

# RESUMEN DE LA TESIS

Los oligosacáridos de la leche humana (OLHs) no son digeridos por los lactantes y en su mayoría llegan intactos al colon, donde son utilizados por la microbiota neonatal a través de la expresión de una amplia variedad de glicosil hidrolasas (GHs). Estas enzimas permiten la utilización de OLHs así como la parte glicana de glicoconjugados como fuente de carbono, promoviendo el establecimiento de una microbiota intestinal con beneficios para la salud de los lactantes. El objetivo principal de esta Tesis Doctoral consistió en la caracterización funcional de GHs de la microbiota intestinal de niños lactantes capaces de metabolizar OLHs y glicoconjugados, y el estudio de su relevancia biológica, centrándose en el papel de las GHs en las infecciones víricas, así como en su potencial biotecnológico para la síntesis de OLHs.

Se aislaron cepas bacterianas a partir de las heces de niños lactantes, y se demostró que solo las cepas pertenecientes al género *Bifidobacterium* metabolizaban eficientemente 2'-fucosilactosa (2'FL), 3-fucosilactosa (3FL), 2',3-difucosilactosa (DFL), lacto-*N*-tetraosa (LNT) y lacto-*N*-neotetraosa (LNnT), que son los principales oligosacáridos encontrados en la leche humana. *Bifidobacterium infantis* Y538 consumió eficientemente todos los HMOs testados, mientras que las dos cepas aisladas de *Bifidobacterium dentium*, Y510 y Y521 solo metabolizaron LNT y LNnT. Se caracterizaron dos  $\beta$ -galactosidasas de *B. dentium* Y510; Bdg42A exhibió la mayor actividad frente a LNT, hidrolizándola en galactosa y lacto-*N*-triosa (LNTII), mientras que Bdg2A mostró actividad frente a la lactosa, 6'-galactopiranosil-*N*-acetilglucosamina, *N*-acetilglucosamina y LNnT. También se aislaron de heces de niños lactantes cepas bacterianas con actividad glicosidasa extracelular. Entre las cepas aisladas, *B. infantis* E17 y E18, y *Enterococcus faecalis* E8 y E41 mostraron actividad endo- $\beta$ -*N*-acetilglucosaminidasa, liberando *N*-glicanos de glicoproteínas. Se clonó el gen que codifica la endo- $\beta$ -*N*-acetilglucosaminidasa EndoE de *E. faecalis* E8, y la enzima purificada deglicosiló eficientemente la proteína S1 del coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave de tipo 2 (SARS-CoV-2). Tanto la EndoE silvestre como un mutante catalíticamente inactivo, el cual carecía de actividad endo- $\beta$ -*N*-acetilglucosaminidasa, mostraron actividad lectina frente a la proteína S1 y actividad neutralizante frente a la infección de un virus pseudotipado el cual presentaba expresada la proteína S de SARS-CoV-2. Estos resultados proporcionan información sobre el papel de las GHs de la microbiota intestinal en infecciones virales y abren nuevas vías para el desarrollo de estrategias antivirales.

También se identificaron posibles GHs involucradas en la degradación de OLHs y glicoconjugados a través del análisis metagenómico de las heces de niños lactantes, incluyendo  $\beta$ -galactosidasas,  $\beta$ -*N*-acetilhexosaminidasas,  $\alpha$ -sialidasas y  $\alpha$ -L-fucosidasas. Las GHs identificadas pertenecen a diversos géneros, incluyendo *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Ruminococcus*, *Actinomyces*, *Klebsiella*, *Phocaeicola* y *Streptococcus*. Basándose en homología de secuencia, diez  $\alpha$ -L-fucosidasas de la familia de glicosil hidrolasas GH29 (Fuc18, Fuc19A, Fuc30, Fuc35A, Fuc35B, Fuc39, Fuc193, Fuc1584, Fuc2358 y Fuc5372) fueron seleccionadas y se evaluó su actividad frente a OLHs, antígenos histo-sanguíneos, glicoproteínas

naturales y neoglicoproteínas. Las  $\alpha$ -L-fucosidasas Fuc18, Fuc19, Fuc35B, Fuc39 y Fuc1584 mostraron actividad hidrolítica sobre enlaces de fucosa  $\alpha$ -1,3/4 y Fuc35A, Fuc193 y Fuc2358 mostraron actividad frente a enlaces de fucosa  $\alpha$ -1,2/3/4/6. Fuc30 mostró actividad únicamente sobre la fucosa con enlace  $\alpha$ -1,6, mientras que la Fuc5372 mostró preferencia por los enlaces  $\alpha$ -1,2. Además, la  $\alpha$ -L-fucosidasa Fuc2358 presentó actividad sobre glicoconjugados con lacto-*N*-fucopentaosa II (antígeno Lewis a) o lacto-*N*-fucopentaosa III (antígeno Lewis x), y también sobre mucina. Las  $\alpha$ -L-fucosidasas Fuc18, Fuc19A y Fuc39 eliminaron la L-fucosa de neoglicoproteínas y de la glicoproteína  $\alpha$ -1 ácida. Además, se evaluó la capacidad de las  $\alpha$ -L-fucosidasas aisladas para sintetizar fucosil-oligosacáridos (FUS) a través de reacciones de transfucosilación, utilizando *p*-nitrofenil- $\alpha$ -L-fucopiranosido (pNP-Fuc) como sustrato donador y lactosa como sustrato aceptor. Utilizando Fuc2358 se sintetizó 2'F, 3'-fucosilactosa (3'FL) y 1-fucosilactosa (1FL), con un rendimiento de hasta un 35 % para la 2'FL. Con Fuc5372 se sintetizaron varios isómeros de fucosilactosa (FL), incluyendo 2'FL, 3'FL y 1FL, con una mayor proporción de 3'FL. Se llevó a cabo mutagénesis dirigida por diseño racional con el fin de aumentar los rendimientos de transfucosilación. Los mutantes Fuc2358-H132F, Fuc2358-F184H, Fuc2358-R301Q, Fuc2358-K286R y Fuc5372-R230K mostraron una mayor relación entre la 2'FL producida y el pNP-Fuc hidrolizado que sus respectivas enzimas silvestres. La actividad de transfucosilación de los mutantes Fuc2358-F184W y Fuc5378-W151F también mostró que los residuos F184 de Fuc2358 y W151 de Fuc5378 tienen un efecto en la regioselectividad de la transfucosilación: la fenilalanina aumenta la selectividad por los enlaces  $\alpha$ -1,2, mientras que el triptófano aumenta la selectividad por los enlaces  $\alpha$ -1,3. Estos resultados aportan información acerca de la funcionalidad de los aminoácidos del centro activo en la actividad de transfucosilación de las  $\alpha$ -L-fucosidasas GH29 Fuc2358 y Fuc5372.

Los resultados presentados en esta Tesis Doctoral ilustran la diversidad de GHs en la microbiota intestinal de niños lactantes y han permitido ampliar los conocimientos sobre la especificidad de estas enzimas implicadas en el metabolismo de OLHs y glicoconjugados. Esto podría contribuir a una mejor comprensión del posible papel de las GHs en la colonización bacteriana del tracto gastrointestinal infantil y presenta un gran potencial biotecnológico.