmico 0,1%).

Para la ionización en modo positivo, se utilizó un voltaje spray de (+) 3.5 kV y una temperatura del capilar de 275 °C; para modo negativo el voltaje spray fue de (-) 1.5 kV. y una temperatura del capilar de 250 °C. Para el análisis full MS, en ambos casos se empleó una resolución de 70000, se utilizó para el lanzamiento de cada espectro una acumulación iónica de $3e^6$ y un tiempo de acumulación iónica de máximo de 60 ms. Se realizó el scan de iones barriendo una ventana espectral de 400 – 2000 m/z .

Los espectros MS/MS, se adquirieron en modo data-dependiente con un escaneo de los 15 picos principales en cada ciclo. Se empleó una resolución de 17500, se utilizó para el lanzamiento de cada espectro una acumulación iónica de $1e^5$ y un tiempo de acumulación iónica de máximo de 250 ms. Durante la selección de iones para conducir a su fragmentación se aplicó una ventana de aislamiento de m/z 1.6. Se realizó el scan de iones barriendo una ventana espectral con posición fijada desde 100 m/z y con límite de m/z variable en cada scan. La energía de colisión normalizada (NCE) se ajustó a 27.

Las secuencias de las proteínas se obtuvieron de la base de datos actualizada de UNIPROT. La identificación de proteínas se realizó mediante el Proteome Discoverer 2.1 (Thermo Scientific). Las tolerancias de masa para MS y MS/MS fueron 10 ppm y 0.02 Da respectivamente. Como modificación estática se estableció la carbamidometilación de los residuos de cisteína y como modificación dinámica, la oxidación de la metionina. La tolerancia en masa del ión precursor fue de 10 ppm y la tolerancia de la masa del fragmento fue de 20 ppm. La deconvolución de iones fue realizada mediante el software Xtract en Thermo Xcalibur 3.0.63 (Thermo Scientific). La búsqueda de glicopéptidos se realizó mediante la herramienta de búsqueda automática, Byonic™ (ProteinMetrics). Todas las identificaciones de glicopéptidos se curaron manualmente. Para la anotación manual, los datos se convirtieron en archivos de texto mediante la herramienta MS-Convert Tool.

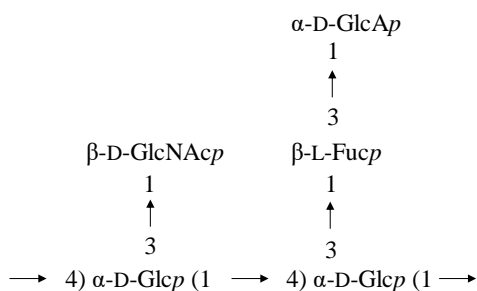
Conclusiones

El presente trabajo de tesis planteó como objetivo general la puesta a punto de metodologías que permitan caracterizar glicoconjugados utilizando la espectrometría de masa. La adquisición a través de la ANPCyT de equipamiento de e.m de alta resolución (MALDI-TOF y nanoHPLC-ESI-Orbitrap) motivo de la creación del CEQUIBIEN (Centro de Estudios Químicos y Biológicos por Espectrometría de Masa), nos impulsó a investigar la utilidad de dicho equipamiento para un área en la cual no existían antecedentes en el país y que escasos laboratorios en el mundo dominan. En este contexto, el trabajo se desarrolló en tres etapas:

1. El estudio estructural del exopolisacárido de *Pseudomonas veronii* 2E.

En esta primera etapa además de utilizar técnicas tradicionales para la purificación de diferentes fracciones, se caracterizó el exopolisacárido mayoritario, denominado EPO2, utilizando microscopía de barrido electrónico, diferentes tipos de hidrólisis, permetilación, espectroscopía IR y RMN mono y bidimensional.

Los resultados indicaron que EPO2 presenta sustitución con grupos acetilo, característica común en muchos polisacáridos ya que favorece el mantenimiento en solución del biofilm bacteriano, sin embargo, la acetilación tenía como consecuencia una alta viscosidad de la solución del polisacárido que obstaculizaba la completa asignación de las señales por RMN. Con el fin de alcanzar una mayor resolución de los espectros, la muestra fue desacetilada, sin embargo, este tratamiento no condujo a mejorar la calidad de los espectros significativamente debido a que disminuía la concentración en solución de EPO2 como consecuencia del notorio aumento de las interacciones hidrofóbicas que conducen a la precipitación del polisacárido a temperatura ambiente. Por este motivo, resultó de especial utilidad el análisis por espectrometría de masa MALDI-TOF junto con MS/MS, de los oligosacáridos obtenidos por hidrólisis parcial, para postular como unidad repetitiva:



Dado que trabajos previos habían demostrado que el material polimérico extracelular (EPS) de *P. veronii* 2E, la fracción total de exopolisacáridos y también el lipopolisacárido aislado del EPS, presentan capacidad de biosorción de Cd (II) en solución, resultó muy interesante estudiar la capacidad de biosorción de diferentes metales del polisacárido producido por *P. veronii* 2E, tanto en su forma purificada EPO2, como en el extracto polisacárido total, utilizando espectroscopia de absorción atómica. Los valores más altos de biosorción con EPO2 fueron obtenidos para Fe(II) y Pb(II) con valores de 20.57 mg/g y 10.20 mg/g respectivamente, seguido de Zn(II) con 6.09 mg/g y Cu(II) con 4.6 mg/g y con una eficiencia de biosorción para Fe(II) de 70%. El extracto total de polisacáridos presentó una capacidad de biosorción menor para todos los metales analizados.

Estos resultados sugirieron que la presencia en EPO2, de una ramificación constituida por el disacárido α -D-GlcpA-(1-3)-L-Fucp de carácter ácido, podría ser responsable de la retención de los cationes metálicos y proyecta a la posibilidad de sintetizar nuevos materiales biomiméticos conteniendo dicha estructura.

2. Estudio de la glicosilación de la glicoproteína Capa-S de diferentes cepas de *Lactobacillus kefir*

En una segunda etapa, y con el fin de desarrollar técnicas de glicoproteómica, se realizó el estudio de la glicoproteína capa S de cuatro cepas diferentes de *L. kefirii*: dos de ellas con características no -agregantes y otras dos, agregantes.

El primer estudio se realizó sobre la proteína capa S de *L. kefir* CIDCA 83111. En este caso, luego de liberación de los *O*-glicanos por β -eliminación, su estructura fue analizada por e.m. MALDI-TOF. Posteriormente, avanzando en la complejidad del análisis glicoproteómico, se analizaron los glicopéptidos obtenidos por digestión con proteasas por nanoHPLC-ESI-Orbitrap. Este análisis realizado en modo de ionización positivo y negativo permitió detectar varias familias de iones de diferente carga correspondientes a dos péptidos glicosilados: $^{147}\text{SASASSASSASSTE}^{160}$ sustituido con 20 a 34 unidades de Glc y 1-3 unidades de GalA y el péptido $^{469}\text{DKTTTSAE}^{476}$ sustituido con 4 a 7 unidades de Glc y 1-2 unidades de GalA.

Pero el análisis de la secuencia proteica mostraba la presencia de 9 sitios potenciales de *N*-glicosilación. Aunque este tipo de modificación pos-traducciona no había sido descrita en *Lactobacillus* se decidió investigar su presencia.

En este caso el análisis glicoproteómico fue fundamental para identificar tres péptidos *N*-glicosilados: ²³³IADTN²³⁷ATNGQK²⁴³; ²⁰³TVTDATPYAN²¹²DTFK²¹⁶ y ¹²⁵SVTAFAGGIASFNTTTAPAAK¹⁴⁶. En todos los casos se determinaron estructuras *N*-glicosídicas truncadas, y las estructuras fueron corroboradas por la presencia de iones reporteros de azúcares en los MS/MS correspondientes.

En este caso resultó muy interesante demostrar la complementariedad de los modos de ionización positivo y negativo para la identificación de glicopéptidos en baja abundancia. Durante el análisis de éste tipo de señales minoritarias, es común que los correspondientes espectros MS/MS no proporcionen la información suficiente para caracterizar completamente la identidad del péptido, por lo cual, la combinación de los dos modos de ionización contribuyó a su confirmación.

Se continuó con el estudio de la proteína capa S de *L. kefir* JCM 5818, la otra cepa no-agregante. En este caso, el análisis de la *O*-glicosilación fue similar, sin embargo los resultados mostraron que la experiencia adquirida permitió que se obtuvieran espectros de óptima calidad. Por lo tanto, en este caso, la estrategia empleada consistió en la identificación en los espectros MS/MS de iones de la serie *b* - y provenientes de la fragmentación del glicopéptido. Aún más, fue posible detectar fragmentos del tipo Y, provenientes de la conservación del esqueleto peptídico con sucesivas pérdidas de los monosacáridos que componen el glicano, hasta encontrar en última instancia, el péptido desnudo. Esta cepa presenta el péptido análogo (147-170) conteniendo el motivo SSASSASSA *O*-glicosilado en promedio por sitio modificado, con ocho unidades de hexosa. Sin embargo, a diferencia de *L. kefir* CIDCA 83111, estos glicopéptidos están compuestos solo por unidades de glucosa.

Posteriormente, también resultó interesante el estudio de *N*-glicosilación en esta glicoproteína. Pero en este caso el abordaje metodológico fue diferente: en un primer paso se realizó una purificación de la GP por afinidad a WGA-Sepharosa. El material retenido en la lectina fue analizado por SDS-PAGE y la banda detectada fue caracterizada por un estudio proteómico clásico. Una vez que se aseguró la identidad de la GP retenida en la lectina, para determinar los sitios de *N*-sustitución, la banda correspondiente se sometió a digestión con PNGasa F para liberar los *N*-glicanos y detectar las diferencias de masa provenientes de la conversión asparagina/ácido aspártico. Por medio de esta estrategia,

se pudieron determinar dos *N*-glicositos: el primero, ubicado en el péptido NVAVN⁵⁵GTNALYTK y el segundo, en el péptido DAALTSLN⁴⁵⁷NTVK. A continuación los *N*-oligosacáridos liberados por digestión enzimática, fueron sometidos a permetilación y analizados por nanoHPLC-ESI-Orbitrap. En este caso, los MS/MS de los iones correspondientes permitieron determinar la presencia de oligosacáridos de estructura HexNac₄-Hex₄ y HexNac₄-Hex_{3,5}-dHex. Estas estructuras fueron confirmadas mediante el análisis por e.m. MALDI-TOF.

Para completar el análisis, se estudiaron las proteínas capa S de las cepas *L. kefir* CIDCA 8348 y *L. kefir* CIDCA 8321, que presentan ambas un comportamiento de auto-agregación.

En este caso se emplearon técnicas de glicómica utilizando e.m. MALDI para la determinación estructural de los *O*-glicanos liberados y posteriormente se realizó el estudio de glicopéptidos por nanoHPLC-ESI. Los experimentos de MS² de los iones más abundantes conteniendo los iones diagnóstico de glicosilación mostraron que las señales obtenidas para las muestras provenientes de ambas cepas, corresponden al péptido 125-170 conteniendo el motivo SASASSASSA descrito como secuencia de *O*-glicosilación en las proteínas capa S de *L. kefir* anteriormente determinadas. Sin embargo, fue interesante notar, que en ningún caso fue posible obtener resultados cuando se extrajeron los cromatogramas iónicos en función de iones reporteros de *N*-glicosilación. La ausencia de este tipo de glicosilación diferencia marcadamente a las glicoproteínas en estudio de las proteínas capa S caracterizadas anteriormente en las cepas no-agregantes, lo cual abre un nuevo interrogante sobre el rol de los *N*-glicanos en este comportamiento.

3. Estudio de glicoproteínas de clara de huevo.

Como un nuevo avance en el tipo de estudio por EM, se propuso analizar, como ejemplo de sistema proteico complejo, la clara de huevo de gallina (CEW), con el fin de determinar las ventajas y limitaciones de la *N*-glicoproteómica en comparación con otras técnicas. El análisis fue conducido mediante dos abordajes, el primero, realizado sobre el material total obtenido como extracto después de la precipitación de proteínas de CEW, y el segundo, sobre una proteína aislada utilizando como modelo de glicoproteína, ovotransferrina.

El análisis del extracto proteico de CEW condujo a la identificación de un total de 34 proteínas, de las cuales 19 de ellas fueron identificadas glicosiladas. Dentro de este último grupo, 6 de las glicoproteínas identificadas en este trabajo (Heat shock cognate 71 kDa protein, Vimentin (Fragment), |E1BY93| Uncharacterized protein, Transforming growth factor beta-2 proprotein, ITA6_CHICK Integrin alpha-6, VIT2_CHICK Vitellogenin-2), representan dentro de la composición total de CEW el grupo de proteínas de menor abundancia. Este resultado constituyó la primera descripción de la glicosilación de las proteínas de baja abundancia en CEW.

Los resultados indicaron que la identificación de la ovotransferrina aislada y en la muestra de CEW fue consistente, asegurando la calidad de los resultados obtenidos cuando la muestra se analiza desde el extracto proteico total y resaltando que es posible lograr la identificación de la proteína sin necesidad de introducir pasos previos de purificación en el tratamiento de la muestra. El análisis de la ovotransferrina aislada por SDS-PAGE permitió determinar la presencia del péptido 634-641 modificado en N⁶³⁷ glicosilado con glicofomas del tipo HexNAc₅₋₇Hex₃₋₄, mientras que el péptido 480-493 modificado en N⁴⁹² presentó un patrón de glicofomas más heterogéneo donde fue posible determinar 25 glicofomas entre las cuales se identificó la presencia de desoxihexosa y ácido siálico en su composición, motivos estructurales que no habían sido descritos previamente como componentes de los *N*-glicanos de ovotransferrina. Cuando se estudió la glicosilación de ovotransferrina en la muestra compleja de CEW, pudo ser determinado únicamente el sitio de glicosilación N492 con las glicofomas mayoritarias probablemente debido a la baja eficiencia de ionización de los glicopéptidos en comparación con los péptidos no modificados, lo cual conlleva a una baja relación señal-ruido para estas especies cuando la muestra es una mezcla compleja.

Sin embargo, debe destacarse que la metodología puesta a punto para la determinación de la glicosilación de CEW a nivel glicoproteoma se centra principalmente en la gran capacidad de análisis integrado que permite elucidar en simultaneo los sitios de glicosilación conjuntamente con la información estructural de los glicanos asociados a cada péptido modificado. Y a pesar de que estructuras minoritarias pudieran perderse en el análisis de sistemas glicoproteicos complejos, la información obtenida mediante esta estrategia representa un abordaje altamente valioso que permite expandir la comprensión de funcionalidades, bioactividades y la alergenicidad derivada de las glicoproteínas presentes en CEW, lo cual contribuiría al desarrollo de nuevos métodos de procesamiento de CEW que impliquen una potencial reducción de los efectos adversos durante su

consumo. Por otro lado, es igualmente importante agregar que esta metodología involucra un procesamiento simple del material de partida traducándose en menores tiempos de análisis, lo que lo hace útil para ser utilizado en otros sistemas glicoproteicos complejos.

De esta forma, durante el desarrollo de esta tesis, comenzando con un estudio estrictamente glicómico de un polisacárido, el abordaje metodológico fue evolucionando paulatinamente, logrando el análisis de oligosacáridos presentes en proteínas, para luego desarrollar un análisis de glicopéptidos que combinó el estudio de la estructura de los glicanos conjuntamente con el sitio de glicosilación de glicoproteínas aisladas. Finalmente, fue interesante lograr el análisis de un sistema glicoproteómico complejo como el de la clara de huevo, en donde fue necesario centrarse en el desarrollo de estrategias que permitan manipular y procesar un enorme caudal de datos, teniendo en cuenta que las herramientas bioinformáticas para glicoproteómica aún se encuentran poco desarrolladas.

Trabajos Publicados

Cavallero, G. J., Malamud, M., Casabuono, A. C., Serradell, M. D. L. Á., Couto, A. S. (2017). A glycoproteomic approach reveals that the S-layer glycoprotein of *Lactobacillus kefir* CIDCA 83111 is O- and N-glycosylated. *Journal of Proteomics*. 162. 20-29. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2017.04.007>

Ferreira, M. L., Gerbino, E., Cavallero, G. J., Casabuono, A. C., Couto, A. S., Gomez-Zavaglia, A., Ramirez, S., Vullo, D. L. (2019). Infrared spectroscopy with multivariate analysis to interrogate the interaction of whole cells and secreted soluble exopolimeric substances of *Pseudomonas veronii* 2E with Cd(II), Cu(II) and Zn(II). *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 117820. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.117820>

Cavallero, G. J., Landoni, M., Couto, A. In depth N-glycoproteomics shows glyco-features in chicken egg white. *Food Bioscience*. (en prensa)

Referencias

- Agrawal, P. K. (1992). NMR Spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. *Phytochemistry*, 31(10), 3307–3330. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0031-9422\(92\)83678-R](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0031-9422(92)83678-R)
- Ahmed, F. E. (2008). Utility of mass spectrometry for proteome analysis: part I. Conceptual and experimental approaches. *Expert Review of Proteomics*, 5(6), 841–864. <https://doi.org/10.1586/14789450.5.6.841>
- Ahn, Y. H., Kim, J. Y., & Yoo, J. S. (2015). Quantitative mass spectrometric analysis of glycoproteins combined with enrichment methods. *Mass Spectrometry Reviews*, 34(2), 148–165. <https://doi.org/10.1002/mas.21428>
- Alagesan, K., Khilji, S. K., & Kolarich, D. (2017). It is all about the solvent: on the importance of the mobile phase for ZIC-HILIC glycopeptide enrichment. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 409(2), 529–538. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-0051-6>
- Alpert, A. J. (1990). Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. *Journal of Chromatography A*, 499, 177–196. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)96972-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)96972-3)
- Amicucci, M. J., Galermo, A. G., Guerrero, A., Treves, G., Nandita, E., Kailemia, M. J., ... Lebrilla, C. B. (2019). Strategy for Structural Elucidation of Polysaccharides: Elucidation of a Maize Mucilage that Harbors Diazotrophic Bacteria. *Analytical Chemistry*, 91(11), 7254–7265. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b00789>
- Amicucci, M. J., Nandita, E., & Lebrilla, C. B. (2019). Function without Structures: The Need for In-Depth Analysis of Dietary Carbohydrates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(16), 4418–4424. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b00720>
- Anumula, K. R., & Dhume, S. T. (1998). High resolution and high sensitivity methods for oligosaccharide mapping and characterization by normal phase high performance liquid chromatography following derivatization with highly fluorescent anthranilic acid. *Glycobiology*, 8(7), 685–694. <https://doi.org/10.1093/glycob/8.7.685>
- Anumula, K. R., & Taylor, P. B. (1992). A comprehensive procedure for preparation of

- partially methylated alditol acetates from glycoprotein carbohydrates. *Analytical Biochemistry*, 203(1), 101–108. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697\(92\)90048-C](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697(92)90048-C)
- Anzengruber, J., Pabst, M., Neumann, L., Sekot, G., Heintl, S., Grabherr, R., ... Schäffer, C. (2014). Protein O-glycosylation in *Lactobacillus buchneri*. *Glycoconjugate Journal*, 31(2), 117–131. <https://doi.org/10.1007/s10719-013-9505-7>
- Asperger, A., Marx, K., Albers, C., Molin, L., & Pinato, O. (2015). Low Abundant N-linked Glycosylation in Hen Egg White Lysozyme Is Localized at Nonconsensus Sites. *Journal of Proteome Research*, 14(6), 2633–2641. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5b00175>
- Aspinall, G. O. (1983). Classification of Polysaccharides. In G.O. Aspinall (Ed.), *The polysaccharides* (pp. 1–9). Academic Press.
- Åvall-Jääskeläinen, S., & Palva, A. (2005). *Lactobacillus* surface layers and their applications. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(3), 511–529. <https://doi.org/10.1016/j.fmre.2005.04.003>
- Balzarini, J. (2006). Inhibition of HIV entry by carbohydrate-binding proteins. *Antiviral Research*, 71(2-3 SPEC. ISS.), 237–247. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2006.02.004>
- Banazadeh, A., Veillon, L., Wooding, K. M., Zabet-Moghaddam, M., & Mechref, Y. (2017). Recent advances in mass spectrometric analysis of glycoproteins. *Electrophoresis*, 38(1), 162–189. <https://doi.org/10.1002/elps.201600357>
- Bauer, Stefan. (2012). Mass Spectrometry for Characterizing Plant Cell Wall Polysaccharides. *Frontiers in Plant Science*. 45 (3) <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00045>
- Benedé, S., López-Expósito, I., Molina, E., & López-Fandiño, R. (2015). Egg proteins as allergens and the effects of the food matrix and processing. *Food & Function*, 6(3), 694–713. <https://doi.org/10.1039/C4FO01104J>
- Bern, M., Kil, Y. J., & Becker, C. (2012). Byonic: advanced peptide and protein

- identification software. *Current Protocols in Bioinformatics, Chapter 13, Unit13.20-Unit13.20*. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi1320s40>
- Birghila, S., Bratu, M., Prajitura, C., Roncea, F., & Negreanu-Pirjol, T. (2015). Spectrophotometric Method for the Determination of Total Proteins in Egg White Samples. *Revista de Chimie, 66*, 378–381.
- Björndal, H., Lindberg, B., & Svensson, S. (1967). Mass spectrometry of partially methylated alditol acetates. *Carbohydrate Research, 5*(4), 433–440. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)81115-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)81115-5)
- Blundell, C. D., Reed, M. A. C., Overduin, M., & Almond, A. (2006). NMR spectra of oligosaccharides at ultra-high field (900 MHz) have better resolution than expected due to favourable molecular tumbling. *Carbohydrate Research, 341*(12), 1985–1991. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2006.05.017>
- Bock, K., Pedersen, C., & Pedersen, H. (1984). *Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Data for Oligosaccharides* (R. S. Tipson & D. B. T.-A. in C. C. and B. Horton, Eds.). [https://doi.org/10.1016/S0065-2318\(08\)60125-0](https://doi.org/10.1016/S0065-2318(08)60125-0)
- Bolla, P. A., Sanz, A., Huggias, S., Ruggera, J. F., Serradell, M. A., & Casella, M. L. (2018). Regular arrangement of Pt nanoparticles on S-layer proteins isolated from *Lactobacillus kefir*: synthesis and catalytic application. *Molecular Catalysis*. <https://doi.org/10.1016/j.mcat.2018.12.011>
- Bourgoin-Voillard, S., Leymarie, N., & Costello, C. E. (2014). Top-down tandem mass spectrometry on RNase A and B using a Qh/FT-ICR hybrid mass spectrometer. *Proteomics, 14*(10), 1174–1184. <https://doi.org/10.1002/pmic.201300433>
- Bowie, J. H., Brinkworth, C. S., & Dua, S. (2002). Collision-induced fragmentations of the (M-H)⁻ parent anions of underivatized peptides: An aid to structure determination and some unusual negative ion cleavages. *Mass Spectrometry Reviews, 21*(2), 87–107. <https://doi.org/10.1002/mas.10022>
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of proteindye binding. *Analytical Biochemistry 72*: 248–254.

- Brinkworth, C. S., Dua, S., McAnoy, A. M., & Bowie, J. H. (2001). Negative ion fragmentations of deprotonated peptides: backbone cleavages directed through both Asp and Glu. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, *15*(20), 1965–1973. <https://doi.org/10.1002/rcm.457>
- Broussard, A. C., & Boyce, M. (2019). Life is sweet: the cell biology of glycoconjugates. *Molecular Biology of the Cell*, *30*(5), 525–529. <https://doi.org/10.1091/mbc.E18-04-0247>
- Bulet, P., Hegy, G., Lambert, J., Van Dorsselaer, A., Hoffmann, J. A., & Hetru, C. (1995). Insect immunity. The inducible antibacterial peptide diptericin carries two O-glycans necessary for biological activity. *Biochemistry*, *34*(22), 7394–7400. <https://doi.org/10.1021/bi00022a012>
- Burley, R. W., & Vadehra, D. V. (1989). *The avian egg : chemistry and biology*. New York: Wiley.
- Carasi, P., Trejo, F. M., Pérez, P. F., De Antoni, G. L., & Serradell, M. de los A. (2012). Surface proteins from *Lactobacillus kefir* antagonize in vitro cytotoxic effect of *Clostridium difficile* toxins. *Anaerobe*, *18*(1), 135–142. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2011.11.002>
- Casillo, A., Ståhle, J., Parrilli, E., Sannino, F., Mitchell, D. E., Pieretti, G., ... Corsaro, M. M. (2017). Structural characterization of an all-aminosugar-containing capsular polysaccharide from *Colwellia psychrerythraea* 34H. *Antonie van Leeuwenhoek*, *110*(11), 1377–1387. <https://doi.org/10.1007/s10482-017-0834-6>
- Caubet, J.-C., & Wang, J. (2011). Current understanding of egg allergy. *Pediatric Clinics of North America*, *58*(2), 427–xi. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2011.02.014>
- Cech, N. B., & Enke, C. G. (2001). Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals. *Mass Spectrometry Reviews*, *20*(6), 362–387. <https://doi.org/10.1002/mas.10008>
- Cescutti, P., Cuzzi, B., Herasimenka, Y., & Rizzo, R. (2013). Structure of a novel exopolysaccharide produced by *Burkholderia vietnamiensis*, a cystic fibrosis opportunistic pathogen. *Carbohydrate Polymers*, *94*(1), 253–260.

- <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.01.047>
- Cescutti, P., Toffanin, R., Fett, W. F., Osman, S. F., Pollesello, P., & Paoletti, S. (1998). Structural investigation of the exopolysaccharide produced by *Pseudomonas flavescens* strain B62. *European Journal of Biochemistry*, *251*(3), 971–979. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1998.2510971.x>
- Chalkley, R. J., & Clauser, K. R. (2012). Modification site localization scoring: strategies and performance. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, *11*(5), 3–14. <https://doi.org/10.1074/mcp.R111.015305>
- Chen, C.-C., Su, W.-C., Huang, B.-Y., Chen, Y.-J., Tai, H.-C., & Obena, R. P. (2014). Interaction modes and approaches to glycopeptide and glycoprotein enrichment. *Analyst*, *139*(4), 688–704. <https://doi.org/10.1039/C3AN01813J>
- Ciucanu, I. (2006). Per-*O*-methylation reaction for structural analysis of carbohydrates by mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, *576*(2), 147–155. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.06.009>
- Ciucanu, I., & Kerek, F. (1984a). A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydrate Research*, *131*(2), 209–217. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0008-6215\(84\)85242-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0008-6215(84)85242-8)
- Ciucanu, I., & Kerek, F. (1984b). Rapid and simultaneous methylation of fatty and hydroxy fatty acids for gas—liquid chromatographic analysis. *Journal of Chromatography A*, *284*, 179–185. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)87813-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)87813-4)
- Claus, H., Akça, E., Debaerdemaeker, T., Evrard, C., Declercq, J.-P., Harris, J. R., ... König, H. (2005). Molecular organization of selected prokaryotic S-layer proteins. *Canadian Journal of Microbiology*, *51*(9), 731–743. <https://doi.org/10.1139/w05-093>
- Cooke, S. K., & Sampson, H. A. (1997). Allergenic properties of ovomucoid in man. *The Journal of Immunology*, *159*(4), 2026 LP – 2032. Retrieved from <http://www.jimmunol.org/content/159/4/2026.abstract>

- Cristobal, A., Marino, F., Post, H., van den Toorn, H. W. P., Mohammed, S., & Heck, A. J. R. (2017). Toward an Optimized Workflow for Middle-Down Proteomics. *Analytical Chemistry*, 89(6), 3318–3325. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b03756>
- D'Ambrosio, C., Arena, S., Scaloni, A., Guerrier, L., Boschetti, E., Mendieta, M. E., ... Righetti, P. G. (2008). Exploring the Chicken Egg White Proteome with Combinatorial Peptide Ligand Libraries. *Journal of Proteome Research*, 7(8), 3461–3474. <https://doi.org/10.1021/pr800193y>
- Dallas, D. C., Martin, W. F., Hua, S., & German, J. B. (2013). Automated glycopeptide analysis--review of current state and future directions. *Briefings in Bioinformatics*, 14(3), 361–374. <https://doi.org/10.1093/bib/bbs045>
- Davis, J. G., Zahnley, J. C., & Donovan, J. W. (1969). Separation and characterization of the ovoidinhibitors from chicken egg white. *Biochemistry*, 8(5), 2044–2053. <https://doi.org/10.1021/bi00833a039>
- Dedvisitsakul, P., Jacobsen, S., Svensson, B., Bunkenborg, J., Finnie, C., & Hägglund, P. (2014). Glycopeptide Enrichment Using a Combination of ZIC-HILIC and Cotton Wool for Exploring the Glycoproteome of Wheat Flour Albumins. *Journal of Proteome Research*, 13(5), 2696–2703. <https://doi.org/10.1021/pr401282r>
- Deepak, A. ., Thippeswamy, G., Shivakameshwari, M. ., & Salimath, B. P. (2003). Isolation and characterization of a 29-kDa glycoprotein with antifungal activity from bulbs of *Urginea indica*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 311(3), 735–742. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2003.10.056>
- DeLange, R. J., & Huang, T.-S. (1971). Egg White Avidin: iii. Sequence of the 78-residue middle cyanogen bromide peptide. Complete amino acid sequence of the protein subunit. *Journal of Biological Chemistry*, 246(3), 698–709. Retrieved from <http://www.jbc.org/content/246/3/698.abstract>
- Delfederico, L., Hollmann, A., Martínez, M., Iglesias, N. G., De Antoni, G., & Semorile, L. (2006). Molecular identification and typing of lactobacilli isolated from kefir grains. *Journal of Dairy Research*, 73(1), 20–27. <https://doi.org/DOI:10.1017/S0022029905001408>

- Dell, A., Galadari, A., Sastre, F., & Hitchen, P. (2010). Similarities and differences in the glycosylation mechanisms in prokaryotes and eukaryotes. *International Journal of Microbiology*, 2010, 148178. <https://doi.org/10.1155/2010/148178>
- Domon, B., & Costello, C. E. (1988). A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates. *Glycoconjugate Journal*, 5(4), 397–409. <https://doi.org/10.1007/BF01049915>
- Donot, F., Fontana, A., Baccou, J. C., & Schorr-Galindo, S. (2012). Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. *Carbohydrate Polymers*, 87(2), 951–962. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.08.083>
- DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Duus, J. Ø., Gotfredsen, C. H., & Bock, K. (2000). Carbohydrate Structural Determination by NMR Spectroscopy: Modern Methods and Limitations. *Chemical Reviews*, 100(12), 4589–4614. <https://doi.org/10.1021/cr990302n>
- Fenn, J. B. (2002). Electrospray ionization mass spectrometry: How it all began. *Journal of Biomolecular Techniques: JBT*, 13(3), 101–118. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19498975>
- Ferreira, M. L., Casabuono, A. C., Stacchiotti, S. T., Couto, A. S., Ramirez, S. A., & Vullo, D. L. (2017). Chemical characterization of *Pseudomonas veronii* 2E soluble exopolymer as Cd(II) ligand for the biotreatment of electroplating wastes. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 119, 605–613. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.10.013>
- Ferreira, M. L., Gerbino, E., Cavallero, G. J., Casabuono, A. C., Couto, A. S., Gomez-Zavaglia, A., & Vullo, D. L. (2019). Infrared spectroscopy with multivariate analysis to interrogate the interaction of whole cells and secreted soluble exopolimeric substances of *Pseudomonas veronii* 2E with Cd(II), Cu(II) and Zn(II). *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 117820. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.117820>

- Fishman, M. L., Cescutti, P., Fett, W. F., Osman, S. F., Hoagland, P. D., & Chau, H. K. (1997). Screening the physical properties of novel *Pseudomonas* exopolysaccharides by HPSEC with multi-angle light scattering and viscosity detection. *Carbohydrate Polymers*, 32(3), 213–221. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(97\)00012-X](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(97)00012-X)
- Freitas, F., Alves, V. D., & Reis, M. A. M. (2011). Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications. *Trends in Biotechnology*, 29(8), 388–398. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.03.008>
- Galermo, A. G., Nandita, E., Barboza, M., Amicucci, M. J., Vo, T.-T. T., & Lebrilla, C. B. (2018). Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Approach for Determining Glycosidic Linkages. *Analytical Chemistry*, 90(21), 13073–13080. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b04124>
- Garavaglia, L., Cerdeira, S. B., & Vullo, D. L. (2010). Chromium (VI) biotransformation by β - and γ -Proteobacteria from natural polluted environments: A combined biological and chemical treatment for industrial wastes. *Journal of Hazardous Materials*, 175(1), 104–110. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.09.134>
- Garrote, G., Abraham, A., & De Antoni, G. (2001). Chemical and microbiological characterisation of kefir grains. *The Journal of Dairy Research*, 68, 639–652. <https://doi.org/10.1017/S0022029901005210>
- Garrote, G., Delfederico, L., Bibiloni, R., Abraham, A., Pérez, P., Semorile, L., & De Antoni, G. (2004). Lactobacilli isolated from kefir grains: Evidence of the presence of S-layer proteins. *The Journal of Dairy Research*, 71, 222–230. <https://doi.org/10.1017/S0022029904000160>
- Geng, F., Huang, X., Majumder, K., Zhu, Z., Cai, Z., & Ma, M. (2015). Mass Spectrometry and Two-Dimensional Electrophoresis To Characterize the Glycosylation of Hen Egg White Ovomacroglobulin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(37), 8209–8215. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b02618>
- Geng, F., Wang, J., Liu, D., Jin, Y., & Ma, M. (2017). Identification of N-Glycosites in

- Chicken Egg White Proteins Using an Omics Strategy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(26), 5357–5364. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b01706>
- Ghosh, D., Krokhin, O., Antonovici, M., Ens, W., Standing, K. G., Beavis, R. C., & Wilkins, J. A. (2004). Lectin Affinity as an Approach to the Proteomic Analysis of Membrane Glycoproteins. *Journal of Proteome Research*, 3(4), 841–850. <https://doi.org/10.1021/pr049937f>
- Giansanti, F., Rossi, P., Teresa Massucci, M., Botti, D., Antonini, G., Valenti, P., & Seganti, L. (2002). Antiviral activity of ovotransferrin discloses an evolutionary strategy for the defensive activities of lactoferrin. In *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* (Vol. 80). <https://doi.org/10.1139/o01-208>
- Gilbert, A. B. (1971). The egg: its physical and chemical aspects. In D. J. Bell & B. M. Freeman (Eds.), *Physiology and Biochemistry of the Domestic Fowl* (pp. 1379–1399). New York: Academic Press.
- Goldberg, D., Bern, M., Parry, S., Sutton-Smith, M., Panico, M., Morris, H. R., & Dell, A. (2007). Automated N-Glycopeptide Identification Using a Combination of Single- and Tandem-MS. *Journal of Proteome Research*, 6(10), 3995–4005. <https://doi.org/10.1021/pr070239f>
- Golowczyc, M. A., Mobili, P., Garrote, G. L., Abraham, A. G., & De Antoni, G. L. (2007). Protective action of Lactobacillus kefir carrying S-layer protein against Salmonella enterica serovar Enteritidis. *International Journal of Food Microbiology*, 118(3), 264–273. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.042>
- Grill, E., Huber, C., Oefner, P., Vorndran, A., & Bonn, G. (1993). Capillary zone electrophoresis of p-aminobenzoic acid derivatives of aldoses, ketoses and uronic acids. *Electrophoresis*, 14, 1004–1010. <https://doi.org/10.1002/elps.11501401160>
- Guérin-Dubiard, C., Pasco, M., Mollé, D., Désert, C., Croguennec, T., & Nau, F. (2006). Proteomic Analysis of Hen Egg White. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(11), 3901–3910. <https://doi.org/10.1021/jf0529969>
- Guerrero, A., Lerno, L., Barile, D., & Lebrilla, C. B. (2015). Top-down analysis of highly

- post-translationally modified peptides by Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 26(3), 453–459. <https://doi.org/10.1007/s13361-014-1034-5>
- Guillard, M., Gloerich, J., Wessels, H. J. C. T., Morava, E., Wevers, R. A., & Lefeber, D. J. (2009). Automated measurement of permethylated serum N-glycans by MALDI-linear ion trap mass spectrometry. *Carbohydrate Research*, 344(12), 1550–1557. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carres.2009.06.010>
- Gupta, P., & Diwan, B. (2017). Bacterial Exopolysaccharide mediated heavy metal removal: A Review on biosynthesis, mechanism and remediation strategies. *Biotechnology Reports*, 13, 58–71. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.btre.2016.12.006>
- Guthals, A., Watrous, J. D., Dorrestein, P. C., & Bandeira, N. (2012). The spectral networks paradigm in high throughput mass spectrometry. *Molecular BioSystems*, 8(10), 2535–2544. <https://doi.org/10.1039/c2mb25085c>
- Hakomori, S.-I. (1964). A Rapid Permethylation of Glycolipid, and Polysaccharide Catalyzed by Methylsulfinyl Carbanion in Dimethyl Sulfoxide. *The Journal of Biochemistry*, 55(2), 205–208.
- Halfinger, B., Sarg, B., & Lindner, H. H. (2011). Evaluation of non-reductive β -elimination/Michael addition for glycosylation site determination in mucin-like O-glycopeptides. *Electrophoresis*, 32(24), 3546–3553. <https://doi.org/10.1002/elps.201100393>
- Han, L., & Costello, C. E. (2013). Mass spectrometry of glycans. *Biochemistry. Biokhimiia*, 78(7), 710–720. <https://doi.org/10.1134/S0006297913070031>
- Hanisch, F.-G., Jovanovic, M., & Peter-Katalinic, J. (2001). Glycoprotein Identification and Localization of O-Glycosylation Sites by Mass Spectrometric Analysis of Deglycosylated/Alkylaminylated Peptide Fragments. *Analytical Biochemistry*, 290(1), 47–59. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/abio.2000.4955>
- Hart-Smith, G., & Raftery, M. J. (2012). Detection and Characterization of Low Abundance Glycopeptides Via Higher-Energy C-Trap Dissociation and Orbitrap

- Mass Analysis. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 23(1), 124–140. <https://doi.org/10.1007/s13361-011-0273-y>
- Harvey, D. J., Wing, D. R., Küster, B., & Wilson, I. B. H. (2000). Composition of N-linked carbohydrates from ovalbumin and co-purified glycoproteins. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 11(6), 564–571. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1044-0305\(00\)00122-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1044-0305(00)00122-7)
- Hillenkamp, F., Karas, M., Beavis, R. C., & Chait, B. T. (1991). Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Biopolymers. *Analytical Chemistry*, 63(24), 1193A-1203A. <https://doi.org/10.1021/ac00024a716>
- Hsu, N.Y., Yang, W.B., Wong, C.-H., Lee, Y.C., Lee, R. T., Wang, Y.S., & Chen, C.-H. (2007). Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of polysaccharides with 2',4',6'-trihydroxyacetophenone as matrix. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 21(13), 2137–2146. <https://doi.org/10.1002/rcm.3072>
- Hu, H., Khatri, K., & Zaia, J. (2017). Algorithms and design strategies towards automated glycoproteomics analysis. *Mass Spectrometry Reviews*, 36(4), 475–498. <https://doi.org/10.1002/mas.21487>
- Hu, J., Yu, S., & Yao, P. (2007). Stable Amphoteric Nanogels Made of Ovalbumin and Ovotransferrin via Self-Assembly. *Langmuir*, 23(11), 6358–6364. <https://doi.org/10.1021/la063419x>
- Hu, S., Qiu, N., Liu, Y., Zhao, H., Gao, D., Song, R., & Ma, M. (2016). Identification and comparative proteomic study of quail and duck egg white protein using 2-dimensional gel electrophoresis and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight tandem mass spectrometry analysis. *Poultry Science*, 95(5), 1137–1144. <https://doi.org/10.3382/ps/pew033>
- Huang, Y., Mechref, Y., & Novotny, M. V. (2001). Microscale Nonreductive Release of O-Linked Glycans for Subsequent Analysis through MALDI Mass Spectrometry and Capillary Electrophoresis. *Analytical Chemistry*, 73(24), 6063–6069. <https://doi.org/10.1021/ac015534c>

- Huopalahti, R., López-Fandiño, R., Anton, M., & Schade, R. (Eds.). (2007). *Bioactive Egg Compounds*. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-37885-3>
- Hwang, H. S., Kim, B. S., Park, H., Park, H.-Y., Choi, H.-D., & Kim, H. H. (2014a). Type and branched pattern of N-glycans and their structural effect on the chicken egg allergen ovotransferrin: a comparison with ovomucoid. *Glycoconjugate Journal*, *31*(1), 41–50. <https://doi.org/10.1007/s10719-013-9498-2>
- Hwang, H. S., Kim, J. Y., Park, H., Jeong, J., Hyun, H., Yoon, T. J., & Kim, H. H. (2014b). Cleavage of the terminal N-acetylglucosamine of egg-white ovalbumin N-glycans significantly reduces IgE production and Th2 cytokine secretion. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *450*(4), 1247–1254. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.06.101>
- Hynönen, U., & Palva, A. (2013). Lactobacillus surface layer proteins: structure, function and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *97*(12), 5225–5243. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4962-2>
- Ian W. Sutherland. (2001). Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*, *174*(1), 3–9. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-1-3>
- Ilk, N., Egelseer, E. M., & Sleytr, U. B. (2011). S-layer fusion proteins--construction principles and applications. *Current Opinion in Biotechnology*, *22*(6), 824–831. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.05.510>
- Iyer, R. N., & Carlson, D. M. (1971). Alkaline borohydride degradation of blood group H substance. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *142*(1), 101–105. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-9861\(71\)90263-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-9861(71)90263-3)
- Jiang, K., Wang, C., Sun, Y., Liu, Y., Zhang, Y., Huang, L., & Wang, Z. (2014). Comparison of Chicken and Pheasant Ovotransferrin N-Glycoforms via Electrospray Ionization Mass Spectrometry and Liquid Chromatography Coupled with Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *62*(29), 7245–7254. <https://doi.org/10.1021/jf501352j>
- Kalli, A., Smith, G. T., Sweredoski, M. J., & Hess, S. (2013). Evaluation and optimization of mass spectrometric settings during data-dependent acquisition mode: focus on

- LTQ-Orbitrap mass analyzers. *Journal of Proteome Research*, 12(7), 3071–3086.
<https://doi.org/10.1021/pr3011588>
- Karlsson, G., Winge, S., & Sandberg, H. (2005). Separation of monosaccharides by hydrophilic interaction chromatography with evaporative light scattering detection. *Journal of Chromatography A*, 1092(2), 246–249.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.08.025>
- Kim, J., Moon, S. H., Ahn, D. U., Paik, H. D., & Park, E. (2012). Antioxidant effects of ovotransferrin and its hydrolysates. *Poultry Science*, 91(11), 2747–2754.
<https://doi.org/10.3382/ps.2012-02150>
- Kim, J. S., Reuhs, B. L., Michon, F., Kaiser, R. E., & Arumugham, R. G. (2006). Addition of glycerol for improved methylation linkage analysis of polysaccharides. *Carbohydrate Research*, 341(8), 1061–1064.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carres.2006.03.008>
- Kisiel, D. G., Radziejewska, I., & Gindziński, A. (2008). Application of the 50% Hydrazine Solution Method for O-Glycans Release, their Chemical Labeling, and HPLC Separation. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 18(6), 503–507.
<https://doi.org/10.1080/15376510701623755>
- Klement, E., Lipinszki, Z., Kupihár, Z., Udvardy, A., & Medzihradzky, K. F. (2010). Enrichment of O-GlcNAc Modified Proteins by the Periodate Oxidation–Hydrazide Resin Capture Approach. *Journal of Proteome Research*, 9(5), 2200–2206.
<https://doi.org/10.1021/pr900984h>
- Konstantinov, S. R., Smidt, H., de Vos, W. M., Bruijns, S. C. M., Singh, S. K., Valence, F., & van Kooyk, Y. (2008). S layer protein A of *Lactobacillus acidophilus* NCFM regulates immature dendritic cell and T cell functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(49), 19474–19479.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0810305105>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685.
<https://doi.org/10.1038/227680a0>

- Lattova, E., & Perreault, H. (2003). Labelling saccharides with phenylhydrazine for electrospray and matrix-assisted laser desorption–ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 793(1), 167–179. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1570-0232\(03\)00374-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1570-0232(03)00374-X)
- Leymarie, N., & Zaia, J. (2012). Effective Use of Mass Spectrometry for Glycan and Glycopeptide Structural Analysis. *Analytical Chemistry*, 84(7), 3040–3048. <https://doi.org/10.1021/ac3000573>
- Li-Chan, E., & Nakai, S. (1989). Biochemical Basis for the Properties of Egg White. *Critical Reviews in Poultry Biology*, 2(1), 21–58.
- Li, Hailong, Long, C., Zhou, J., Liu, J., Wu, X., & Long, M. (2013). Rapid analysis of mono-saccharides and oligo-saccharides in hydrolysates of lignocellulosic biomass by HPLC. *Biotechnology Letters*, 35(9), 1405–1409. <https://doi.org/10.1007/s10529-013-1224-4>
- Li, Hong, Debowski, A. W., Liao, T., Tang, H., Nilsson, H.-O., Marshall, B. J., ... Benghezal, M. (2016). Understanding protein glycosylation pathways in bacteria. *Future Microbiology*, 12(1), 59–72. <https://doi.org/10.2217/fmb-2016-0166>
- Li, Q.-R., Wang, S.-S., Zhu, H.-W., Xia, F.-Y., Roepstorff, P., Wu, J.-R., & Zeng, R. (2018). Data-Independent Acquisition Mass Spectrometry to Localize Phosphosites. *BioRxiv*, 464545. <https://doi.org/10.1101/464545>
- Li, S., Xiong, Q., Lai, X., Li, X., Wan, M., Zhang, J., & Lin, Y. (2016). Molecular Modification of Polysaccharides and Resulting Bioactivities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(2), 237–250. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12161>
- Limoli, D. H., Jones, C. J., & Wozniak, D. J. (2015). Bacterial Extracellular Polysaccharides in Biofilm Formation and Function. *Microbiology Spectrum*, 3(3), 10.1128/microbiolspec.MB-0011–2014. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MB-0011-2014>
- Lin, C.-H., Krisp, C., Packer, N. H., & Molloy, M. P. (2018). Development of a data independent acquisition mass spectrometry workflow to enable glycopeptide

- analysis without predefined glycan compositional knowledge. *Journal of Proteomics*, 172, 68–75. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jpro.2017.10.011>
- Lin, E.S., & Chen, Y.H. (2007). Factors affecting mycelial biomass and exopolysaccharide production in submerged cultivation of *Antrodia cinnamomea* using complex media. *Bioresource Technology*, 98(13), 2511–2517. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.09.008>
- Lindberg, B., Lönngrén, J., & Svensson, S. (1975). *Specific Degradation of Polysaccharides* (R. S. Tipson & D. B. T.-A. in C. C. and B. Horton, Eds.). [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0065-2318\(08\)60297-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0065-2318(08)60297-8)
- Liu, C., Lu, J., Lu, L., Liu, Y., Wang, F., & Xiao, M. (2010). Isolation, structural characterization and immunological activity of an exopolysaccharide produced by *Bacillus licheniformis* 8-37-0-1. *Bioresource Technology*, 101(14), 5528–5533. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.151>
- Liu, G., Cheng, K., Lo, C. Y., Li, J., Qu, J., & Neelamegham, S. (2017). A Comprehensive, Open-source Platform for Mass Spectrometry-based Glycoproteomics Data Analysis. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP*, 16(11), 2032–2047. <https://doi.org/10.1074/mcp.M117.068239>
- Liu, J., Wang, F., Zhu, J., Mao, J., Liu, Z., Cheng, K., ... Zou, H. (2014). Highly efficient N-glycoproteomic sample preparation by combining C18 and graphitized carbon adsorbents. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406(13), 3103–3109. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-7716-9>
- Liu, M.-Q., Zeng, W.-F., Fang, P., Cao, W.-Q., Liu, C., Yan, G.-Q., ... Yang, P.-Y. (2017). pGlyco 2.0 enables precision N-glycoproteomics with comprehensive quality control and one-step mass spectrometry for intact glycopeptide identification. *Nature Communications*, 8(1), 438. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00535-2>
- Liu, Y., Qiu, N., & Ma, M. (2015). Comparative proteomic analysis of egg white proteins during the rapid embryonic growth period by combinatorial peptide ligand libraries. *Poultry Science*, 94(10), 2495–2505. <https://doi.org/10.3382/ps/pev176>

- Liu, Z., Cao, J., He, Y., Qiao, L., Xu, C., Lu, H., & Yang, P. (2010). Tandem 18O Stable Isotope Labeling for Quantification of N-Glycoproteome. *Journal of Proteome Research*, 9(1), 227–236. <https://doi.org/10.1021/pr900528j>
- Lv, Y., Yang, X., Zhao, Y., Ruan, Y., Yang, Y., & Wang, Z. (2009). Separation and quantification of component monosaccharides of the tea polysaccharides from *Gynostemma pentaphyllum* by HPLC with indirect UV detection. *Food Chemistry*, 112(3), 742–746. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.042>
- Maalej, H., Boisset, C., Hmidet, N., Buon, L., Heyraud, A., & Nasri, M. (2014). Purification and structural data of a highly substituted exopolysaccharide from *Pseudomonas stutzeri* AS22. *Carbohydrate Polymers*, 112, 404–411. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.06.003>
- Malamud, M., Carasi, P., Bronsoms, S., Trejo, S. A., & Serradell, M. de los A. (2017). Lactobacillus kefir shows inter-strain variations in the amino acid sequence of the S-layer proteins. *Antonie van Leeuwenhoek*, 110(4), 515–530. <https://doi.org/10.1007/s10482-016-0820-4>
- Mann, K. (2007). The chicken egg white proteome. *Proteomics*, 7(19), 3558–3568. <https://doi.org/10.1002/pmic.200700397>
- Mann, K., Hincke, M. T., & Nys, Y. (2002). Isolation of ovocleidin-116 from chicken eggshells, correction of its amino acid sequence and identification of disulfide bonds and glycosylated Asn. *Matrix Biology*, 21(5), 383–387. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0945-053X\(02\)00031-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0945-053X(02)00031-8)
- Mann, K., & Mann, M. (2011). In-depth analysis of the chicken egg white proteome using an LTQ Orbitrap Velos. *Proteome Science*, 9(1), 7. <https://doi.org/10.1186/1477-5956-9-7>
- Mantovani, V., Galeotti, F., Maccari, F., & Volpi, N. (2018). Recent advances in capillary electrophoresis separation of monosaccharides, oligosaccharides, and polysaccharides. *Electrophoresis*, 39(1), 179–189. <https://doi.org/10.1002/elps.201700290>
- McAlister, G. C., Russell, J. D., Rumachik, N. G., Hebert, A. S., Syka, J. E. P., Geer, L.

- Y., & Coon, J. J. (2012). Analysis of the acidic proteome with negative electron-transfer dissociation mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 84(6), 2875–2882. <https://doi.org/10.1021/ac203430u>
- Mechref, Y. (2012). Use of CID/ETD mass spectrometry to analyze glycopeptides. *Current Protocols in Protein Science*, Chapter 12, Unit-12.11.11. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps1211s68>
- Mechref, Y., Madera, M., & Novotny, M. V. (2008). *Glycoprotein Enrichment Through Lectin Affinity Techniques BT - 2D PAGE: Sample Preparation and Fractionation* (A. Posch, Ed.). https://doi.org/10.1007/978-1-60327-064-9_29
- Megherbi, M., Herbreteau, B., Faure, R., & Salvador, A. (2009). Polysaccharides as a Marker for Detection of Corn Sugar Syrup Addition in Honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(6), 2105–2111. <https://doi.org/10.1021/jf803384q>
- Merry, A. H., Neville, D. C. A., Royle, L., Matthews, B., Harvey, D. J., Dwek, R. A., & Rudd, P. M. (2002). Recovery of Intact 2-Aminobenzamide-Labeled O-Glycans Released from Glycoproteins by Hydrazinolysis. *Analytical Biochemistry*, 304(1), 91–99. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/abio.2002.5620>
- Mine, Y., & Yang, M. (2008). Recent Advances in the Understanding of Egg Allergens: Basic, Industrial, and Clinical Perspectives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(13), 4874–4900. <https://doi.org/10.1021/jf8001153>
- Miranda, M. J., Anton, X., Redondo-Valbuena, C., Roca-Saavedra, P., Rodriguez, A. J., Lamas, A., & Cepeda, A. (2015). Egg and Egg-Derived Foods: Effects on Human Health and Use as Functional Foods. *Nutrients*, Vol. 7. <https://doi.org/10.3390/nu7010706>
- Mirza, S. P., Raju, N. P., Madhavendra, S. S., & Vairamani, M. (2004). 5-Amino-2-mercapto-1,3,4-thiadiazole: a new matrix for the efficient matrix-assisted laser desorption/ionization of neutral carbohydrates. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 18(14), 1666–1674. <https://doi.org/10.1002/rcm.1536>
- Mobili, P., de los Ángeles Serradell, M., Trejo, S. A., Avilés Puigvert, F. X., Abraham,

- A. G., & De Antoni, G. L. (2009). Heterogeneity of S-layer proteins from aggregating and non-aggregating *Lactobacillus kefir* strains. *Antonie van Leeuwenhoek*, 95(4), 363–372. <https://doi.org/10.1007/s10482-009-9322-y>
- Moremen, K. W., Tiemeyer, M., & Nairn, A. V. (2012). Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13, 448. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/nrm3383>
- Möschl, A., Schäffer, C., Sleytr, U. B., Messner, P., Christian, R., & Schulz, G. (1993). Characterization of the S-Layer Glycoproteins of Two Lactobacilli BT - Advances in Bacterial Paracrystalline Surface Layers (T. J. Beveridge & S. F. Koval, Eds.). https://doi.org/10.1007/978-1-4757-9032-0_27
- Na, S., & Paek, E. (2015). Software eyes for protein post-translational modifications. *Mass Spectrometry Reviews*, 34(2), 133–147. <https://doi.org/10.1002/mas.21425>
- Nabetani, T., Miyazaki, K., Tabuse, Y., & Tsugita, A. (2006). Analysis of acidic peptides with a matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry using positive and negative ion modes with additive monoammonium phosphate. *PROTEOMICS*, 6(16), 4456–4465. <https://doi.org/10.1002/pmic.200500916>
- Namchuk, M. N., McCarter, J. D., Becalski, A., Andrews, T., & Withers, S. G. (2000). The Role of Sugar Substituents in Glycoside Hydrolysis. *Journal of the American Chemical Society*, 122(7), 1270–1277. <https://doi.org/10.1021/ja992044h>
- Naz, T., Khan, M. D., Ahmed, I., Rehman, S. ur, Rha, E. S., Malook, I., & Jamil, M. (2015). Biosorption of heavy metals by *Pseudomonas* species isolated from sugar industry. *Toxicology and Industrial Health*, 32(9), 1619–1627. <https://doi.org/10.1177/0748233715569900>
- Nicolaus, B., Kambourova, M., & Oner, E. T. (2010). Exopolysaccharides from extremophiles: from fundamentals to biotechnology. *Environmental Technology*, 31(10), 1145–1158. <https://doi.org/10.1080/09593330903552094>
- Nielsen P.H., J. A. (1999). Extraction of EPS. In F. H. Wingender J., Neu T.R. (Ed.), *Microbial Extracellular Polymeric Substances* (pp. 49–72). https://doi.org/10.1007/978-3-642-60147-7_3

- Nišavić, M., Hozić, A., Hameršak, Z., Radić, M., Butorac, A., Duvnjak, M., & Cindrić, M. (2017). High-Efficiency Microflow and Nanoflow Negative Electrospray Ionization of Peptides Induced by Gas-Phase Proton Transfer Reactions. *Analytical Chemistry*, 89(9), 4847–4854. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b04466>
- Nishikaze, T. (2017). Sensitive and Structure-Informative N-Glycosylation Analysis by MALDI-MS; Ionization, Fragmentation, and Derivatization. *Mass Spectrometry (Tokyo, Japan)*, 6(1), A0060–A0060. <https://doi.org/10.5702/massspectrometry.A0060>
- Nishio, S., Kohno, Y., Iwata, Y., Arai, M., Okumura, H., Oshima, K., ... Matsuda, T. (2014). Glycosylated Chicken ZP2 Accumulates in the Egg Coat of Immature Oocytes and Remains Localized to the Germinal Disc Region of Mature Eggs1. *Biology of Reproduction*, 91(5). <https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.119826>
- Nothaft, H., & Szymanski, C. M. (2010). Protein glycosylation in bacteria: sweeter than ever. *Nature Reviews Microbiology*, 8, 765. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/nrmicro2383>
- Nowak, K., Wiater, A., Choma, A., Wiącek, D., Bieganowski, A., Siwulski, M., & Waśko, A. (2019). Fungal (1 → 3)- α -D-glucans as a new kind of biosorbent for heavy metals. *International Journal of Biological Macromolecules*, 137, 960–965. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2019.07.036>
- Offengenden, M., Fentabil, M. A., & Wu, J. (2011). N-glycosylation of ovomucin from hen egg white. *Glycoconjugate Journal*, 28(3), 113–123. <https://doi.org/10.1007/s10719-011-9328-3>
- Offengenden, M., & Wu, J. (2013). Egg white ovomucin gels: structured fluids with weak polyelectrolyte properties. *RSC Advances*, 3(3), 910–917. <https://doi.org/10.1039/C2RA22501H>
- Omana, D. A., Liang, Y., Kav, N. N. V., & Wu, J. (2011). Proteomic analysis of egg white proteins during storage. *Proteomics*, 11(1), 144–153. <https://doi.org/10.1002/pmic.201000168>
- Painter, T. J., & Morgan, W. T. J. (1961). Partial Acid-Hydrolysis of a

- Mucopolysaccharide Without Appreciable N-Deacetylation of Hexosamine. *Nature*, *191*(4783), 39–40. <https://doi.org/10.1038/191039a0>
- Palmblad, M., Lamprecht, A.L., Ison, J., & Schwämmle, V. (2019). Automated workflow composition in mass spectrometry-based proteomics. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *35*(4), 656–664. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty646>
- Palmisano, G., Melo-Braga, M. N., Engholm-Keller, K., Parker, B. L., & Larsen, M. R. (2012). Chemical Deamidation: A Common Pitfall in Large-Scale N-Linked Glycoproteomic Mass Spectrometry-Based Analyses. *Journal of Proteome Research*, *11*(3), 1949–1957. <https://doi.org/10.1021/pr2011268>
- Papac, D. I., Wong, A., & Jones, A. J. S. (1996). Analysis of Acidic Oligosaccharides and Glycopeptides by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, *68*(18), 3215–3223. <https://doi.org/10.1021/ac960324z>
- Papinutti, L. (2010). Effects of nutrients, pH and water potential on exopolysaccharides production by a fungal strain belonging to *Ganoderma lucidum* complex. *Bioresource Technology*, *101*(6), 1941–1946. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.09.076>
- Pavasant, P., Apiratikul, R., Sungkhum, V., Suthiparinyanont, P., Wattanachira, S., & Marhaba, T. F. (2006). Biosorption of Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , and Zn^{2+} using dried marine green macroalga *Caulerpa lentillifera*. *Bioresource Technology*, *97*(18), 2321–2329. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2005.10.032>
- Peix, A., Ramírez-Bahena, M.-H., & Velázquez, E. (2018). The current status on the taxonomy of *Pseudomonas* revisited: An update. *Infection, Genetics and Evolution*, *57*, 106–116. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.10.026>
- Perepelov, A. V, Chen, T., Senchenkova, S. N., Filatov, A. V, Song, J., Shashkov, A. S., & Knirel, Y. A. (2018). Structure and genetics of the O-specific polysaccharide of *Escherichia coli* O27. *Carbohydrate Research*, *456*, 1–4. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carres.2017.11.016>
- Pettolino, F. A., Walsh, C., Fincher, G. B., & Bacic, A. (2012). Determining the

- polysaccharide composition of plant cell walls. *Nature Protocols*, 7, 1590. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.081>
- Piskarev, V. E., Sepetov, N. F., Ikhosherstov, L. M., Galenko, E. L., Derevitskaia, V. A., & Kochetkov, N. K. (1989). Structure of carbohydrate chains of the riboflavin-binding glycoprotein of chicken egg protein. II. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz) spectroscopy of the major neutral oligosaccharides. *Bioorganicheskaiia khimiia*, 15(11), 1546–1554. Retrieved from <http://europepmc.org/abstract/MED/2624592>
- Pohlentz, G., Marx, K., & Mormann, M. (2016). Characterization of Protein *N*-Glycosylation by Analysis of ZIC-HILIC-Enriched Intact Proteolytic Glycopeptides BT - *Proteomics in Systems Biology: Methods and Protocols* (J. Reinders, Ed.). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3341-9_12
- Prado Acosta, M., Ruzal, S. M., & Cordo, S. M. (2016). S-layer proteins from *Lactobacillus* sp. inhibit bacterial infection by blockage of DC-SIGN cell receptor. *International Journal of Biological Macromolecules*, 92, 998–1005. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2016.07.096>
- Price, N. P. J., Vermillion, K. E., Eller, F. J., & Vaughn, S. F. (2015). Frost Grape Polysaccharide (FGP), an Emulsion-Forming Arabinogalactan Gum from the Stems of Native North American Grape Species *Vitis riparia* Michx. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(32), 7286–7293. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b02316>
- Guo, L., Ai, S. C. (2018). *Methodology for Structural Analysis of Polysaccharides* (1st ed.). <https://doi.org/10.1007/978-3-319-96370-9>
- Qiu, N., Liu, W., Ma, M., Zhao, L., & Li, Y. (2013). Differences between fertilized and unfertilized chicken egg white proteins revealed by 2-dimensional gel electrophoresis-based proteomic analysis. *Poultry Science*, 92(3), 782–786. <https://doi.org/10.3382/ps.2012-02565>
- Qiu, N., Ma, M., Cai, Z., Jin, Y., Huang, X., Huang, Q., & Sun, S. (2012a). Proteomic analysis of egg white proteins during the early phase of embryonic development. *Journal of Proteomics*, 75(6), 1895–1905. <https://doi.org/10.1016/J.JPROT.2011.12.037>

- Qiu, N., Ma, M., Zhao, L., Liu, W., Li, Y., & Mine, Y. (2012b). Comparative Proteomic Analysis of Egg White Proteins under Various Storage Temperatures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(31), 7746–7753. <https://doi.org/10.1021/jf302100m>
- Qiu, R., & Regnier, F. E. (2005). Use of Multidimensional Lectin Affinity Chromatography in Differential Glycoproteomics. *Analytical Chemistry*, 77(9), 2802–2809. <https://doi.org/10.1021/ac048751x>
- Ramberg, J. E., Nelson, E. D., & Sinnott, R. A. (2010). Immunomodulatory dietary polysaccharides: a systematic review of the literature. *Nutrition Journal*, 9, 54. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-9-54>
- Ravella, S. R., Quiñones, T. S., Retter, A., Heiermann, M., Amon, T., & Hobbs, P. J. (2010). Extracellular polysaccharide (EPS) production by a novel strain of yeast-like fungus *Aureobasidium pullulans*. *Carbohydrate Polymers*, 82(3), 728–732. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.05.039>
- Réhault-Godbert, S., Guyot, N., & Nys, Y. (2019). The Golden Egg: Nutritional Value, Bioactivities, and Emerging Benefits for Human Health. *Nutrients*, 11(3), 684. <https://doi.org/10.3390/nu11030684>
- Réhault-Godbert, S., Labas, V., Helloin, E., Hervé-Grépinet, V., Slugocki, C., Berges, M., & Nys, Y. (2013). Ovalbumin-related protein X is a heparin-binding ov-serpin exhibiting antimicrobial activities. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(24), 17285–17295. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.469759>
- Rehm, B. H. A. (2010). Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. *Nature Reviews Microbiology*, 8, 578. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/nrmicro2354>
- Ruhaak, L. R., Zauner, G., Huhn, C., Bruggink, C., Deelder, A. M., & Wuhrer, M. (2010). Glycan labeling strategies and their use in identification and quantification. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397(8), 3457–3481. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3532-z>
- Ruiz-May, E., Catalá, C., & Rose, J. K. C. (2014). *N-Glycoprotein Enrichment by Lectin*

- Affinity Chromatography BT - Plant Proteomics: Methods and Protocols* (J. V. Jorrin-Novó, S. Komatsu, W. Weckwerth, & S. Wienkoop, Eds.). https://doi.org/10.1007/978-1-62703-631-3_43
- Rujitanaroj, P.O., Aid-Launais, R., Chew, S. Y., & Le Visage, C. (2014). Polysaccharide electrospun fibers with sulfated poly(fucose) promote endothelial cell migration and VEGF-mediated angiogenesis. *Biomaterials Science*, 2(6), 843–852. <https://doi.org/10.1039/C3BM60245A>
- Schäffer, C., Graninger, M., & Messner, P. (2001). Prokaryotic glycosylation. *Proteomics*, 1(2), 248–261. [https://doi.org/10.1002/1615-9861\(200102\)1:2<248::AID-PROT248>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/1615-9861(200102)1:2<248::AID-PROT248>3.0.CO;2-K)
- Schembri, M. A., Dalsgaard, D., & Klemm, P. (2004). Capsule shields the function of short bacterial adhesins. *Journal of Bacteriology*, 186(5), 1249–1257. <https://doi.org/10.1128/jb.186.5.1249-1257.2004>
- Schievano, E., Tonoli, M., & Rastrelli, F. (2017). NMR Quantification of Carbohydrates in Complex Mixtures. A Challenge on Honey. *Analytical Chemistry*, 89(24), 13405–13414. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b03656>
- Schuster, B., Györvary, E., Pum, D., & Sleytr, U. B. (2005). Nanotechnology With S-Layer Proteins BT - Protein Nanotechnology: Protocols, Instrumentation, and Applications (T. Vo-Dinh, Ed.). <https://doi.org/10.1385/1-59259-858-7:101>
- Segu, Z. M., Hussein, A., Novotny, M. V, & Mechref, Y. (2010). Assigning N-Glycosylation Sites of Glycoproteins Using LC/MSMS in Conjunction with Endo-M/Exoglycosidase Mixture. *Journal of Proteome Research*, 9(7), 3598–3607. <https://doi.org/10.1021/pr100129n>
- Segu, Z. M., & Mechref, Y. (2010). Characterizing protein glycosylation sites through higher-energy C-trap dissociation. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 24(9), 1217–1225. <https://doi.org/doi:10.1002/rcm.4485>
- Selman, M. H. J., Hemayatkar, M., Deelder, A. M., & Wuhrer, M. (2011). Cotton HILIC SPE Microtips for Microscale Purification and Enrichment of Glycans and Glycopeptides. *Analytical Chemistry*, 83(7), 2492–2499.

<https://doi.org/10.1021/ac1027116>

Selman, M. H. J., Hoffmann, M., Zauner, G., McDonnell, L. A., Balog, C. I. A., Rapp, E., & Wuhrer, M. (2012). MALDI-TOF-MS analysis of sialylated glycans and glycopeptides using 4-chloro- α -cyanocinnamic acid matrix. *Proteomics*, *12*(9), 1337–1348. <https://doi.org/10.1002/pmic.201100498>

Shameer, S. (2016). Biosorption of lead, copper and cadmium using the extracellular polysaccharides (EPS) of *Bacillus* sp., from solar salterns. *3 Biotech*, *6*(2), 194. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0498-3>

Shibue, M., Mant, C. T., & Hodges, R. S. (2005). Effect of anionic ion-pairing reagent hydrophobicity on selectivity of peptide separations by reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography. A*, *1080*(1), 68–75. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.03.035>

Signor, L., & Boeri Erba, E. (2013). Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometric analysis of intact proteins larger than 100 kDa. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, (79), 50635. <https://doi.org/10.3791/50635>

Sims, I. M., Carnachan, S. M., Bell, T. J., & Hinkley, S. F. R. (2018). Methylation analysis of polysaccharides: Technical advice. *Carbohydrate Polymers*, *188*, 1–7. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.12.075>

Sleytr, U. B., Schuster, B., Egelseer, E.-M., & Pum, D. (2014). S-layers: principles and applications. *FEMS Microbiology Reviews*, *38*(5), 823–864. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12063>

Sun, X., Gänzle, M., & Wu, J. (2017). Identification and Characterization of Glycopeptides from Egg Protein Ovomucin with Anti-Agglutinating Activity against Porcine K88 Enterotoxigenic *Escherichia coli* Strains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *65*(4), 777–783. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04299>

Sutherland, I. W. (1988). *Bacterial Surface Polysaccharides: Structure and Function* (K. W. Jeon & M. Friedlander, Eds.) <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0074->

7696(08)60849-9

- Sutherland, I. W. (2001). Microbial polysaccharides from Gram-negative bacteria. *International Dairy Journal*, *11*(9), 663–674. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00112-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00112-1)
- Tan, F. Y. Y., Tang, C. M., & Exley, R. M. (2015). Sugar coating: bacterial protein glycosylation and host–microbe interactions. *Trends in Biochemical Sciences*, *40*(7), 342–350. <https://doi.org/10.1016/J.TIBS.2015.03.016>
- Thomsson, K. A., Bäckström, M., Holmén Larsson, J. M., Hansson, G. C., & Karlsson, H. (2010). Enhanced Detection of Sialylated and Sulfated Glycans with Negative Ion Mode Nanoliquid Chromatography/Mass Spectrometry at High pH. *Analytical Chemistry*, *82*(4), 1470–1477. <https://doi.org/10.1021/ac902602e>
- Tsiatsiani, L., & Heck, A. J. R. (2015). Proteomics beyond trypsin. *The FEBS Journal*, *282*(14), 2612–2626. <https://doi.org/10.1111/febs.13287>
- van den Heuvel, E., Murphy, J. L., & Appleton, K. M. (2018). Towards a Food-Based Intervention to Increase Protein Intakes in Older Adults: Challenges to and Facilitators of Egg Consumption. *Nutrients*, *10*(10), 1409. <https://doi.org/10.3390/nu10101409>
- Varky A, Cummings RD, E. J. (2009). *Essentials of Glycobiology*. New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Vullo, D. L., Ceretti, H. M., Daniel, M. A., Ramírez, S. A. M., & Zalts, A. (2008). Cadmium, zinc and copper biosorption mediated by *Pseudomonas veronii* 2E. *Bioresource Technology*, *99*(13), 5574–5581. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.10.060>
- Wang, Jianlong, & Chen, C. (2006). Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: A review. *Biotechnology Advances*, *24*(5), 427–451. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.03.001>
- Wang, Jiapei, Liang, Y., Omana, D. A., Kav, N. N. V., & Wu, J. (2012). Proteomics Analysis of Egg White Proteins from Different Egg Varieties. *Journal of*

- Agricultural and Food Chemistry*, 60(1), 272–282.
<https://doi.org/10.1021/jf2033973>
- Wang, Y., Liu, Y., Yu, H., Zhou, S., Zhang, Z., Wu, D., & Zhang, J. (2017). Structural characterization and immuno-enhancing activity of a highly branched water-soluble β -glucan from the spores of *Ganoderma lucidum*. *Carbohydrate Polymers*, 167, 337–344. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.03.016>
- Wasi, S., Tabrez, S., & Ahmad, M. (2013). Use of *Pseudomonas* spp. for the bioremediation of environmental pollutants: a review. *Environmental Monitoring and Assessment*, 185(10), 8147–8155. <https://doi.org/10.1007/s10661-013-3163-x>
- Wei, J., Ni, Y., Zhang, W., Zhang, Z., & Zhang, J. (2017). Detection of glycoprotein through fluorescent boronic acid-based molecularly imprinted polymer. *Analytica Chimica Acta*, 960, 110–116. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.12.046>
- Whitfield, C. (2006). Biosynthesis and Assembly of Capsular Polysaccharides in *Escherichia coli*. *Annual Review of Biochemistry*, 75(1), 39–68. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.103004.142545>
- Wu, J., & Acero-Lopez, A. (2012). Ovotransferrin: Structure, bioactivities, and preparation. *Food Research International*, 46(2), 480–487. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2011.07.012>
- Xu, Gege, Amicucci, M. J., Cheng, Z., Galermo, A. G., & Lebrilla, C. B. (2017). Revisiting monosaccharide analysis - quantitation of a comprehensive set of monosaccharides using dynamic multiple reaction monitoring. *The Analyst*, 143(1), 200–207. <https://doi.org/10.1039/c7an01530e>
- Xu, Guang, Stupak, J., Yang, L., Hu, L., Guo, B., & Li, J. (2018). Deconvolution in mass spectrometry based proteomics. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 32(10), 763–774. <https://doi.org/10.1002/rcm.8103>
- Yang, Y., Liu, F., Franc, V., Halim, L. A., Schellekens, H., & Heck, A. J. R. (2016). Hybrid mass spectrometry approaches in glycoprotein analysis and their usage in scoring biosimilarity. *Nature Communications*, 7, 13397. Retrieved from

<https://doi.org/10.1038/ncomms13397>

- You, J., Sheng, X., Ding, C., Sun, Z., Suo, Y., Wang, H., & Li, Y. (2008). Detection of carbohydrates using new labeling reagent 1-(2-naphthyl)-3-methyl-5-pyrazolone by capillary zone electrophoresis with absorbance (UV). *Analytica Chimica Acta*, 609(1), 66–75. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.12.022>
- Yu, G., Zhang, Y., Zhang, Z., Song, L., Wang, P., & Chai, W. (2010). Effect and Limitation of Excess Ammonium on the Release of *O*-Glycans in Reducing Forms from Glycoproteins under Mild Alkaline Conditions for Glycomic and Functional Analysis. *Analytical Chemistry*, 82(22), 9534–9542. <https://doi.org/10.1021/ac102300r>
- Yu Ip, C. C., Manam, V., Hepler, R., & Hennessey, J. P. (1992). Carbohydrate composition analysis of bacterial polysaccharides: Optimized acid hydrolysis conditions for HPAEC-PAD analysis. *Analytical Biochemistry*, 201(2), 343–349. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697\(92\)90349-C](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697(92)90349-C)
- Yuan, J. Hashii N., Kawasaki, N., Itoh, S., Kawanishi, T. Hayakawa, T. (2005). Isotope tag method for quantitative analysis of carbohydrates by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr.* 1067:145-152. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.11.070>
- Zeng, W.-F., Liu, M.Q., Zhang, Y., Wu, J.-Q., Fang, P., Peng, C., & Yang, P. (2016). pGlyco: a pipeline for the identification of intact *N*-glycopeptides by using HCD- and CID-MS/MS and MS3. *Scientific Reports*, 6, 25102. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/srep25102>
- Zhang R., Sioma C. S., Wang S., Regnier F. E. (2001). Fractionation of isotopically labeled peptides in quantitative proteomics. *Anal. Chem.* 73, 5142–5149. <https://doi.org/514910.1021/ac001432v>
- Zhang, H., Li, X., Martin, D. B., & Aebersold, R. (2003). Identification and quantification of *N*-linked glycoproteins using hydrazide chemistry, stable isotope labeling and mass spectrometry. *Nature Biotechnology*, 21(6), 660–666. <https://doi.org/10.1038/nbt827>

- Zhang, X., Zhang, S., Baek, S. J., & Best, M. D. (2017). A Boronic Acid Assay for the Detection of Mucin-1 Glycoprotein from Cancer Cells. *ChemBioChem*, *18*(16), 1578–1582. <https://doi.org/10.1002/cbic.201700288>
- Zhang, Y., Fonslow, B. R., Shan, B., Baek, M.-C., & Yates, J. R. (2013). Protein Analysis by Shotgun/Bottom-up Proteomics. *Chemical Reviews*, *113*(4), 2343–2394. <https://doi.org/10.1021/cr3003533>
- Zhang, Z., Khan, N. M., Nunez, K. M., Chess, E. K., & Szabo, C. M. (2012). Complete Monosaccharide Analysis by High-Performance Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection. *Analytical Chemistry*, *84*(9), 4104–4110. <https://doi.org/10.1021/ac300176z>
- Zhao, S., Cao, F., Zhang, H., Zhang, L., Zhang, F., & Liang, X. (2014). Structural Characterization and Biosorption of Exopolysaccharides from *Anoxybacillus sp.* R4-33 Isolated from Radioactive Radon Hot Spring. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *172*(5), 2732–2746. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0680-6>
- Zhou, W., Yao, N., Yao, G., Deng, C., Zhang, X., & Yang, P. (2008). Facile synthesis of aminophenylboronic acid-functionalized magnetic nanoparticles for selective separation of glycopeptides and glycoproteins. *Chemical Communications*, (43), 5577–5579. <https://doi.org/10.1039/B808800D>
- Zhu, F., Trinidad, J. C., & Clemmer, D. E. (2015). Glycopeptide Site Heterogeneity and Structural Diversity Determined by Combined Lectin Affinity Chromatography/IMS/CID/MS Techniques. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, *26*(7), 1092–1102. <https://doi.org/10.1007/s13361-015-1110-5>
- Zhu, Z., Go, E. P., & Desaire, H. (2014). Absolute Quantitation of Glycosylation Site Occupancy Using Isotopically Labeled Standards and LC-MS. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, *25*(6), 1012–1017. <https://doi.org/10.1007/s13361-014-0859-2>
- Zou, Z., Ibisate, M., Zhou, Y., Aebbersold, R., Xia, Y., & Zhang, H. (2008). Synthesis and Evaluation of Superparamagnetic Silica Particles for Extraction of Glycopeptides in the Microtiter Plate Format. *Analytical Chemistry*, *80*(4), 1228–1234. <https://doi.org/10.1021/ac701950h>