



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO
PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUIMICAS

**Actividad catalítica de la colina sulfatasa de *Ensifer*
(*Sinorhizobium*) *meliloti***

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. JUAN JOSÉ SÁNCHEZ ROMERO

TUTOR:

Dr. LUIS F. OLGUÍN CONTRERAS
Facultad de Química UNAM

México, DF. Noviembre 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Miembros del H. Jurado:

Presidente:

Dr. Anatoly Yatsimirsky Facultad de Química, UNAM

Vocal

Dr. Miguel Antonio Costas Basín Facultad de Química, UNAM

Vocal:

Dr. Edmundo Castillo Rosales Instituto de Biotecnología, UNAM

Vocal:

Dr. Abel Moreno Cárcamo Instituto de Química, UNAM

Secretario:

Dr. Enrique García Hernández Instituto de Química, UNAM

Dr. Luis Fernando Olguín Contreras
Facultad de Química, UNAM
Tutor

M. en C. Juan José Sánchez Romero
Sustentante

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y al Posgrado en Ciencias Químicas por brindarme la oportunidad y las facilidades para desarrollar este proyecto.

Al Dr. Luis F. Olguín Contreras, por sus consejos y la paciencia que me tuvo a lo largo de esta investigación.

Al comité Tutelar, formado por el Dr. Miguel Costas Basin y el Dr. Ismael Bustos Jaimes, quienes con sus sugerencias contribuyeron en el enriquecimiento de este trabajo de investigación.

Al honorable jurado: Dr. Anatoly Yatsimirsky, Dr. Miguel Costas, Dr. Edmundo Castillo, Dr. Abel Moreno y al Dr. Enrique García por la evaluación del manuscrito, las observaciones y sugerencias que contribuyeron a mejorar el escrito final.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico recibido (Becario **235576**).

A la Universidad Nacional Autónoma de México, Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación (PAPIIT-DGPA-UNAM) por el financiamiento a través del proyecto **IN104210-3**.

Al consejo nacional de ciencia y tecnología (CONACyT) por el financiamiento a través del proyecto **153208**.

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Biofísicoquímica (L. 309) de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría del Dr. Luis F. Olguín Contreras.

Los resultados de este trabajo fueron presentados en el:

- .XXIX Congreso Nacional de Bioquímica, de la Sociedad Mexicana de Bioquímica Noviembre 2012. Oaxaca, México.
- Cuarto Congreso de la Rama de Físicoquímica, Estructura y Diseño de Proteínas, de la Sociedad Mexicana de Bioquímica, Noviembre 2013 Guanajuato, México.
- 3er USA-Mexico Workshop in Biological Chemistry: Protein Folding, Dynamics and Function. November 2013 Guanajuato, México
- "QUIMIUNAM", organizado por el Posgrado en Ciencias Químicas UNAM, 2015

Los resultados de este proyecto fueron publicados en la revista *Biochemistry and Biophysics Reports* con el título:

Sánchez-Romero J.J., Olguin L.. "Choline sulfatase from *Ensifer (Sinorhizobium) meliloti*: Characterization of the unmodified enzyme" *Biochemistry and Biophysics Reports, Volume 3, September, 2015. Pages 161-168.* doi:10.1016/j.bbrep.2015.08.002

A mis padres que gracias a ellos he podido llegar tan lejos. A mis hermanas por su apoyo durante este largo camino. A mis sobrinos la alegría de mi vida.

Índice

Índice.....	i
Índice de figuras.....	iii
Resumen	vii
Abstract	ix
1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.	2
2.1. Simbiosis y osmoprotección	2
2.2. Sulfatasas.....	5
2.2.1. Estructura	7
2.2.2. Mecanismo enzimático	9
2.2.3. Modificación Pos-trasducional (FGly)	10
3. Objetivos	14
3.1. Objetivo general.....	14
3.2. Objetivos particulares.....	14
4. Materiales y métodos	15
4.1. Producción del vector de expresión para COS	15
4.2. Cultivo Celular y condiciones de expresión de la COS	15
4.3. Purificación de la COS.....	16
4.4. Caracterización de la COS.....	18
4.5. Ensayos de actividad nativa	19
4.6. Ensayos de actividad promiscua	20
4.7. Ensayos de inhibición.....	21
4.8. Determinación de la modificación pos-traduccional	22

4.9. Co-expresión	23
5. Resultados.	25
5.1. Producción del vector.....	25
5.2. Cultivo Celular.....	27
5.3. Purificación.....	29
5.4. Caracterización.....	30
5.5. Ensayos de actividad nativa.	33
5.6. Ensayos de actividad promiscua.	45
5.7. Ensayos de inhibición.....	50
5.8. Determinación de la modificación postraducciona.	55
5.9. Co-expresión.	60
5.9.1. Producción de los vectores y cultivo celular.....	60
5.9.2. Purificación	64
5.9.3. Caracterización y determinación de la modificación postraducciona ...	66
5.9.4. Ensayos de actividad nativa.	68
5.9.5. Ensayos de actividad promiscua.....	70
6. Discusión.....	73
7. Conclusiones.....	82
8. Referencias	83
9. Anexo	87

Índice de figuras

FIGURA 2.1. SÍNTESIS DE GLICINA BETAÍNA PARTIR DE SULFATO DE COLINA EN CONDICIONES DE ESTRÉS OSMÓTICO EN <i>ENSIFER MELILOTI</i>	3
FIGURA 2.2. DISTRIBUCIÓN DE LAS COLINA-O-SULFATASAS EN MICROORGANISMOS (CREGUT, DURAND, & THOUAND, 2014).....	5
FIGURA 2.3. SECUENCIA ALTAMENTE CONSERVADA EN LAS SULFATASAS PROCARIOTAS Y EUCARIOTAS.	7
FIGURA 2.4. ESTRUCTURA DE LAS SULFATASAS Y LA REPRESENTACIÓN DE LOS SUBDOMINIOS (LOS CÍRCULOS SON HÉLICES Y LOS TRIÁNGULOS HOJAS B). TOMADO DE (GHOSH, 2005).....	8
FIGURA 2.5. RESIDUOS CONSERVADOS DEL SITIO ACTIVO DE LAS SULFATASAS TIPO I.(TOMADO DE (HANSON ET AL., 2004).	9
FIGURA 2.6. ESQUEMA DEL MECANISMO CATALÍTICO DE LAS SULFATASAS TIPO I. TOMADO DE (BOLTES ET AL., 2001).	10
FIGURA 2.7. MECANISMOS DE MADURACIÓN DE SULFATASAS EN PROCARIONTES TOMADO DE (BENJDIA ET AL., 2007).	11
FIGURA 2.8. MECANISMO DE MADURACIÓN DE LAS SULFATASAS TIPO CYS POR LA FGE TOMADO DE (BENJDIA ET AL., 2007).	12
FIGURA 5.1. COMPARACIÓN ENTRE FRAGMENTOS DE LA SECUENCIA EL GEN SILVESTRE DE COS (<i>BETC</i>) (SEQ_2) Y EL GEN COS OPTIMIZADO PARA LA EXPRESIÓN EN <i>E. COLI</i> (SEQ_1).	25
FIGURA 5.2.A) ESQUEMA DEL VECTOR DE EXPRESIÓN PET26B-COS Y B) PATRONES DE DIGESTIÓN PARA EL VECTOR DE EXPRESIÓN. VECTOR LINELIZADO CON <i>XhoI</i> (LÍNEA 1) Y TRATADO CON <i>NdeI</i> Y <i>XhoI</i> (LÍNEA 2), M MARCADOR DE PESO (PARES DE BASES PB).....	26
FIGURA 5.3. SDS-PAGE PARA LA DETERMINACIÓN DE CONDICIONES ÓPTIMAS DE INDUCCIÓN. A) VARIACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE IPTG Y B) INFLUENCIA DEL TIEMPO DE INDUCCIÓN.....	28
FIGURA 5.4. A) CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD (HisTRAP) PARA LA MUESTRA DE COS. B) SDS-PAGE DE LOS DIFERENTES PASOS DE PURIFICACIÓN: 1) EXTRACTO CRUDO, 2) HisTRAP Y 3) FILTRACIÓN EN GEL. Y C) CROMATOGRAMA DE FILTRACIÓN EN GEL PARA LA COS.....	29
FIGURA 5.5. DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR EN SOLUCIÓN MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE FILTRACIÓN EN GEL A) CALIBRACIÓN DE LA COLUMNA, B) DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR DE COS.....	31
FIGURA 5.6. ANÁLISIS DLS PARA LA PROTEÍNA COS, EN EL CUAL SE MUESTRA UN SOLO PICO CON UN RADIO HIDRODINÁMICO EN 5.6NM.	32
FIGURA 5.7. RESULTADO DEL ANÁLISIS MALDI-TOF PARA COS. SE PUEDEN OBSERVAR PICOS CORRESPONDIENTES AL MONÓMERO (59.170 KDA) Y AL DIMERO (118.411 KDA) DE LA PROTEÍNA. .	33
FIGURA 5.8. TERMOGRAMA DEL CALOR DE DILUCIÓN DEL SULFATO DE COLINA EN EL AMORTIGUADOR DE REACCIÓN A 25°C Y UN PH 7.5.	34

FIGURA 5.9. TERMOGRAMA DE LA HIDRÓLISIS DEL SULFATO DE COLINA POR COS. EN ESTE SE OBSERVAN LAS MÚLTIPLES INYECCIONES ASÍ COMO LOS DIFERENTES ESTADOS ESTACIONARIOS CORRESPONDIENTES A LAS VELOCIDADES INICIALES A CADA CONCENTRACIÓN A 25°C Y UN PH 7.5.	35
FIGURA 5.10. ENTALPÍA APARENTE (ΔH_{APP}) PARA LA HIDRÓLISIS DEL SULFATO DE COLINA POR COS, DETERMINADA POR ITC UTILIZANDO EL MÉTODO DE INYECCIÓN SIMPLE A 25°C Y PH 7.5.	36
FIGURA 5.11. GRÁFICO DE MICHAELIS-MENTEN PARA LA HIDRÓLISIS DEL SULFATO DE COLINA CATALIZADO POR COS A 25°C Y UN PH 7.5. EN LA CUAL SE OBSERVA INHIBICIÓN POR SUSTRATO.	37
FIGURA 5.12. CURVA PATRÓN DE P-NITROFENOL A 400NM, A UN PH= 7.5 Y 25°C.	38
FIGURA 5.13. CINÉTICA DE MICHAELIS-MENTEN PARA LA HIDRÓLISIS DEL PNPS A 25°C Y PH 7.5. SE PUEDE OBSERVAR QUE NO SE LOGRA LA SATURACIÓN DE LA ENZIMA CON ESTE SUSTRATO.	39
FIGURA 5.14. CURVA PATRÓN DE MU A 370NM, A 25°C Y PH 7.5.	40
FIGURA 5.15. CINÉTICA DE MICHAELIS-MENTEN PARA LA HIDROLISIS DEL MUS A 25°C Y PH=7.5. SE PUEDE OBSERVAR QUE NO SE LOGRA LA SATURACIÓN COMPLETA DE LA ENZIMA CON ESTE SUSTRATO.	41
FIGURA 5.16. GRÁFICO DE CURSO DE LA REACCIÓN EN EL CUAL SE OBSERVAN LOS MÚLTIPLES CICLOS CATALÍTICOS EN LA REACCIÓN DE HIDRÓLISIS DEL PNPS (70mM) Y 1.7µM DE COS A 25°C Y UN PH 7.5.	42
FIGURA 5.17. CURVA PATRÓN DE P-NITROFENOL A 400NM A LOS DIFERENTES PH DE TRABAJO Y 25°C. SE OBSERVA LA DEPENDENCIA DEL COEFICIENTE DE ABSORTIVIDAD MOLAR EN FUNCIÓN DEL PH: 4,917 M ⁻¹ CM ⁻¹ A PH 6.5; 13,567 M ⁻¹ CM ⁻¹ A PH 7.5 Y 19,581 M ⁻¹ CM ⁻¹ A PH 8.5.	43
FIGURA 5.18. CONSTANTES CINÉTICAS DE LA HIDRÓLISIS DEL PNPS EN FUNCIÓN DEL PH. A) K_{CAT} VS PH B) K_M VS PH Y C) LA CONSTANTE DE ESPECIFICIDAD (K_{CAT}/K_M) VS PH QUE PRESENTA UN MÁXIMO A PH 6.5.	44
FIGURA 5.19. ESTRUCTURA DE LOS COMPUESTOS UTILIZADOS COMO SUSTRATOS PARA LA COS.	45
FIGURA 5.20. CURSO DE LA REACCIÓN DE HIDRÓLISIS DEL PNPP (40 mM) POR COS (5.2 µM) A 25°C Y PH 7.5. LA REACCIÓN TIENE UN COMPORTAMIENTO LINEAL HASTA POR 24 H.	46
FIGURA 5.21. CINÉTICA DE MICHAELIS-MENTEN PARA LA ACTIVIDAD PROMISCUA DE MONOFOSFATASA CONTRA PNPP A 25°C Y UN PH 7.5.	47
FIGURA 5.22. CINÉTICA DE MICHAELIS-MENTEN PARA LA ACTIVIDAD PROMISCUA DE FOSFONATASA CONTRA PNPPP A 25°C Y UN PH 7.5.	48
FIGURA 5.23. TERMOGRAMA DE LA HIDRÓLISIS DEL FOSFATO DE COLINA POR COS A 25°C Y PH 7.5. EN TODAS LAS INYECCIONES SE OBSERVA EL CALOR ASOCIADO A LA DILUCIÓN DEL SUSTRATO, PERO EN CADA CASO SE OBSERVA QUE LA POTENCIA REGRESA A LA LÍNEA BASE INICIAL, INDICANDO LA AUSENCIA DE REACCIÓN.	49
FIGURA 5.24. TERMOGRAMA DEL CALOR DE DISOLUCIÓN DEL FOSFATO DE COLINA EN EL AMORTIGUADOR DE REACCIÓN A 25°C Y UN PH 7.5.	50
FIGURA 5.25. LA GRAFICA NOS MUESTRA LA VARIACIÓN DE LA ACTIVIDAD RELATIVA DE COS EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE DIFERENTES INHIBIDORES A 25°C Y UN PH 7.5.	51

FIGURA 5.26. GRÁFICO DE MICHAELIS–MENTEN PARA LA HIDRÓLISIS DE PNPS A LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE COLINA A 25°C Y UN PH 7.5.	52
FIGURA 5.27. GRÁFICA DE DOBLES RECÍPROCOS JUNTO CON EL AJUSTE GLOBAL PARA DETERMINAR EL TIPO DE INHIBICIÓN Y SU CONSTANTE DE INHIBICIÓN A 25°C Y UN PH 7.5.....	53
FIGURA 5.28. GRÁFICO DE MICHAELIS–MENTEN PARA LA ACTIVIDAD PROMISCUA DE MONOFOSFATAS, A LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE COLINA.	54
FIGURA 5.29. GRÁFICO DE MICHAELIS–MENTEN PARA LA ACTIVIDAD PROMISCUA DE FOSFONATASA A LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE COLINA.	54
FIGURA 5.30. ESQUEMA DE LA REACCIÓN DE ELLMAN PARA LA CUANTIFICACIÓN DE CISTEÍNAS EN LA PROTEÍNA.	56
FIGURA 5.31. CURVA PATRÓN DE LA REACCIÓN DE ELLMAN PARA LA CUANTIFICACIÓN DE CISTEINAS A 412 NM.	57
FIGURA 5.32. ESPECIES QUE PUEDEN DETECTARSE POR MS CUANDO SE ANALIZA EL PÉPTIDO CON LA CISTEÍNA DEL SITIO ACTIVO DE LAS ARS.....	58
FIGURA 5.33. RESULTADO DEL ANÁLISIS HPLC-MS PARA COS A) CROMATOGRAMA DE IONES EXTRAÍDOS DEL PÉPTIDO M+3H= 578.93 M/Z Y B) ESPECTRO DE MASAS PARA ESTE PÉPTIDO.	59
FIGURA 5.34. A) ESQUEMA DEL VECTOR DE EXPRESIÓN PRSFDUET+FGE+COS Y B) PATRONES DE DIGESTIÓN PARA EL VECTOR DE CLONACIÓN (LÍNEA 1), EL VECTOR LINELIZADO CON <i>XhoI</i> (LÍNEA 2) Y TRATADO CON <i>HindIII</i> Y <i>XhoI</i> (LINEA3), M MARCADOR DE PESO EN PARES DE BASES.	61
FIGURA 5.35. GRÁFICO DE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE COS A LAS DIFERENTES CONDICIONES DE CO-EXPRESIÓN UTILIZANDO EL SISTEMA pDUET. MODIFICANDO LA TEMPERATURA DE INDUCCIÓN Y LA CONCENTRACIÓN DE IPTG (MM).	62
FIGURA 5.36. A) ESQUEMA DEL VECTOR DE EXPRESIÓN pBAD+COS Y B) PATRONES DE DIGESTIÓN PARA EL VECTOR DE CLONACIÓN EL VECTOR TRATADO CON LAS ENZIMAS DE RESTRICCIÓN <i>NcoI</i> Y <i>HindIII</i> (LINEA1), M MARCADOR DE PESO EN PARES DE BASES.	63
FIGURA 5.37. GRÁFICO DE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE COS A LAS DIFERENTES CONDICIONES DE CO-EXPRESIÓN CON EL SISTEMA pBAD.	64
FIGURA 5.38. GEL DE SDS-PAGE DE LOS DIFERENTES PASOS DE PURIFICACION1) EXTRACTO CRUDO, 2) ELUIDA DE LA COLUMNA HIS-TRAP Y 3) ELUIDA DE LA COLUMNA DE FILTRACIÓN EN GEL.	65
FIGURA 5.39. DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR DE COS-FGLY UTILIZANDO UNA COLUMNA DE FILTRACIÓN EN GEL.	66
FIGURA 5.40. ANÁLISIS DLS PARA LA PROTEÍNA COS-FGLY, EN EL CUAL SE MUESTRA UN SOLO PICO CON UN RADIO HIDRODINÁMICO EN 5.6NM.....	67
FIGURA 5.41 TERMOGRAMA DE LA HIDRÓLISIS DEL SULFATO DE COLINA POR COS-FGLY .EN ESTE SE OBSERVAN LAS MÚLTIPLES INYECCIONES ASÍ COMO LOS DIFERENTES ESTADOS ESTACIONARIOS CORRESPONDIENTES A LAS VELOCIDADES INICIALES A CADA CONCENTRACIÓN A PH7.5 Y 25°C.	68
FIGURA 5.42. GRÁFICO DE MICHAELIS-MENTEN PARA LA HIDRÓLISIS DEL SULFATO DE COLINA POR COS-FGLY A PH 7.5 Y 25°C.EN LA CUAL SE OBSERVA UNA INHIBICIÓN POR SUSTRATO.	69

FIGURA 5.43. CINÉTICA DE MICHAELIS-MENTEN PARA LA HIDRÓLISIS DEL PNPS POR COS-FGLY A PH 7.5 Y 25°C. SE PUEDE OBSERVAR QUE NO SE LOGRA LA SATURACIÓN DE LA ENZIMA CON ESTE SUSTRATO.	70
FIGURA 5.44. CINÉTICA DE MICHAELIS-MENTEN PARA LA ACTIVIDAD PROMISCUA CONTRA PNPP CON LA ENZIMA COS-FGLY.	71
FIGURA 5.45. TERMOGRAMA DE LA HIDRÓLISIS DEL FOSFATO DE COLINA POR COS-FGLY. EN ESTE SE OBSERVAN EN MÚLTIPLES INYECCIONES EL CALOR ASOCIADO A LA DISOLUCIÓN, POSTERIORMENTE SE OBSERVA QUE LA POTENCIA REGRESA A LA LÍNEA BASE A PH7.5 Y 25°C.	72
FIGURA 6.1. INCREMENTO DE A) K_{CAT} Y B) EFICIENCIA CATALÍTICA (K_{CAT}/K_M), PARA LA ENZIMA MODIFICADA COS-FGLY EN COMPARACIÓN A LA NO MODIFICADA COS-CYS. EL VALOR DE K_M NO SE MODIFICA CON LA FGLY.....	77
FIGURA 6.2. MECANISMOS CATALÍTICOS PROPUESTOS A) EN AUSENCIA DE LA MODIFICACIÓN POSTRADUCCIONAL (FGLY) Y B) CON LA MODIFICACIÓN.	78
FIGURA 6.3. GRÁFICA DE LAS CONSTANTES DE INHIBICIÓN COMPETITIVA POR COLINA PARA CADA UNA DE LAS ACTIVIDADES.	81

Resumen

Las colina-O-sulfatasas son enzimas ampliamente distribuidas en los microorganismos. Estas enzimas participan en el metabolismo del azufre (S) y en procesos de regulación osmótica en los microorganismos. La enzima colina-O-sulfatasa de *Ensifer (Sinorhizobium) meliloti* pertenece a la familia de las arilsulfatasas (sulfatasas de tipo I) y se escogió como modelo de estudio. Se realizó su clonación y expresión en *E. coli* y se diseñó un protocolo de purificación. Se realizó la caracterización bioquímica de esta proteína, determinando que se encuentra en estado dimérico en solución y que presenta un puente disulfuro intramolecular.

La actividad nativa de sulfatasa de la enzima fue probada contra *p*-nitrofenil-sulfato (pNPS) y metilumbeliferil sulfato (MUS) obteniéndose valores de k_{cat} de 3.5×10^{-2} y $4.2 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ y K_{MS} de 75.8 y 11.8 mM, respectivamente. Estos valores de k_{cat} son ~100 veces menores a los reportados para otras arilsulfatasas con los mismos sustratos. Del mismo modo se midió la hidrolisis del sustrato natural, sulfato de colina, mostrando valores de k_{cat} de $2.47 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$ y una K_M de 11.11 mM; estos valores no pueden ser comparados ya que no existen estudios previos que presenten valores de k_{cat} sobre estas enzimas y su sustrato natural.

La causa de la baja actividad de esta enzima se debe a la falta de una modificación postraduccional que deben tener todas las sulfatasas en su sitio activo, en la cual se modifica enzimáticamente una cisteína por una formilglicina (FGly). Este residuo es el responsable de realizar el ataque nucleofílico sobre el sustrato. La ausencia de FGly se comprobó mediante la reacción de Ellman en la cual se cuantificaron seis cisteínas de las seis presentes en la secuencia de la proteína lo cual nos sugiere la falta de esta modificación. Este resultado fue confirmado por medio de un análisis detallado de HPLC-espectroscopia de masas de los péptidos trípticos, el cual reveló la ausencia de la modificación postraduccional. A pesar de la falta de modificación postraduccional, la actividad catalítica de COS tiene

múltiples ciclos catalíticos, lo cual sugiere que la cisteína del sitio activo es capaz de realizar el ataque nucleofílico sobre los distintos ésteres de sulfato.

Se probaron también las actividades promiscuas de fosfatasa y fosfonatasa de la COS, las cuales son menores a las obtenidas con los sulfatos (k_{cat} $3.4 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ y k_{cat} $4.28 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ y K_M de 8.2 mM y 45.5 mM respectivamente), lo cual es esperado para las actividades promiscuas que siempre son varios órdenes de magnitud más bajas que la actividad nativa; a pesar que estas actividades promiscuas son mucho mayores que para las reacciones no catalizadas.

Finalmente, se realizó la co-expresión de la colina-O-sulfatasa junto a la enzima generadora de formilglicina FGE de *E. meliloti* (encargada de la modificación postraducciona). Con lo anterior se logró la conversión de un 29% de la cisteína 54 a formilglicina, y un aumento de 65 veces en la actividad contra el sulfato de colina (k_{cat} 5.22 s^{-1}).

Este trabajo representa la primera caracterización cinética en una enzima purificada de la familia de las colina-O-sulfatasas, y abre la puerta para investigar con mayor detalle estas enzimas en los microorganismos.

Abstract

Choline-O-sulfatases are enzymes broadly distributed in microorganisms. They are involved in the metabolism of sulfur (S) and in the cellular osmotic regulation processes. Choline-O-sulfatase from *Ensifer meliloti* (COS) belongs to the family of arylsulfatases (sulfatases type I) and was chosen as a case of study. Its expression was performed in *E. coli* and a purification protocol was designed. The biochemical characterization of COS showed that it is a dimer in solution and has an intramolecular disulfide bridge.

COS native sulfatase activity was tested against *p*-nitrophenyl sulfate (pNPS) and methylumbelliferyl sulfate (MUS), obtaining values of $k_{cat} = 3.5 \times 10^{-2}$ and $4.2 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ and $K_M = 75.8$ and 11.8 mM , respectively. These k_{cat} values are ~100-fold lower than those reported for other arylsulfatases with the same substrates. Furthermore, measurement of the hydrolysis of its natural substrate (choline sulfate) gave a k_{cat} value of $2.47 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$ and a K_M of 11.11 mM .

The reason for the low COS activity is the lack of a posttranslational modification that all sulfatases should have in their active site, in which a cysteine is enzymatically modified to a formylglycine (FGly). This residue is responsible for carrying out the nucleophilic attack on the substrate. The absence of FGly in COS was tested by the Ellman reaction in which all six cysteines from its sequence were determined as present in the recombinant protein, indicating the lack of this modification. This was confirmed by HPLC-Mass spectroscopy analysis of COS tryptic digestion, which showed no evidence of the FGly presence. Despite the absence of the posttranslational modification, COS has multiple catalytic turnovers, suggesting that the active site cysteine is able to perform the nucleophilic attack to the sulfate esters.

COS promiscuous activities of phosphonate and phosphate were also determined, finding that they are lower than those obtained with sulfate esters (k_{cat} $3.4 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ and k_{cat} $4.28 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ and K_M 8.2 mM and 45.5 mM, respectively). This is expected for promiscuous activities, which are always several orders of magnitude lower than the native activity.

Finally, the co-expression of choline sulfatase and the FGE from *E. meliloti* (formylglycine-generating enzyme responsible for the post-translational modification) was performed. With the above, the conversion of 29% of cysteine 54 to formylglycine was achieved, and a 65-fold increase was observed for the choline sulfate hydrolysis ($5.2 \text{ k}_{cat} \text{ s}^{-1}$).

This work represents the first kinetic characterization of a purified member of the choline-O-sulfatase family, and paves the way for further investigations of these enzymes in microorganisms.

1. Introducción

En 1998 fue identificado el gen *BetC* que codifica para la colina-*O*-sulfatasa de *Ensifer (Sinorhizobium) meliloti* (Osteras, Boncompagni, Vincent, Poggi, & Le Rudulier, 1998). Esta enzima se encuentra involucrada en el primer paso de la biosíntesis de la glicinbetaina a partir del sulfato de colina en condiciones de estrés osmótico (Osteras et al., 1998). También se sabe que los productos catabólicos del sulfato de colina pueden utilizarse como fuente de C, N y S en condiciones de escasas nutrición (Cregut, Durand, & Thouand, 2013; Galvao, de Lorenzo, & Canovas, 2006; Woolley & Peterson, 1937).

Así mismo, se ha demostrado que las colina-*O*-sulfatasas se encuentran ampliamente distribuidas entre los microorganismos, aunque la función que realizan en cada uno de ellos no está claramente definida. Debido a lo anterior, el estudio de las colina-*O*-sulfatasas se vuelve esencial en la comprensión de los procesos de osmoprotección y el metabolismo del S en los microorganismos. Sin embargo, existen solo tres estudios sobre la caracterización cinética de las colina-*O*-sulfatasas, pero todos ellos han sido realizados con extractos crudos (Lucas, Burchiel, & Segel, 1972; Scott & Spencer, 1968; Takebe, 1961).

En este trabajo se realizó la expresión heteróloga de la colina-*O*-sulfatasa de *Ensifer meliloti* en *E. coli* BL21 (DE3), así como su purificación y caracterización bioquímica y cinética.

2. Antecedentes.

2.1. Simbiosis y osmoprotección

Las plantas realizan simbiosis con los microorganismos para satisfacer sus necesidades nutricionales. Una de las más importantes es la endosimbiosis bacteriana en las leguminosas que sirve para la fijación de nitrógeno, como en el caso de *Ensifer meliloti* (anteriormente conocida como *Sinorhizobium meliloti* (Young, 2010)) una especie simbiótica de la alfalfa (*Medicago sativa*) (Jones, Kobayashi, Davies, Taga, & Walker, 2007). Estas simbiosis se encuentran localizadas en las raíces de las plantas, formando un microambiente denominado rizosfera (zona del suelo que interactúa con las raíces de las plantas). La rizosfera es un sistema en constante cambio ya que es modificado por un gran número de factores como la cantidad de agua, la composición de las sales así, como los cambios fisicoquímicos inducidos por las plantas y los microorganismos. Estos factores puede producir cambios drásticos en la osmolaridad (concentración de solutos en el medio) de la rizosfera (Miller & Wood, 1996). Debido a esto, la habilidad de adaptación de las bacterias a cambios en la osmolaridad juega un papel muy importante en la supervivencia y la colonización de la rizosfera. Las bacterias combaten el estrés osmótico mediante la acumulación de solutos inertes que proveen un balance en la presión osmótica. Estos solutos pueden acumularse en altas concentraciones sin que interfieran con los procesos vitales para el organismo. Los solutos más significativos son el glutamato, la prolina, el K⁺, la trehalosa, la glicina betaína, la prolina betaína y la ectoína (Galvao et al., 2006; Miller & Wood, 1996). Estos compuestos se acumulan mediante tres procesos: a) su transporte activo, b) vía la modulación de su biosíntesis y c) una combinación de ambos mecanismos (Miller & Wood, 1996). De los compuestos osmoprotectores, la glicina betaína es uno de los más eficientes (Lerudulier, Strom, Dandekar, Smith, &

Valentine, 1984). La glicina betaína puede ser sintetizada a partir de colina a través de mecanismos enzimáticos (Miller & Wood, 1996). Algunas bacterias y hongos pueden obtener colina a partir de colín-O-sulfato a través de la hidrólisis de éste por la colina-O-sulfatasa (*betC*) (Galvao et al., 2006; Miller & Wood, 1996; Osteras et al., 1998).

El mecanismo de síntesis de la glicina betaína a partir del sulfato de colina en condiciones de estrés osmótico en *Ensifer meliloti* fue descrito por Osteras et al (Osteras et al., 1998). En dicho estudio, se logró la identificación del operón *bet/CBA* involucrado en este proceso (Figura 2.1). Este operón está constituido por un gen regulatorio (*betI*) y tres genes estructurales, *betC* (colina-O-sulfatasa), *betB* (betaina-aldehído deshidrogenasa) y *betA* (colina deshidrogenasa) (Osteras et al., 1998). Esta ruta biosintética es dependiente de la concentración de colina en el medio y en menor medida de la concentración de sulfato de colina y acetilcolina (Mandon et al., 2003; Osteras et al., 1998).

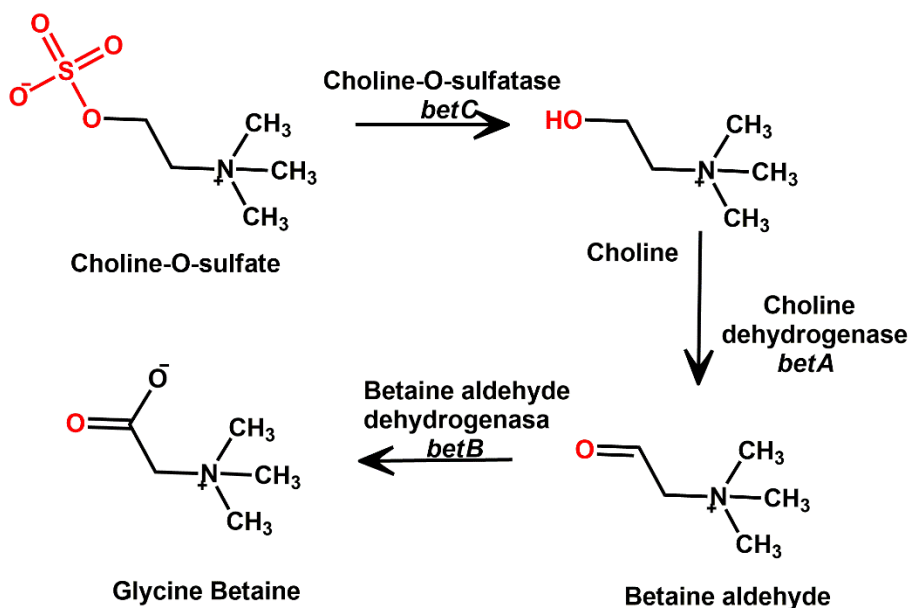


Figura 2.1. Síntesis de glicina betaína a partir de sulfato de colina en condiciones de estrés osmótico en *Ensifer meliloti*

Por otro lado, el sulfato de colina puede ser almacenado por las bacterias para utilizarse como fuente de carbono, nitrógeno y azufre en condiciones de escasez nutricional, como es el caso de *Pseudomonas putida* y *Aspergillus sydowi* (Cregut et al., 2013; Galvao et al., 2006; Woolley & Peterson, 1937). No obstante, la utilización de sulfato de colina como fuente de nutrientes, solo es posible en condiciones de baja osmolaridad para algunos microorganismos como *Rhizobium meliloti* (Lerudulier & Bernard, 1986; Miller & Wood, 1996). El sulfato producido por la hidrólisis del sulfato de colina, ayuda a satisfacer las necesidades de azufre. Por otro lado, la colina juega un papel importante en la biosíntesis de fosfatidil colina (PC), que es un componente esencial de la membrana de algunas especies de bacterias como en la familia *Rhizobiaceae* (de Rudder, Sohlenkamp, & Geiger, 1999).

Debido a la importancia de las colina-O-sulfatasas en el mecanismo de regulación del estrés osmótico, estas enzimas se encuentran ampliamente distribuidas en muchos microorganismos (Figura 2.2), aunque la función que realizan en cada microorganismo no está claramente definida (Cregut et al., 2013). En algunos casos es considerada como proveedora de fuentes alternativas de azufre (Galvao et al., 2006; Woolley & Peterson, 1937), o como parte del mecanismo de regulación del estrés osmótico por acumulación de glicina betaína (Mandon et al., 2003; Osteras et al., 1998).

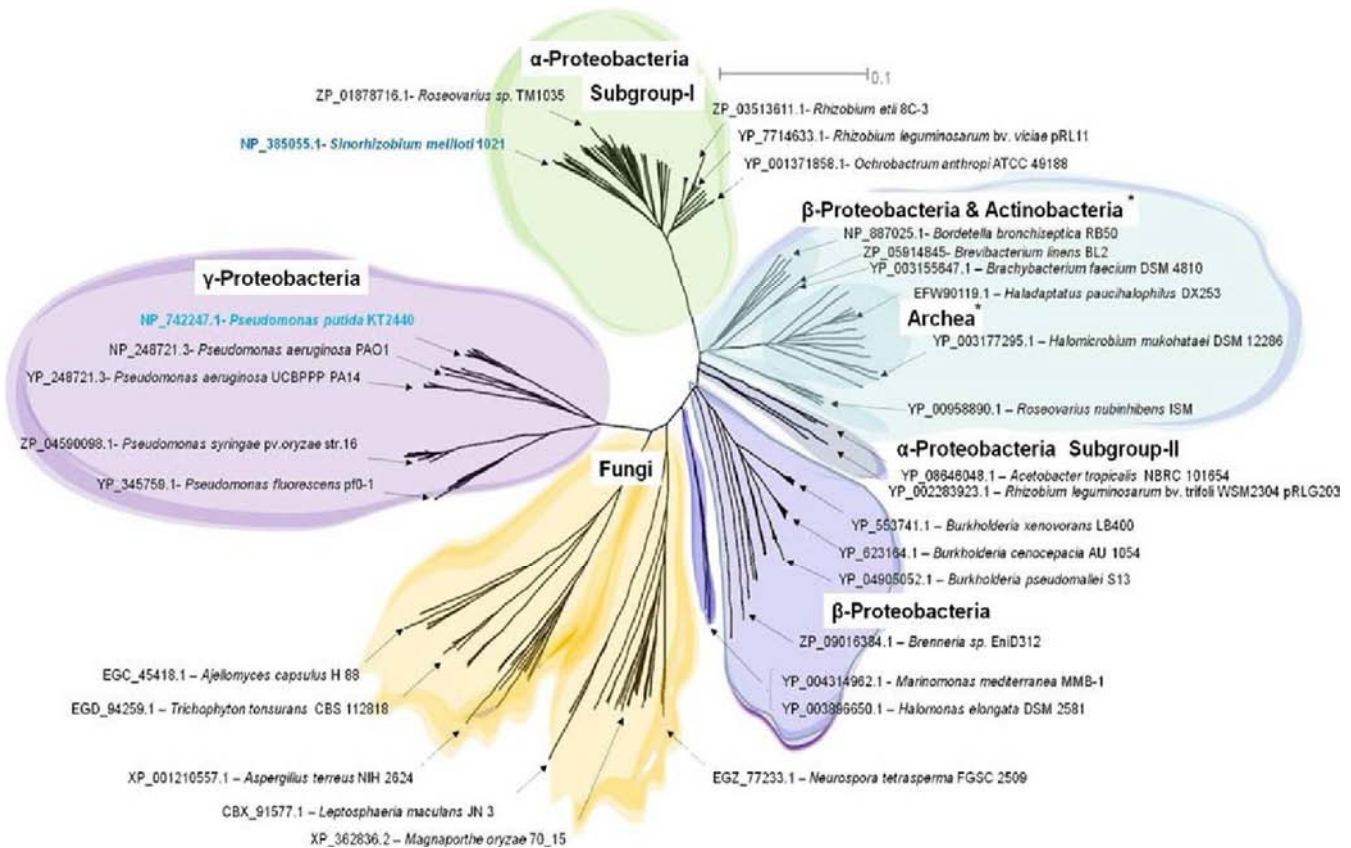


Figura 2.2. Distribución de las colina-O-sulfatases en microorganismos (Cregut, Durand, & Thouand, 2014).

2.2. Sulfatasas

Una gran parte de los compuestos de azufre en la naturaleza se encuentran presentes en forma de ésteres de sulfato. Estos ésteres de sulfato son hidrolizados por sulfatasas, las cuales se encuentran distribuidas tanto en eucariontes como en procariontes. Las sulfatasas cumplen diversas funciones celulares como metabolismo del azufre, degradación celular, y señalización celular. Pueden hidrolizar una gran diversidad de ésteres de sulfato desde glicolípidos, carbohidratos sulfatados, hasta hormonas (Hanson, Best, & Wong, 2004).

Las sulfatasas pueden ser clasificadas en tres grupos mecanísticamente distintos: Las sulfatasas Tipo II, que incluyen a las Fe (II) α-cetoglutarato-

dependiente dioxigenasas; las sulfatasas Tipo III, que son el grupo identificado más recientemente de alquilsulfatasas Zn-dependientes, y finalmente se encuentran las sulfatasas de Tipo I también conocidas como “arilsulfatasas” (ARS). Debido a un alto grado de identidad, las colina-O-sulfatasas se encuentran dentro de este último grupo de sulfatasas. Estructuralmente, las sulfatasas Tipo I pertenecen a la superfamilia de la fosfatasa alcalina y muestran un alto grado de conservación en su secuencia, estructura y mecanismo enzimático, tanto en enzimas de origen eucariontes como procariontes (Hanson et al., 2004). Las ARS tienen una secuencia de aminoácidos altamente conservada en su sitio activo: C/S-X-P-X-R (Figura 2.3) (Dierks, Lecca, Schlotterhose, Schmidt, & von Figura, 1999; Hanson et al., 2004; Sardiello, Annunziata, Roma, & Ballabio, 2005; von Figura, Schmidt, Selmer, & Dierks, 1998). Esta secuencia es fundamental ya que es el sitio de reconocimiento para una modificación postraducciona de un residuo de cisteína o serina del sitio catalítico, al residuo catalíticamente activo formilglicina (FGly). Esta modificación es realizada mediante una reacción catalizada por la enzima denominada enzima generadora de FGly (GFE), la cual solo reconoce la secuencia si ésta se encuentra en el primer tercio del extremo N-terminal de la proteína (Hanson et al., 2004).

		FGly	Largo	Secuencia
<i>Sulfatasas Humanas</i>				
ARSA	CTPSRAALLTG	69	507	P15189
ARSB	CTPSRSQLLTG	75	533	NP_000037
ARSC	CTPSRAAFMTG	83	583	P08842
ARSD	CTPSRAAFLTG	89	593	CAA58555
ARSE	CTPSRAAFLTG	86	589	I37197
ARSF	CSPSRSAFLTG	79	591	CAA78164
ARSG	CSPSRASLLTG	82	525	NP_001254656
SULF-1	CCPSRSSMLTG	87	871	AAM76860
SULF-2	CCPSRSSILTG	88	870	AAM76861
GLCN6S	CCPSRASILTG	79	522	P54793
GLCNS	CSPSRASLLTG	61	502	P51688
<i>Sulfatasas Eucariotas</i>				
HeARS	CTPSRS A IMTG	106	559	AAC27821
HpARS	CTPSRS A IMTG	100	551	P14000
SpARS	CTPSRS A I V TG	115	567	P50473
HpSULF-1	CTPTRS Q L M S G	80	508	AAF30402
PxGSS	CSPARTAVLTG	70	532	CAC86342
NcARS	CCPARVSLWTG	89	639	AAC02715
VcARS	CCPSRTNLWRG	72	649	Q10723
<i>Sulfatasas Procariotas</i>				
EmCOS	CAPARA S F M A G	54	512	AAC13371
MtARS	CTPSRGS L F T G	72	517	AAF72520
PsCOS	CAPSRF T L V S G	82	577	T45548
PaARS	CAPSRF T L V S G	51	533	P51691
PcARS	SQPANAML V N G	79	464	P22304
RlPMH	CSPARATLYTG	73	612	P15430
Consensus				
CTPSRAALLTG				

Figura 2.3. Secuencia altamente conservada en las sulfatasas procariotas y eucariotas.

2.2.1. Estructura

La estructura de las arilsulfatasas humanas y de bacterias gram-negativas presenta una gran similitud, dominando principalmente un monómero globular con una topología de sándwich α/β , que se divide en dos dominios, y algunas sulfatasas presentan un dominio transmembranal (Figura 2.4) (Ghosh, 2005; Hanson et al., 2004).

El dominio N-terminal está formado de una larga cadena de hojas β (alrededor de 10-11 hojas β) rodeada de hélices α y este dominio contiene el centro catalítico al final de la gran cadena de hojas β . El dominio C-terminal contiene una cadena de hojas β antiparalelas rodeado por hélices α , y una larga hélice α que empaqueta las regiones bucle de la hoja β del dominio N-terminal (Ghosh, 2005; Hanson et al., 2004).

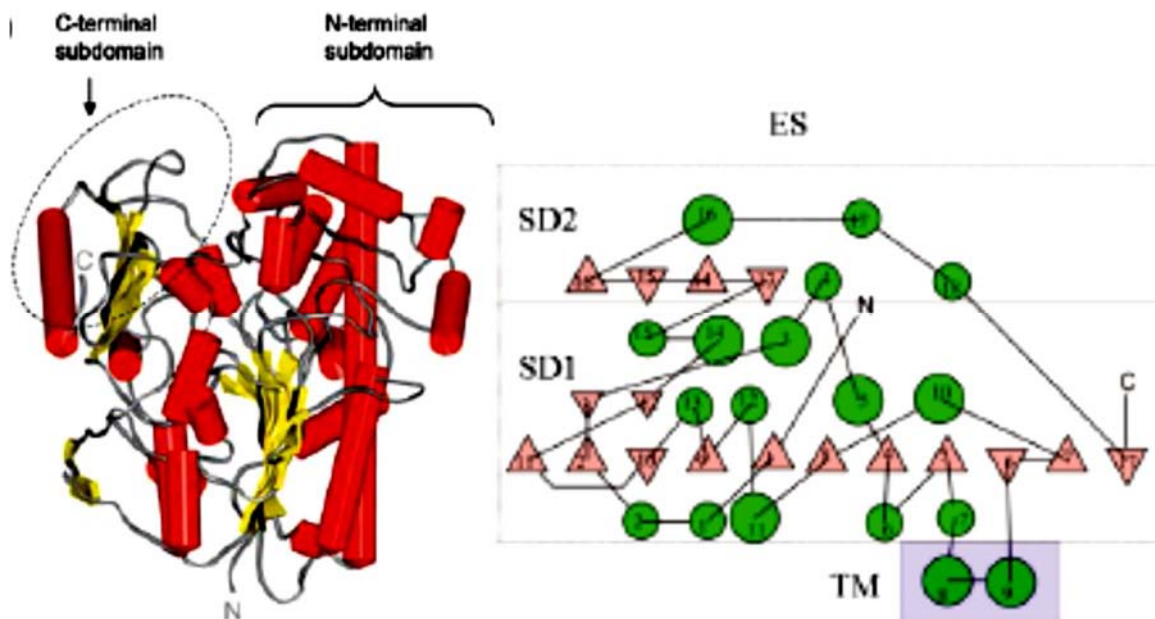


Figura 2.4. Estructura de las sulfatasas y la representación de los subdominios (los círculos son hélices y los triángulos hojas β). Tomado de (Ghosh, 2005).

La cavidad del sitio activo está ubicada en el extremo C-terminal de la gran cadena de hojas β , con el residuo FGly situado en la parte inferior de una estrecha hendidura rodeada de aminoácidos cargados positivamente. El dominio N-terminal del sitio catalítico de las sulfatasas muestra un alto grado de similitud estructural con la de las fosfatasas alcalinas (AP), pero difiere drásticamente en secuencia (Sowadski, Handschumacher, Murthy, Foster, & Wyckoff, 1985). Al superponer las estructuras tridimensionales de las ARS, se pueden observar 10 residuos altamente conservados (Figura 2.5), así como un catión divalente (Ca^{2+} ó Mg^{2+}). Este catión está coordinado con los residuos AspA, AspB, AspC y AsnA, además un oxígeno

($\gamma 1$) del residuo hidratado de FGly así como de uno de los oxígenos del sulfato están unidos a este catión (determinado a través de estructuras cristalizadas con sulfatos). Los residuos cargados positivamente LysA, LysB y HisB se encuentran uniendo al sustrato y los residuos ArgA y HisA estabilizan y orientan a el hidrato de FGly, que es responsable del ataque nucleófilico ($O \gamma 2$) (Figura 2.5) (Ghosh, 2005; Hanson et al., 2004).

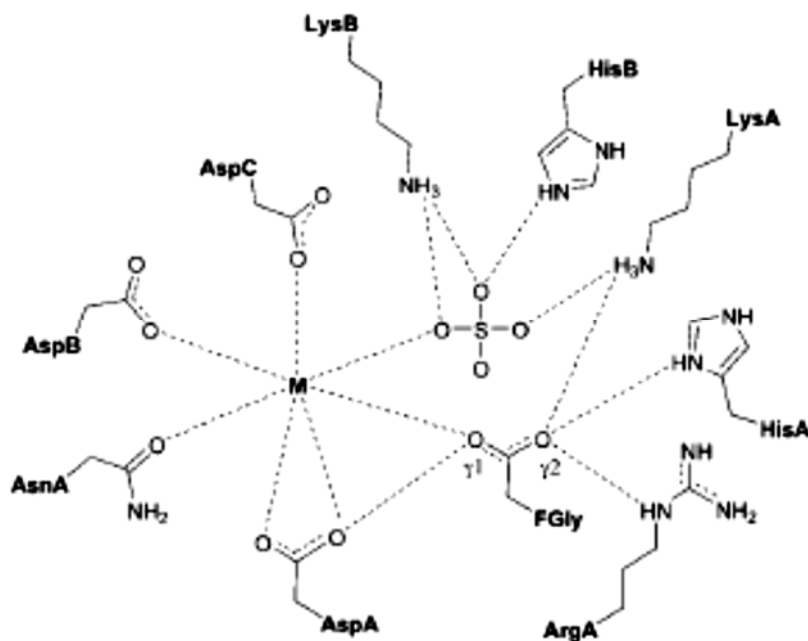


Figura 2.5. Residuos conservados del sitio activo de las sulfatasas tipo I.(tomado de (Hanson et al., 2004).

2.2.2. Mecanismo enzimático

El residuo de FGly que es catalíticamente activo es la forma α -formilglicina hidratada. Este diol es el responsable del ataque nucleófilico. El primer paso del mecanismo es la adición de una molécula de agua al aldehído de la FGly para formar el diol (Figura 2.6 A \rightarrow B). Posteriormente a la unión del éster de sulfato en el sitio activo, se produce el ataque nucleófilico del oxígeno del diol ($\gamma 1$) hacia el azufre del éster, para liberar el resto del alcohol como grupo saliente. Esto se realiza

mediante una sustitución nucleofílica (S_N2) con un intermediario pentavalente del azufre, resultando un intermediario covalente S-O (Figura 2.6 C→D). El siguiente paso consiste en la eliminación del grupo SO_4 para regenerar el aldehído de la FGly. Esto es impulsado por el oxígeno (γ_2) que es desprotonado por la HisA, para finalmente regenerar el sitio activo (Figura 2.6 D→A) (Boltes et al., 2001; Ghosh, 2005; Hanson et al., 2004; Toesch, Schober, & Faber, 2014).

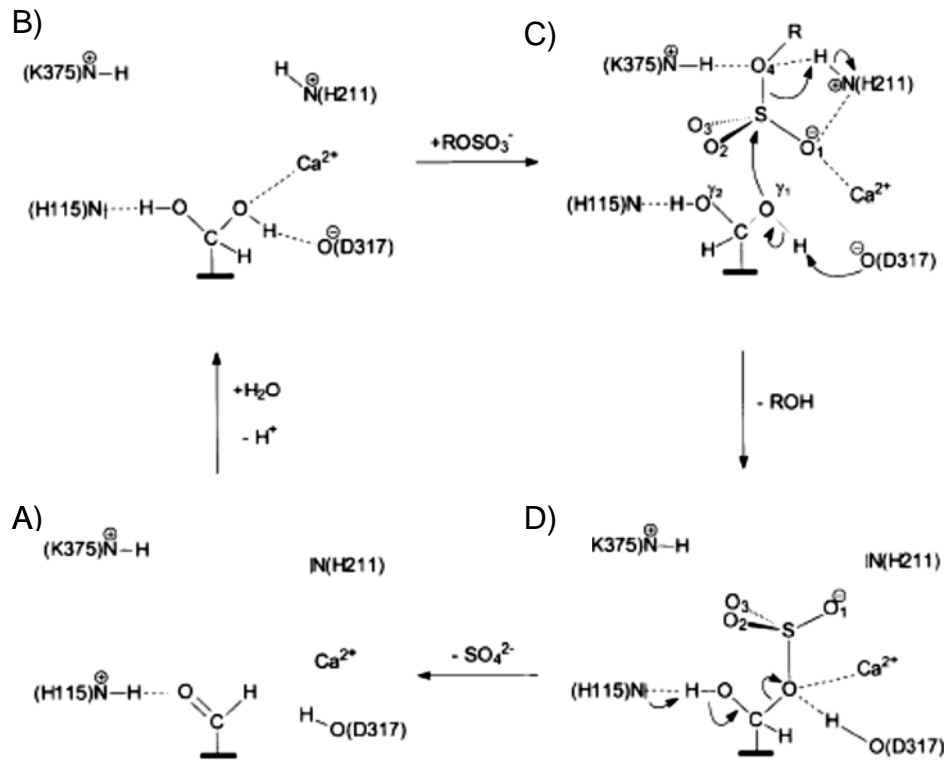


Figura 2.6. Esquema del mecanismo catalítico de las sulfatasas tipo I. Tomado de (Boltes et al., 2001).

2.2.3. Modificación Postraducciona (FGly)

Las sulfatasas de tipo I tienen en común un penta-péptido característico C/S-X-P-X-R que dirige la modificación postraducciona del primer residuo de cisteína (en eucariotas y procariotas) o serina (en procariotas) a FGly (Dierks et al., 1999; Hanson et al., 2004; Sardiello et al., 2005; von Figura et al., 1998). Debido a esto,

podemos clasificar a las sulfatasas en tipo serina y tipo cisteína. La modificación de enzimas del tipo Ser y del tipo Cys se produce por diferentes vías, y varios estudios han sido diseñados para identificar y caracterizar la maquinaria de la formación de la FGly (Figura 2.7) (Benjdia, Deho, Rabot, & Berteau, 2007; Bojarova & Williams, 2008; Sardiello et al., 2005).

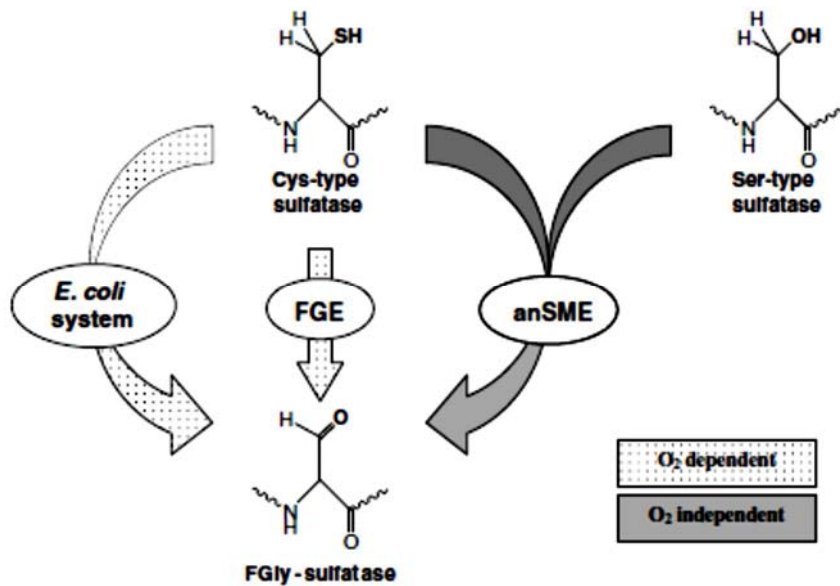


Figura 2.7. Mecanismos de maduración de sulfatasas en procariontes tomado de (Benjdia et al., 2007).

La conversión de las sulfatasas tipo Cys a FGly se realiza postraduccionalmente por una clase de enzimas llamadas FGE. En los eucariontes, estas enzimas residen en el retículo endoplasmático y realizan la modificación mediante la oxidación de la cisteína a través de un proceso que utiliza oxígeno molecular. El mecanismo propuesto para la formación de FGly por esta ruta involucra la formación de un disulfuro mixto entre el sustrato (cisteína de la sulfatasa) y la Cys 341 de la FGE, la oxidación de otro residuo de cisteína de la FGE a un ácido o perácido sulfénico, la transferencia de oxígeno de la cisteína del sustrato para generar un nuevo perácido en la cisteína, una eliminación de agua para dar un tio-aldehído y por último una hidrólisis para formar la FGly (Figura 2.8) (Bojarova & Williams, 2008).

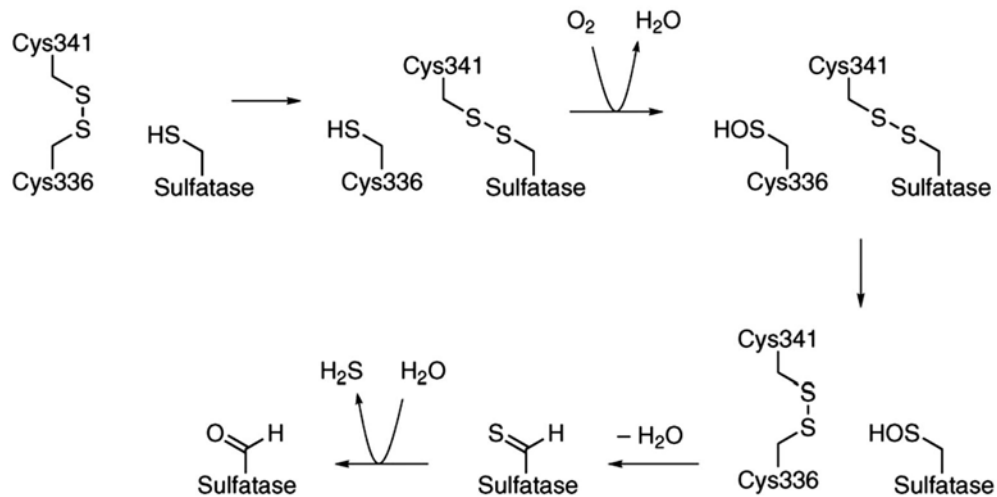


Figura 2.8. Mecanismo de maduración de las sulfatasas tipo Cys Por la FGE tomado de (Benjdia et al., 2007).

Las sulfatasas tipo Ser son modificadas a FGly de manera anaerobia por un grupo de enzimas llamadas enzimas anaerobias maduradoras de sulfatasas (anSME). Recientemente se ha demostrado que las anSME son capaces de la maduración de sulfatasas de tipo Cys (Berteau, Guillot, Benjdia, & Rabot, 2006). Las anSME son dependientes del cofactor S-adenosilmetionina (SAM), el cual es utilizado para formar el radical 5'-deoadenosil, que cataliza la extracción directa de un átomo de hidrógeno del sustrato (Benjdia, Leprince, Sandstrom, Vaudry, & Berteau, 2009; Bojarova & Williams, 2008). Sin embargo, el mecanismo por el cual estas enzimas catalizan la oxidación anaerobia de residuos de Cys o Ser todavía no es claro (Benjdia et al., 2009).

Por otro lado, *E. coli* tiene la capacidad de reconocer la secuencia característica de las sulfatasas (C/S-X-P-X-R) y convertir la cisteína a FGly, a pesar de no tener un gen homólogo que codifique para la enzima FGE, o equivalentes funcionales de anSME (Benjdia et al., 2009, Bojarova, 2008 #80). Lo anterior indica que *E. coli* presenta un tercer mecanismo de maduración de las sulfatasas Tipo Cys aún no descrito (Benjdia et al., 2007).

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

Expresar y purificar la colina-O-sulfatasa de *Ensifer (Sinorhizobium) meliloti*, para determinar los parámetro cinéticos asociados a su actividad nativa, para la caracterización de este grupo de enzimas.

3.2. Objetivos particulares.

- Sobre-expresar la proteína recombinante de *Ensifer meliloti* en *E. coli*.
- Purificar y caracterizar la enzima en solución.
- Determinar la presencia de la modificación postraducciona (FGly) de la enzima.
- Caracterizar la actividad nativa contra su sustrato natural y contra sustratos sintéticos.
- Determinar la presencia de actividades promiscuas de la enzima y caracterizar aquellas que estén presentes.
- Co-expresar la enzima junto con la FGE de *Ensifer meliloti* para lograr la modificación postraducciona de la enzima.

4. Materiales y métodos

4.1. Producción del vector de expresión para COS

El gen *betC* [AAC13371.1] fue optimizado - para su expresión en *E. coli* y sintetizado por GeneScript USA Inc. Seis residuos de histidina (His-Tag) fueron introducidos de manera adicional en el extremo C-terminal para facilitar su posterior purificación. Para obtener el vector de clonación (pET26-COS) el gen fue clonado en el pET26b+ (Novagen) entre los sitios de restricción *NdeI* (5' CATATG 3') y *XhoI* (5' CTCGAG 3').

4.2. Cultivo Celular y condiciones de expresión de la COS

El vector pET26-COS fue transformado en bacterias *E. coli* BL21 (DE3) químicamente competentes (método de cloruro de calcio (Sambrook & Russell, 2001)) utilizando medio Luria-Bertani (LB)-agar adicionado con 50 mg/ml de kanamicina. Las bacterias transformadas se seleccionaron y el ADN plasmidico fue extraído utilizando un kit de miniprep (QIAprep Spin Miniprep Kit, QIAGEN). Posteriormente se hizo un patrón de restricción para confirmar su identidad, utilizando las enzimas de restricción *NdeI* y *XhoI* (Fermentas) utilizando el protocolo del fabricante. La muestra se analizó mediante un gel de electroforesis de agarosa al 1%, con un amortiguador TAE, utilizando una cámara de electroforesis (B1a Thermo Scientific).

Para obtener las condiciones óptimas de expresión se realizaron experimentos para determinar la concentración óptima de Isopropil β -D tiogalactopiranosido

(IPTG), así como el tiempo de inducción. Para esto se preparó un cultivo de 3 ml de medio LB adicionado con 50 µg/ml de kanamicina, a 37 °C y agitación de 250 rpm, durante toda la noche. 50 µl de este cultivo se utilizaron para inocular 20 ml de medio LB adicionado con 50 µg/ml kanamicina, estos últimos fueron incubados a las mismas condiciones hasta alcanzar una densidad óptica de DO_{600} 0.6. Para la inducción se adicionó IPTG hasta una concentración final de 1.0 mM y se incubaron disminuyendo la temperatura a 30 °C. Se tomaron muestras de 1 ml de medio de cultivo a tiempo 0 y a cada hora durante las primeras 8 horas. Por otro lado se realizaron pruebas de inducción siguiendo el mismo procedimiento anteriormente citado, pero se varió la concentración final de IPTG a 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 y 1.5 mM. La incubación se realizó a 30 °C y manteniendo el tiempo inducción en 4 horas, después de las cuales se tomaron muestras de 1 ml de medio de cultivo para su análisis. Las muestras de la proteína recombinante se analizaron mediante electroforesis en gel al 10% de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) aplicando un voltaje de 120 V durante 120 minutos. Con los resultados obtenidos en el gel, se seleccionaron las mejores condiciones para la producción de la proteína.

La expresión de la proteína se realizó a partir de un cultivo de 3 ml de medio LB adicionado con 50 µg/ml kanamicina, a 37 °C y agitación de 250 rpm durante toda la noche. Este cultivo fue transferido a 1L de medio LB adicionado con 50 µg/ml kanamicina incubado a las mismas condiciones hasta alcanzar una densidad óptica OD_{600} de 0.6. Para la inducción se adiciono IPTG hasta una concentración final de 1.0 mM, disminuyendo la temperatura a 30 °C. Finalmente las células fueron colectadas después de 7 hrs de inducción, por centrifugación a 10,000 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente.

4.3. Purificación de la COS.

Los extractos proteicos se obtuvieron al resuspender el botón de células sedimentadas en 40 ml de amortiguador de lisis (Tris-HCl 200 mM pH 7.5 y 20 mM de imidazol), adicionando lisozima a una concentración final de 1 mg/ml, esta mezcla se incubó a 4°C durante 30 minutos. Posteriormente la mezcla fue tratada con ultrasonido (Sonicator 300 Misonix) utilizando pulsos de 30 segundos con un intervalo de 2 minutos entre cada pulso, durante un total de 20 ciclos manteniendo la temperatura de la muestra a 4°C. El extracto fue centrifugado a 10,000 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente para clarificación del lisado celular.

El extracto crudo se aplicó en una columna His-Trap FF (GE-Healthcare) de 1 ml equilibrada previamente con 3 volúmenes de columna (VC) utilizando amortiguador de lisis, la muestra se eluyó utilizando un gradiente de concentración de imidazol de 20 a 250 mM en 10 VC utilizando el sistema HPLC (Shimadzu Serie 20) a un flujo de 1 ml/min, se colectaron fracciones de 1ml. Las fracciones fueron analizadas mediante PAGE-SDS (10%), y aquellas que presentaron la proteína fueron reunidas.

Posteriormente se realizó una cromatografía de exclusión molecular, utilizando una columna de filtración en gel preparativa (HiLoadSuperdex 200 16/600 GL; GE-Healthcare), previamente equilibrada con un amortiguador Tris-HCl 20 mM pH 7.5. La muestra fue eluída utilizando un flujo continuo de 1ml/min, colectando fracciones de 2ml, las cuales fueron analizadas mediante un gel de acrilamida PAGE-SDS 10%, las fracciones que presentaron la proteína fueron reunidas.

La proteína fue cuantificada utilizando el coeficiente de extinción molar teórico de $97,750 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 280 nm calculado en el servidor ExPASy ProtParam tool (Gasteiger et al., 2003) y se realizaron alícuotas de 1 ml las cuales fueron congeladas a -20°C para su posterior análisis.

4.4. Caracterización de la COS

Para determinar el peso molecular de la proteína nativa se utilizó una columna de filtración en gel analítica (Superdex 200 10/300 GL; GE-Healthcare). La calibración se realizó con los estándares trioglobulina (670 KDa), gammaglobulina (158 KDa), Ovoalbumina (44 KDa), Mioglobulina (17KDa) y Vit B12 (1.35 KDa) (Gel Filtration Standard; Bio-Rad).

La masa de la proteína fue determinada por espectrometría de masas en un equipo Bruker Microflex, que emplea la técnica de desorción-ionización láser asistida por matriz de tiempo de vuelo (MALDI-TOF) (Bruker Daltonics GmbH, Leipzig, Alemania), equipado con un láser de nitrógeno a 20-Hz a $\lambda=337$ nm. Los espectros se registraron en un reflector en el modo positivo lineal para el rango de masas de 25000-250000 Da. La muestra se preparó mezclando 1.0 μ L de solución de la COS con 5 μ L de 30% de acetonitrilo, 70% de agua, 0.1 % TFA, y saturado con ácido sinapínico. Posteriormente 1.0 μ L de esta solución se depositó sobre el objetivo del equipo MALDI y se dejó secar a temperatura ambiente.

También se realizó un análisis de Dynamic light scattering (DLS) de la proteína a 25 °C utilizando un equipo Malvern Nano S (Malvern, Ltd) equipado con un láser NIBS (Non Invasive Back Scattering). El radio hidrodinámico fue calculado usando el software Zeta Sizer incluido en el equipo.

4.5. Ensayos de actividad nativa

La actividad enzimática de la COS en contra el sulfato de colina, fue determinada mediante calorimetría de titulación isotérmica (ITC) utilizando un calorímetro VP-ITC (Microcal Inc.). Esto se realizó a 25 °C en el Amortiguador de Reacción (200mM de Tris-HCl pH 7.5 y NaCl de 500 mM). Los parámetros cinéticos fueron obtenidos siguiendo el procedimiento de múltiples inyecciones, en el cual la solución de enzima fue incubada en la celda del calorímetro (2.46 μ M) y la solución del sulfato de colina (300 mM) fue inyectada en múltiples tiempos (2 \times 5 μ L y 18 \times 10 μ L) para adquirir el termograma calorimétrico. Los datos calorimétricos fueron transformados a gráficos de velocidad inicial contra concentración de sustrato utilizando el software ITC Data Analysis en Origin 7.0 (Microcal Inc.). Las constantes cinéticas k_{cat} , K_M y K_i fueron calculadas a partir de una regresión no lineal de los gráficos de velocidad inicial contra sustrato utilizando el software GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, inc.). Para determinar el calor de dilución del sulfato de colina se realizó un experimento “blanco” utilizando el Amortiguador de Reacción en la celda del calorímetro y se inyectó la solución del sulfato de colina (300 mM), siguiendo el mismo procedimiento mencionado anteriormente.

La entalpía de reacción fue determinada por triplicado utilizando el método de inyección simple. Se incubó la enzima (21.2 μ M) junto con el Amortiguador de Reacción en la celda del calorímetro y se realizó una simple inyección de 10 μ l de sulfato de colina 300 mM. Los datos se analizaron utilizando el software ITC Data Analysis en Origin 7.0 (Microcal Inc.).

La actividad contra el *p*-nitrofenil sulfato (pNPS) se realizó utilizando el Amortiguador de Reacción, utilizando una concentración de enzima de 1.7 μ M y concentraciones de sustrato en el intervalo de 1-80 mM, en un volumen de reacción de 100 μ l, a una temperatura de 25 °C. La reacción fue seguida mediante la

cuantificación de *p*-nitrofenolato liberado durante la hidrólisis, midiendo su cambio en la absorbancia a 400 nm. Para esto se realizaron curvas patrón de *p*-nitrofenolato en un intervalo de 1-200 μ M a pH 7.5 y 25 °C y 400 nm.

La actividad contra el 4-metilumbeliferil sulfato (MUS) se determinó utilizando el Amortiguador de Reacción, en un intervalo de concentración de sustrato 1-20 mM con una concentración de 1.7 μ M de enzima, manteniendo la temperatura constante a 25 °C. Esta reacción fue seguida midiendo los cambios de absorbancia a 370 nm. También se realizó una curva patrón de 4-metilumbeliferona a 370 nm en el amortiguador de reacción a pH 7.5 y 25 °C.

La dependencia de la actividad enzimática con el pH fue determinada a 25 °C utilizando el pNPS como sustrato. Las soluciones amortiguadoras utilizadas fueron las siguientes: pH 5.5 ácido acético/acetato de sodio (200 mM), para pH 6.5 - 8.5 Tris-HCl (200 mM), los amortiguadores fueron preparados con 500 mM de NaCl. La velocidad de hidrólisis fue determinada por el cambio de absorbancia a 400 nm. Para el pH 5.5 se realizó un ensayo discontinuo en el cual alícuotas de la mezcla de reacción fueron tomadas a diferentes tiempos, posteriormente se les ajustó el pH a 8.0 con 1.0 M de Tris-HCl y se determinó inmediatamente su absorbancia a 400 nm.

4.6. Ensayos de actividad promiscua

Para la actividad enzimática contra el *p*-nitrofenil fosfato (pNPP) se utilizó el Amortiguador de Reacción, empleando una concentración de enzima de 11.2 μ M y concentraciones de sustrato en el intervalo de 1-20 mM, en un volumen de reacción de 100 μ l y una temperatura de 25 °C. La reacción fue seguida mediante la

cuantificación de *p*-nitrofenolato liberado durante la hidrólisis, midiendo su cambio en la absorbancia a 400nm.

La actividad enzimática contra el *p*-nitrofenil fenil fosfonato (pNPPP) se realizó utilizando el Amortiguador de Reacción, empleando una concentración de enzima de 6.2 μM y concentraciones de sustrato en el intervalo de 1-40 mM, en un volumen de reacción de 100 μl , la reacción se llevó a cabo a una temperatura de 25 °C. La reacción fue seguida mediante la cuantificación de *p*-nitrofenolato liberado durante la hidrólisis, midiendo su cambio en la absorbancia a 400 nm.

La actividad enzimática contra el fosfato de colina, fue determinada utilizando ITC con el método de inyecciones múltiples utilizando una solución de enzima de 24.6 μM en el amortiguador de reacción y una solución de fosfato de colina de 300 mM, siguiendo el programa de inyecciones utilizando para el sulfato de colina, a 25 °C. Para determinar el calor de disolución del fosfato de colina se utilizó el Amortiguador de Reacción en la celda del calorímetro y se inyectó la solución del fosfato de colina siguiendo el mismo procedimiento mencionado anteriormente.

4.7. Ensayos de inhibición

Se realizaron estudios de inhibición de COS por sulfatos (sulfato de amonio), fosfatos (fosfato de sodio) y colina (cloruro de colina), para estos ensayos se utilizó pNPS como sustrato. Estos se realizaron en el Amortiguador de Reacción, utilizando una concentración de enzima de 1.7 μM y una concentración de sustrato de 20 mM. El estudio se realizó en un intervalo de 10 – 80 mM de inhibidor.

Para el estudio más detallado de la colina como inhibidor se utilizó el pNPS como sustrato en el amortiguador de reacción, una concentración de 1.7 μM enzima y una concentración de sustrato de 1-80mM, en un volumen de reacción de 100 μl , a los cuales se les adicionó el inhibidor cloruro de colina en concentraciones de 20, 50 y 70 mM. La reacción fue seguida por la cuantificación de *p*-nitrofenolato a 400nm. Para determinar las constantes de inhibición se realizó un ajuste global con el software GraphPad-Prism6. Posteriormente este estudio se realizó para las actividades promiscuas de monofosfatasa y fosfonatasa, siguiendo el protocolo anteriormente descrito.

4.8. Determinación de la modificación postraduccional

La cuantificación de cisteínas presentes en la proteína se realizó mediante la reacción de Ellman (Ellman, 1959), para esto se preparó un stock de 2 mM 5,5'-ditiobis (2-ácido nitrobenzoico) (DTNB) con una concentración final de 50 mM de acetato de sodio. Para la preparación de la solución de trabajo se adicionó 50 μL del stock DTNB y 100 μL de buffer de Tris-HCl 1M pH 8.0 y agua destilada para un volumen de 990 μL . Se adicionaron 10 μl (250 μM) de la proteína 1) nativa, 2) tratada previamente con 8M de urea, 3) tratada con 8 M de Urea y 100 mM de Ditiotreitól (DTT) y 4) tratada con 8 M de Urea y 100 mM de Tris (2-carboxi-etil) fosfina (TCEP). Después del tratamiento fue removido el exceso de DTT y TCEP para esto se realizó un cambio de amortiguador utilizando ultrafiltración (Vivaspin 20, 10,000 MWCO, Sartorius) y una solución 8 M de urea, antes de ser mezclada con la solución de DTNB. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos, para posteriormente medir la absorbancia a 412 nm. Para la cuantificación se realizó una curva patrón utilizando un estándar de acetil-cisteína en concentraciones de 10-200 μM .

Adicionalmente, la ausencia de la modificación fue analizada en un equipo HPLC-ESI-TOF-MS basándose en el procedimiento reportado por Rabuka, *et al* (Rabuka, Rush, deHart, Wu, & Bertozzi, 2012). 200 µg de la proteína fueron desnaturalizados con una solución de 6 M de urea y 100 mM de Tris pH 8.5 durante 15 minutos. Posteriormente la muestra fue incubada con 50 mM de DTT a 37 °C por 35 minutos, seguido por una alquilación con iodoacetamida 30 mM por 60 minutos. Posteriormente la muestra fue lavada con bicarbonato de amonio, se deshidrato con acetonitrilo y se llevó a la sequedad. La digestión fue llevada a cabo con 30 µl de tripsina porcina durante 18 horas a 37 °C. Posteriormente la muestra fue desalada y concentrada en una columna Ziptip C18 utilizando 12 µl de fase móvil (97% agua 3% acetonitrilo 0.1% de ácido fórmico). Las muestras fueron analizadas por HPLC-ESI-TOF-MS (nanoACQUITY-Waters Synapt-G2SWaters) en la USAI de la Facultad de Química de la UNAM.

4.9. Co-expresión

El gen que codifica para la proteína FGE de *Ensifer meliloti* (GI: 459644275, SM2011_b20334) fue optimizado para su expresión en *E. coli* y sintetizado por GeneScript. Para obtener el vector de clonación (pRSFduet-FGE-COS) el gen FGE fue clonado en el vector pRSFDuet-1 (Novagen) en el primer sitio de clonación, entre el sitio de restricción NcoI (5' CCATGG 3') y HindIII (5' AAGCTT 3'). Para completar el vector de expresión, el gen de la sulfatasa COS fue clonado en el segundo sitio de clonación entre los sitios de restricción *NdeI* (5' CATATG 3') y *XhoI* (5' CTCGAG 3'). Esta clonación fue realizada por GeneScript. La co-expresión fue realizada en bacterias *E. coli* BL21 (DE3) siguiendo el procedimiento descrito anteriormente para el vector pET26-COS.

El gen FGE fue clonado en el vector pBAD/Myc-His A (Invitrogen) entre el sitio de restricción *NcoI* (5' CCATGG 3') y *HindIII* (5' AAGCTT 3'). Este vector (pBAD-FGE) fue transformado conjuntamente con el vector pET26-COS en bacterias *E. coli* BL21 (DE3), las clonas positivas fueron identificadas por análisis de restricción utilizando medio LB adicionado con 50 µg/ml de kanamicina y 100 µg/ml de ampicilina. La expresión de la proteína se realizó a partir de un cultivo de 3 ml de medio LB adicionado con 50 µg/ml kanamicina y 100 µg/ml de ampicilina, a 37 °C y agitación de 250 rpm durante toda la noche. Este cultivo fue transferido a 1L de medio LB adicionado con 50 µg/ml de kanamicina y 100 µg/ml de ampicilina incubado a las mismas condiciones hasta alcanzar una densidad óptica OD₆₀₀ de 0.6. Para la inducción se adiciono inicialmente L-arabinosa hasta una concentración final de 0.02%, fue incubada a 37 °C durante 30 minutos. Posteriormente se adicionó IPTG hasta una concentración final de 1.0 mM, se incubaron disminuyendo la temperatura a 30 °C. Finalmente las células fueron colectadas después de 7 hrs de incubación, por centrifugación a 10,000 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente.

5. Resultados.

5.1. Producción del vector.

Se realizó una optimización de los codones de la secuencia del gen que codifica para la colina-*O*-sulfatasa de *Ensifer meliloti* (*betC*) para su mejor expresión en *E. coli*. Este proceso lo realizó la compañía GenScript utilizando el software OptimumGene. Con lo anterior, se modifica la secuencia del gen pero no se altera la secuencia de los aminoácidos de la proteína expresada, como se puede observar en la Figura 5.1

```

ALIGNMENT OF SEQUENCE_1: [COS.XDNA] WITH SEQUENCE_2: [BETC.XDNA]
SIMILARITY : 1217/1567 (77.66 %)

          M T T G K P N I L I I M V D Q L N G K L F P D G P A D F L H A P N L K A L A K
SEQ_1  1  -->ATGACGACGGGTAAACCAATATCTCTGATTATTATGTGGACCAACTGAAATGGCAAACCTTTCCCGGACGGCCGGCGGACTTCTGTCATGCTCCGAACTGAAAGCGCTGGCCAA
          ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
SEQ_2  1  -->GTGACCACCGGTAAGCCCAACATTCGATCATCATGGTGGACCAGTTGAACGGAAAGCTCTTCCGGACGGGCCTGCAGACTTCCTGATCGGCCAACCCTGAAGCGCTGGCCAA
          V T T G K P N I L I I M V D Q L N G K L F P D G P A D F L H A P N L K A L A K

          R S A R F H N N Y T S S P L C A P A R A S F M A G Q L P S R T R V Y D N A A E Y
SEQ_1 118  CGTAGCGCGGCTTTCACAACAATTATACGAGCTCTCCGCTGTGGCGCCGGCTCGTGCAGATTCATGGCCGGTCAGTGCCGTCCCGTACC CGCGGTGATGATAATCGCCGGAATAC
          ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
SEQ_2 118  CGGTGCGCGCTTTCACAAACAACATACACCTCGTCGCCCTGTGTGCCCTGCCCGCATCCTTCATGGCCGGCAATTGCCGAGCCGACCCGGGCTACGACAATGCTGCCGAATAC
          R S A R F H N N Y T S S P L C A P A R A S F M A G Q L P S R T R V Y D N A A E Y

          Q S S I P T Y A H H L R R A G Y Y T A L S G K M H F V G P D Q L H G F E E R L T
SEQ_1 238  CAAGTTCATCCCGACGTATGCGCATCACTGCTGCGCCGGCTATTACACCGCACTGTCCGGCAAATGCATTTTGTGGTCGGGATCAGTGCACGGCTTCGAAGAACCGCTGACC
          ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
SEQ_2 238  CAGTCGTCATCCCAACCTATGCACATCACCCTGCGCCGGGCGGCTACTACACCGCTTTCCGGCAAGATGCATTCGTCGGGCGGACAGTGCACGGCTTCGAGGACGGCTGACC
          Q S S I P T Y A H H L R R A G Y Y T A L S G K M H F V G P D Q L H G F E E R L T

          T D I Y P A D F G W T P D Y R K P G E R I D W W Y H N L G S V T G A G V A E I T
SEQ_1 358  ACGGATATTTATCCGGCCGACTTGGTTGGACCCGGATTACCGTAAACCGGGCGAACGCATCGACTGGTGGTATCATAACCTGGGTAGCGTACGGGTCAGTGTCAGAAATTACC
          ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
SEQ_2 358  ACCGATCTATCCCGCGATTTCGGCTGGACGCGGATTACCGCAAGCCGGGCGAGCGGATCGACTGGTGGTATCACAATCTCCGGTCCGTCACGGCCCGGGGTCGCGAAATACC
          T D I Y P A D F G W T P D Y R K P G E R I D W W Y H N L G S V T G A G V A E I T

          N Q M E Y D D E V A F L A N Q K L Y Q L S R E N D D E S R R P W G C L T V S F T H
SEQ_1 478  AACAGATGAATATGACGACGAGGTGGCTTCTCGCAACCAAGCTTACCGACTTCCGGGAGAACGACGAGAGCCGCGCTCCCTGGTCCCTCACCGTCTCCTCACCCAC
          ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
SEQ_2 478  AACAGATGAATATGACGACGAGGTGGCTTCTCGCAACCAAGCTTACCGACTTCCGGGAGAACGACGAGAGCCGCGCTCCCTGGTCCCTCACCGTCTCCTCACCCAC
          N Q M E Y D D E V A F L A N Q K L Y Q L S R E N D D E S R R P W G C L T V S F T H

          P H D P Y V A R R K F W D L Y E D C E H L T P E V G A I P L D E Q D P H S Q R I
SEQ_1 598  CCGCAGATCCGTATGTCGCGCTCGCAAAATCTGGGATCTGTACGAACTGTGAACATCTGACCCCGAAGTGGGCGCATTCGCTGGATGAACAGGACCCGCATCACAAAGCATC
          ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
SEQ_2 598  CCGCAGACCCCTATGTCGCGCGCGGAAATCTGGGATCTGTACGAGGATTCGAGGACCTCAGCCCGAGGTCGGGCGCATTCGCTCGAGCAGGACCCGCATTCGCAACGGATC
          P H D P Y V A R R K F W D L Y E D C E H L T P E V G A I P L D E Q D P H S Q R I

          M L S C D Y Q N F D V T E E N V R R S R R A Y F A N I S Y L D E K V G E L I D T
SEQ_1 718  ATGCTCGTCTCGGATATCAGAACTTTGACGTCCACGAAAGAAATGTGCGTCCGCTCAGTGCAGGCTTATTCGCAAACTTCTGTAAGTGAATAATCGCTGACGACCC
          ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
SEQ_2 718  ATGCTCTCTCGGACATCAGAAATTTGACGTGACGAGGAGAAATGTGCGCGCTCGGCCGCGCTTATTCGCAAACTTCTGTAAGTGAATAATCGCTGACGAGGAGGTCGGGACGATGTCGACCC
          M L S C D Y Q N F D V T E E N V R R S R R A Y F A N I S Y L D E K V G E L I D T

          L T R T R M L D D T L I L F C S D H G D M L G E R G L W F K M N F F E G S A R V
SEQ_1 838  CTGACGCTACCCCGATGCTGGATGACACCCTGATTCGTTTTGTTAGTATCATGGCAGATGCTGGCGAAGCTGGTCTGTTGGTCAAATGAACCTTTTCGAAGSTTCGCGCCGCTT
          ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
SEQ_2 838  CTGACGCGACCCGATGCTCGAGATGACCTTCCTCTGTTCCGACCACGGCGACATGCTGGCGAGCGGCGCTCGTTCAAGATGAACTCTTTCAAGGCTCGGCGCGCTG
          L T R T R M L D D T L I L F C S D H G D M L G E R G L W F K M N F F E G S A R V
    
```

Figura 5.1. Comparación entre fragmentos de la secuencia el gen silvestre de COS (*betC*) (SEQ_2) y el gen COS optimizado para la expresión en *E. coli* (SEQ_1).

A la secuencia del gen optimizada, se le incluyó al final seis codones extras que codifican para una cola de histidinas (His-Tag), la cual facilitó la purificación de la proteína expresada. El gen fue sintetizado por la compañía GeneScript, y fue después subclonado en el plásmido pET26b+ obteniendo el vector de expresión pET26b-COS (Figura 5.2^a). El vector fue transformado en células químicamente competentes de *E. coli* DH5 α . Para corroborar que las clonas tuvieran el vector correcto se realizó una prueba de patrones de digestión, utilizando las enzimas de restricción *Nde*I y *Xho*I, en el cual se obtuvieron dos fragmentos correspondientes para el vector (5,231 pb) y al inserto COS (1,575 pb) (Figura 5.2B).

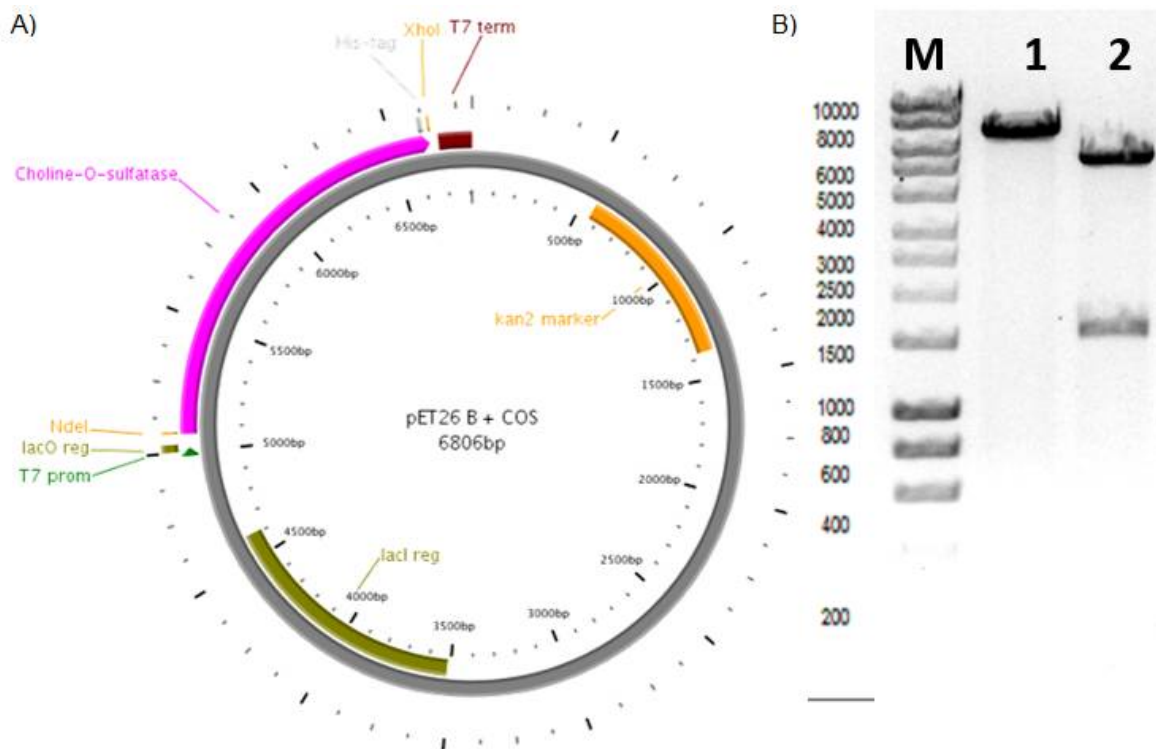


Figura 5.2.A) Esquema del vector de expresión pET26b-COS y B) patrones de digestión para el vector de expresión. Vector linelizado con *Xho*I (línea 1) y tratado con *Nde*I y *Xho*I (línea 2), M marcador de peso (pares de bases pb).

5.2. Cultivo Celular

Posteriormente, el vector pET26b-COS fue transformado en *E. coli BL21* (DE3) para su expresión, esta cepa fue utilizada ya que es utilizada por Rabuka et al. (Rabuka et al., 2012) en su protocolo para la expresión y coexpresión de sulfatasas. El efecto de la concentración de IPTG y el tiempo de inducción en la expresión de la colina-O-sulfatasa fueron analizados por la cantidad de proteína presente utilizando SDS-PAGE. La concentración de IPTG se varió desde 0.25-1.5 mM manteniendo el tiempo de inducción de 4 horas constante. En la Figura 5.3A se muestra el aumento en la cantidad de proteína al aumentar la concentración de IPTG hasta la concentración de 1.0 mM. En concentraciones superiores no se observa un aumento significativo en la cantidad de proteína. Después, manteniendo la concentración de IPTG constante se determinó la cantidad de enzima durante cada hora hasta las 8 horas, observándose un aumento gradual en la concentración de proteína durante el periodo de inducción. Sin embargo, a un tiempo de 8 horas se puede observar una disminución en la cantidad de proteína (Figura 5.3B). Con lo anterior se determinó que las condiciones óptimas de inducción fueron 1.0 mM IPTG y 7 hrs a 30 °C. Una vez concluido el tiempo de inducción, las bacterias fueron lisadas utilizando ultrasonido, y después se centrifugó para obtener el sobrenadante con el extracto crudo.

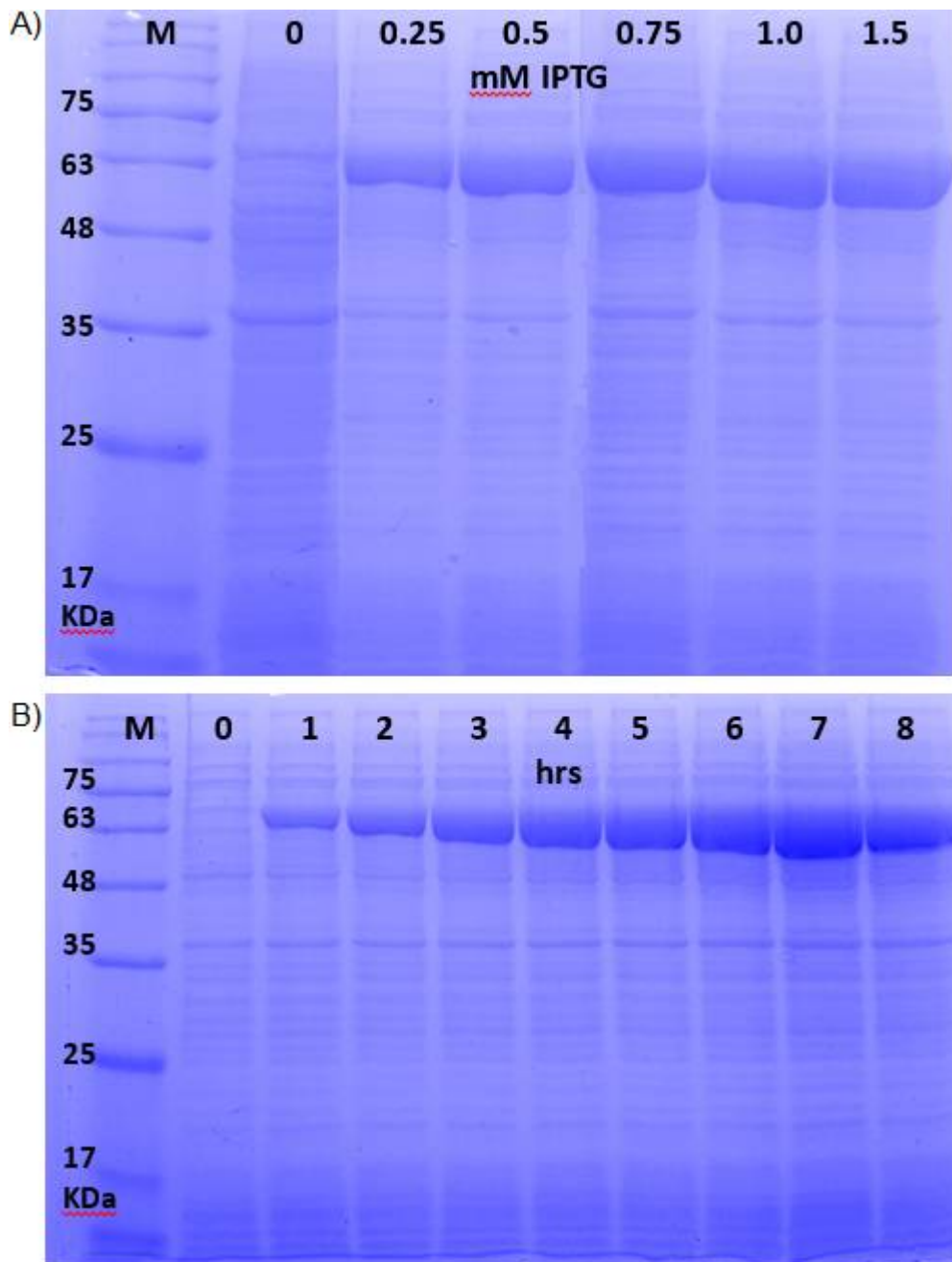


Figura 5.3. SDS-PAGE para la determinación de condiciones óptimas de inducción. A) Variación de la concentración de IPTG y B) Influencia del tiempo de inducción

5.3. Purificación

Una vez obtenido el extracto crudo se prosiguió con la purificación de la proteína mediante una cromatografía de afinidad, utilizando una columna HisTrap, la cual retiene la proteína mediante la interacción de su secuencia His-Tag con los iones de níquel inmovilizados en la membrana de la columna. La proteína recombinante eluyó de la columna en un solo pico, como se observa en la Figura 5.4A, y con un alta pureza, como se observa al analizar mediante SDS-PAGE (Figura 5.4B) que muestra una sola banda en el peso esperado (59 kDa).

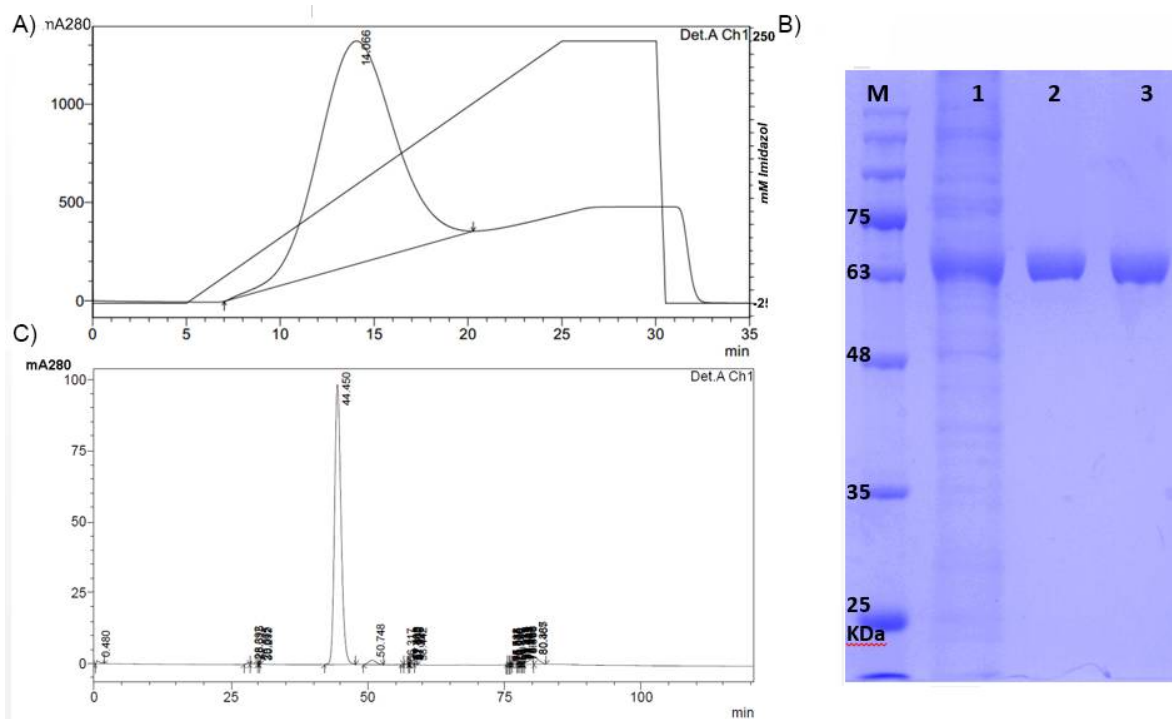


Figura 5.4. A) Cromatografía de afinidad (HisTrap) para la muestra de COS. B) SDS-PAGE de los diferentes pasos de purificación: 1) extracto crudo, 2) HisTrap y 3) filtración en gel. y C) Cromatograma de filtración en gel para la COS.

A pesar de la pureza observada después de la columna de afinidad se decidió someter la muestra a una cromatografía de exclusión molecular para eliminar

posibles agregados solubles de la proteína que sería imposible detectar en SDS-PAGE. Para esto se utilizó una columna de filtración en gel preparativa, la cual separa las proteínas en función del tamaño de estas. La muestra eluye en un solo pico como se observa en la Figura 5.4C. Nuevamente se puede observar una alta pureza al analizar la muestra mediante SDS-PAGE (Figura 5.4B).

Posteriormente, la proteína fue cuantificada utilizando el coeficiente de extinción molar teórico de $97,750 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Gasteiger et al., 2003)(Gasteiger et al., 2003)(Gasteiger et al., 2003). Se obtuvieron alícuotas de 1 ml, las cuales se congelaron a -20°C para su posterior análisis. El rendimiento promedio obtenido fue de 30-35 mg de proteína /L de medio de cultivo.

5.4. Caracterización

Para determinar el estado oligomérico de la proteína en solución se utilizó una columna de filtración en gel analítica. Inicialmente la columna fue calibrada utilizando estándares de peso molecular, con lo cual se obtiene una gráfica lineal de Log peso molecular en función del tiempo de elución (Figura 5.5A). Una vez calibrada la columna se determinó el peso molecular en solución de la proteína recombinante. Considerando el tiempo de elución (Figura 5.5B) se determinó que la proteína presenta un peso molecular de aproximadamente 120 KDa, lo cual es indicativo que la proteína se encuentra de forma dimérica en solución.

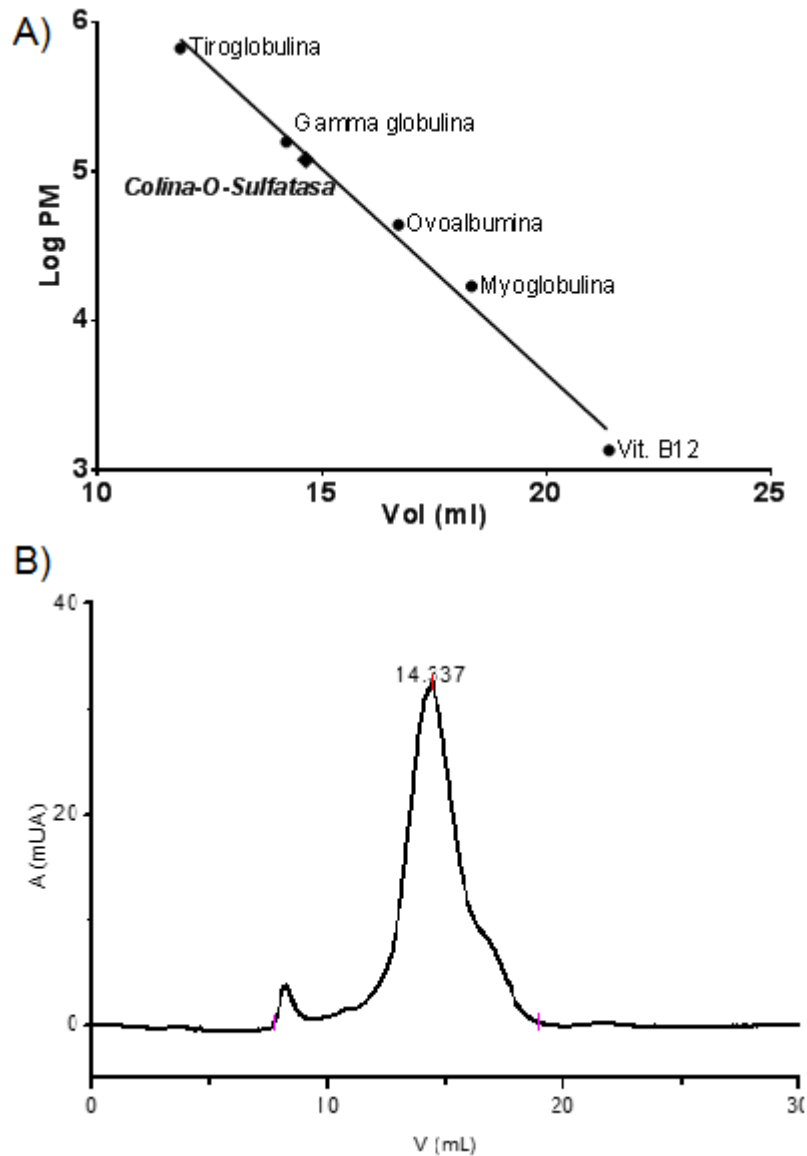


Figura 5.5. Determinación del peso molecular en solución mediante cromatografía de filtración en gel A) calibración de la columna, B) Determinación del peso molecular de COS.

Posteriormente, para corroborar la forma dimérica de COS en solución se realizó una prueba de DLS, con la cual es posible determinar la distribución de los radios hidrodinámicos de macromoléculas en una solución. A partir de estos valores, se puede conocer su peso molecular. La muestra presentó una mono dispersión en

un radio hidrodinámico promedio de 5.6 nm (Figura 5.6) lo cual representa una masa molecular de 120 KDa, correspondiente a la forma dimerica de la proteína.

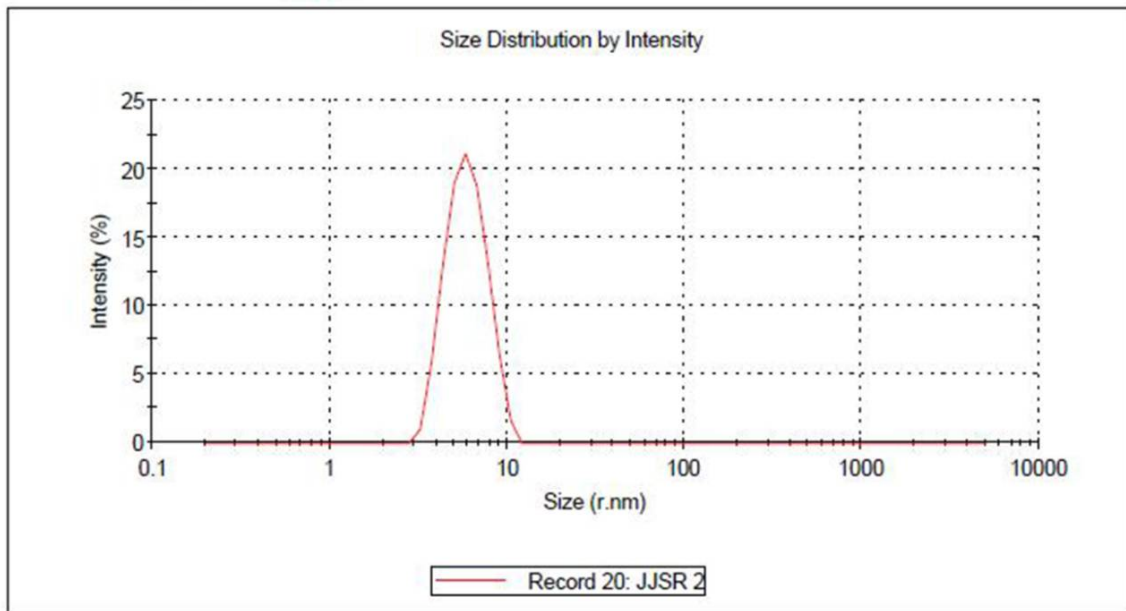


Figura 5.6. Análisis DLS para la proteína COS, en el cual se muestra un solo pico con un radio hidrodinámico en 5.6nm.

Por otro lado, la muestra fue sometida a MALDI TOF para conocer el peso de la muestra. En los resultados se pudo observar la presencia tanto de la forma dimérica (118 kDa) como de la forma monomérica de la proteína (59 kDa) (Figura 5.7), lo cual nos confirma que la proteína se encuentra formando homo-dimeros en solución, con una masa molecular de 118 KDa.

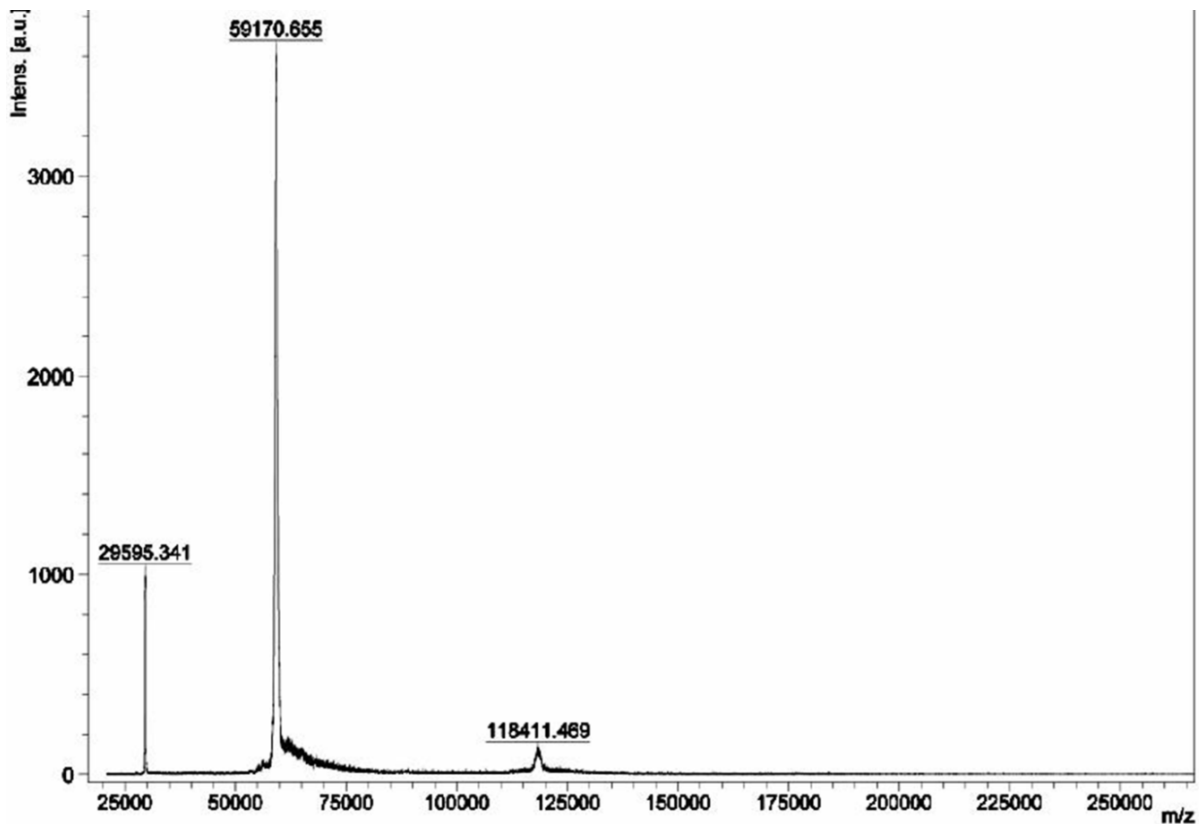


Figura 5.7. Resultado del análisis MALDI-TOF para COS. Se pueden observar picos correspondientes al monómero (59.170 KDa) y al dímero (118.411 KDa) de la proteína.

5.5. Ensayos de actividad nativa.

Debido a que la reacción de hidrólisis del sulfato de colina (sustrato natural de la proteína COS) no presenta un cambio en el espectro UV-visible, se utilizó calorimetría de titulación isotérmica (ITC) para determinar la actividad cinética de la proteína. Para ello se empleó la técnica de inyecciones múltiples (Todd & Gomez, 2001), la cual consiste en realizar una inyección de baja concentración de sustrato sobre la enzima y medir la velocidad inicial. Momentos después y antes de que el reactivo se consuma en más de ~1.0%, se realiza una segunda inyección de sustrato para aumentar su concentración en el medio y se determina la nueva

velocidad inicial. Este proceso se repite consecutivamente para obtener las velocidades iniciales a concentraciones cada vez mayores de sustrato. A la par de este experimento es importante realizar las inyecciones del sustrato sobre el buffer de reacción sin la enzima y conocer los posibles calores de dilución del sustrato para substraerlos del análisis. En el termograma de la Figura 5.8, podemos observar el aumento en la potencia del equipo en cada inyección correspondiente al calor de dilución del sustrato en el amortiguador de reacción dentro de la celda en ausencia de la enzima. Después de cada inyección, la potencia regresa a la línea base al alcanzar el equilibrio. Cuando se realizó el experimento adicionando la enzima COS en la celda, se obtuvo el termograma de la Figura 5.9, donde podemos observar inicialmente un aumento en la potencia del equipo correspondiente al calor de dilución, seguido de una disminución de la potencia hasta alcanzar un estado semi-estacionario, correspondiente a la velocidad inicial de la hidrólisis a esa concentración de sustrato. Este proceso de inyecciones se repite múltiples veces.

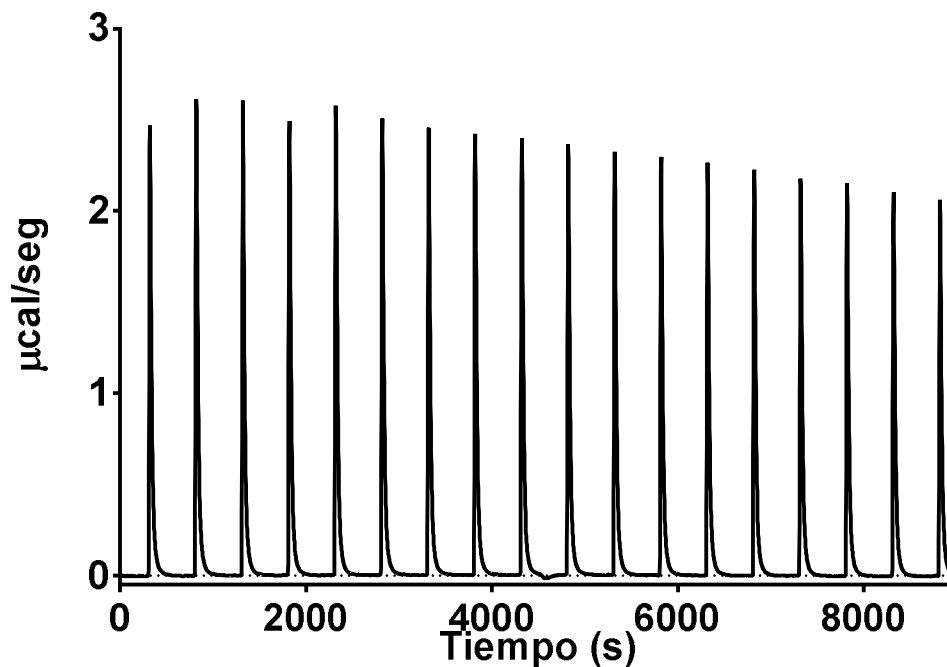


Figura 5.8. Termograma del calor de dilución del sulfato de colina en el amortiguador de reacción a 25°C y un pH 7.5.

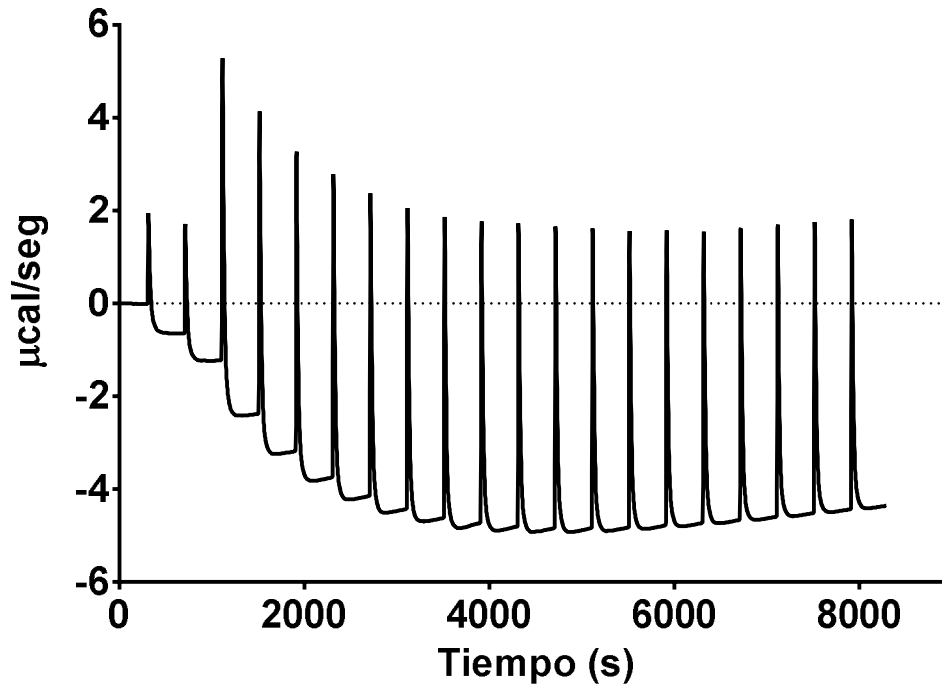


Figura 5.9. Termograma de la hidrólisis del sulfato de colina por COS. En este se observan las múltiples inyecciones así como los diferentes estados estacionarios correspondientes a las velocidades iniciales a cada concentración a 25°C y un pH 7.5.

Para poder transformar el termograma en un gráfico de velocidades iniciales en función de la concentración de sustrato (gráfico de Michaelis–Menten), es necesario utilizar la Ecuación 1, la cual nos permite transformar datos de potencia a velocidades iniciales.

$$\text{Ecuación 1. } v = \frac{d[P]}{dt} = \frac{1}{V \cdot \Delta H_{app}} \cdot \frac{dQ}{dt}$$

Como podemos observar en la ecuación, es necesario conocer la entalpia aparente de la reacción (ΔH_{app}). Esta se determinó utilizando el método de inyección simple, en el cual se realiza una sola inyección de sustrato y se permite que la

reacción se lleve a cabo por completo (Figura 5.10). Una vez obtenido el termograma se integra el área bajo la curva, que es igual al ΔH_{app} , el cual tiene un valor de -73.63 ± 3.34 kJ/mol ($-17,600 \pm 800$ cal/mol).

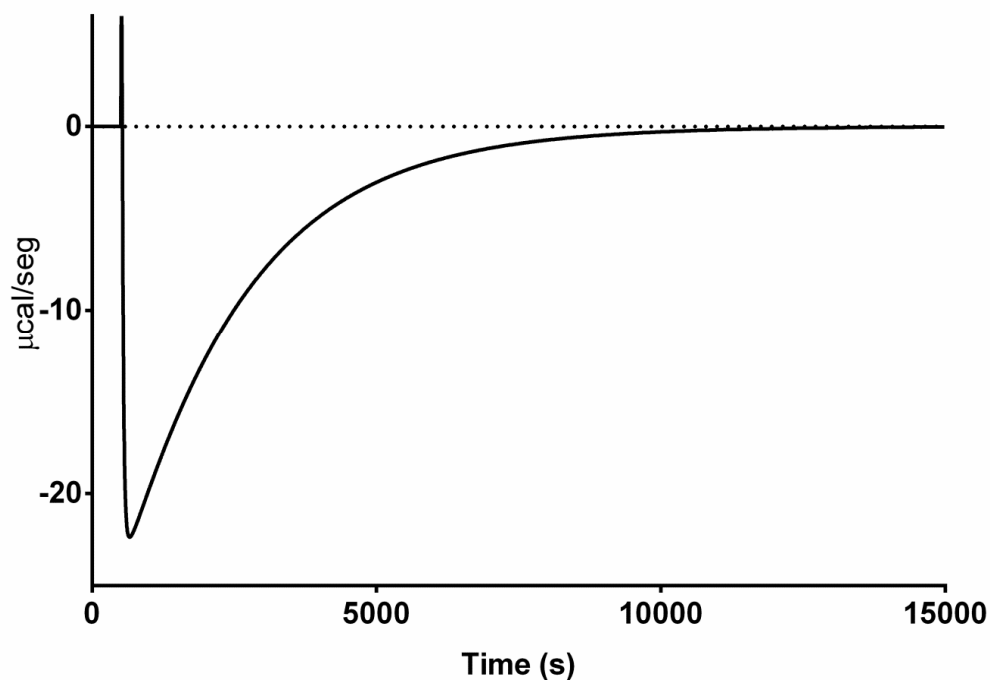


Figura 5.10. Entalpía aparente (ΔH_{app}) para la hidrólisis del sulfato de colina por COS, determinada por ITC utilizando el método de inyección simple a 25°C y pH 7.5.

Una vez obtenido el ΔH_{app} , se obtuvo el gráfico de Michaelis-Menten para la hidrólisis de sulfato de colina (Figura 5.11). En esta se puede observar que existe inhibición por sustrato, por lo cual se hizo un ajuste de los datos al modelo correspondiente (Ecuación 2). Los parámetros cinéticos obtenidos fueron: $k_{cat} = 0.27 \pm 0.02$ s⁻¹, $K_M = 11.1 \pm 1.0$ mM. y una constante de inhibición por sustrato $K_i = 11.4 \pm 1.1$ mM.

Ecuación 2:
$$v_0 = \frac{v_{max} \cdot [S]}{K_M + [S] \cdot \left(1 + \frac{[S]}{K_i}\right)}$$

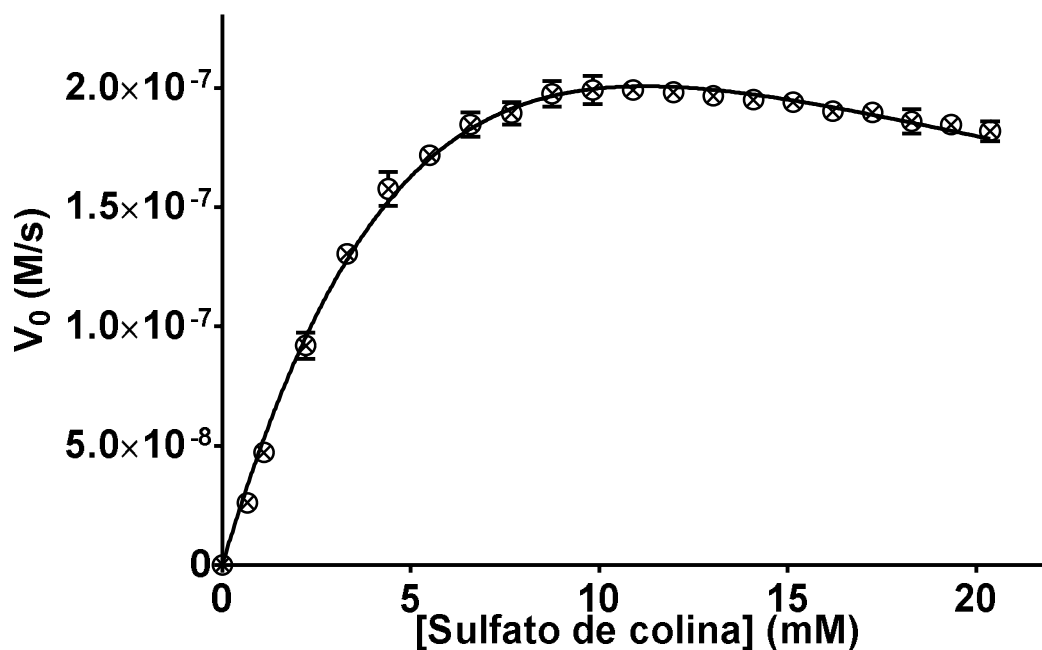


Figura 5.11. Gráfico de Michaelis-Menten para la hidrólisis del sulfato de colina catalizado por COS a 25°C y un pH 7.5. En la cual se observa inhibición por sustrato.

Adicionalmente, se determinó la actividad catalítica de COS contra sustratos sintéticos como el pNPS y el MUS, debido a que estos compuestos son ampliamente utilizados como sustratos modelo para las sulfatasas.

Para la hidrólisis del pNPS, la reacción se siguió espectrofotométricamente a 400 nm cuantificando la formación de *p*-nitrofenol que a pH básico ($pK_a = 7.2$); presenta una coloración amarilla. Para determinar las velocidades iniciales se calculó el coeficiente de absortividad molar a 400 nm del *p*-nitrofenol, realizando una curva patrón (Figura 12) a las condiciones de los ensayos enzimáticos, obteniendo un coeficiente de absortividad molar de $13,467 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. A partir de las velocidades iniciales se obtuvo el gráfico de Michaelis-Menten (Figura 13) y las siguientes constantes cinéticas:

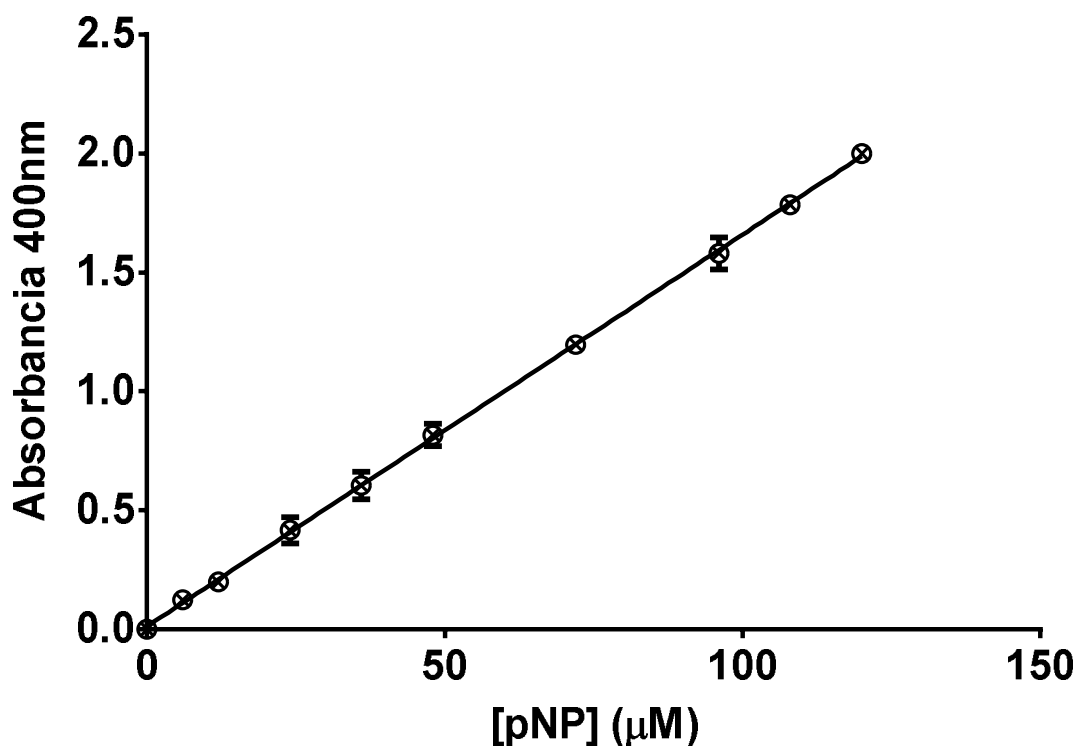


Figura 5.12. Curva patrón de p-nitrofenol a 400nm, a un pH= 7.5 y 25°C.

$k_{cat} = 3.5 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, el cual es un valor muy bajo para esta familia de enzimas (D. E. Kim et al., 2005; J. H. Kim et al., 2004; Pesentseva et al., 2012; Stawoska et al., 2010; Wiegmann et al., 2013), y una $K_M \geq 76 \text{ mM}$. Estos valores tienen errores de ajuste altos, 22% para K_M y 13 % en k_{cat} , ya que con este sustrato no se logra la saturación de la enzima (Figura 5.13). Debido a la solubilidad del sustrato, no fue posible realizar ensayos a concentraciones de sustrato mayores.

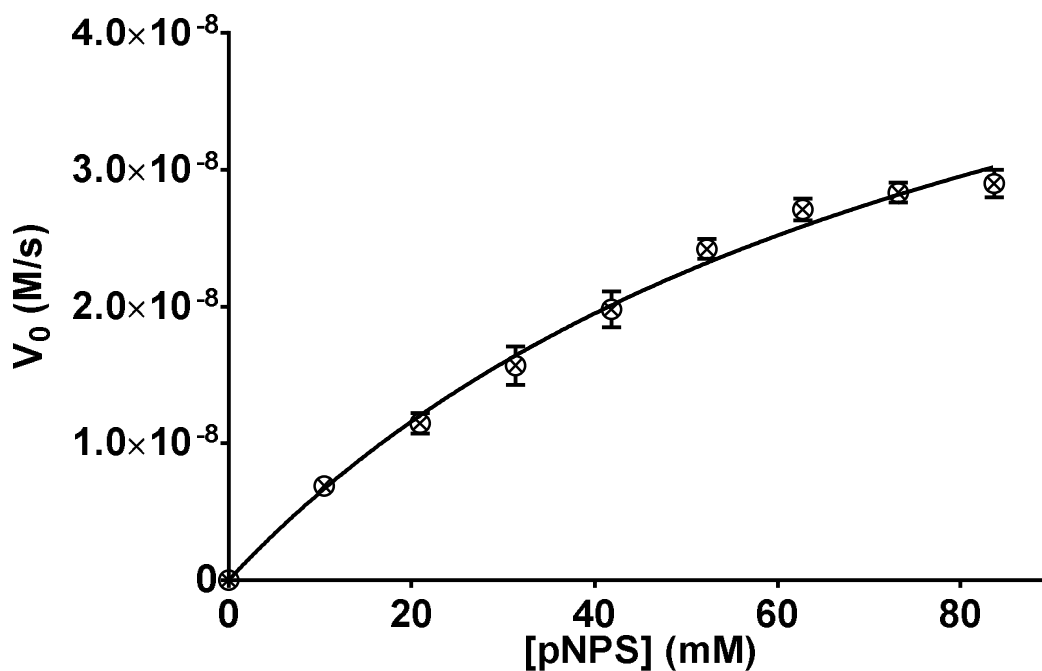


Figura 5.13. Cinética de Michaelis-Menten para la hidrólisis del pNPS a 25°C y pH 7.5. Se puede observar que no se logra la saturación de la enzima con este sustrato.

Para la hidrólisis del metilumbeliferol sulfato (MUS), la reacción fue seguida determinando las concentraciones de metilumbeliferol (MU) espectrofotométricamente a 370 nm utilizando un coeficiente de absorptividad molar de $6,014 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Figura 5.14). A partir de las velocidades iniciales se obtuvo la gráfica de Michaelis-Menten (Figura 5.15), pero al igual que para el pNPS, la solubilidad del MUS impidió hacer ensayos a concentraciones mayores de sustrato.

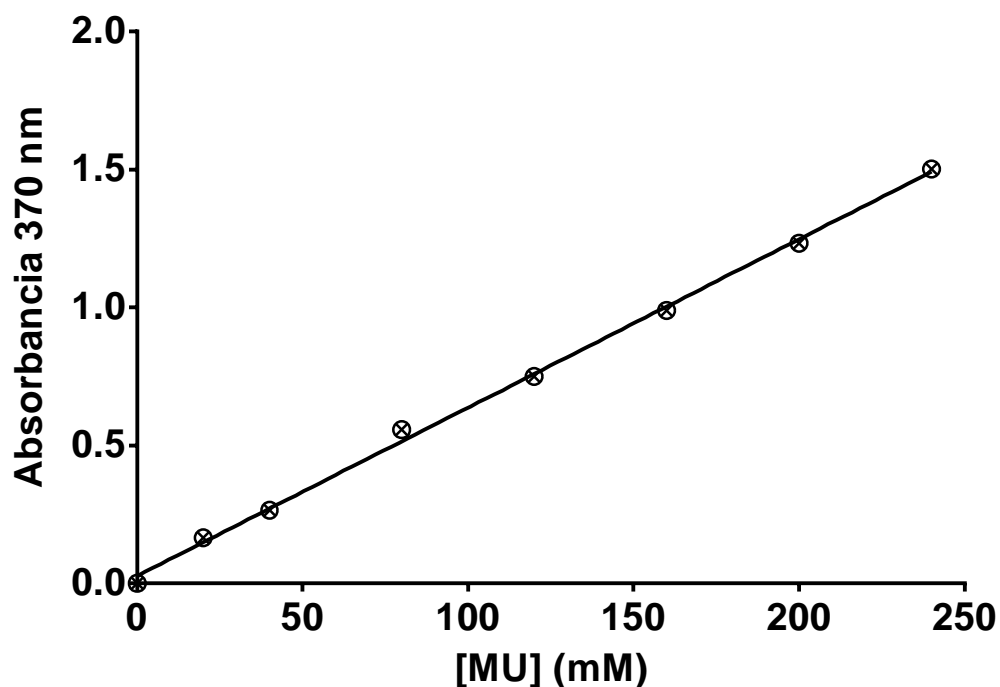


Figura 5.14. Curva patrón de MU a 370nm, a 25°C y pH 7.5.

Las constantes cinéticas son muy similares a las obtenidas para pNPS: la k_{cat} es del mismo orden ($4.3 \times 10^{-2} \text{s}^{-1}$) pero se observa una K_M menor (11.8 mM), aunque del mismo orden de magnitud. Estos valores también son aproximados (errores del 20 % para K_M y 11% en k_{cat}), ya que con este sustrato tampoco se logra la saturación completa de la enzima como se observa en la Figura 5.15.

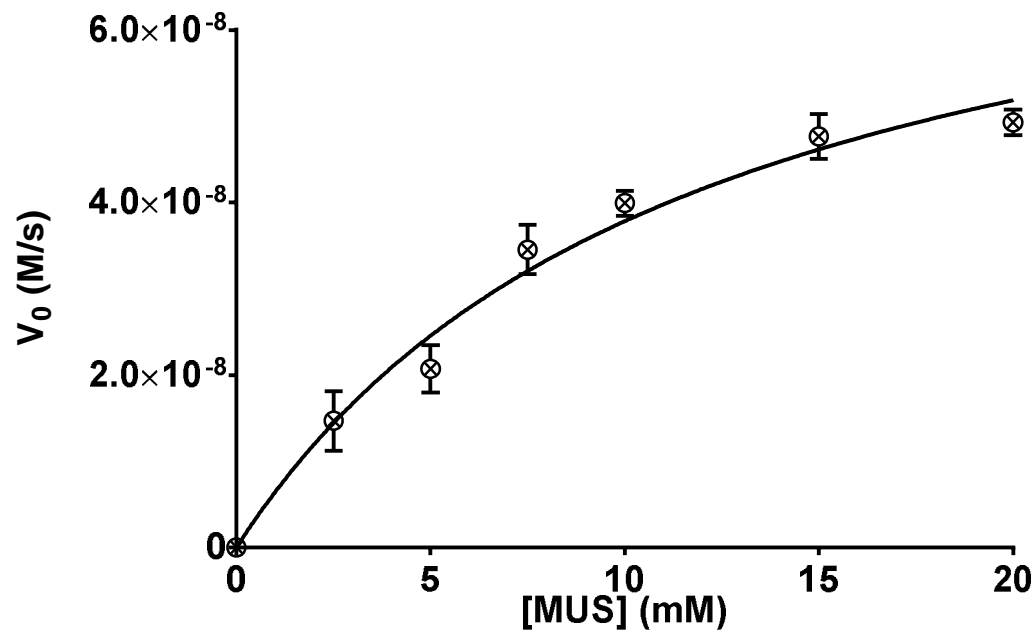


Figura 5.15. Cinética de Michaelis-Menten para la hidrólisis del MUS a 25°C y pH=7.5. Se puede observar que no se logra la saturación completa de la enzima con este sustrato.

A pesar de que no se observa la saturación completa de la enzima con estos sustratos, se observaron múltiples ciclos catalíticos, Por ejemplo para el pNPS se logró medir 73 ciclos en una hora (Figura 5.16), y 90 ciclos catalíticos para el sulfato de colina en el experimento de inyección simple.

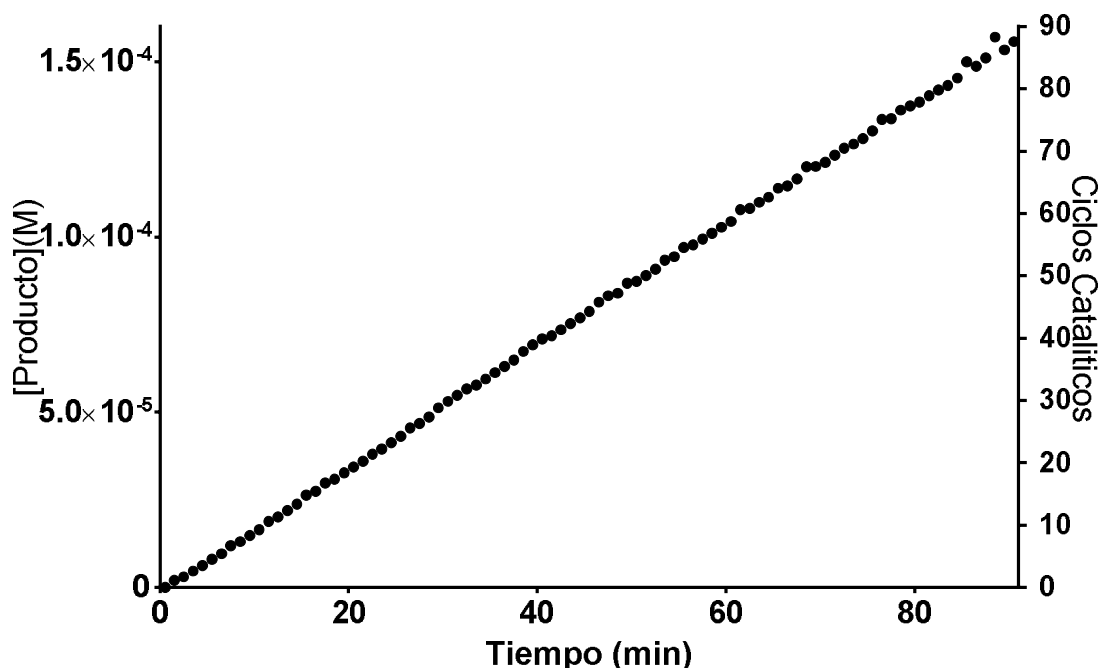


Figura 5.16. Gráfico de curso de la reacción en el cual se observan los múltiples ciclos catalíticos en la reacción de hidrólisis del pNPS (70mM) y $1.7 \mu\text{M}$ de COS a 25°C y un pH 7.5.

La dependencia de la actividad enzimática con el pH fue determinada utilizando el pNPS como sustrato ya que este compuesto es estable en el intervalo de la prueba y es fácil seguir su hidrólisis por espectrofotometría visible. Para esto se realizaron experimentos en un intervalo de pH 5.5-8.5; en los cuales se determinaron las constantes cinéticas para cada pH. Para lo anterior se calculó el coeficiente de absortividad molar a 400 nm del *p*-nitrofenol, realizando curvas patrón para cada pH utilizado (Figura 5.17) ya que la coloración del *p*-nitrofenol presenta una dependencia con el pH. En el caso del pH 5.5, el *p*-nitrofenol no presentaba absorbancia a 400 nm, por lo que se decidió realizar un experimento discontinuo, en el que la reacción se detiene con un rápido cambio a pH 8.5 en el cual se realizan las mediciones, para determinar los parámetros cinéticos.

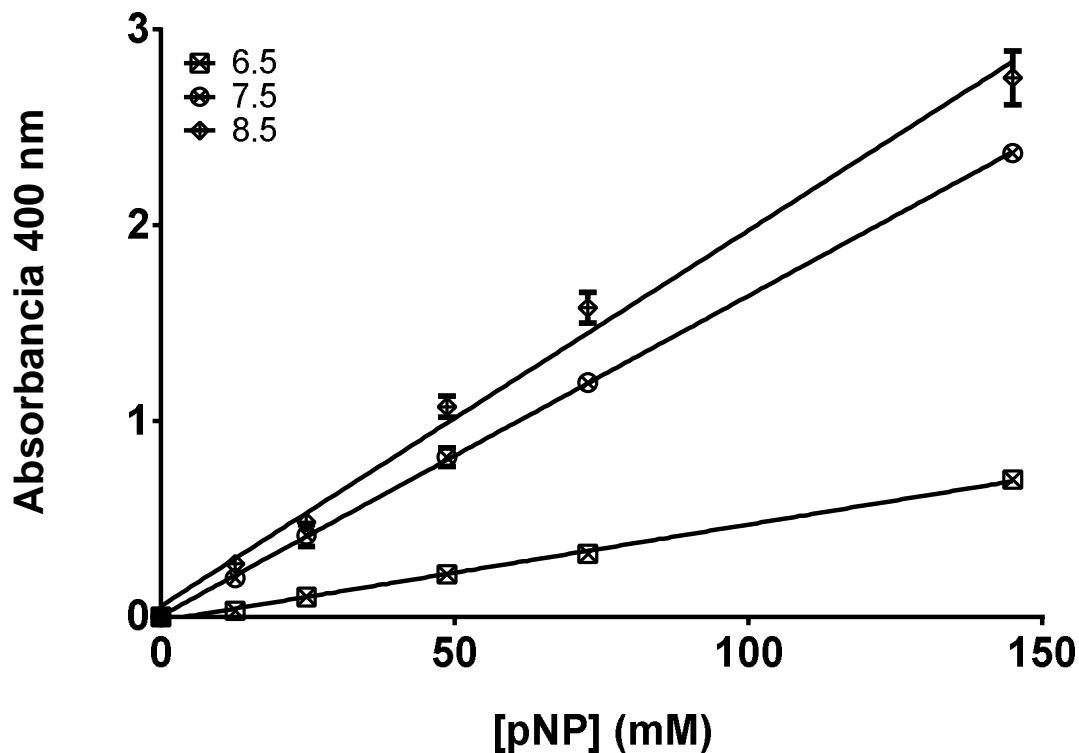


Figura 5.17. Curva patrón de *p*-nitrofenol a 400nm a los diferentes pH de trabajo y 25°C. Se observa la dependencia del coeficiente de absortividad molar en función del pH: 4,917 M⁻¹ cm⁻¹ a pH 6.5; 13,567 M⁻¹ cm⁻¹ a pH 7.5 y 19,581 M⁻¹ cm⁻¹ a pH 8.5.

En los gráficos de la Figura 5.18, observamos que la constante cinética k_{cat} disminuye a medida que el pH se vuelve ácido (Figura 5.18 A). Del mismo modo, se observa una disminución en el valor de K_M (Figura 5.18 B) y la constante de especificidad (k_{cat}/K_M) presenta un máximo a pH 6.5 lo cual nos indica el pH óptimo de nuestra enzima (Figura 5.18 C), ya que a este pH la enzima presenta el estado óptimo de protonación de los residuos del sitio activo, por lo que presenta una mayor relación entre la afinidad (K_M mayor) y la k_{cat} .

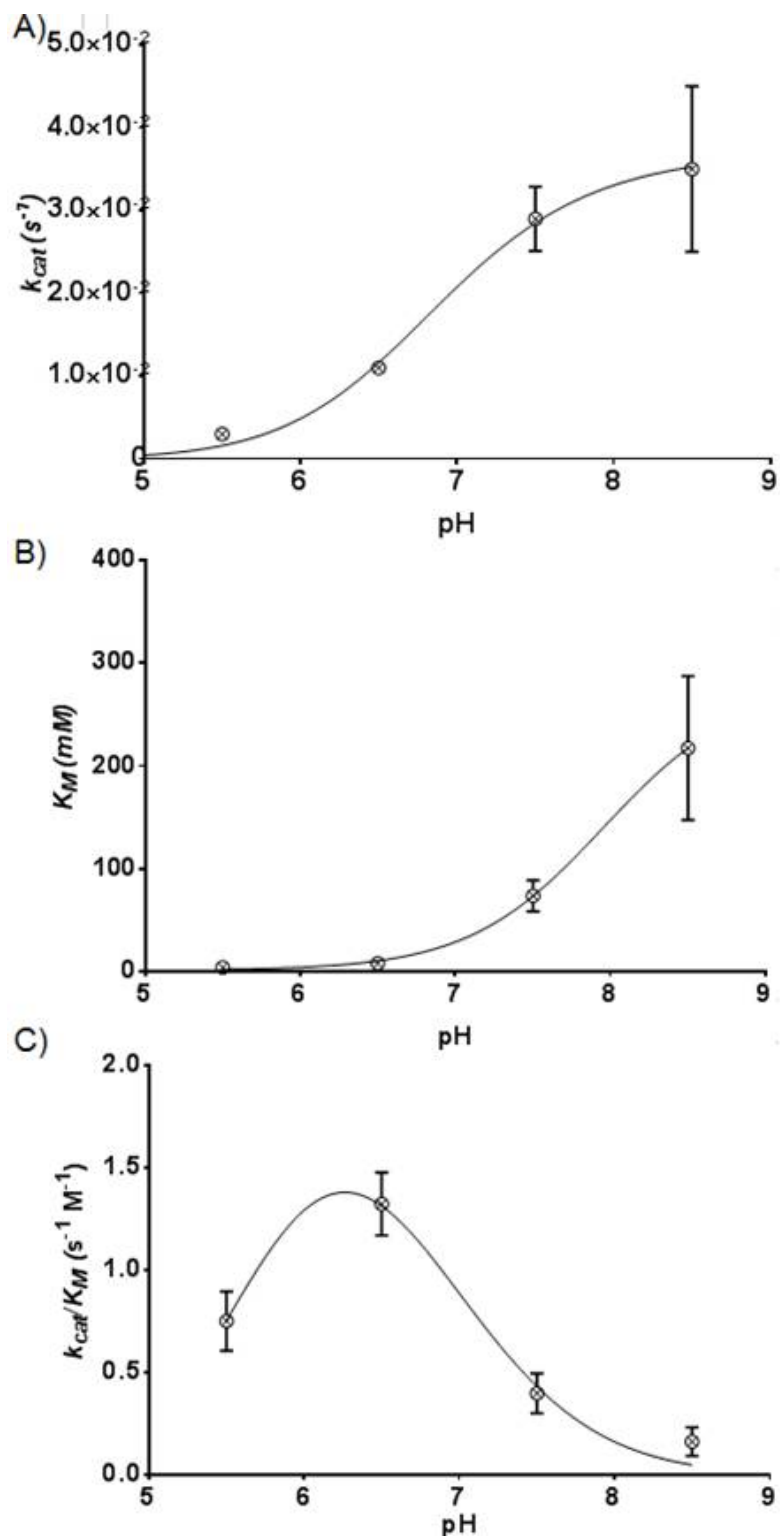


Figura 5.18. Constantes cinéticas de la hidrólisis del pNPS en función del pH. A) k_{cat} vs pH B) K_M vs pH y C) la constante de especificidad (k_{cat}/K_M) vs pH que presenta un máximo a pH 6.5.

5.6. Ensayos de actividad promiscua.

Debido a la baja actividad de la enzima para la hidrólisis de ésteres de sulfato se probaron actividades de enzimas pertenecientes a otras familias de la misma superfamilia, para comprobar si es una sulfatasa o pertenece a otra familia de enzimas (Jonas, van Loo, Hyvonen, & Hollfelder, 2008).

El estudio de las actividades promiscuas de monofosfatasa, fosfonatasa, y fosfodiesterasa de la COS se realizó utilizando los sustratos *p*-nitrofenilfosfato (*p*-NPP), *p*-nitrofenil-fenilfosfonato (*p*-NPPP) y bis-*p*-nitrofenilfosfato (bpNPP) respectivamente (Figura 5.19). En cada caso se determinaron las velocidades iniciales siguiendo espectrofotométricamente la formación del *p*-nitrofenol a 400 nm.

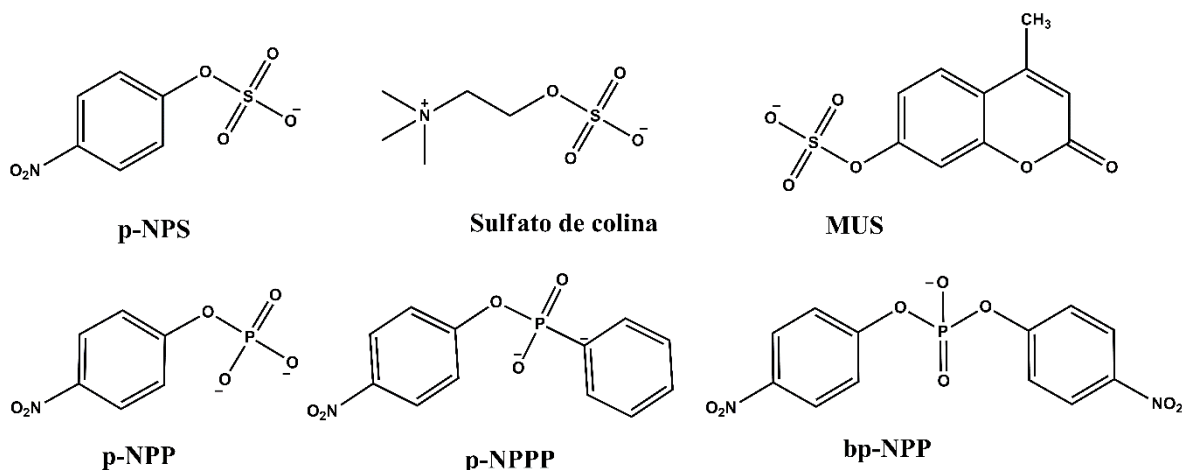


Figura 5.19. Estructura de los compuestos utilizados como sustratos para la COS.

En el caso de la actividad promiscua de monofosfatasa, fue necesario seguir la reacción hasta por 24 horas, ya que la hidrólisis ocurre de manera muy lenta, y el cambio de absorbancia es muy pequeño ($\Delta Abs = 0.1$ en 90 minutos) (Figura 5.20). Como se observa en la Figura 5.21, las velocidades iniciales son del orden de 10^{-10} M/s y la constante cinética k_{cat} ($3.4 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$) es 1000 veces menor que para la

observada para el pNPS. Aunque la K_M es de 8.2 mM, un valor menor que la que presenta la actividad de sulfatasa contra pNPS.

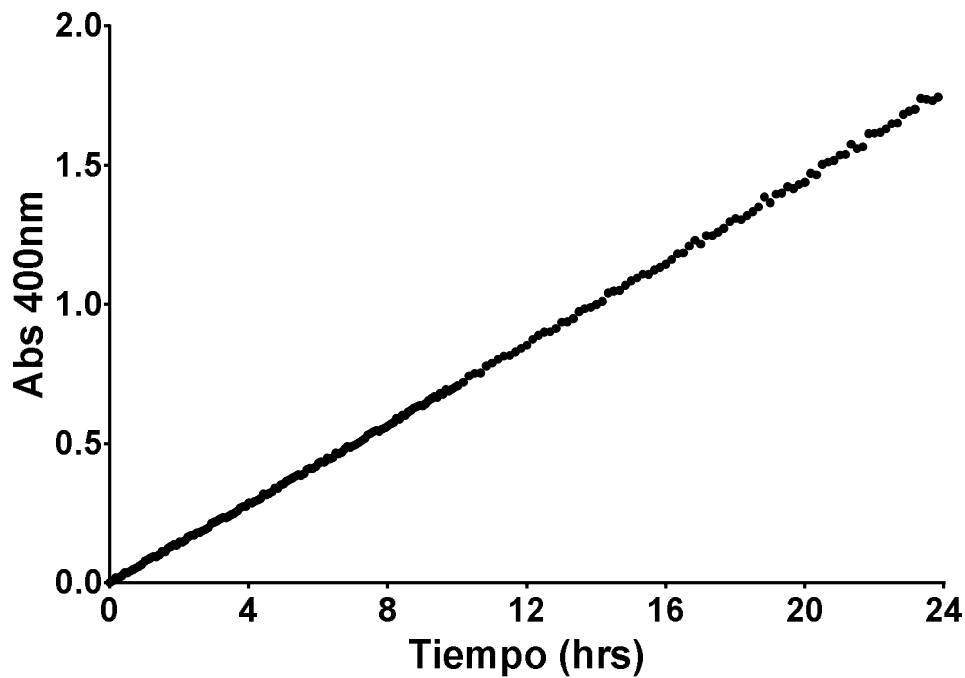


Figura 5.20. Curso de la reacción de Hidrólisis del pNPP (40 mM) por COS (5.2 μ M) a 25°C y pH 7.5. La reacción tiene un comportamiento lineal hasta por 24 h.

La actividad de fosfodiesterasa contra el bpNPP no fue detectada a las condiciones utilizadas en los experimentos.

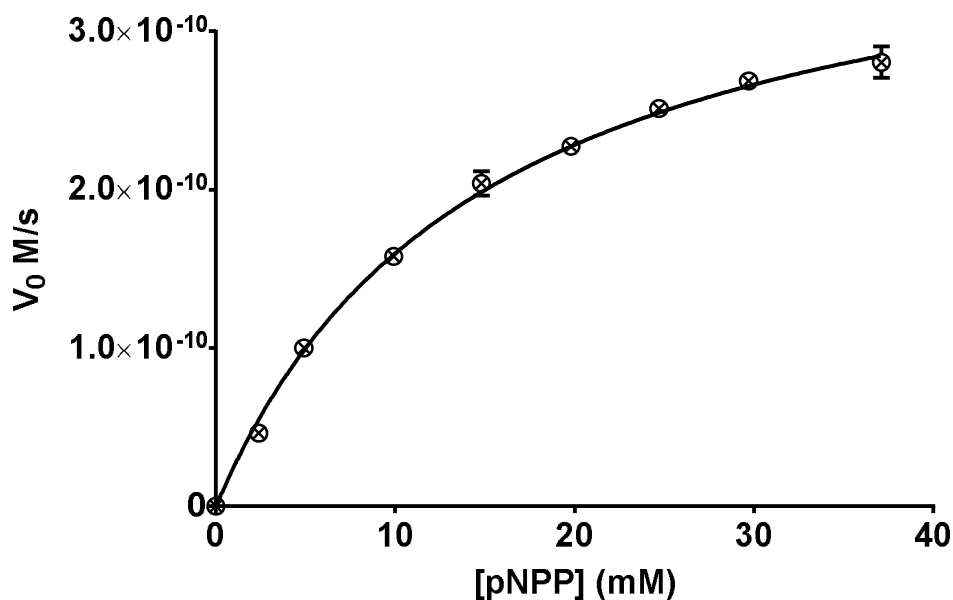


Figura 5.21. Cinética de Michaelis-Menten para la actividad promiscua de monofosfatasa contra pNPP a 25°C y un pH 7.5.

Por otro lado, la actividad de fosfonatasa presenta una actividad solo 10 veces menor que la actividad nativa contra el pNPS. La constante cinética k_{cat} tiene un valor de $4.28 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ y la K_M un valor de 45.5 mM, la cual es menor que la presentada contra el pNPS. A pesar de esto, los valores son aproximados ya que no se observa saturación de la enzima con este sustrato (Figura 5.22), por lo que los errores en el ajuste son grandes (15% K_M y 18% para k_{cat}). Debido a la baja solubilidad del sustrato, no fue posible aumentar las concentraciones de este en el análisis.

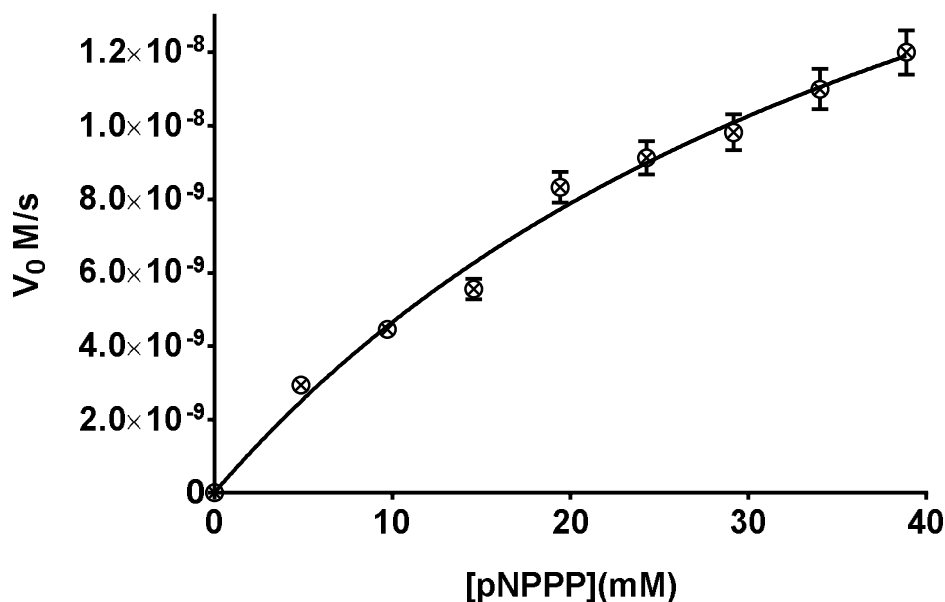


Figura 5.22. Cinética de Michaelis-Menten para la actividad promiscua de fosfatasa contra pNPPP a 25°C y un pH 7.5.

Adicionalmente, la actividad de monofosfatasa se intentó determinar con un análogo del sustrato natural: el fosfato de colina. Esto se realizó utilizando calorimetría de titulación isotérmica, con el método de múltiples inyecciones, siguiendo las mismas condiciones descritas para el sulfato de colina pero aumentando la concentración de COS a 5.2 μM . En el termograma (Figura 5.23) podemos observar inicialmente un aumento en la potencia del equipo que corresponde al calor de dilución del sustrato en el amortiguador de reacción dentro de la celda, pero se observa que el potencial disminuye hasta alcanzar de nuevo el estado estacionario inicial correspondiente a la línea base del calorímetro y no se observa un proceso exotérmico que pudiera corresponder a la reacción de hidrólisis.

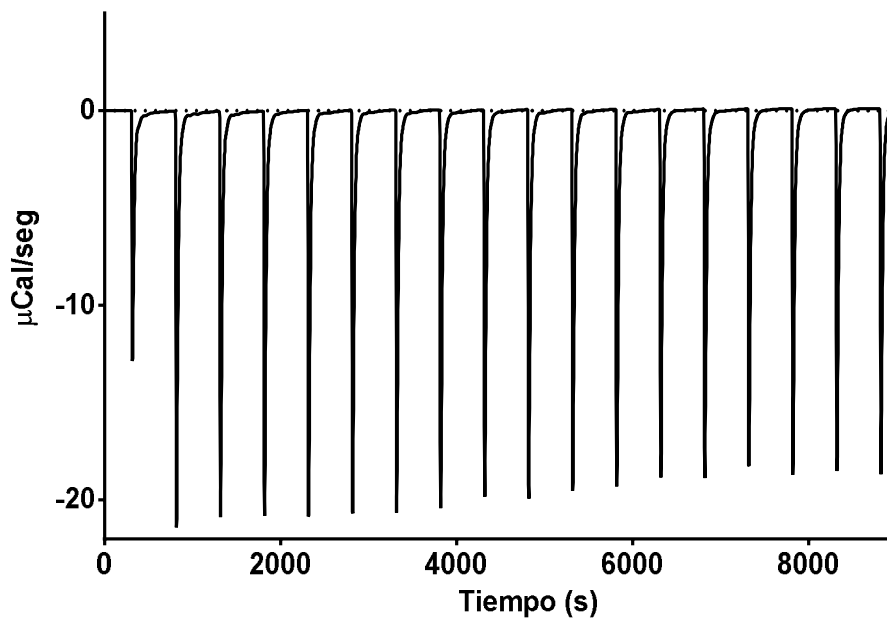


Figura 5.23. Termograma de la hidrólisis del fosfato de colina por COS a 25°C y pH 7.5. En todas las inyecciones se observa el calor asociado a la dilución del sustrato, pero en cada caso se observa que la potencia regresa a la línea base inicial, indicando la ausencia de reacción.

Para corroborar esto se realizó un experimento para determinar el calor de disolución del sustrato en el amortiguador de reacción, esto es el experimento en ausencia de la enzima. Como muestra la Figura 5.24, el termograma es muy similar a lo observado en presencia de la COS, por lo anterior podemos asegurar que no existe reacción entre el fosfato de colina y la COS a las condiciones experimentales estudiadas.

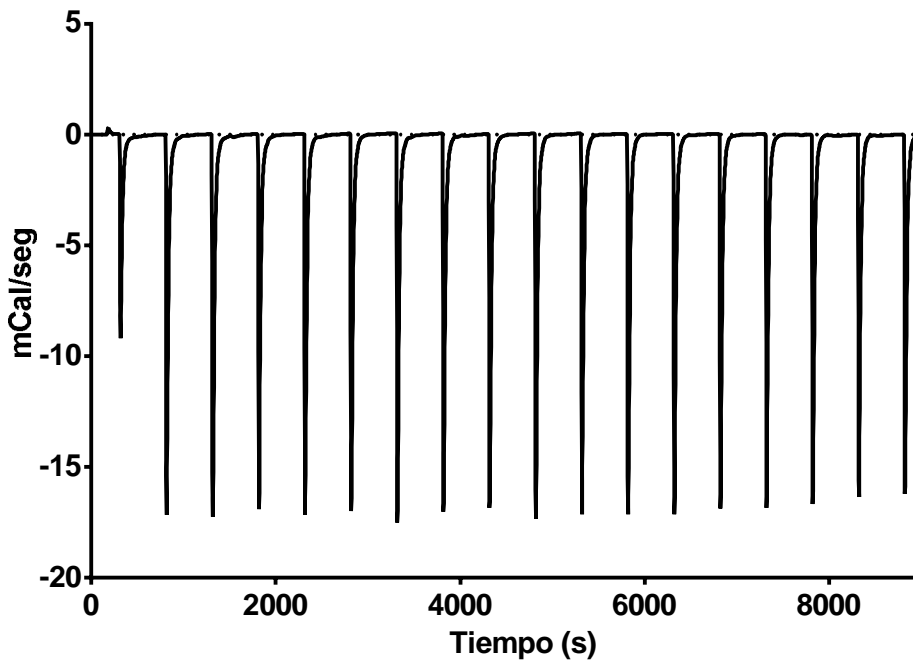


Figura 5.24. Termograma del calor de disolución del fosfato de colina en el amortiguador de reacción a 25°C y un pH 7.5.

5.7. Ensayos de inhibición.

Se estudió el efecto inhibitor en la enzima de los productos de la reacción nativa: colina y sulfato, así como también se determinó la inhibición por fosfatos. Para estos experimentos se utilizó pNPS como sustrato. Inicialmente se utilizó un intervalo de 10-80 mM de cada inhibidor, y se determinó la actividad a cada una de las concentraciones. En la Figura 5.25 se puede observar la actividad relativa para cada inhibidor. En el caso del sulfato no se presentó inhibición alguna a las concentraciones empleadas en el análisis. En el caso del fosfato observamos una rápida caída de la actividad relativa a concentraciones bajas, la cual se mantiene constante a concentraciones altas. Por otro lado, la inhibición por colina presenta un comportamiento menos pronunciado que el observado para los fosfatos, por lo

que la disminución en la actividad relativa es proporcional a la concentración de compuesto.

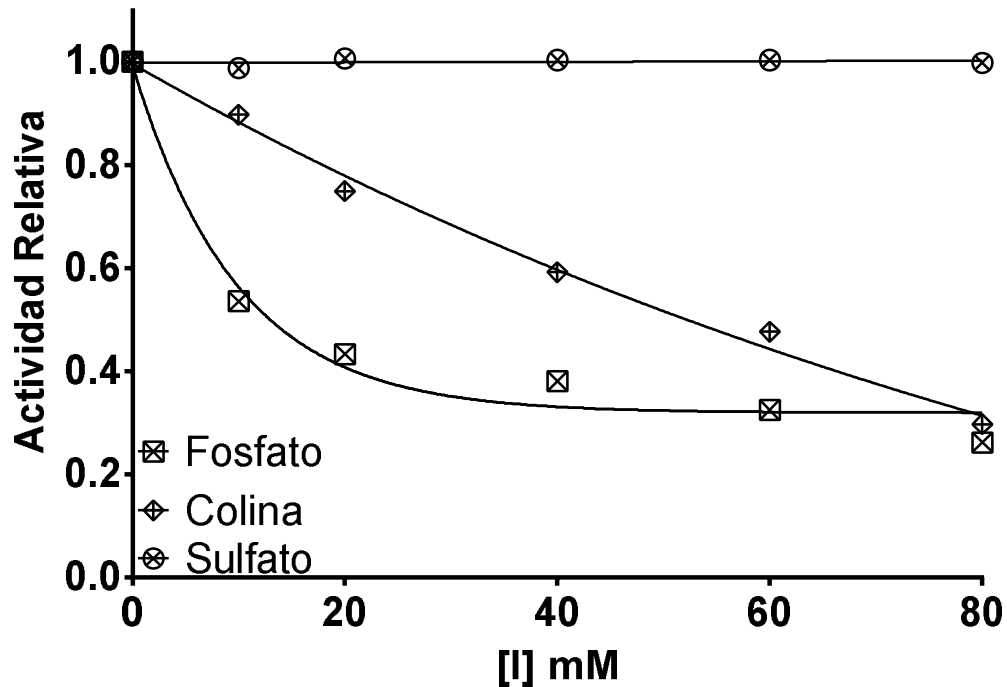


Figura 5.25. La grafica nos muestra la variación de la actividad relativa de COS en función de la concentración de diferentes inhibidores a 25°C y un pH 7.5.

Posteriormente se decidió realizar un estudio más detallado sobre el tipo de inhibición de COS por la colina, utilizando nuevamente pNPS como sustrato. Para esto se realizaron ensayos de actividad a diferentes concentraciones de inhibidor, y se obtuvieron los parámetros cinéticos en cada caso. La Figura 5.26 muestra los gráficos de Michaelis-Menten para las diferentes concentraciones de inhibidor.

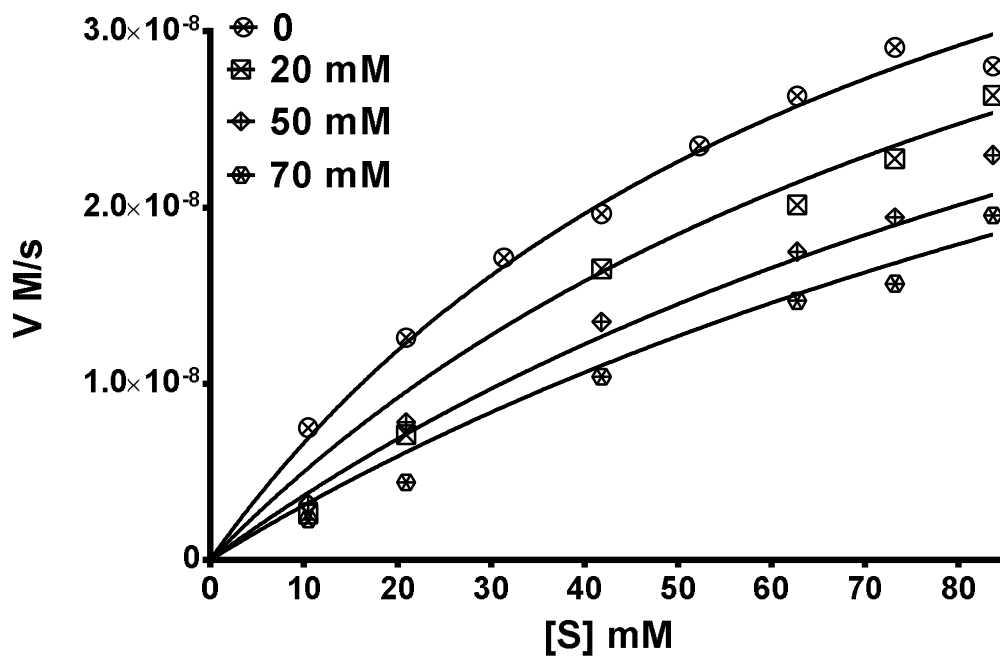


Figura 5.26. Gráfico de Michaelis–Menten para la hidrólisis de pNPS a las diferentes concentraciones de colina a 25°C y un pH 7.5.

Posteriormente se realizó un ajuste global de los datos utilizando el programa GraphPadPrism 6 con el cual se obtuvo que el comportamiento se ajusta mejor a una inhibición de tipo competitiva con una constante de inhibición (K_i) con valor de 57.8 mM. Una representación gráfica de los datos como dobles recíprocos (Lineweaver-Burk) se muestra en la Figura 5.27.

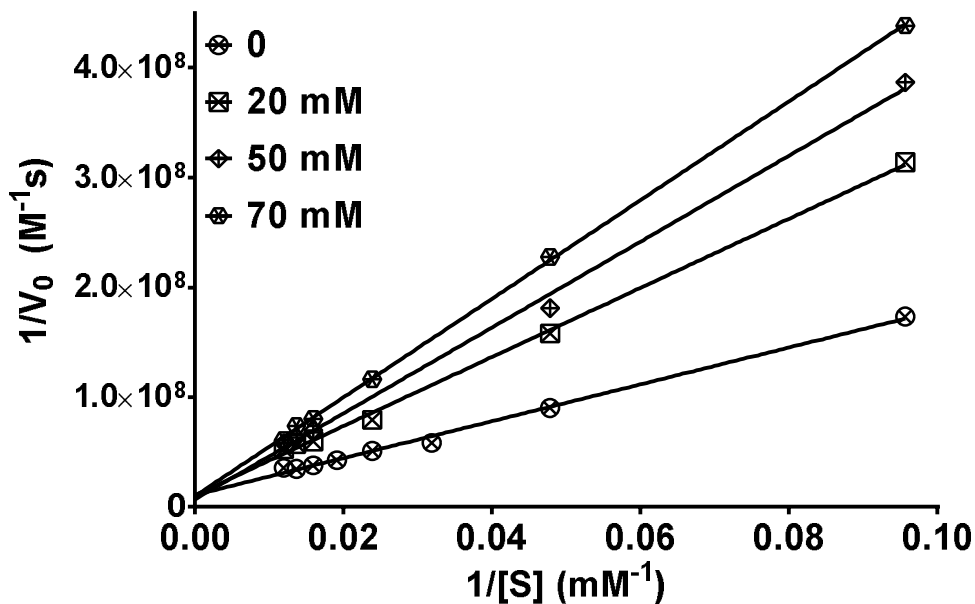


Figura 5.27. Gráfica de dobles recíprocos junto con el ajuste global para determinar el tipo de inhibición y su constante de inhibición a 25°C y un pH 7.5.

Para asegurar que las actividades promiscuas son realizadas por la COS y no debidas a alguna impureza, se realizó el análisis de inhibición por colina para las actividades promiscuas de monofosfatasa y fosfonatasa, utilizando las mismas condiciones experimentales que para la actividad de sulfatasa. Las Figuras 5.28 y 5.29 muestran los gráficos de Michaelis-Menten para las diferentes concentraciones de inhibidor para cada una de las actividades promiscuas. Con los datos anteriores se realizó un ajuste global con el cual pudimos determinar que en cada caso el mejor modelo de inhibición es el competitivo y las constantes de inhibición (K_i) para las actividades de monofosfatasa y fosfonatasa son muy similares: 52.8 y 54.46 mM respectivamente (Tabla 1). Estos resultados sugieren fuertemente que es el mismo sitio activo el que cataliza la actividad de sulfatasa y las dos actividades promiscuas.

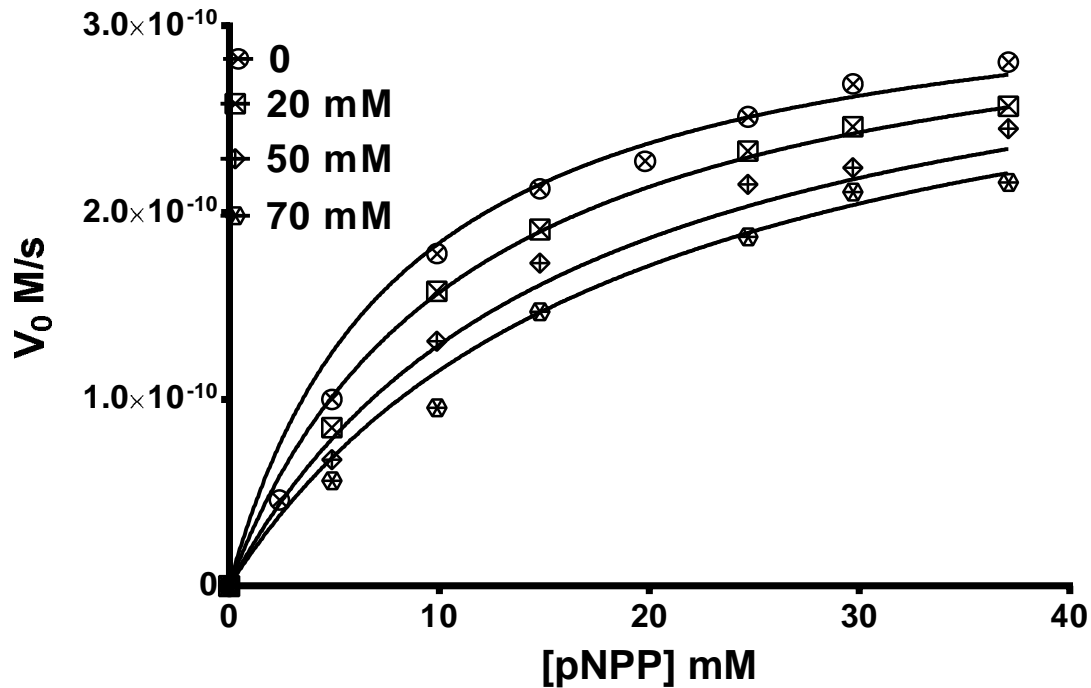


Figura 5.28. Gráfico de Michaelis–Menten para la actividad promiscua de monofosfatas, a las diferentes concentraciones de colina.

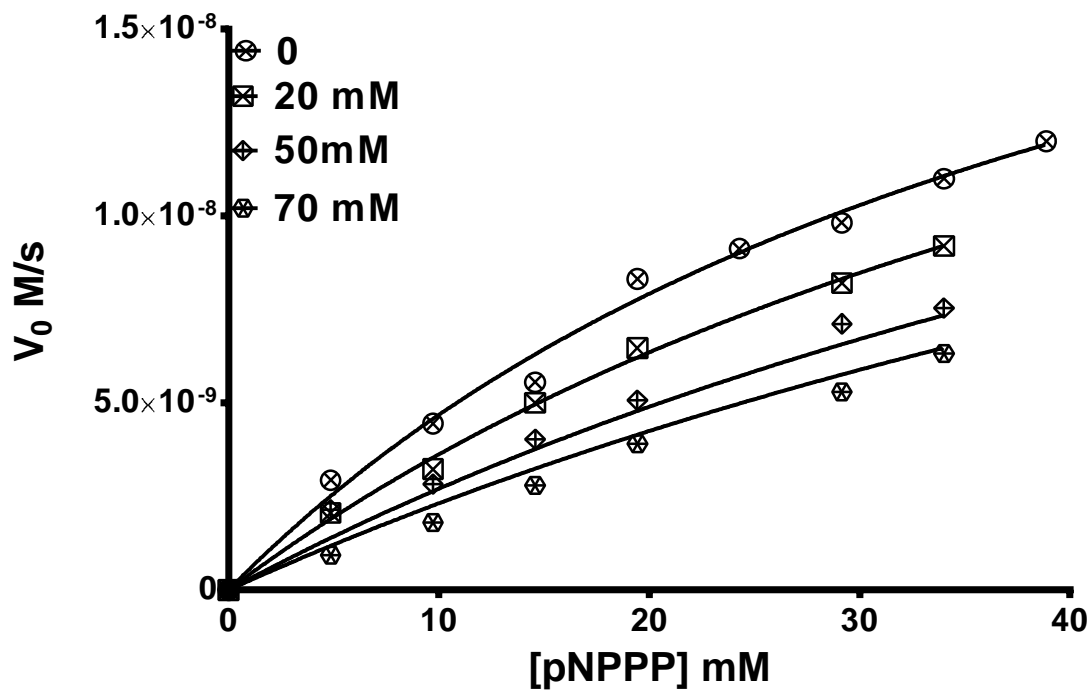


Figura 5.29. Gráfico de Michaelis–Menten para la actividad promiscua de fosfonatasa a las diferentes concentraciones de colina.

Tabla 1. Constantes de inhibición para la COS por parte de la colina utilizando diversos sustratos.

	K_i (mM)	
Sulfato (pNPS)	57.83	± 6.21
Mono Fosfato (pNPP)	52.8	± 5.59
Fosfonato (pNPPP)	54.46	± 6.03

5.8. Determinación de la modificación postraduccional.

Como se mencionó en la introducción, al pertenecer COS a la familia de las ARS requiere una modificación postraduccional en la cual la Cys del sitio activo es transformada en formilglicina (FGly). Debido a la importancia de esta modificación es necesario determinar su presencia y para ello se realizó la cuantificación de las cisteínas presentes en la proteína mediante la reacción de Ellman. En este ensayo el DTNB (5,5'-Dithiobis (ácido 2-nitrobenzoico)) reacciona con las cisteínas liberando un compuesto colorido por el cual se puede determinar la concentración de cisteínas en la muestra (Figura 5.30).

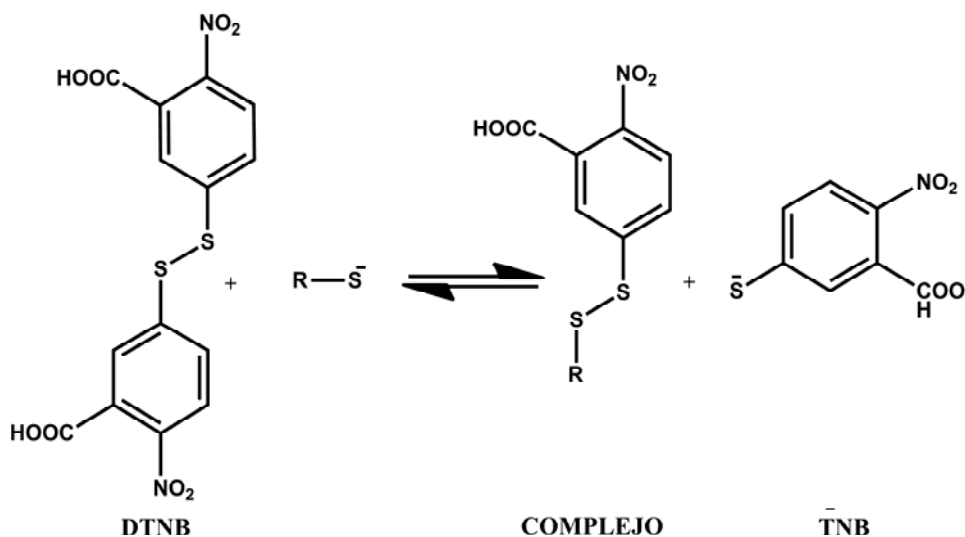


Figura 5.30. Esquema de la reacción de Ellman para la cuantificación de cisteínas en la proteína.

Para poder determinar la concentración de cisteínas en la muestra fue necesario conocer el coeficiente de absorptividad molar del compuesto liberado en la reacción (ácido 2-nitro-5-mercapto-benzoico). Para lo anterior se realizó una curva patrón utilizando como estándar acetilcistina (Ellman, 1959), bajo las mismas condiciones que el ensayo y obteniendo un coeficiente de absorptividad molar de $13,690 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Figura 5.31).

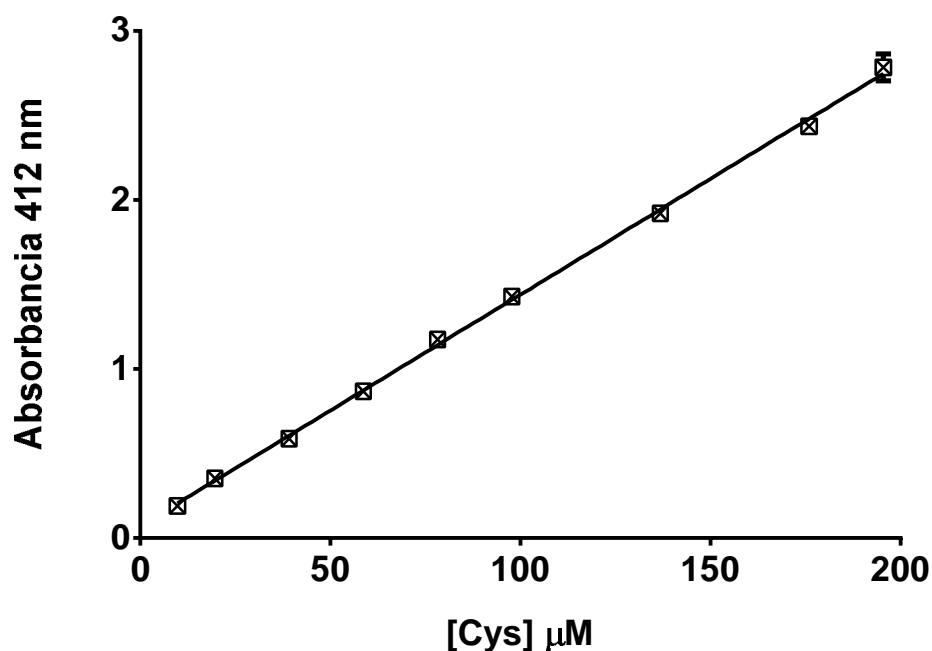


Figura 5.31. Curva patrón de la reacción de Ellman para la cuantificación de cisteínas a 412 nm.

Para esta cuantificación se realizó el análisis a diferentes muestras: la proteína nativa, la proteína desnaturalizada con urea y la proteína desnaturalizada y tratada con agentes reductores de puentes disulfuro (DTT y TCEP). Como se muestra en la Tabla 2, se determinó que de las 6 cisteínas presentes en la proteína 4 están libres (muestra desnaturalizada) y 2 están formando un puente disulfuro (muestras tratadas con DTT y TCEP), lo cual también nos sugiere la ausencia de la FGly.

Tabla 2. Cuantificación de cisteínas presentes en la colín-O-sulfatasa utilizando la reacción de Ellman

Tratamiento de la muestra	Numero de Cys detectadas
Proteína nativa	0.30 ± 0.01
Urea 8 M	3.99 ± 0.03
Urea 8 M + DTT	6.05 ± 0.09
Urea 8 M + TCEP	5.98 ± 0.01

Adicionalmente, para determinar la presencia o no de la modificación postraduccional de la cisteína 54 del sitio activo, se realizó un análisis de espectroscopia de masas (MS). La proteína fue reducida, alquilada y digerida con tripsina, posteriormente se realizó una cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC)-acoplado a MS para determinar la posible presencia y la comparación directa de los fragmentos que contuvieran la Cys o la FGly. La FGly es un aldehído que en medio acuoso sufre una hidratación para formar un diol (Figura 2.6). Debido a esto, el análisis de MS es capaz de detectar estas dos especies de FGly con sus diferentes pesos moleculares. Por esta razón en el análisis de MS podríamos encontrar el péptido con tres pesos diferentes: el correspondiente a la forma Cys de la proteína y las dos especies de FGly (Figura 5.32).

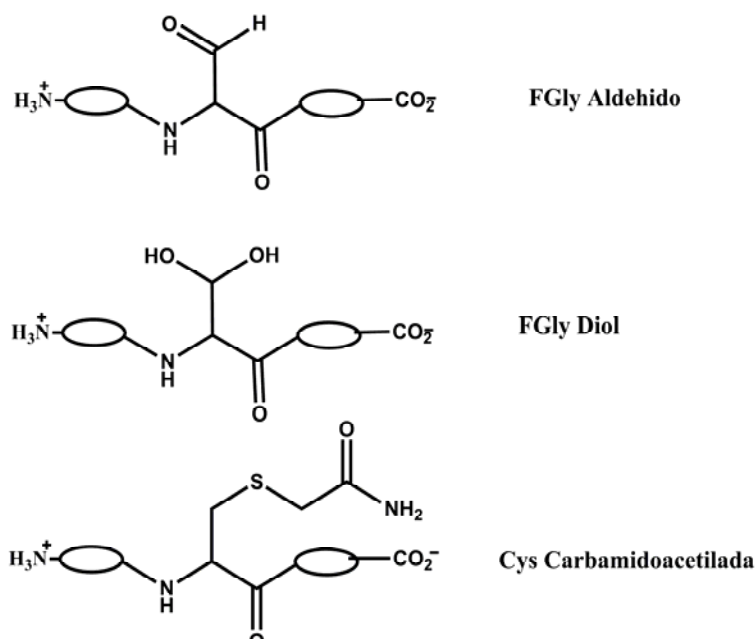


Figura 5.32. Especies que pueden detectarse por MS cuando se analiza el péptido con la cisteína del sitio activo de las ARS.

Los resultados del análisis de MS confirmaron la presencia del péptido en la forma Cys (Figura 5.33) en la forma carbamidoacetilada ($M+3H= 578.93$ m/z), el cual eluye a 17.17 minutos. Los péptidos esperados para la forma FGly del péptido, aldehído ($M+3H=553.93$ m/z) y la forma diol ($M+3H=559.94$ m/z), no fueron

detectados en el análisis de MS, lo cual confirma la ausencia total del residuo FGly en la proteína.

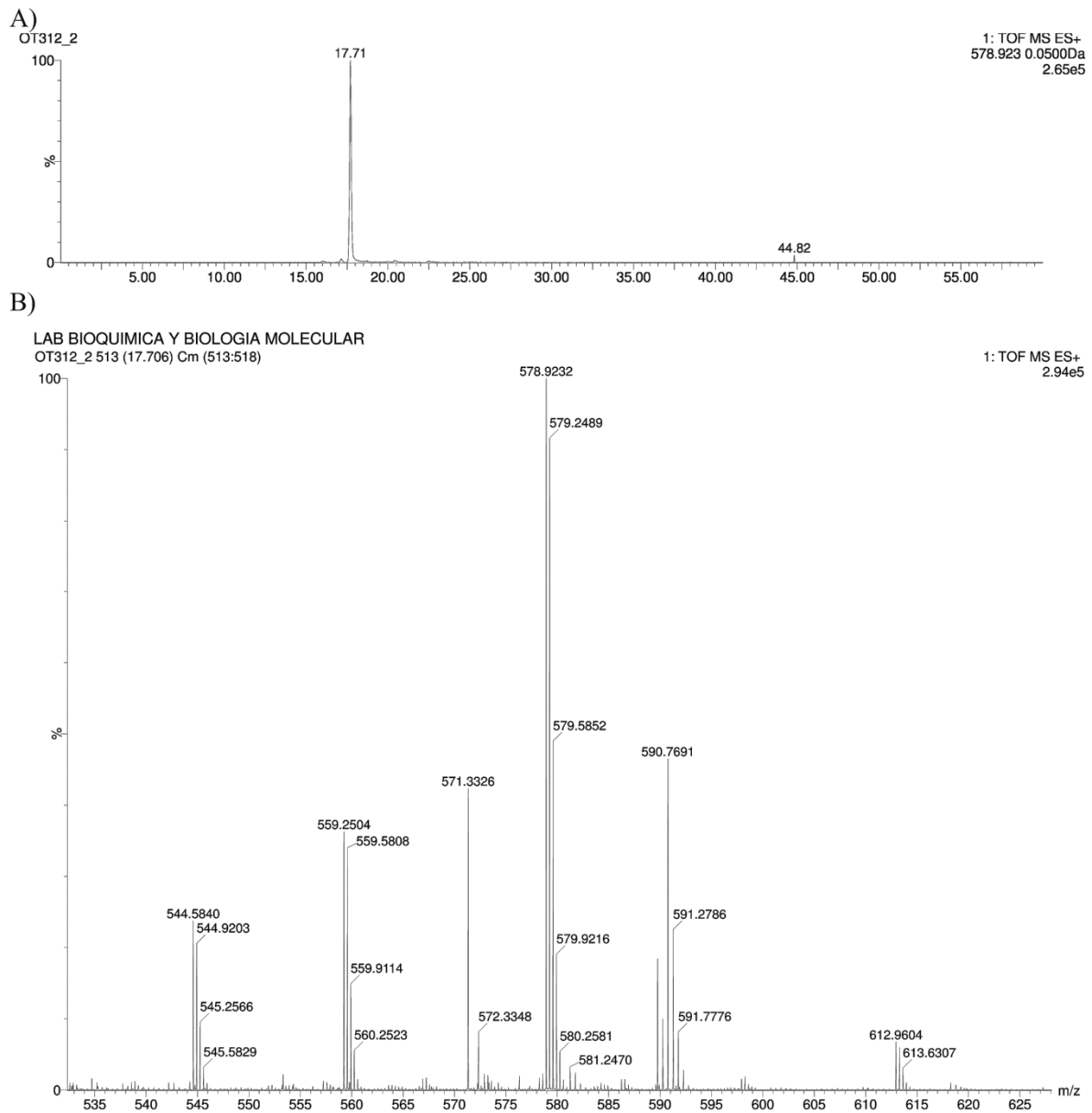


Figura 5.33. Resultado del análisis HPLC-MS para COS A) cromatograma de iones extraídos del péptido $M+3H= 578.93$ m/z y B) Espectro de masas para este péptido.

5.9. Co-expresión.

Con el fin de obtener la proteína con la modificación postraduccional se llevaron a cabo co-expresiones de la sulfatasa con la proteína generadora de FGly (FGE) de *Ensifer meliloti*. Para esto se siguieron dos metodologías de co-expresión: utilizando el vector del sistema pDUET (Novagen), y utilizando un sistema de doble vector (Rabuka et al., 2012).

5.9.1. Producción de los vectores y cultivo celular

5.9.1.1. Sistema pDUET

Se realizó una optimización del gen que codifica para la FGE de *Ensifer meliloti* para su expresión en *E. coli* como anteriormente se realizó para la sulfatasa COS. El gen optimizado fue sintetizado por GeneScript y fue clonado en el plásmido pRSFDuet, en el primer sitio de clonación, mientras que el gen que codifica para la COS fue insertado en el segundo sitio de clonación. Con eso se obtuvo el vector de expresión pRSFDuet+FGE+COS (Figura 5.33A). El vector fue transformado en células químicamente competentes de *E. coli* DH5 α y para corroborar que las clonas tuvieran el vector correcto se realizó una prueba de patrones de digestión utilizando las enzimas de restricción *HindIII* y *XhoI*, en el cual se obtuvieron dos fragmentos correspondientes para el vector (5000pb) y al inserto COS (2000pb) Figura 5.34 B.

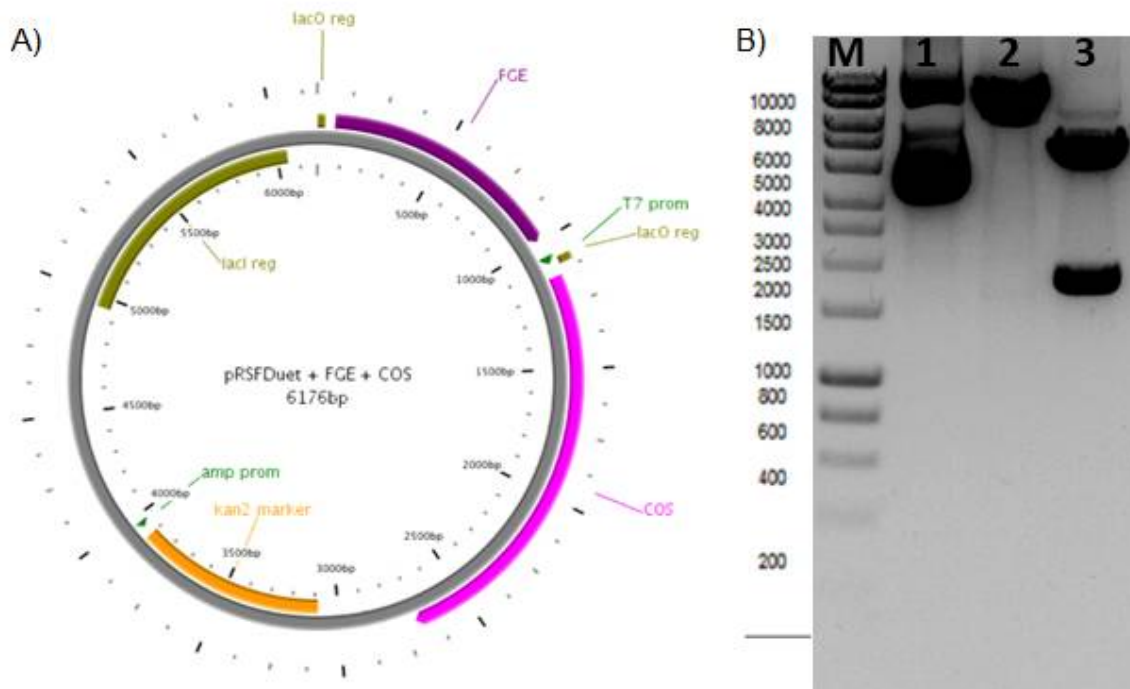


Figura 5.34.A) Esquema del vector de expresión pRSFDuet+FGE+COS y B) patrones de digestión para el vector de clonación (línea 1), el vector linealizado con *Xho*I (línea 2) y tratado con *Hind*III y *Xho*I (línea 3), M marcador de peso en pares de bases.

Posteriormente el vector pRSFDuet+FGE+COS fue transformado en *E. coli* BL21 (DE3) para su expresión. El efecto de la concentración de IPTG y la temperatura de inducción en la co-expresión de colina-*O*-sulfatasa fue analizado por actividad específica de los extractos celulares contra pNPS, esto debido a que al aumentar la expresión de la proteína FGE se espera que modifique a COS en su sitio activo y esto a su vez aumente la actividad catalítica de la COS, siendo esto un indicador indirecto de la eficiencia de la co-expresión. La concentración de IPTG se varió desde 0.25-1.0 mM manteniendo el tiempo de inducción de 7 hr constante. Este ensayo se realizó a 30°C y 25°C y un ensayo a 18°C. En la Figura 5.35 se muestra el gráfico de la actividad específica de la proteína a cada una de las condiciones. Se puede observar que la concentración de IPTG no es un factor que influya considerablemente en la actividad específica de la proteína. Por el contrario

a 18°C se observa una actividad cercana a la presentada por el control de la proteína no modificada (COS-Cys), por lo que a estas condiciones es probable que no hay una expresión de la proteína FGE.

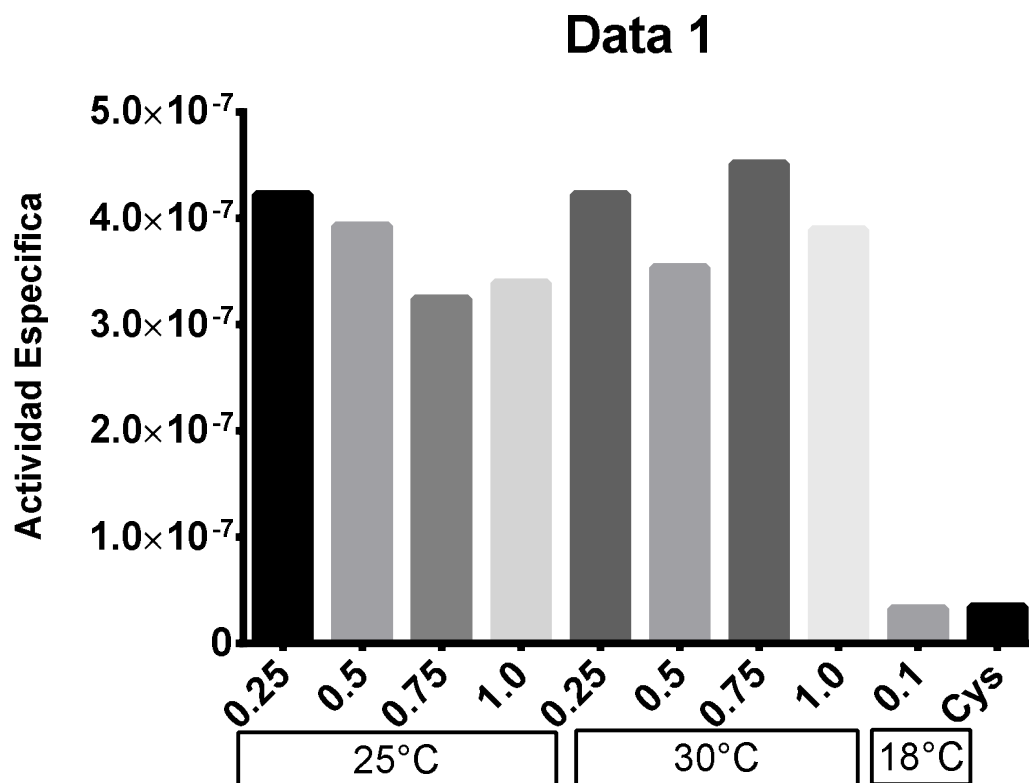


Figura 5.35. Gráfico de la actividad específica de COS a las diferentes condiciones de co-expresión utilizando el sistema pDUET. Modificando la temperatura de inducción y la concentración de IPTG (mM).

5.9.1.2. Sistema pBAD + pET

Por otro lado, el gen FGE fue clonado en el vector pBAD, para obtener el vector pBAD+FGE (Figura 5.36A). El vector fue transformado en células químicamente competentes de *E. coli* DH5 α y para corroborar que las clonas tuvieran el vector correcto se realizó una prueba de patrones de digestión utilizando las enzimas de

restricción *NcoI* y *HindIII*, en el cual se obtuvieron dos fragmentos correspondientes para el vector (4,046pb) y al inserto FGE (918pb) Figura 5.36 B.

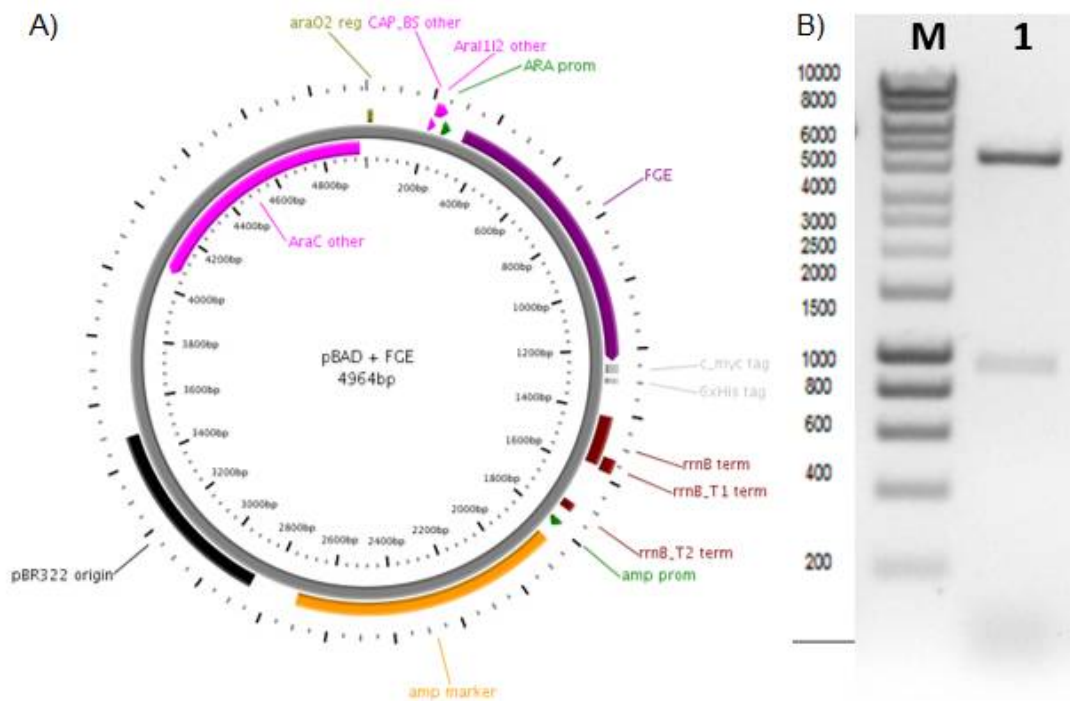


Figura 5.36. A) Esquema del vector de expresión pBAD+COS y B) patrones de digestión para el vector de clonación el vector tratado con las enzimas de restricción *NcoI* y *HindIII* (línea 1), M marcador de peso en pares de bases.

Posteriormente, el vector pBAD+FGE fue transformado en *E. coli* BL21 (DE3) que previamente tenían el vector de clonación pET26b-COS para su co-expresión. El efecto de la concentración de L-arabinosa en la co-expresión de colina-O-sulfatasa fue analizado por actividad específica de los extractos celulares contra pNPS, ya que esto será un indicador indirecto de la eficiencia de la co-expresión. La concentración de L-arabinosa se varió desde 0.0002% hasta 0.2% m/v manteniendo el tiempo de inducción de 30 minutos constante. Posteriormente se realizó la expresión de la proteína COS con IPTG como se realizó anteriormente para el pET26-COS. En Figura 5.37 se muestra el gráfico de la actividad específica de la proteína a cada una de las condiciones. Se puede observar que la actividad

específica de las muestras es muy similar (del mismo orden) que para la muestra COS-Cys por lo que la co-expresión con este método no es muy efectiva.

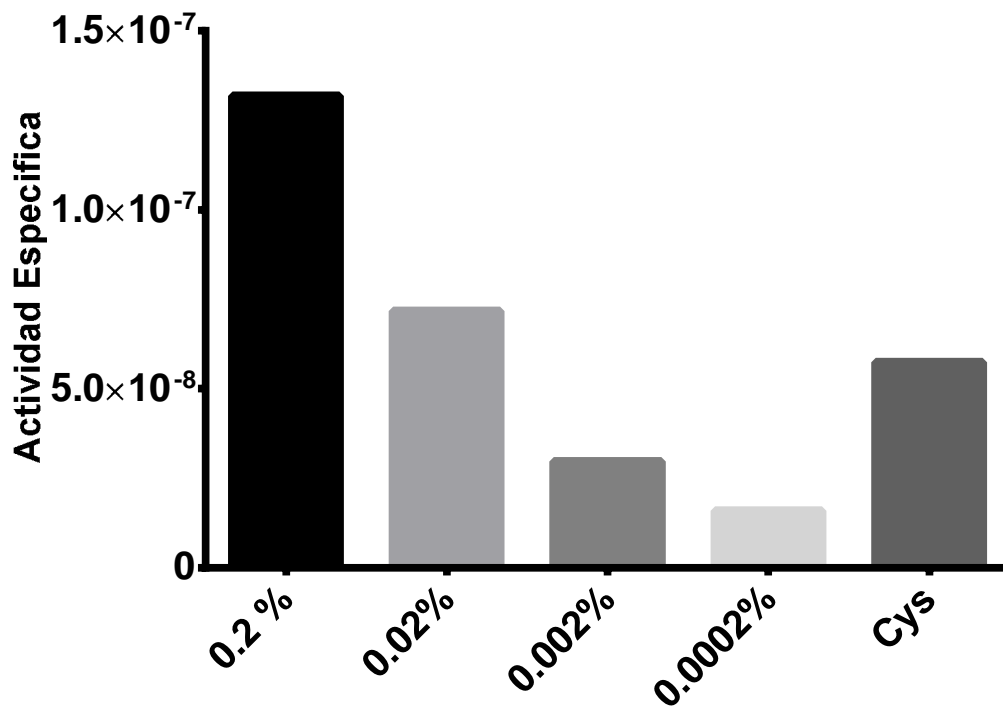


Figura 5.37. Gráfico de la actividad específica de COS a las diferentes condiciones de co-expresión con el sistema pBAD.

A pesar de que en los dos sistemas (pDUET y pBAD) se observa un aumento en la actividad de la COS, la expresión de la FGE no se observa mediante SDS-PAGE, esto se puede deber a que la cantidad que se expresa es muy poca para la sensibilidad de este método.

5.9.2. Purificación

La muestra de COS que finalmente mostró mayor actividad específica fue la co-expresada utilizando el método pRSFDuet utilizando 0.75 mM de IPTG y 30 °C . La purificación se realizó utilizando el protocolo antes mencionado para la proteína

COS-Cys: Un primer paso en una columna de afinidad (His-Trap) seguido de una cromatografía de exclusión molecular, después de las cuales las se obtiene la proteína COS-FGly, con un alto grado de pureza. La Figura 5.38 muestra un gel SDS-PAGE en el cual se muestran los diferentes pasos de purificación. Después de la purificación se obtiene un rendimiento promedio de 45-50 mg de proteína /L de medio de cultivo. La proteína fue guardada en alícuotas de 1 ml y congelada a -20°C para su posterior análisis

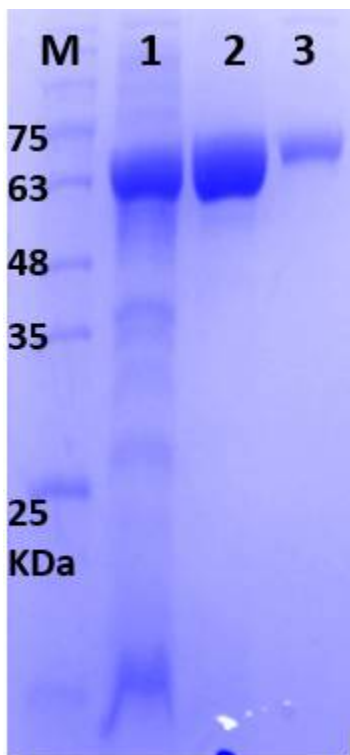


Figura 5.38. Gel de SDS-PAGE de los diferentes pasos de purificación 1) extracto crudo, 2) eluida de la columna His-Trap y 3) eluida de la columna de filtración en gel.

5.9.3. Caracterización y determinación de la modificación postraduccion

Para determinar el peso molecular de la proteína COS-FGly se utilizó una columna de filtración en gel analítica. Inicialmente la columna fue calibrada utilizando estándares de peso molecular como se realizó para la proteína COS-Cys. Una vez calibrada la columna, se analizó la proteína recombinante la cual considerando el tiempo de elución se determinó que presenta un peso molecular de aproximadamente 120 KDa, lo cual es indicativo que la proteína COS-FGly también se encuentra de forma dimérica en solución (Figura 5.39).

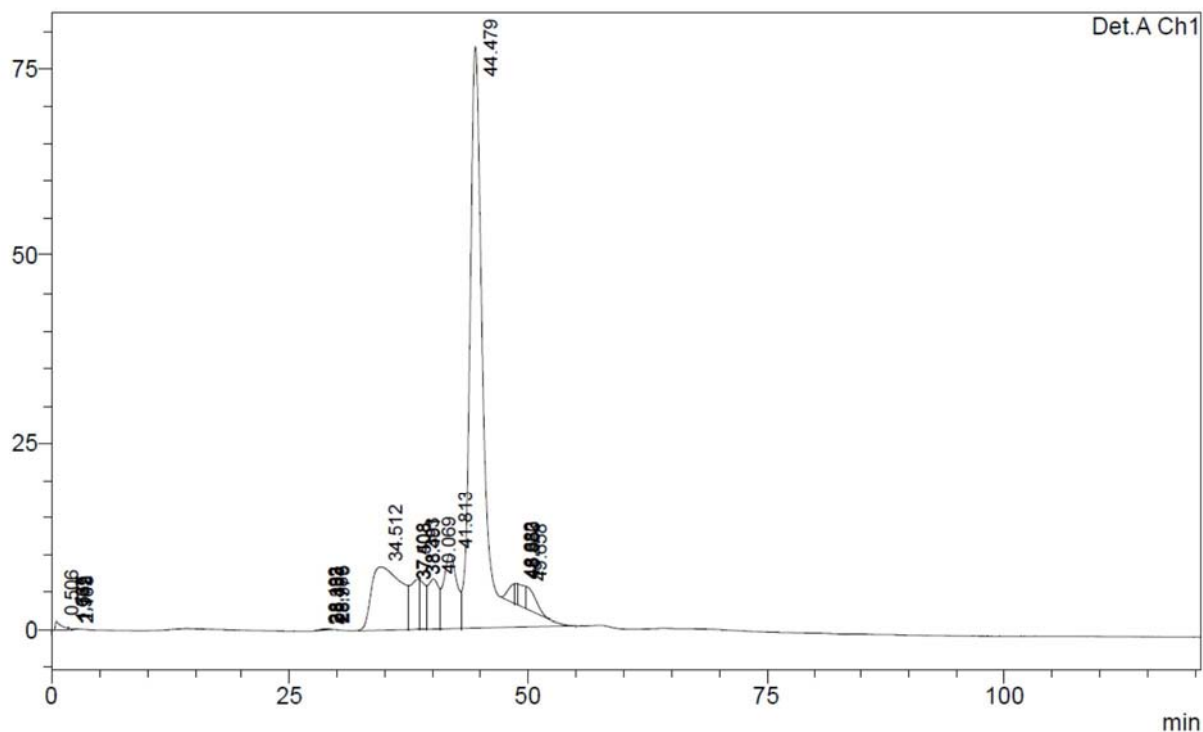


Figura 5.39. Determinación del peso molecular de COS-FGly utilizando una columna de filtración en gel.

Posteriormente para corroborar la forma dimérica de COS en solución se realizó una prueba de DLS. La muestra COS-FGly presenta una mono dispersión en un radio hidrodinámico de 5.6 nm (Figura 5.40) lo cual representa una masa molecular de 120 KDa lo cual corresponde a la forma dimérica de esta proteína.

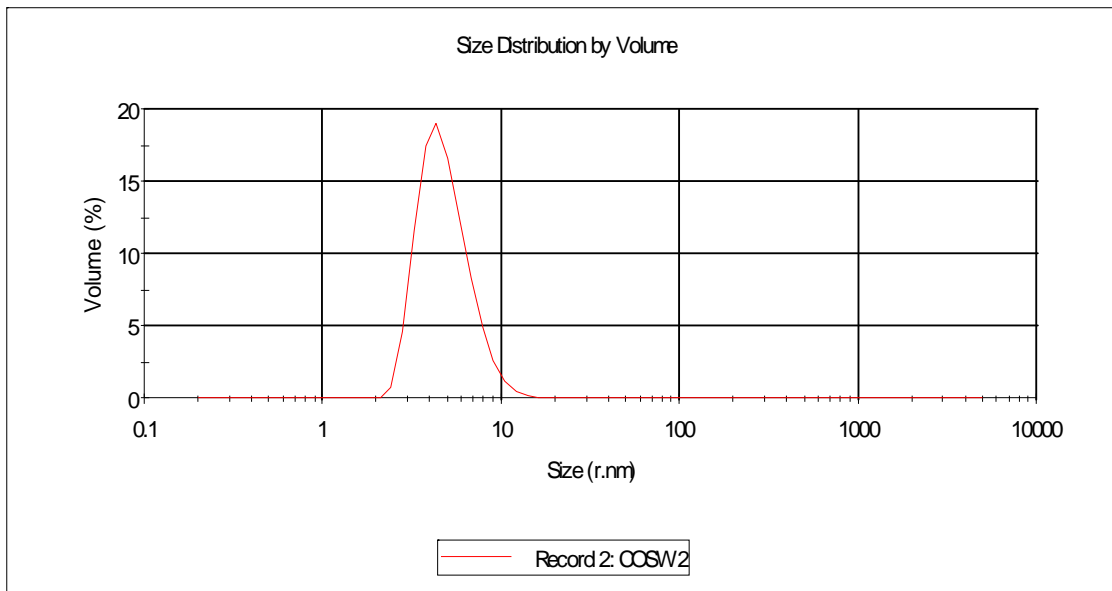


Figura 5.40. Análisis DLS para la proteína COS-FGly, en el cual se muestra un solo pico con un radio hidrodinámico en 5.6nm.

Para determinar la presencia de la modificación postraduccional se realizó la cuantificación de las cisteínas presentes en la proteína mediante la reacción de Ellman, se utilizó el coeficiente de absortividad molar de $13,690 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ determinado anteriormente. Para esta cuantificación se realizó el análisis a diferentes muestras: la proteína nativa y la proteína desnaturizada con urea. Con esta prueba se determinó que de los cuatro equivalentes de cisteínas libres presentes en la proteína (los dos restantes están formando un puente disulfuro), 3.71 cisteínas están presentes. Esto nos indica que tenemos una mezcla de proteína no modificada COS-Cys y proteína modificada COS-FGly, esta última se encuentra en un 29 %.

5.9.4. Ensayos de actividad nativa.

Para determinar la actividad cinética de la proteína COS- FGly contra su sustrato natural, el sulfato de colina, se utilizó nuevamente calorimetría (ITC) utilizando la técnica de múltiples inyecciones. Este ensayo se realizó utilizando las mismas condiciones empleadas para la muestra COS-Cys, solo se modificó la concentración de enzima disminuyéndola hasta una concentración final en la celda de 25 nM. Bajo estas condiciones se obtienen un termograma similar al obtenido para la COS-Cys (Figura 5.41).

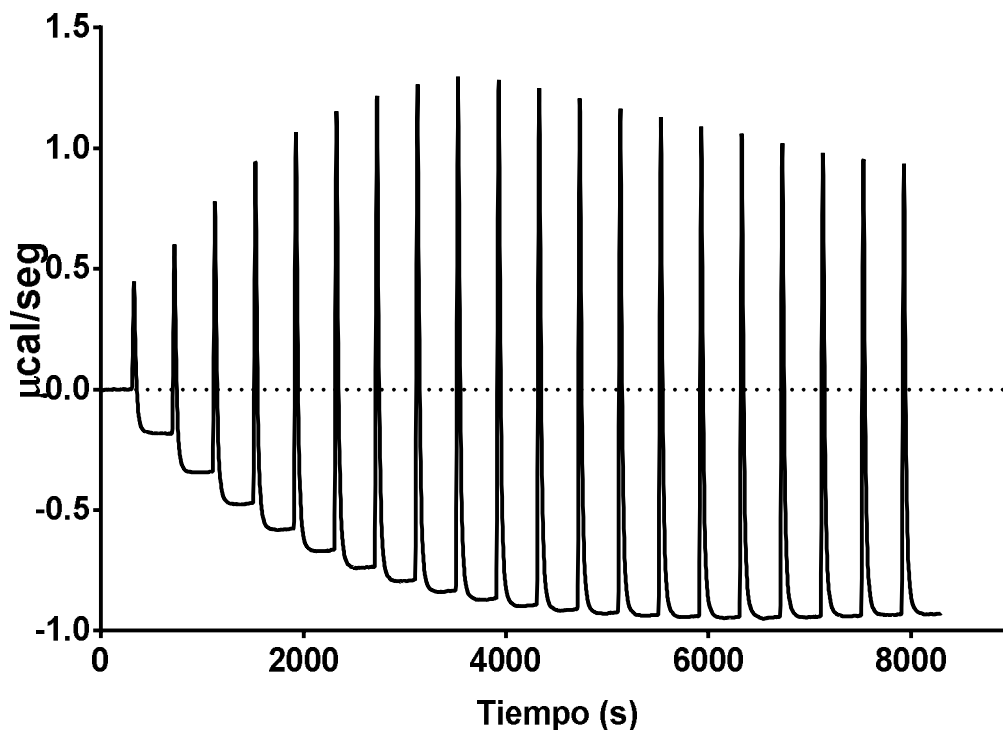


Figura 5.41 Termograma de la hidrólisis del sulfato de colina por COS-FGly .En este se observan las múltiples inyecciones así como los diferentes estados estacionarios correspondientes a las velocidades iniciales a cada concentración a pH7.5 y 25°C.

Para poder transformar el termograma en un gráfico de velocidades iniciales en función de la concentración de sustrato (grafico de Michaelis –Menten), se utilizó

la Ecuación 1 y el valor obtenido de ΔH_{app} . Con esto se obtuvo el gráfico de Michaelis-Menten para la hidrólisis de sulfato de colina (Figura 5.42). En esta se puede obtener las constantes cinéticas $k_{cat} 5.22 \pm 0.2 \text{ s}^{-1}$ y un valor de $K_M = 14.05 \pm 1.0 \text{ mM}$. Por otro lado, para la proteína COS-FGly también se puede observar la presencia de inhibición por sustrato con una constante de inhibición por sustrato K_i 13.6 mM.

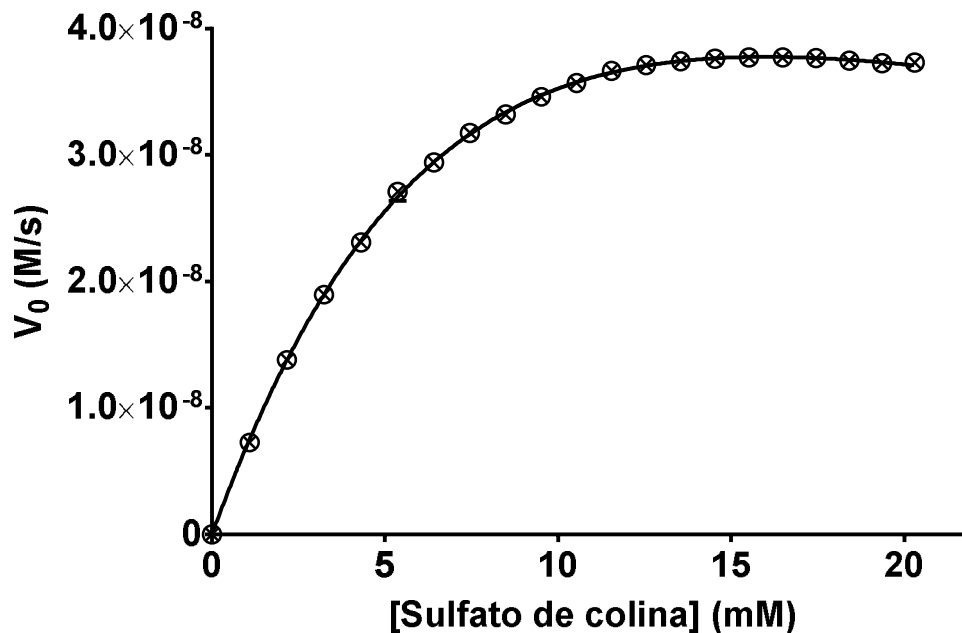


Figura 5.42. Gráfico de Michaelis-Menten para la hidrólisis del sulfato de colina por COS-FGly a pH 7.5 y 25°C. En la cual se observa una inhibición por sustrato.

El valor de k_{cat} de 5.22 s^{-1} es el obtenido para la mezcla de proteínas modificada (29%) y no modificada (71%), por lo que si consideramos que sólo el 29 % de la proteína se encuentra modificada, la k_{cat} de la enzima modificada tiene un valor de 17.35 s^{-1} .

Adicionalmente, se determinó la actividad catalítica de COS-FGly contra el sustrato sintético pNPS siguiendo su hidrólisis a 400 nm. Las constantes que se

obtuvieron fueron: $k_{cat} = 0.726 \text{ s}^{-1}$, y $K_M = 76.2 \text{ mM}$. Al igual que con la muestra COS-Cys con este sustrato no se logra la saturación de la enzima (Figura 5.43).

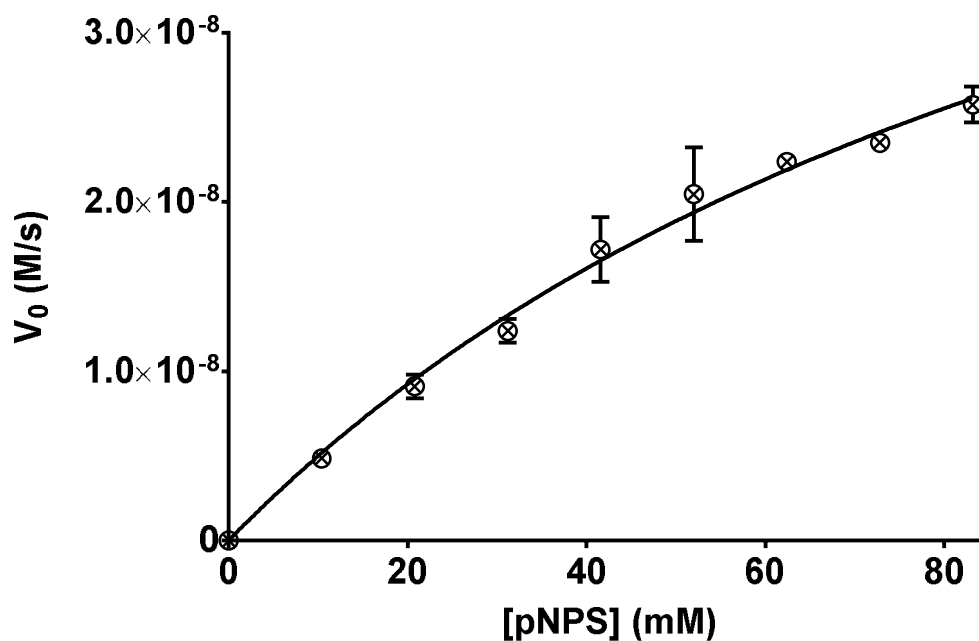


Figura 5.43. Cinética de Michaelis-Menten para la hidrólisis del pNPS por COS-Fgly a pH 7.5 y 25°C. Se puede observar que no se logra la saturación de la enzima con este sustrato.

5.9.5. Ensayos de actividad promiscua.

El estudio de las actividades promiscua de monofosfatasa, de la COS-FGly, se realizó utilizando el sustrato p-nitrofenilfosfato y los ensayos cinéticos se siguieron espectrofotométricamente cuantificando la formación del p-nitrofenol a 400 nm.

En el caso de la actividad promiscua de monofosfatasa, se observan unas constantes cinéticas de $k_{cat} = 6.204 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ y un valor de $K_M = 9.66 \text{ mM}$ (Figura 5.44).

La actividad de fosfodiesterasa contra en bpNPP no fue detectada a las condiciones utilizadas en los experimentos.

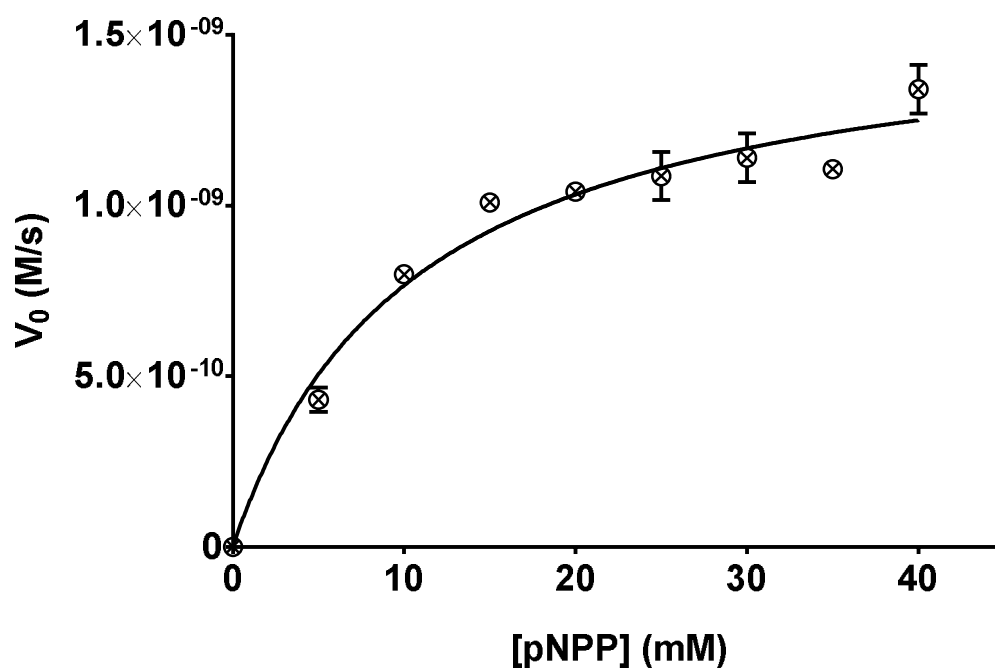


Figura 5.44. Cinética de Michaelis-Menten para la actividad promiscua contra pNPP con la enzima COS-FGly.

Adicionalmente, la actividad de monofosfatasa se intentó determinar con un análogo del sustrato natural: el fosfato de colina. Esto se realizó utilizando calorimetría ITC, utilizando el método de múltiples inyecciones, utilizando las mismas condiciones descritas para el sulfato de colina. En la Figura 5.45 se observa un termograma similar a lo observado con la COS-Cys, por lo anterior podemos asegurar que no existe reacción entre el fosfato de colina y la COS-FGly a las condiciones experimentales empleadas.

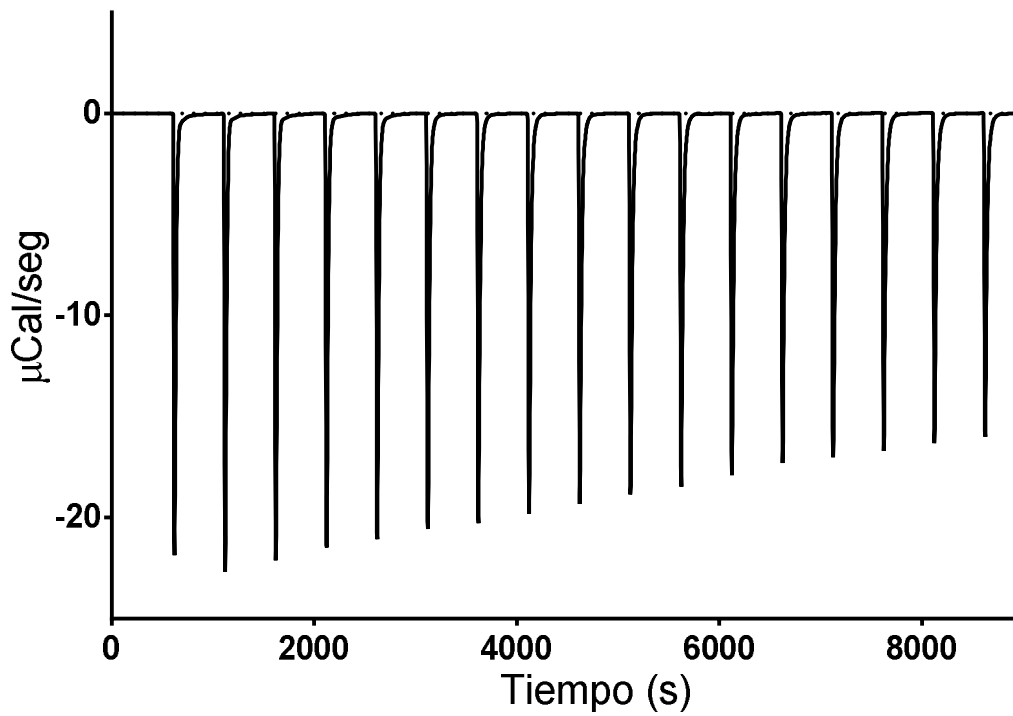


Figura 5.45. Termograma de la hidrólisis del fosfato de colina por COS-FGly. En este se observan en múltiples inyecciones el calor asociado a la disolución, posteriormente se observa que la potencia regresa a la línea base a pH7.5 y 25°C.

6. Discusión.

En 1998 fue identificado el gen *BetC* que codifica para la colín-O-Sulfatasa (COS) de *Ensifer meliloti* (Osteras et al., 1998). La secuencia proteica de la enzima presenta una gran similitud con los miembros de la familia de las arilsulfatasas, incluyendo la secuencia de reconocimiento para que una cisteína de su sitio activo sea modificada al amino ácido formilglucina. Esta modificación es catalizada por la enzima FGE y la secuencia de reconocimiento es la más conservada dentro de la familia de las arilsulfatasas.

En este trabajo la COS fue expresada en *E. coli* y después de ser purificada presenta un peso aparente de 59 KDa en SDS-PAGE considerando la presencia de la His-Tag. Se determinó también que en solución presenta una estructura dimérica, lo cual es poco común en las arilsulfatasas ya que estas enzimas tienen una estructura muy conservada, formando principalmente monómeros con una estructura 3-D de sándwich α/β (Hanson et al., 2004). Solo la arilsulfatasa A de humano ha sido reportada como dimérica (Lukatela et al., 1998). Por otro lado, la forma dimérica es común en miembros de otras familias dentro de la misma superfamilia, como las fosfatasas alcalinas y las fosfonatasas monoester hidrolasas, que llegan a presentar tetrámeros (dímero de dímeros)(Jonas et al., 2008).

Las arilsulfatasas presentan un alto grado de conservación principalmente en la secuencia de reconocimiento para la modificación postraducciona C/S-X-P-X-R (Dierks et al., 1999; Hanson et al., 2004; Sardiello et al., 2005; von Figura et al., 1998) la cual es fundamental para su actividad. Sin embargo, a pesar de la presencia de esta secuencia en la COS, dicha modificación no se presentó en la proteína expresada en *E. coli*, lo cual nos indica que la FGE presente en *E. coli* no es capaz de reconocer a nuestra enzima. Este hecho ha sido también reportado con

algunas otras arilsulfatasas. Lo anterior nos demuestra que la sola presencia de la secuencia de reconocimiento no es suficiente para que dicha modificación se lleve a cabo. La Tabla 3 muestra que esta secuencia consenso puede ser reconocida y transformada a FGly en diferentes grados en *E. coli* por la maquinaria enzimática, la cual no ha sido todavía identificada (Benjdia, Deho et al. 2007). En algunos casos, una mezcla de cisteína sin modificar y FGly ha sido observado por análisis cualitativo de MALDI-TOF, mientras que en otros casos sólo el péptido con la FGly se ha detectado, lo cual indica 100% de modificación. Sólo en tres ejemplos el grado de formación FGly se ha cuantificado directamente en mezclas con los péptidos de Cys no modificados. Para casi la mitad de todos los casos, el porcentaje de FGly no se ha determinado. Basándose en estos resultados, es evidente que la presencia de los cinco residuos mínimos conocidos como "firma de sulfatasa", o incluso la secuencia extendida de 25 aminoácidos presentada en la Tabla 3, no es una garantía de modificación ni siquiera parcialmente de FGly en *E. coli*. La enzima Iduronato 2-sulfato sulfatasa humana y COS tienen un residuo de serina en la posición (-13) con respecto a la cisteína del sitio activo que es diferente del residuo consenso glicina, pero aún con glicina en esta posición, la modificación puede ser baja ya que fue el caso de la sulfatasa de *M. tuberculosis* (Hossain, Kawarabayasi et al. 2009).

Tabla 3. Secuencias de reconocimiento para la cisteína del sitio activo expresadas en *E. coli*, y el porcentaje de modificación a FGly. Tomada de (Sánchez-Romero & Olguin, 2015)

Sulfatasa	Secuencia	Presencia FGly	Método de determinación	Co-expresión	Ref
<i>F. heparinum</i> <i>FH2S</i>	(69) GTRFTRAYCAQPLCTPSRSAIFSG	100%	MALDI-MS	-	(Myette et al., 2003)
<i>C. perfringens</i> (BAB79937.1)	(37) GYNFENAYTAVPSCIASRASILTG	Parcial 100%	MALDI-TOF	- anSME	(Bertheau et al., 2006)
<i>P. aeruginosa</i> (CAA88421.2)	(39) GLRLTDFHTAST-CSPTRSMLLTG	95%	DTNB	-	(Olguin, Askew, O'Donoghue, & Hollfelder, 2008)
<i>E. meliloti</i> (AAC13371.1)	(41) SARFHNNYTSSPLCAPARASFMAG	0%	DTNB	-	This work
<i>M. tuberculosis</i> (F70837)	(45) GILFTRAHATAPLCTPSRGSFLTG	ND ¹	-	-	(Hossain, Kawarabayasi, Kimura, & Kakuta, 2009)
<i>H. sapiens</i> (NP_000503.1)	(66) GLLFPNFYSANPLCSPSRAALLTG	ND ¹	-	-	(Rodriguez et al., 2010)
<i>H. sapiens</i> (AAC77828.1)	(71) SLLFQNAFAQQAVCAPSRVSFLTG	ND ¹	-	-	(Morales-Alvarez et al., 2013)
<i>P. sp</i> ATCC19151 (CBI83290.1)	(40) GVVFDSAYCNSPLCAPSRFTLVSG	ND	-	-	(Jovic, Venturi, Topisirovic, & Kojic, 2011)
<i>F. heparinum</i> <i>FH6S</i>	(67) GMLFNNCFVTNAVCGPSRATILTG	ND	-	-	(Myette, Soundararajan, Shriver, Raman, & Sasisekharan, 2009)
<i>F. heparinum</i> <i>NSulf</i>	(67) GVRFTNAFCSSPCTPARAGMLTG	ND	-	-	(Myette, Soundararajan, Behr, et al., 2009)
<i>H. pomatia</i> (AAF30402.1)	(71) GVRLNYYVQ-PICTPTRLMSG	²	-	-	(Wittstock, Fischer, Svendsen, & Halkier, 2000)

Phosphonate Monoester Hydrolase

<i>R. leguminosarum</i> (WP025417352.1)	(49) GTLFRRHYAGAAPCSPARATLYTG	25% 62%	fluorophore labelling	- <i>Mtb</i> FGE	(Jonas et al., 2008)
<i>B. caryophylli</i> (AAC44467.1)	(45) GLTFRNHVTTTCVPCGPARASLLTG	Parcial Parcial ³	MALDI-TOF	- <i>Mtb</i> FGE	(van Loo et al., 2010)

ND No determinado.

[1] La baja actividad sugiere falta de modificación.

[2] Expresión en *E. coli* no completada.

[3] Parcialmente, pero aumenta en comparación a la no co-expresada.

Para aumentar el porcentaje de la modificación a FGly en las sulfatasas recombinantes expresadas en *E. coli*, una estrategia común es la co-expresión de enzimas generadoras de Fgly (FGE). Por ejemplo: la expresión de la sulfatasa de *Clostridium perfringens*, se realizó junto con la co-expresión de su correspondiente anSME en *E. coli* obteniéndose la completa conversión (Berteau, Guillot et al. 2006). Del mismo modo, hidrolasas de monoéster de fosfonato (PMHs), que son enzimas que comparten la secuencia de reconocimiento de las sulfatasas, fueron co-expresadas con la FGE de *Mycobacterium tuberculosis* (MtbFGE) obteniendo conversiones de 62 % (Jonas, van Loo et al. 2008, van Loo, Jonas et al. 2010). Este último método es muy eficiente (> 85%), ya que se logra modificar secuencias de reconocimiento para FGE en el N- o C- terminal en algunas proteínas (Berteau, Guillot et al. 2006, Jonas, van Loo et al. 2008, Rabuka, de Rush et al. 2012), pero en PMHs las conversiones fueron mucho más bajas (Jonas, van Loo et al. 2008, van Loo, de Jonas et al. 2010).

El genoma de *Ensifer meliloti* incluye una supuesta FGE y en este trabajo se realizó su co-expresión con COS. Sin embargo, con la co-expresión solo se logró la modificación parcial de la *cys54* en un 29%, esto se cree que fue debido a la baja expresión de FGE en *E. coli*. Como era de esperar la presencia parcial de FGly aumenta la actividad enzimática, especialmente la k_{cat} , que fue aumentada 65 veces (Figura 6.1), lo cual concuerda con el aumento observado de entre 5 y 2500 veces en k_{cat} en otras sulfatasas o hidrolasas de monoéster de fosfonato (Recksiek, Selmer et al. 1998, Jonas, van Loo et al. 2008, Olguín, Askew et al. 2008, van Loo, de Jonas et al. 2010). En esos ejemplos, la comparación realizada entre la enzima no modificada y modificada fue posible utilizando una mutación en sus sitios activos (Cys a Ser), esto se hizo para evitar la formación de FGly en *E. coli*.

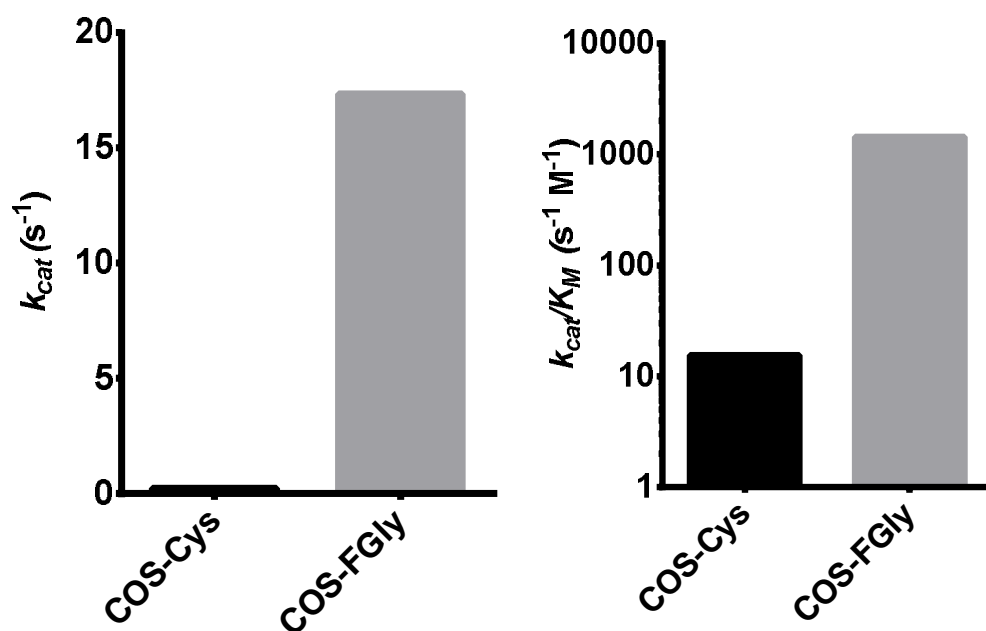


Figura 6.1. Incremento de A) k_{cat} y B) eficiencia catalítica (k_{cat}/K_M), para la enzima modificada COS-FGly en comparación a la no modificada COS-Cys. El valor de K_M no se modifica con la FGLy.

A pesar de la ausencia de la modificación postraduccional, COS-Cys era una enzima competente capaz de realizar múltiples ciclos catalíticos como se mostró en la Figura 5.20. Esto muestra que la enzima debe tener un mecanismo alternativo para llevar a cabo su función a pesar de la ausencia de la FGly, por lo que nos indica la importancia de la COS en la bacteria. En ausencia de la FGly es muy probable que el ataque nucleófilico sea realizado por el $-SH$ de la cisteína como se observa en la Figura 6.2A, en lugar del grupo $-OH$ de la FGly Figura 6.2B.

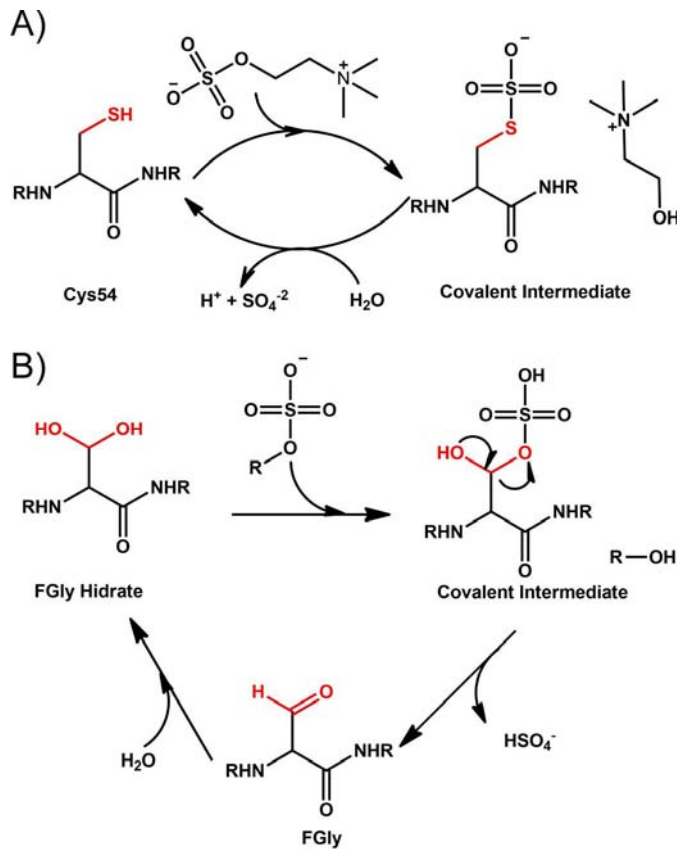


Figura 6.2. Mecanismos catalíticos propuestos A) en ausencia de la modificación postraduccionnal (FGly) y B) con la modificación.

Por otro lado, el valor de K_M 11,1 mM obtenido en este trabajo para COS-Cys es conservado para la enzima COS-FGly, como es el caso de las enzimas parcialmente modificadas y las realizadas con mutantes de Ser (Recksiek, Selmer et al. 1998, Jonas, van Loo et al. 2008, Olgúin, Askew et al. 2008, van Loo, de Jonas et al. 2010). Este valor relativamente alto de K_M es consistente con otros K_M s para otras colina-O-sulfatasas de fuentes naturales: 40 mM para *Pseudomonas nitroreducens* (Takebe 1961); 35 mM de *Aspergillus nidulans* (Scott y Spencer 1968) y 1.4 mM para *Pseudomonas aeruginose* (Lucas, Burchiel et al. 1972), y podría implicar que las concentraciones intracelulares de sulfato de colina están en el rango milimolar, al igual que lo es para muchos otros osmoprotectores (Bernard, Pocard et al. 1986, Miller y Wood 1996). También la inhibición por sustrato observada para COS, podría ser utilizada para prevenir el agotamiento rápido de sulfato de colina

cuando se encuentra en alta concentración y preservar su efecto osmoprotector (Reed, Lieb et al., 2010).

En cuanto a su especificidad de sustrato, COS mostró una $k_{cat} \sim 8$ veces menor contra los de éster de sulfato aromáticos (pNPS y MUS), en comparación con el éster de alquilo del sulfato de colina, a pesar de que los primeros son $\sim 10^8$ veces más lábiles (Edwards, Lohman et al. 2012). Del mismo modo podemos observar la baja afinidad por estos sulfatos aromáticos, observando sus valores elevados de K_M . Este comportamiento es contrario a otras arilsulfatasas que muestran las k_{cats} más altas y valores menores de K_M para los sustratos aromáticos (Hanson, Best et al. 2004, (D. E. Kim et al., 2005; J. H. Kim et al., 2004; Okamura, Yamada, Murooka, & Harada, 1976; Pesentseva et al., 2012; Stawoska et al., 2010). Esta actividad baja o nula hacia sulfatos aromáticos podría ser una característica común de las colina-O-sulfatasas, ya que también se observó para el caso de la colina-O-sulfatasa de *Pseudomonas nitroreducens* (Takebe 1961) y resultaría interesante conocer en un futuro las diferencias estructurales y mecanísticas de esta distinción.

La k_{cat} medida indica la notable eficiencia catalítica (k_{cat}/k_{unecat}) de las COS, modificada y no modificada, ya que la reacción de hidrólisis para el sulfato de colina se acelera de 10^{20} - 10^{22} veces en comparación con la reacción no catalizada ($k_{unecat} = 2.25 \times 10^{-21} \text{ s}^{-1}$ estimada mediante el uso de la ecuación de la gráfica de Brønsted reportada (Edwards, Lohman et al. 2012) y usando un $pK_a = 13,9$ para el sulfato de colina (Dawson 1982)).

Por otro lado, a pesar de que los valores de la constante catalítica k_{cat} de la COS por la actividad promiscua de monofosfatsa (pNPP) es varios órdenes de magnitud menor que para el sustrato natural, ésta presenta una eficiencia catalítica (k_{cat}/k_{unecat}) de las COS, modificada y no modificada, considerablemente alta con respecto a la reacción no catalizada, ya que se acelera la reacción de 10^7 - 10^8 veces

en comparación con la reacción no catalizada ($k_{un\text{cat}} = 2.25 \times 10^{-11} \text{ s}^{-1}$ (Edwards, Lohman, & Wolfenden, 2012)). Estos valores son altos, ya que la mayoría de las enzimas presentan valores de eficiencia catalítica ($k_{\text{cat}}/k_{un\text{cat}}$) para sus actividades nativas entre $10^7 - 10^{19}$ veces (Wolfenden & Snider, 2001). Esta disminución entre la actividad nativa y promiscua de 1000 veces, es comparable con la reportada para la arilsulfatasa de *P. aeruginosa* (Olguin et al., 2008).

Anteriormente, la presencia de la FGly en las enzimas se asociaba exclusivamente a las sulfatasas de tipo I, pero recientemente se demostró que otras enzimas de la superfamilia de la fosfatasa alcalina presentan esta modificación: la familia de las Fosfonato monoester hidrolasa/ fosfodiesterasa (PMH). Debido a esto, enzimas inicialmente clasificadas como sulfatasas, se clasificaron después como PMH (Jonas et al., 2008, van Loo, 2010 #87). Debido a esto fue necesario analizar la actividad de la COS contra fosfonatos (pNPPP) para asegurar la correcta clasificación de esta como sulfatasa de tipo I. Lo anterior se demuestra con la baja actividad contra fosfonatos ($k_{\text{cat}} \approx 100$ veces menor que para el sulfato de colina) que presenta la COS.

Por otro lado, no se observó la actividad contra el fosfato de colina a las condiciones utilizadas en este trabajo, lo cual contrasta con lo reportado por Osteras (Osteras et al., 1998), quien observó actividad contra este sustrato, pero en extractos crudos de *Ensifer meliloti* que fueron crecidas añadiendo sulfato de colina al medio para inducir la expresión de la COS.

Con el análisis de inhibición por colina, podemos ver que este comportamiento es consistente con una inhibición competitiva. Los valores de esta inhibición se observan en la Figura 6.3 en la cual podemos observar que las constantes de inhibición por colina para las diferentes actividades, tanto nativas como promiscuas, son muy similares dentro del error experimental. Con esto podemos asegurar que

las actividades tanto nativa como promiscuas ocurren en el mismo sitio activo de la proteína (Olguin et al., 2008).

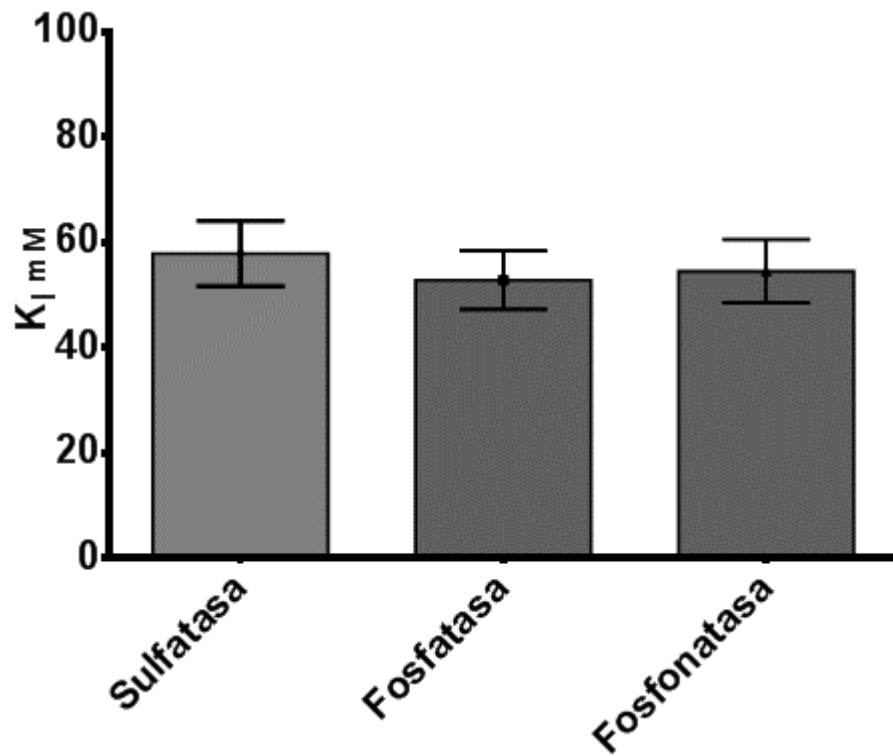


Figura 6.3. Gráfica de las constantes de inhibición competitiva por colina para cada una de las actividades.

7. Conclusiones

Se logró la expresión heteróloga de la colina-*O*-sulfatasa de *Ensifer meliloti* en *E. coli* con un rendimiento aproximado de 35 mg /litro de cultivo. La proteína se purificó a un alto de pureza y se encuentra en forma dimérica en solución.

Se determinó la ausencia de la modificación postraduccional de la COS expresada en *E. coli*, por lo que el mecanismo de maduración de sulfatasas en *E. coli* no es capaz de reconocer a COS a pesar de tener la “firma” de las sulfatasas en su secuencia.

A pesar de la falta de la modificación postraduccional, la enzima COS es funcional, ya que se logró medir su actividad contra su sustrato natural (sulfato de colina), así como contra “sustratos modelo” para las sulfatasas y en ambos casos la enzima puede realizar múltiples ciclos catalíticos.

La proteína no modificada presenta actividades promiscuas de fosfomonesterasa y fosfonatasa, con k_{cat} 100 ó 10 veces menores, respectivamente, en comparación con la actividad nativa. Durante los experimentos no fue posible detectar la actividad promiscua de fosfodiesterasa.

Se logró la co-expresión de la COS con la FGE de *Ensifer meliloti*, utilizando el sistema pDUET, con lo que se obtuvo una modificación postraduccional parcial a FGly de 29% de la COS. Con esta modificación, la k_{cat} de la COS aumento 65 veces en comparación con la enzima no modificada.

8. Referencias

- Benjdia, A., Deho, G., Rabot, S., & Berteau, O. (2007). First evidences for a third sulfatase maturation system in prokaryotes from *E. coli* aslB and ydeM deletion mutants. *FEBS Lett*, *581*(5), 1009-1014. doi: S0014-5793(07)00136-6 [pii]10.1016/j.febslet.2007.01.076
- Benjdia, A., Leprince, J., Sandstrom, C., Vaudry, H., & Berteau, O. (2009). Mechanistic investigations of anaerobic sulfatase-maturing enzyme: direct C β H-atom abstraction catalyzed by a radical AdoMet enzyme. *J Am Chem Soc*, *131*(24), 8348-8349. doi: 10.1021/ja901571p
- Berteau, O., Guillot, A., Benjdia, A., & Rabot, S. (2006). A new type of bacterial sulfatase reveals a novel maturation pathway in prokaryotes. *J Biol Chem*, *281*(32), 22464-22470. doi: 10.1074/jbc.M602504200
- Bojarova, P., & Williams, S. J. (2008). Sulfotransferases, sulfatases and formylglycine-generating enzymes: a sulfation fascination. *Curr Opin Chem Biol*, *12*(5), 573-581. doi: 10.1016/j.cbpa.2008.06.018S1367-5931(08)00106-3 [pii]
- Boltes, I., Czapinska, H., Kahnert, A., von Bulow, R., Dierks, T., Schmidt, B., . . . Uson, I. (2001). 1.3 A structure of arylsulfatase from *Pseudomonas aeruginosa* establishes the catalytic mechanism of sulfate ester cleavage in the sulfatase family. *Structure*, *9*(6), 483-491.
- Cregut, M., Durand, M. J., & Thouand, G. (2013). The Diversity and Functions of Choline Sulphatases in Microorganisms. *Microb Ecol*. doi: 10.1007/s00248-013-0328-7
- Cregut, M., Durand, M. J., & Thouand, G. (2014). The diversity and functions of choline sulphatases in microorganisms. *Microb Ecol*, *67*(2), 350-357. doi: 10.1007/s00248-013-0328-7
- de Rudder, K. E., Sohlenkamp, C., & Geiger, O. (1999). Plant-exuded choline is used for rhizobial membrane lipid biosynthesis by phosphatidylcholine synthase. *J Biol Chem*, *274*(28), 20011-20016.
- Dierks, T., Lecca, M. R., Schlotterhose, P., Schmidt, B., & von Figura, K. (1999). Sequence determinants directing conversion of cysteine to formylglycine in eukaryotic sulfatases. *EMBO J*, *18*(8), 2084-2091. doi: 10.1093/emboj/18.8.2084
- Edwards, D. R., Lohman, D. C., & Wolfenden, R. (2012). Catalytic proficiency: the extreme case of S-O cleaving sulfatases. *J Am Chem Soc*, *134*(1), 525-531. doi: 10.1021/ja208827q
- Ellman, G. L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys*, *82*(1), 70-77.
- Galvao, T. C., de Lorenzo, V., & Canovas, D. (2006). Uncoupling of choline-O-sulphate utilization from osmoprotection in *Pseudomonas putida*. *Mol Microbiol*, *62*(6), 1643-1654. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05488.x
- Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2003). ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Research*, *31*(13), 3784-3788. doi: Doi 10.1093/Nar/Gkg563
- Ghosh, D. (2005). Three-dimensional structures of sulfatases. *Methods Enzymol*, *400*, 273-293. doi: 10.1016/S0076-6879(05)00016-9
- Hanson, S. R., Best, M. D., & Wong, C. H. (2004). Sulfatases: structure, mechanism, biological activity, inhibition, and synthetic utility. *Angew Chem Int Ed Engl*, *43*(43), 5736-5763. doi: 10.1002/anie.200300632

- Hossain, M. M., Kawarabayasi, Y., Kimura, M., & Kakuta, Y. (2009). Expression and functional analysis of a predicted AtsG arylsulphatase identified from *Mycobacterium tuberculosis* genomic data. *J Biochem*, *146*(6), 767-769. doi: 10.1093/jb/mvp141
- Jonas, S., van Loo, B., Hyvonen, M., & Hollfelder, F. (2008). A new member of the alkaline phosphatase superfamily with a formylglycine nucleophile: structural and kinetic characterisation of a phosphonate monoester hydrolase/phosphodiesterase from *Rhizobium leguminosarum*. *J Mol Biol*, *384*(1), 120-136. doi: 10.1016/j.jmb.2008.08.072
- Jones, K. M., Kobayashi, H., Davies, B. W., Taga, M. E., & Walker, G. C. (2007). How rhizobial symbionts invade plants: the Sinorhizobium-Medicago model. *Nat Rev Microbiol*, *5*(8), 619-633. doi: 10.1038/nrmicro1705
- Jovcic, B., Venturi, V., Topisirovic, L., & Kojic, M. (2011). Inducible expression of choline sulfatase and its regulator BetR in *Pseudomonas* sp. ATCC19151. *Arch Microbiol*, *193*(6), 399-405. doi: 10.1007/s00203-011-0685-x
- Kim, D. E., Kim, K. H., Bae, Y. J., Lee, J. H., Jang, Y. H., & Nam, S. W. (2005). Purification and characterization of the recombinant arylsulfatase cloned from *Pseudoalteromonas carrageenovora*. *Protein Expr Purif*, *39*(1), 107-115. doi: 10.1016/j.pep.2004.09.007
- Kim, J. H., Byun, D. S., Godber, J. S., Choi, J. S., Choi, W. C., & Kim, H. R. (2004). Purification and characterization of arylsulfatase from *Sphingomonas* sp. AS6330. *Appl Microbiol Biotechnol*, *63*(5), 553-559. doi: 10.1007/s00253-003-1463-8
- Lerudulier, D., & Bernard, T. (1986). Salt Tolerance in *Rhizobium* - a Possible Role for Betaines. *Fems Microbiology Letters*, *39*(1-2), 67-72. doi: Doi 10.1016/0378-1097(86)90062-5
- Lerudulier, D., Strom, A. R., Dandekar, A. M., Smith, L. T., & Valentine, R. C. (1984). Molecular-Biology of Osmoregulation. *Science*, *224*(4653), 1064-1068. doi: DOI 10.1126/science.224.4653.1064
- Lucas, J. J., Burchiel, S. W., & Segel, I. H. (1972). Choline sulfatase of *Pseudomonas aeruginosa*. *Arch Biochem Biophys*, *153*(2), 664-672.
- Lukatela, G., Krauss, N., Theis, K., Selmer, T., Gieselmann, V., von Figura, K., & Saenger, W. (1998). Crystal structure of human arylsulfatase A: the aldehyde function and the metal ion at the active site suggest a novel mechanism for sulfate ester hydrolysis. *Biochemistry*, *37*(11), 3654-3664. doi: 10.1021/bi9714924
- Mandon, K., Osteras, M., Boncompagni, E., Trinchant, J. C., Spennato, G., Poggi, M. C., & Le Rudulier, D. (2003). The Sinorhizobium meliloti glycine betaine biosynthetic genes (betICBA) are induced by choline and highly expressed in bacteroids. *Mol Plant Microbe Interact*, *16*(8), 709-719. doi: 10.1094/MPMI.2003.16.8.709
- Miller, K. J., & Wood, J. M. (1996). Osmoadaptation by rhizosphere bacteria. *Annu Rev Microbiol*, *50*, 101-136. doi: 10.1146/annurev.micro.50.1.101
- Morales-Alvarez, E. D., Rivera-Hoyos, C. M., Baena-Moncada, A. M., Landazuri, P., Poutou-Pinales, R. A., Saenz-Suarez, H., . . . Echeverri-Pena, O. Y. (2013). Low-scale expression and purification of an active putative iduronate 2-sulfate sulfatase-Like enzyme from *Escherichia coli* K12. *J Microbiol*, *51*(2), 213-221. doi: 10.1007/s12275-013-2416-2
- Myette, J. R., Shriver, Z., Claycamp, C., McLean, M. W., Venkataraman, G., & Sasisekharan, R. (2003). The heparin/heparan sulfate 2-O-sulfatase from *Flavobacterium heparinum*. Molecular cloning, recombinant expression, and biochemical characterization. *J Biol Chem*, *278*(14), 12157-12166. doi: 10.1074/jbc.M211420200
- Myette, J. R., Soundararajan, V., Behr, J., Shriver, Z., Raman, R., & Sasisekharan, R. (2009). Heparin/heparan sulfate N-sulfamidase from *Flavobacterium heparinum*: structural and biochemical investigation of catalytic nitrogen-sulfur bond cleavage. *J Biol Chem*, *284*(50), 35189-35200. doi: 10.1074/jbc.M109.053835

- Myette, J. R., Soundararajan, V., Shriver, Z., Raman, R., & Sasisekharan, R. (2009). Heparin/heparan sulfate 6-O-sulfatase from *Flavobacterium heparinum*: integrated structural and biochemical investigation of enzyme active site and substrate specificity. *J Biol Chem*, 284(50), 35177-35188. doi: 10.1074/jbc.M109.053801
- Okamura, H., Yamada, T., Murooka, Y., & Harada, T. (1976). Purification and Properties of Arylsulfatase of *Klebsiella-Aerogenes* Identity of Enzymes Formed by Non-Repressed and De-Repressed Synthesis. *Agricultural and Biological Chemistry*, 40(10), 2071-2076.
- Olguin, L. F., Askew, S. E., O'Donoghue, A. C., & Hollfelder, F. (2008). Efficient catalytic promiscuity in an enzyme superfamily: an arylsulfatase shows a rate acceleration of 10(13) for phosphate monoester hydrolysis. *J Am Chem Soc*, 130(49), 16547-16555. doi: 10.1021/ja8047943
- Osteras, M., Boncompagni, E., Vincent, N., Poggi, M. C., & Le Rudulier, D. (1998). Presence of a gene encoding choline sulfatase in *Sinorhizobium meliloti* bet operon: choline-O-sulfate is metabolized into glycine betaine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(19), 11394-11399.
- Pesentseva, M. S., Sova, V. V., Sil'chenko, A. S., Kicha, A. A., Sil'chenko, A. S., Haertle, T., & Zvyagintseva, T. N. (2012). A new arylsulfatase from the marine mollusk *Turbo chrysostomus*. *Chemistry of Natural Compounds*, 48(5), 853-859. doi: DOI 10.1007/s10600-012-0400-4
- Rabuka, D., Rush, J. S., deHart, G. W., Wu, P., & Bertozzi, C. R. (2012). Site-specific chemical protein conjugation using genetically encoded aldehyde tags. *Nat Protoc*, 7(6), 1052-1067. doi: 10.1038/nprot.2012.045nprot.2012.045 [pii]
- Rodriguez, A., Espejo, A. J., Hernandez, A., Velasquez, O. L., Lizaraso, L. M., Cordoba, H. A., . . . Barrera, L. A. (2010). Enzyme replacement therapy for Morquio A: an active recombinant N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase produced in *Escherichia coli* BL21. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 37(11), 1193-1201. doi: 10.1007/s10295-010-0766-x
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning : a laboratory manual* (3rd ed.). Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sánchez-Romero, J. J., & Olguin, L. F. (2015). Choline sulfatase from *Ensifer (Sinorhizobium) meliloti*: Characterization of the unmodified enzyme. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 3, 161-168. doi: 10.1016/j.bbrep.2015.08.002
- Sardiello, M., Annunziata, I., Roma, G., & Ballabio, A. (2005). Sulfatases and sulfatase modifying factors: an exclusive and promiscuous relationship. *Hum Mol Genet*, 14(21), 3203-3217. doi: 10.1093/hmg/ddi351
- Scott, J. M., & Spencer, B. (1968). Regulation of choline sulphatase synthesis and activity in *Aspergillus nidulans*. *Biochem J*, 106(2), 471-477.
- Sowadski, J. M., Handschumacher, M. D., Murthy, H. M., Foster, B. A., & Wyckoff, H. W. (1985). Refined structure of alkaline phosphatase from *Escherichia coli* at 2.8 Å resolution. *J Mol Biol*, 186(2), 417-433.
- Stawoska, I., Gaweda, S., Bielak-Lakomska, M., Brindell, M., Lewinski, K., Laidler, P., & Stochel, G. (2010). Mechanistic studies of the hydrolysis of p-nitrophenyl sulfate catalyzed by arylsulfatase from *Helix pomatia*. *Journal of Coordination Chemistry*, 63(14-16), 2472-2487. doi: Doi 10.1080/00958972.2010.500377
- Takebe, I. (1961). Isolation and characterization of a new enzyme choline sulfatase. *J Biochem*, 50, 245-255.
- Todd, M. J., & Gomez, J. (2001). Enzyme kinetics determined using calorimetry: a general assay for enzyme activity? *Anal Biochem*, 296(2), 179-187. doi: 10.1006/abio.2001.5218

- Toesch, M., Schober, M., & Faber, K. (2014). Microbial alkyl- and aryl-sulfatases: mechanism, occurrence, screening and stereoselectivities. *Appl Microbiol Biotechnol*, *98*(4), 1485-1496. doi: 10.1007/s00253-013-5438-0
- van Loo, B., Jonas, S., Babbie, A. C., Benjdia, A., Berteau, O., Hyvonen, M., & Hollfelder, F. (2010). An efficient, multiply promiscuous hydrolase in the alkaline phosphatase superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *107*(7), 2740-2745. doi: 10.1073/pnas.09039511070903951107 [pii]
- von Figura, K., Schmidt, B., Selmer, T., & Dierks, T. (1998). A novel protein modification generating an aldehyde group in sulfatases: its role in catalysis and disease. *Bioessays*, *20*(6), 505-510. doi: 10.1002/(SICI)1521-1878(199806)20:6<505::AID-BIES9>3.0.CO;2-K
- Wiegmann, E. M., Westendorf, E., Kalus, I., Pringle, T. H., Lubke, T., & Dierks, T. (2013). Arylsulfatase K, a novel lysosomal sulfatase. *J Biol Chem*, *288*(42), 30019-30028. doi: 10.1074/jbc.M113.499541
- Wittstock, U., Fischer, M., Svendsen, I., & Halkier, B. A. (2000). Cloning and characterization of two cDNAs encoding sulfatases in the Roman snail, *Helix pomatia*. *IUBMB Life*, *49*(1), 71-76. doi: 10.1080/713803591
- Wolfenden, R., & Snider, M. J. (2001). The depth of chemical time and the power of enzymes as catalysts. *Acc Chem Res*, *34*(12), 938-945.
- Woolley, D. W., & Peterson, W. H. (1937). The chemistry of mold tissue XIV. Isolation of cyclic choline sulfate from *Aspergillus sydowi*. *Journal of Biological Chemistry*, *122*(1), 213-218.
- Young, J. M. (2010). *Sinorhizobium* versus *Ensifer*: may a taxonomy subcommittee of the ICSP contradict the Judicial Commission? *Int J Syst Evol Microbiol*, *60*(Pt 7), 1711-1713. doi: 10.1099/ijs.0.025163-0

9. Anexo

Parte del trabajo realizado durante los estudios de doctorado fueron publicados

en:

Sánchez-Romero J.J., Olguin L. (2015). "Choline sulfatase from *Ensifer (Sinorhizobium) meliloti*: Characterization of the unmodified enzyme" *Biochemistry and Biophysics Reports*, Volume 3, September, Pages 161-168.

[doi:10.1016/j.bbrep.2015.08.002](https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2015.08.002)



Contents lists available at ScienceDirect

Biochemistry and Biophysics Reports

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbrep

Choline sulfatase from *Ensifer (Sinorhizobium) meliloti*: Characterization of the unmodified enzyme



Juan José Sánchez-Romero, Luis F. Olguin*

^aLaboratorio de Biofísicoquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México D. F. 04510, México

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 April 2015
 Received in revised form
 3 August 2015
 Accepted 4 August 2015
 Available online 7 August 2015

Keywords:

Choline-O-sulfatase
 Type I sulfatase
 Formylglycine post-translational modification
 Choline-O-sulfate
 Catalytic efficiency

ABSTRACT

Ensifer (Sinorhizobium) meliloti is a nitrogen-fixing α -proteobacterium able to biosynthesize the osmoprotectant glycine betaine from choline sulfate through a metabolic pathway that starts with the enzyme choline-O-sulfatase. This protein seems to be widely distributed in microorganisms and thought to play an important role in their sulfur metabolism. However, only crude extracts with choline sulfatase activity have been studied. In this work, *Ensifer (Sinorhizobium) meliloti* choline-O-sulfatase was obtained in a high degree of purity after expression in *Escherichia coli*. Gel filtration and dynamic light scattering experiments showed that the recombinant enzyme exists as a dimer in solution. Using calorimetry, its catalytic activity against its natural substrate, choline-O-sulfate, gave a $k_{cat}=2.7 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$ and a $K_M=11.1 \text{ mM}$. For the synthetic substrates *p*-nitrophenyl sulfate and methylumbelliferyl sulfate, the k_{cat} values were $3.5 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ and $4.3 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, with K_M values of 75.8 and 11.8 mM respectively. The low catalytic activity of the recombinant sulfatase was due to the absence of the formylglycine post-translational modification in its active-site cysteine 54. Nevertheless, unmodified *Ensifer (Sinorhizobium) meliloti* choline-O-sulfatase is a multiple-turnover enzyme with remarkable catalytic efficiency.

© 2015 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Ensifer meliloti (formerly *Sinorhizobium meliloti*) is a nitrogen-fixing α -proteobacterium that establishes root nodule symbiosis with legume plants, providing ammonia to their hosts and receiving nutrients from them [1]. In free life or in symbiosis, these bacteria have to deal with adverse environmental conditions such as droughts, rain or floods, which cause severe changes in their extracellular osmolality. An immediate response to cope with these situations is to accumulate or release ions and selected low-molecular-weight organic molecules called osmolytes that counteract the osmotic gradient [2–5]. Glycine betaine is a potent and well-characterized osmoprotectant widespread in nature [5,6], and *E. meliloti* can efficiently transport it to its interior through high-affinity uptake protein systems [4,7]. Alternatively, it can synthesize glycine betaine from choline-O-sulfate by a three-step

pathway with choline and betaine aldehyde as intermediates (Fig. 1) [8]. The genes involved in this metabolic pathway constitute the operon *betICBA*, which is composed of a regulatory gene (*betI*) and three structural genes: *betC* (choline-O-sulfatase, or COS), *betB* (betaine aldehyde dehydrogenase) and *betA* (choline dehydrogenase) [8].

The metabolic pathway is controlled by *BetI*, a repressor that regulates the expression of *bet* genes in response to the inducer choline [9]. Transcription of the operon can also be initiated to a lesser extent by the presence of choline-O-sulfate or acetylcholine, but not by the presence of high salt concentration alone [9]. However, as the product of the route, glycine betaine, is a potent osmolyte that accumulates in *E. meliloti* under salt stress [10,11], choline-O-sulfate or choline can allow the proliferation of *E. meliloti* under high salt concentration through their transformation to glycine betaine [8,9]. Under no salt stress, *E. meliloti* can import choline or choline-O-sulfate from its surroundings and transform them to glycine betaine, which can be further metabolized to cope entirely with the carbon and nitrogen cell demands in the absence of other nutrients [8,11]. The inorganic sulfate produced by the hydrolysis of choline-O-sulfate can also be used as the only source of sulfur by *E. meliloti* [8]. Choline-O-sulfate, has been shown to be biosynthesized and accumulated by a variety of plants, marine and soil fungi and red algae where it serves as an osmoprotector and sulfur reservoir [12–18]. In contrast, certain bacteria, as *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, accumulate

Abbreviations: COS, *E. meliloti* choline-O-sulfatase; FGly, α -formylglycine; FGE, α -formylglycine-generating enzyme; anSME, anaerobic sulfatase maturing enzyme; pNPS, *p*-nitrophenyl sulfate; MUS, 4-methylumbelliferyl sulfate; ITC, isothermal titration calorimetry; DLS, dynamic light scattering; MALDI-TOF, matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight; DTNB, 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid); DTT, DL-Dithiothreitol; TCEP, Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride; UPLC-ESI-Q-TOF-MS, Ultra-performance liquid chromatography-electrospray ionization-quadrupole time-of-flight-mass spectrometry

* Corresponding author.

E-mail address: olguin.lf@comunidad.unam.mx (L.F. Olguin).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrep.2015.08.002>

2405-5808/© 2015 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

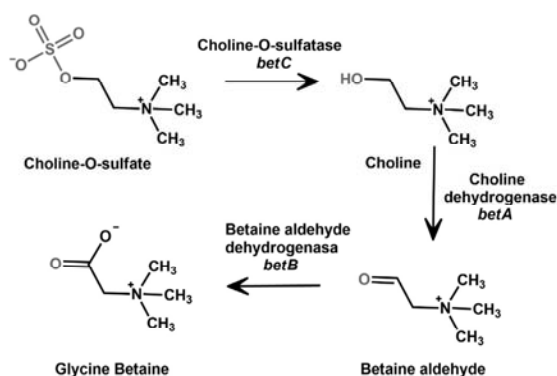


Fig. 1. Synthesis of glycine betaine from choline sulfate in *E. melliloti*.

choline-O-sulfate as osmoprotector without further metabolization [19,20]. Choline-O-sulfate can be released to the environment through root exudation or microbial cell decay [4,21] and once in the soil, it can be taken by other microorganisms as an important source of sulfur, carbon and nitrogen [22,23]. The extent of choline-O-sulfate in soil or other environments is not well characterized, however, its direct or indirect role as osmolyte and the widespread presence of choline sulfatase genes in microbes [24] suggest an important role of this compound and these enzymes in the biological sulfur cycle.

Amino acid sequence analysis of COS revealed that this enzyme belongs to the type I sulfatases family (previously named arylsulfatases) [8,24]. These enzymes share high degree of conservation in sequence, structure and enzymatic mechanism among all life kingdoms and hydrolyze many diverse sulfate esters present in mono- oligo- and polysaccharides, proteoglycans, amino acids, steroids and glycolipids [25]. Recent genetic analyzes identified a few peptide signatures that seem to be specific for choline sulfatases [24]. In *E. melliloti* and other members of the *Rhizobiaceae* family, the gene *betC*, is in the operon *betCBA* mentioned above, but in the rest of microbes *betC* has a different genetic environment and is mainly found associated to an ABC-type betaine periplasmic binding protein and to an ATP-binding protein with a putative sulfate permease activity [22,24]. All type I sulfatases, including COS, have a highly conserved amino acid sequence in their active site: (C/S)-X-(P/A)-X-R [25–27]. This sequence is critical, since it is the recognition site for a post-translational modification of an active site cysteine or serine residue, to the catalytically functional residue α -formylglycine (FGly). This modification is catalyzed by a formylglycine-generating enzyme (FGE), or by an anaerobic sulfatase maturing enzyme (anSME) depending on the organism [27]. *E. coli* is only able to modify cysteine residues and the identification of the enzymatic machinery responsible for this modification in this bacterium has been elusive [28].

Given the apparent ubiquity of choline-O-sulfatases in microorganisms [24], their study is important in understanding sulfur metabolism in microorganisms and soil, and in some contexts the osmoprotection capacity of their substrate. To our knowledge, there are only three reports of biochemical characterization of choline-O-sulfatases, but in all of them only crude extract or partially purified proteins were studied [14,29,30]. In this work the heterologous expression of COS was performed in *E. coli* BL21 (DE3), followed by complete purification and biochemical characterization.

2. Materials and methods

2.1. Molecular cloning and recombinant expression

COS gene (*betC*) sequence [AAC13371.1] was codon optimized for *E. coli* expression (Supplementary material Fig. S1), synthesized, and sequenced by GenScript USA Inc. Then, it was subcloned in pET26b+ with a C-terminus His₆-tag sequence. Overexpression of COS was performed in *E. coli* BL21 (DE3) using IPTG (1.0 mM) at 30 °C for 7 h.

2.2. Enzyme purification

Cells were centrifuged and resuspended in 1/25 of their original volume in Tris-HCl buffer (200 mM) with imidazole (20 mM) pH 7.5. They were treated with lysozyme (1 mg/ml final concentration) for 30 min at 4 °C and lysed by sonication. The crude extract obtained after centrifugation was loaded into a His-Trap FF column (GE-Healthcare) and eluted with a linear gradient of 20–250 mM imidazole in 10-column volumes. Fractions were analyzed by 10% SDS-PAGE and those containing the enzyme were pooled and further purified by size exclusion chromatography (HiLoadSuperdex 200 16/600 GL; GE-Healthcare) using Tris-HCl (20 mM) buffer pH 7.5. Fractions containing the pure enzyme were mixed and its concentration calculated spectrophotometrically at 280 nm using a theoretical molar extinction coefficient of 97,750 M⁻¹ cm⁻¹ [31]. The enzyme was aliquoted and stored at –20 °C. Typical yields of purified protein were in the range 30–35 mg of protein/L of culture.

2.3. Biochemical characterization and enzymatic activity

The molecular weight of the native enzyme was determined with a gel filtration analytical column (Superdex 200 10/300 GL; GE-Healthcare) using as standards: thyroglobulin (670 kDa), gamma globulin (158 kDa), ovalbumin (44 kDa), myoglobin (17 kDa) and vitamin B12 (1.35 kDa) (Gel Filtration Standard; Bio-Rad).

Masses were determined with a Bruker Microflex matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI TOF) instrument (Bruker Daltonics GmbH) equipped with a 20-Hz nitrogen laser at $\lambda = 337$ nm. Spectra were recorded in reflector and/or linear positive mode for the mass range of 25,000–250,000 Da. 1.0 μ L of sample solution was mixed with 5 μ L of 30% acetonitrile, 70% water, 0.1% trifluoroacetic acid, and saturated with sinapinic acid. Then, 1.0 μ L of this solution was deposited onto the MALDI target and allowed to dry at room temperature.

Dynamic light scattering (DLS) measurements were performed at 25.0 °C using a Malvern Nano S (Malvern, Ltd.) instrument equipped with laser NIBS (Non Invasive Back Scattering) technology and a Peltier temperature controller. The hydrodynamic radius was calculated using the Zeta Sizer software provided with the equipment.

Enzyme-catalyzed hydrolysis of choline-O-sulfate (Cambridge Isotope Laboratories) was measured by Isothermal Titration Calorimetry (ITC) using a VP-ITC microcalorimeter (Microcal Inc.) at 25 °C in the Reaction Buffer (200 mM Tris-HCl pH 7.5 and 500 mM NaCl). The kinetic parameters were obtained following the procedure of multiple injections [32] in which a COS solution (2.46 μ M) was incubated in the calorimetric cell and a solution of choline-O-sulfate (300 mM) was injected multiple times (2×5 μ L and then 18×10 μ L) to acquire a calorimetric thermogram. The calorimetric data were transformed to initial rate vs substrate concentration plots using the ITC Data Analysis in Origin 7.0 (Microcal Inc.) [32]. The enthalpy of the reaction was determined by triplicate using the single injection method in which a COS

solution (21.4 μM) was incubated in the calorimetric cell and a single injection ($1 \times 10 \mu\text{L}$) of choline-*O*-sulfate (300 mM) was done. The kinetic constants k_{cat} , K_m and K_i were calculated from nonlinear least square fitting of the initial rate vs substrate concentration plots using the GraphPad Prism 6 software. Fundamentals of the calorimetry technique to obtain kinetic parameters have been fully illustrated [32–34].

COS enzymatic activity against *p*-nitrophenyl sulfate (pNPS, Sigma-Aldrich) or 4-methylumbelliferyl sulfate (MUS, Sigma-Aldrich) was measured in the Reaction Buffer at 25 °C. Substrate concentrations were varied between 1 and 80 mM or 1 and 20 mM respectively, using a constant enzyme concentration of 1.7 μM . The amount of *p*-nitrophenol or methylumbelliferone released by COS activity was determined by measuring the absorbance changes at 400 nm or 370 nm respectively with a Cary-Bio50 (Varian/Agilent) spectrophotometer.

The pH dependence of COS enzymatic activity was studied using pNPS as substrate. Buffer solutions were sodium acetate/ acetic acid (200 mM) and NaCl (500 mM) for pH 5.5 and Tris-HCl (200 mM) and NaCl (500 mM) for pH 6.5–8.5. The hydrolysis rate was determined spectrophotometrically at 400 nm and 25 °C. For pH 5.5, aliquots of the reaction mixture were taken at different times, adjusted to pH 8.0 with 1 M Tris-HCl and its absorbance immediately measured at 400 nm.

Product inhibition by choline was measured at 25 °C using as substrate pNPS in the Reaction Buffer, with 1.7 μM of enzyme and pNPS in a concentration of 1–80 mM. Choline chloride (Sigma-Aldrich) was added as an inhibitor at concentration of 20, 50 and 70 mM. The activity was obtained by measuring the absorbance changes at 400 nm.

2.4. FGly determination

The total number of cysteines present in a sample of COS was determined by the Ellman's reaction [35,36]. A 2 mM stock solution of 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB, Sigma-Aldrich) in 50 mM sodium acetate was prepared, and 50 μL of this DTNB stock solution and 100 μL of 1 M Tris-HCl buffer pH 8.0 were mixed with distilled water up to a volume of 990 μL . Then, 10 μL of one of the following protein solutions (250 μM) were added: 1) native protein; 2) protein previously treated with 8 M urea; 3) protein treated with 8 M urea and 100 mM DL-Dithiothreitol (DTT, Sigma-Aldrich) and 4) protein treated with 8 M urea and 100 mM Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride (TCEP, Sigma-Aldrich). Remaining DTT and TCEP were removed from samples 3 and 4 before mixing them with the DTNB solution. This was done by buffer exchange using an ultrafiltration device (Vivaspin 20, 10,000 MWCO, Sartorius) employing an 8 M urea solution. The

reaction mixtures with DTNB were incubated at room temperature for 5 min and the changes in absorbance at 412 nm were measured. Cysteine concentration was determined by comparison to a standard curve obtained with acetyl cysteine and DTNB (molar extinction coefficient of $13,689 \pm 122.9 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Additionally, the absence of FGly in a COS sample was investigated by ultra-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-ESI-Q-TOF-MS) based on the procedure described by Rabuka et al. [37]. After purification, $\sim 200 \mu\text{g}$ of COS were denatured in 6.0 M urea and 100 mM Tris pH 8.5 for 15 min. The sample was then incubated with DTT (50 mM) at 37 °C for 45 min, followed by alkylation with iodoacetamide (30 mM) for 60 min. After purification, the sample was digested with porcine trypsin for 18 h at 37 °C. It was then desalted and concentrated in a Ziptip C18 column, using 12 μL of 3% acetonitrile and 0.1% formic acid in water as the mobile phase. The eluted sample was analyzed by UPLC-ESI-QTOF-MS (nanoACQUITY-Waters – SYNAPT G2S Waters).

3. Results

3.1. Expression and biochemical characterization of COS

The choline-*O*-sulfatase gen from *E. meliloti* was efficiently expressed in *E. coli* BL21 (DE3) after induction with 1.0 mM IPTG for 7 h at 30 °C (Fig. 2A; lane 1). Its purification was easily achieved thanks to a His₆-Tag at its C-terminus (Fig. 2A; lane 2) and a final purification step through a gel filtration column (Fig. 2A; lane 3) was performed to remove several soluble aggregates of protein not visible in the SDS-PAGE gel (Fig. 2B).

The apparent molecular mass of COS was $\sim 63 \text{ kDa}$ as estimated by SDS-PAGE (Fig. 2A), which is in agreement with the expected 59 kDa value considering the His₆-Tag. Subsequently, the molecular mass was determined in non-denaturing conditions using a gel filtration analytical column giving a molecular mass of 123 kDa (Fig. 2C), indicating that COS exists in a dimeric form in solution. DLS tests exhibited a single peak with a hydrodynamic radius of 5.6 nm consistent with a dimeric form of the protein (Supplementary material Fig. S2). The sample was also subjected to MALDI-TOF mass spectrometry giving two peaks at 118 and 59 kDa corresponding to the dimeric and monomeric forms of COS (Supplementary material Fig. S3).

3.2. Kinetic characterization of COS

COS-catalyzed hydrolysis of choline-*O*-sulfate was measured by

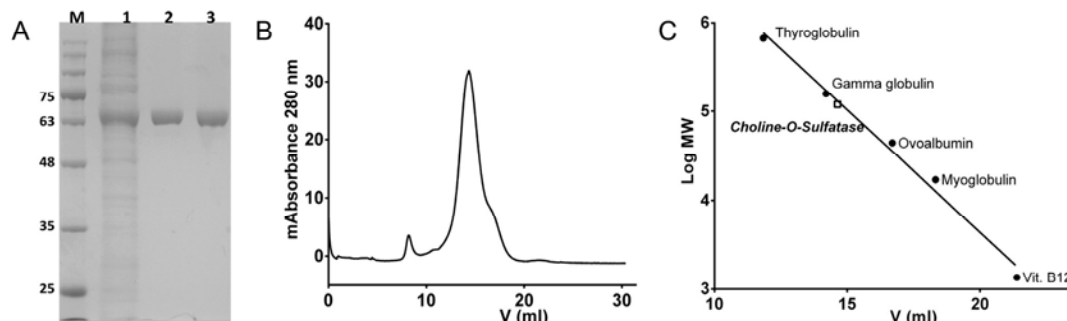


Fig. 2. (A) SDS-PAGE of the purification of COS. Lane 1 crude extract; lane 2 fractions eluted from the His-Trap column containing COS; lane 3 fractions eluted from the gel filtration column containing COS. (B) Molecular exclusion chromatography of COS on a Superdex 200 column. (C) Determination of the molecular mass of COS by molecular exclusion chromatography.

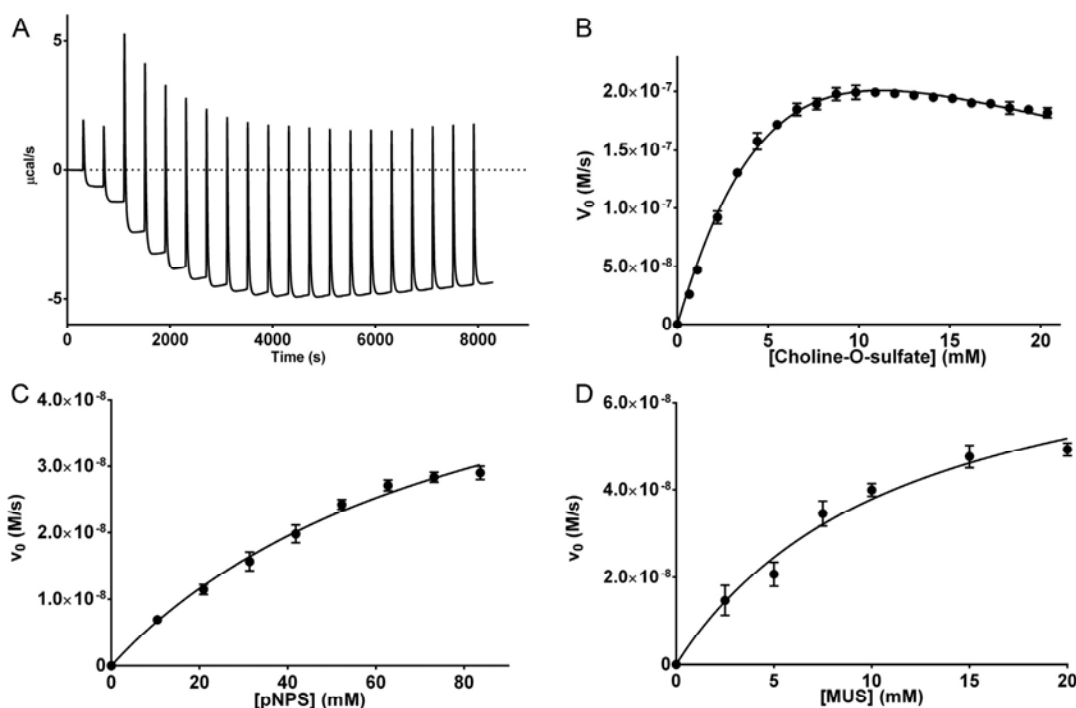


Fig. 3. Determination of COS kinetic parameters at pH 7.5 and 25 °C in 200 mM Tris-HCl and 500 mM NaCl. (A) Calorimetric initial rate measurements. The figure shows a typical thermogram obtained by ITC in which a COS solution (2.46 μM) was titrated with choline-O-sulfate (300 mM) ($2 \times 5 \mu\text{L}$ and then $18 \times 10 \mu\text{L}$). Each titration was done before a significant amount of choline-O-sulfate was hydrolyzed. (B) Michaelis-Menten plot for the choline-O-sulfate hydrolysis. Data was obtained by transforming the calorimetric data to initial rates using procedures reported in the literature (see Section 2). (C) and (D) Michaelis-Menten plot for the hydrolysis of pNPS and MUS respectively obtained by UV-vis spectrophotometry.

calorimetry since non-appreciable change in the UV-vis spectra is observable for this reaction. Multiple injections of the substrate to a calorimetric cell with the enzyme gave a typical thermogram (Fig. 3A) that was interpreted and transformed to a usual Michaelis-Menten plot (Fig. 3B) [32]. The observed peaks in the thermogram correspond to the dilution heat of the substrate reaching the calorimetric cell. After each peak the thermal power returns to a steady-state level that corresponds to the initial rate at that substrate concentration. Before significant substrate depletion occurs, a subsequent injection is made to obtain a different initial rate corresponding to a new higher substrate concentration. This process is repeated multiple times to obtain the thermogram. The more negative steady-state level observed after each injection corresponded to a higher rate. However, at ~ 4000 s the thermal power started to increase (lower rate) indicating the presence of substrate inhibition (Fig. 3A and B). To transform the calorimetric data from the thermogram to enzymatic initial rates it is necessary to experimentally determine the apparent reaction enthalpy (ΔH_{app}). This was obtained by a single injection experiment (Supplementary material Fig. S4), giving a $\Delta H_{\text{app}} = -73.63 \pm 3.34$ kJ/mol ($-17,600 \pm 800$ cal/mol). Table 1 shows the kinetic parameters for the COS catalyzed choline-O-sulfate hydrolysis together with those obtained by spectrophotometry for the synthetic substrates pNPS and MUS. These last two substrates did not show enzyme saturation at their highest solubility in the buffer employed (Fig. 3C and D). Despite the low activity observed for COS, multiple catalytic cycles were observed for the substrates. For example, for pNPS we measured 73 turnovers per hour (Fig. 4A), while for choline-O-sulfate 93 turnovers were measured in the same period of time in a single injection

Table 1

Kinetic parameters for COS catalyzed hydrolysis of sulfate esters substrates at 25 °C and pH 7.5. Reported values represent the average of three independent measurements and error ranges represent one standard deviation.

Substrate	k_{cat} (s^{-1})	K_{M} (mM)	K_{i} (mM) ^a	$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ ($\text{s}^{-1} \text{M}^{-1}$)
Choline-O-sulfate	0.27 ± 0.02	11.1 ± 1.0	11.4 ± 1.1	24.32 ± 2.84
pNPS	0.035 ± 0.004	75.8 ± 15.0	-	0.46 ± 0.11
MUS	0.043 ± 0.007	11.8 ± 1.4	-	3.64 ± 0.73

^a Substrate inhibition constant.

experiment (Supplementary material Fig. S4). Additionally, COS activity against choline phosphate was tested by calorimetry, but no activity was detected, even though a 20-fold more enzyme than with choline-O-sulfate was used (Supplementary material Fig. S5). This contrasts with the reported by Osteras et al. [8], who observed phosphatase activity towards choline phosphate in *E. meliloti* crude extract obtained after COS induction.

3.3. COS activity-pH profiles and product inhibition

The enzymatic activity of COS was tested in the pH range 5.5–8.5 using pNPS as the substrate. We observed a bell shaped profile of COS specificity constant ($k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$) showing a maximum at pH 6.5 (Fig. 4C). Individual graphs of k_{cat} and K_{M} as a function of pH are shown in Supplementary material Figs. S6 and S7.

The possible inhibitory effects of the cognate reaction products, choline and inorganic sulfate, in COS catalyzed hydrolysis were

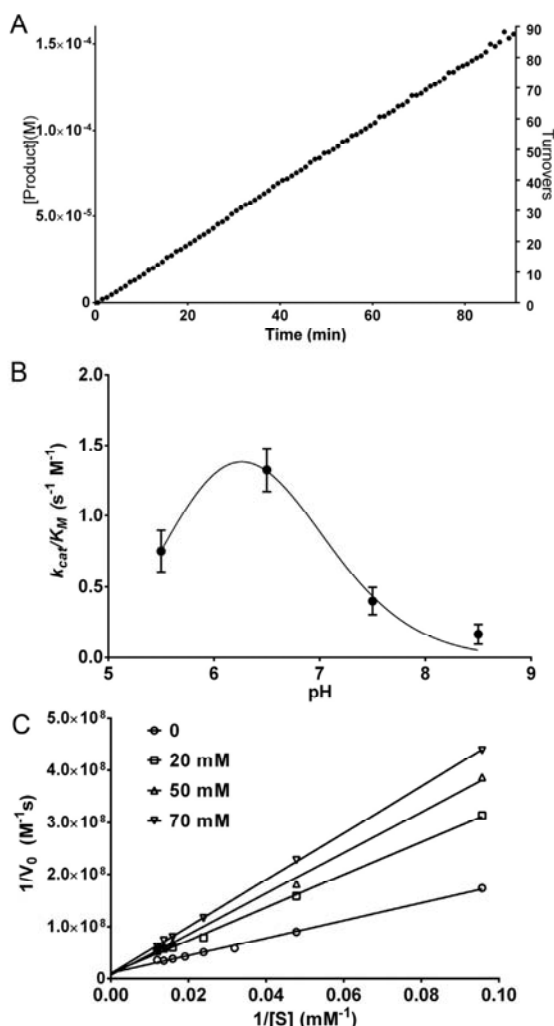


Fig. 4. (A) Time course of the COS catalyzed hydrolysis of pNPS at pH 7.5 and 25 °C; [COS] = 1.74×10^{-6} M and [pNPS] = 70 mM. (B) COS catalyzed hydrolysis of pNPS as a function of pH at 25 °C. (C) Competitive inhibition of COS by choline at 25 °C and pH 7.5.

examined using pNPS as substrate. Choline inhibited COS competitively with an inhibition constant (K_i) of 57.8 mM (Fig. 4D) but no inhibition was observed with ammonium sulfate up to a 70 mM concentration.

3.4. Determination of FGly modification

Due to the low COS catalytic activity, the amount of post-translational modification of the cysteine 54, which is in the sulfatase recognition sequence C-X-P-X-R, was evaluated. First, a quantification of the total number of cysteines per mole of protein was performed using the Ellman's reaction. From the six possible cysteines present in the amino acid sequence, all of them were detected, suggesting the complete absence of the FGly residue (Table 2). Two of these cysteines were forming a disulfide bridge (compare samples treated with urea and urea+DTT or TCEP in Table 2).

Table 2

Quantification of cysteines present in COS using the Ellman's reaction. Values are the average of three independent determinations with their corresponding standard deviations.

Treatment of protein sample	Number of detected Cys per mole of protein
None (native protein)	0.30 ± 0.01
Urea 8 M	3.99 ± 0.03
Urea 8 M+DTT	6.05 ± 0.09
Urea 8 M+TCEP	5.98 ± 0.01

To confirm the absence of the FGly modification in the cysteine 54, an UPLC-ESI-Q-TOF-MS analysis of a reduced, alkylated and trypsin-digested sample of COS was carried out using an established procedure from the literature [37]. The results showed a coverage of 89.5% of the protein sequence, including all cysteine-containing peptides. Amongst them was a peptide eluted at 17.71 min with a $m/z = 578.9232$ corresponding to the triply protonated state $[M+3H]^{3+}$ of the peptide containing the Cys54 in the carbamidomethylated-form (Fig. 5A and B). The FGly residue is an aldehyde that hydrates in water to give a geminol diol. In MS, both, the peptide with aldehyde and the one with the diol have been observed with two distinct molecular masses [37]. The expected COS FGly peptides (aldehyde $M^{+3H} = 553.9390$ m/z or diol $M^{+3H} = 559.9425$ m/z) with the same or different protonation state as the Cys containing peptide were extensively searched but were not detected in the MS analysis (for two independent determinations). These results confirm the absence of the FGly residue when COS is expressed in the conditions mentioned here.

4. Discussion

Recombinant *E. meliloti* COS was overexpressed and purified in high yields from *E. coli* cultures. However, its catalytic activity was poor as a result of the complete absence of the FGly post-translational modification in its active site. This lack of modification occurs despite COS sequence having the "sulfatase signature" (C-X-P-X-R) [25–27]. Table 3 shows that this consensus sequence can be recognized and transformed to FGly in different degrees in *E. coli* by its enzymatic machinery, which has not been identified yet [28]. In some cases, a mixture of unmodified cysteine and FGly has been observed by qualitative MALDI-TOF analysis, while in others only the peptide with the FGly has been detected indicating 100% of modification. Only in three examples the degree of FGly formation has been directly quantified in mixtures with the unmodified Cys peptides. For about half of all cases, the percentage of FGly has not been determined. Based on these results, it is clear that the presence of the minimum five "sulfatase signature" residues, or even the extended sequence depicted in Table 3, is not a guarantee of even partially FGly modification in *E. coli*. Human iduronate 2-sulfate sulfatase and COS have a serine residue at position (–13) with respect to the active site cysteine that is different from the consensus glycine residue, but still with glycine at this position the modification can be low as it was the case with *Mycobacterium tuberculosis* sulfatase [38].

To increase the FGly modification in recombinant *Clostridium perfringens* sulfatase, coexpression with its corresponding anSME in *E. coli* was done [40]. Similarly, phosphonate monoester hydrolases (PMHs), which are enzymes with the sulfatase recognition sequence, had been coexpressed with *M. tuberculosis* FGE (MtbFGE) to increase the FGly formation [47,48]. This last method efficiently (> 85%) modifies N- or C-terminus FGE recognition sequences in some proteins [37,40,47], but in PMHs the conversions were lower [47,48]. *E. meliloti* genome includes a putative FGE and its coexpression with COS will be tested in the near future

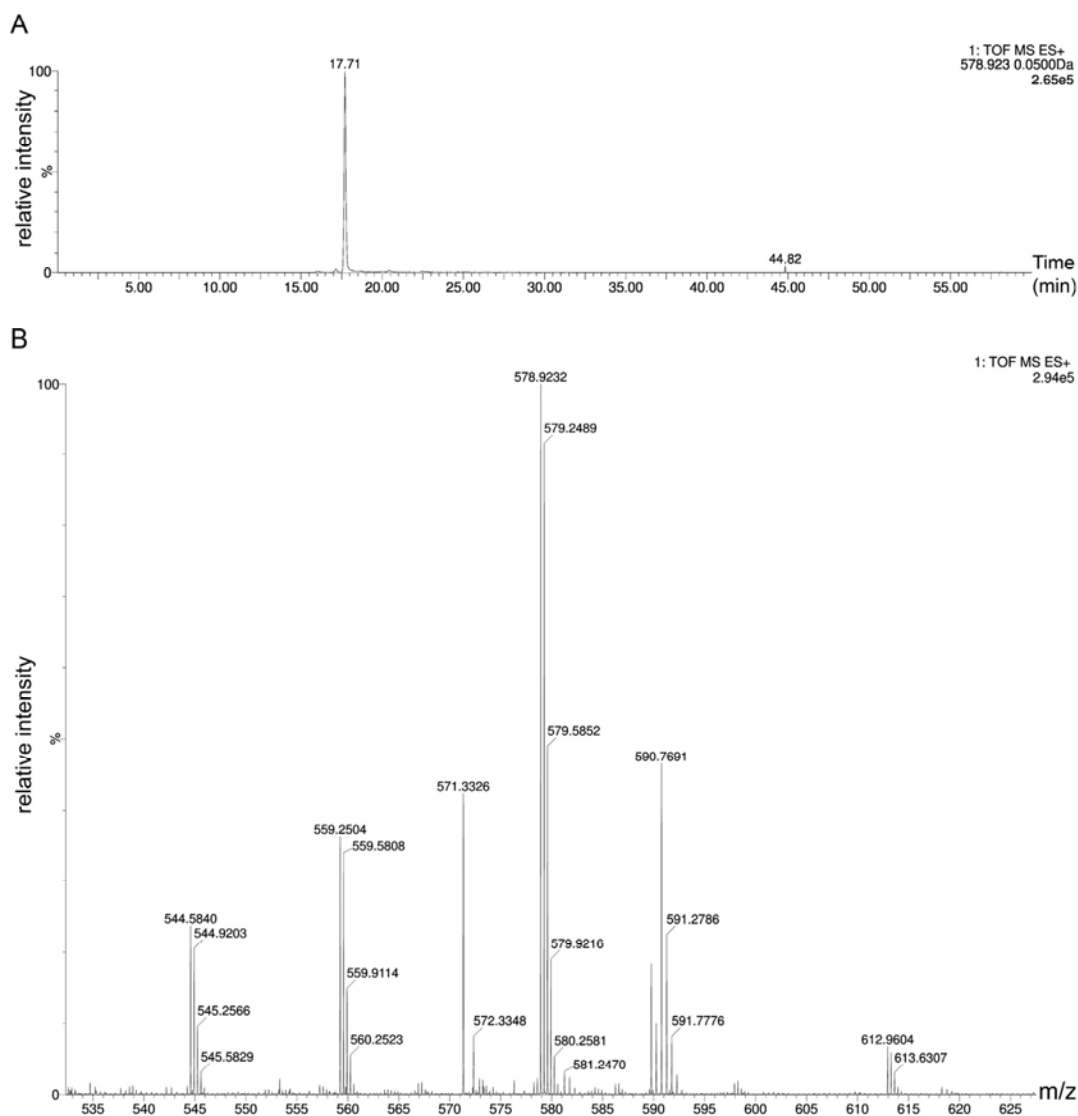


Fig. 5. Results of UPLC-ESI-Q-TOF-MS analysis for COS. The protein was reduced with DTT, alkylated with iodoacetamide, digested with porcine trypsin and analyzed by LC-MS. (A) Extracted ion currents (XIC) at $m/z=578.9232$ corresponding to the peptide FHNNYTSSPLCAPAR $[M+3H]^+3$ with the carbamidomethylated Cys54. (B) Mass spectra of the same peptide (theoretical weight = 1734.8016 Da and $[M+3H]^+3=578.9387$).

in our group. In *E. meliloti* cells, the presence of the FGE should ensure that the modification occurs, obtaining a more active COS. Further studies that elucidate the sequence and/or structural requirements for expression of fully FGly-modified type I sulfatases in *E. coli* would be very beneficial for scientific and biotechnological purposes.

Despite the absence of the post-translational modification, COS was a competent enzyme able to perform multiple catalytic cycles. Another example of an enzyme lacking completely the FGly modification but still with hydrolytic activity is *Burkholderia carboxyphyllyl* phosphonate monoester hydrolase (BCPMH) [48]. Despite this, it would be expected that the presence of FGly in COS would increase the enzymatic activity, especially the k_{cat} , by 5 to 2500-fold as it was observed for BCPMH and other sulfatases [41,47–49].

In those examples, a comparison of the unmodified and modified enzyme was possible, or a Cys to Ser mutation in their active sites was done to prevent FGly formation in *E. coli*. In contrast, the 11.1 mM K_M value obtained in this work for COS is likely to be conserved for the enzyme carrying the FGly, as it was the case in all partially modified or Cys to Ser mutants [41,47–49]. This relatively high K_M value is consistent with other K_M s for choline sulfatase from natural sources: 40 mM for *Pseudomonas nitroreducens* [29]; 35 mM for *Aspergillus nidulans* [14] and 1.4 mM for *Pseudomonas aeruginosa* [30], and could imply that the intracellular concentrations of choline-*O*-sulfate are in the millimolar range, like it is for many other osmoprotectants [2,10]. Also the substrate inhibition observed for COS, might be used to prevent the fast depletion of choline-*O*-sulfate when it is in high concentration

Table 3Recognition sequences for the modification of the active site cysteine to FGly in enzymes expressed in *E. coli*, and the percentage of FGly transformation.

Type I sulfatase	Sequence	FGly presence	Method for FGly determination	Enzyme co-expressed	Ref.
<i>F. heparinum</i> FH25	(69)GTRFTRAYCAQPLCTPSRSAIFSG	100%	MALDI-MS	–	[39]
<i>C. perfringens</i> (BAB79937.1)	(37)GYNFENAYTAVPSCIASRASILTG	Partially 100%	MALDI-TOF	– anSME	[40]
<i>P. aeruginosa</i> (CAA88421.2)	(39)GLRLTDFHTAST-CSPTSRMLLTG	95%	DTNB	–	[41]
<i>E. meliloti</i> (AAC13371.1)	(41)SARFHNNYTSPLCAPARASPMAG	0%	DTNB	–	This work
<i>M. tuberculosis</i> (F70837)	(45)GILFTRAHATAPLCTPSRGSLEPTG	ND ^a	–	–	[38]
<i>H. sapiens</i> (NP_000503.1)	(66)GLLFPNFYSANPLCSFSRAALLTG	ND ^a	–	–	[42]
<i>H. sapiens</i> (AAC77828.1)	(71)SLLFQNAFAQQAQVCAFSRVSFLTG	ND ^a	–	–	[43]
<i>P. sp</i> ATCC19151 (CB183290.1)	(40)GVVPSDAYCNSPLCAPSRFTLVSG	ND	–	–	[23]
<i>F. heparinum</i> FH65	(67)GMLFNFCVFTNAVCGPSRATILTG	ND	–	–	[44]
<i>F. heparinum</i> NSulf	(67)GVRFTNAFCSSPSCPTARAGMLTG	ND	–	–	[45]
<i>H. pomatia</i> (AAF30402.1)	(71)GVRLNYYVQ-PICTPQRSQMSG	^b	–	–	[46]
Phosphonate monoester hydrolase					
<i>R. leguminosarum</i> (WP025417352.1)	(49)GTLFRRHYAGAAPCSPARATLYTG	25% 62%	Fluorophore labeling	– <i>MtbFGE</i>	[47]
<i>B. caryophylli</i> (AAC44467.1)	(45)GLTFRNHVTTVCVCGPARASLLTG	Partially Partially ^c	MALDI-TOF	– <i>MtbFGE</i>	[48]

ND: Not determined.

^a Low activity suggest none or poor FGly modification.^b Expression in *E. coli* was not successful.^c Partially, but greater than without *MtbFGE*.

[50] and preserve its osmoprotectant effect.

Regarding its substrate specificity, COS showed an ~8-fold lower k_{cat} for the aromatic sulfate ester pNPS, compared to the alkyl choline-O-sulfate ester, despite the first one being ~10⁸-fold more labile [51]. This behavior is contrary to other type I sulfatases that show higher activities and lower K_M values for the aromatic substrates [25]. This low or null activity towards aromatic sulfates could be a common characteristic of choline sulfatases as it was also observed for *P. nitroreducens* choline sulfatase [29].

Even with the low k_{cat} values obtained for the unmodified COS, this enzyme has a remarkable catalytic proficiency as it would be accelerating the reaction 10²⁰-fold compared to the uncatalyzed reaction ($k_{uncat}=2.25 \times 10^{-21} \text{ s}^{-1}$ estimated by using the equation of the Brønsted plot reported [51] and using a $pK_a=13.9$ for choline sulfate [52]).

5. Conclusions

COS is a dimeric protein that can be expressed in high yields in *E. coli*, but under the conditions described here, it lacks completely the FGly maturation despite having the C-X-P-X-R sulfatase signature. Regardless of this, COS is able to hydrolyze its natural substrate choline-O-sulfate through multiple catalytic turnovers and with remarkable proficiency. Given the apparent ubiquity of choline sulfatases in microorganisms, further studies on their mechanism of action, the sequence or structural requirements for their post-translational modification and their substrate specificity would be important to understand the role of choline sulfatases in microbial sulfur metabolism and in the biological sulfur cycle.

Acknowledgments

This work was supported by DGAPA-UNAM (PAPIIT grant: IN104210-3) and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACYT grant: 153208). Sanchez-Romero thanks CONACYT for a doctoral fellowship (235576) and the Programa en Ciencias Químicas (UNAM) for its support. We thank Alma Jessica Díaz Salazar for her competent technical assistance; Margarita Guzman-Villanueva and Jorge Herrera-Díaz for performing LC-MS experiments and Ismael Bustos-Jaimes and Miguel Costas for helpful discussions and comments on the manuscript.

Appendix A. Supplementary Information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at <http://doi:10.1016/j.bbrep.2015.08.002>.

References

- [1] K.M. Jones, H. Kobayashi, B.W. Davies, M.E. Taga, G.C. Walker, How rhizobial symbionts invade plants: the Sinorhizobium-Medicago model, *Nat. Rev. Microbiol.* 5 (2007) 619–633.
- [2] K.J. Miller, J.M. Wood, Osmoadaptation by rhizosphere bacteria, *Annu. Rev. Microbiol.* 50 (1996) 101–136.
- [3] D. Paul, Osmotic stress adaptations in rhizobacteria, *J. Basic Microbiol.* 53 (2013) 101–110.
- [4] C. Ziegler, E. Bremer, R. Kramer, The BCCT family of carriers: from physiology to crystal structure, *Mol. Microbiol.* 78 (2010) 13–34.
- [5] N. Empadinhas, M.S. da Costa, Osmoadaptation mechanisms in prokaryotes: distribution of compatible solutes, *Int. Microbiol.* 11 (2008) 151–161.
- [6] D. Lerudulier, A.R. Strom, A.M. Dandekar, L.T. Smith, R.C. Valentine, Molecular biology of Osmoregulation, *Science* 224 (1984) 1064–1068.
- [7] A. Boscarì, K. Mandon, L. Dupont, M.C. Poggi, D. Le Rudulier, BetS is a major glycine betaine/proline betaine transporter required for early osmotic

- adjustment in *Sinorhizobium meliloti*, J. Bacteriol. 184 (2002) 2654–2663.
- [8] M. Osteras, E. Boncompagni, N. Vincent, M.C. Poggi, D. Le Rudulier, Presence of a gene encoding choline sulfatase in *Sinorhizobium meliloti* bet operon: choline-O-sulfate is metabolized into glycine betaine. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 (1998) 11394–11399.
- [9] K. Mandon, M. Osteras, E. Boncompagni, J.C. Trinchant, G. Spennato, M. C. Poggi, D. Le Rudulier, The *Sinorhizobium meliloti* glycine betaine biosynthetic genes (betCBA) are induced by choline and highly expressed in bacteroids, Mol. Plant-Microbe Interact. 16 (2003) 709–719.
- [10] T. Bernard, J.A. Pocard, B. Perroud, D. Lerudulier, Variations in the response of salt-stressed rhizobium strains to betaines, Arch. Microbiol. 143 (1986) 359–364.
- [11] L.T. Smith, J.A. Pocard, T. Bernard, D. Le Rudulier, Osmotic control of glycine betaine biosynthesis and degradation in *Rhizobium meliloti*, J. Bacteriol. 170 (1988) 3142–3149.
- [12] A.D. Hanson, B. Rathinasabapathi, J. Rivoal, M. Burnet, M.O. Dillon, D.A. Gage, Osmoprotective compounds in the Plumbaginaceae: a natural experiment in metabolic engineering of stress tolerance, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 (1994) 306–310.
- [13] T. Harada, B. Spencer, Choline sulphate in fungi, J. Gen. Microbiol. 22 (1960) 520–527.
- [14] J.M. Scott, B. Spencer, Regulation of choline sulphatase synthesis and activity in *Aspergillus nidulans*, Biochem. J. 106 (1968) 471–477.
- [15] J. Rivoal, A.D. Hanson, Choline-O-sulfate biosynthesis in plants (identification and partial characterization of a salinity-inducible choline sulfotransferase from species of Limonium (Plumbaginaceae), Plant Physiol. 106 (1994) 1187–1193.
- [16] Y.I. Park, M.L. Buszko, J.E. Gander, Glycine betaine: reserve form of choline in *Penicillium fellutanum* in low-sulfate medium, Appl. Environ. Microbiol. 65 (1999) 1340–1342.
- [17] P. Catalfomo, J.H. Block, G.H. Constantine Jr., P.W. Kirk Jr., Choline sulfate (ester) in marine higher fungi, Mar. Chem. 1 (1973) 157–162.
- [18] B. Lindberg, Methylated taurines and choline sulphate in red algae, Acta Chem. Scand. 9 (1955) 1323–1326.
- [19] G. Nau-Wagner, J. Boch, J.A. Le Good, E. Bremer, High-affinity transport of choline-O-sulfate and its use as a compatible solute in *Bacillus subtilis*, Appl. Environ. Microbiol. 65 (1999) 560–568.
- [20] A.D. Hanson, B. Rathinasabapathi, B. Chamberlin, D.A. Gage, Comparative physiological evidence that beta-alanine betaine and choline-O-sulfate act as compatible osmolytes in halophytic Limonium species, Plant Physiol. 97 (1991) 1199–1205.
- [21] J.W. Fitzgerald, Sulfate ester formation and hydrolysis: a potentially important yet often ignored aspect of the sulfur cycle of aerobic soils, Bacteriol. Rev. 40 (1976) 698–721.
- [22] T.C. Galvao, V. de Lorenzo, D. Canovas, Uncoupling of choline-O-sulphate utilization from osmoprotection in *Pseudomonas putida*, Mol. Microbiol. 62 (2006) 1643–1654.
- [23] B. Jovic, V. Venturi, L. Topisirovic, M. Kojic, Inducible expression of choline sulfatase and its regulator BetR in *Pseudomonas* sp. ATCC19151, Arch. Microbiol. 193 (2011) 399–405.
- [24] M. Cregut, M.J. Durand, G. Thouand, The diversity and functions of choline sulphatases in microorganisms, Microb. Ecol. 67 (2014) 350–357.
- [25] S.R. Hanson, M.D. Best, C.H. Wong, Sulfatases: structure, mechanism, biological activity, inhibition, and synthetic utility, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 43 (2004) 5736–5763.
- [26] M. Sardiello, I. Annunziata, G. Roma, A. Ballabio, Sulfatases and sulfatase modifying factors: an exclusive and promiscuous relationship, Hum. Mol. Genet. 14 (2005) 3203–3217.
- [27] P. Bojarova, S.J. Williams, Sulfotransferases, sulfatases and formylglycine-generating enzymes: a sulfation fascination, Curr. Opin. Chem. Biol. 12 (2008) 573–581.
- [28] A. Benjdia, G. Deho, S. Rabot, O. Berteau, First evidences for a third sulfatase maturation system in prokaryotes from *E. coli* aslB and ydeM deletion mutants, FEBS Lett. 581 (2007) 1009–1014.
- [29] I. Takebe, Isolation and characterization of a new enzyme choline sulfatase, J. Biochem. 50 (1961) 245–255.
- [30] J.J. Lucas, S.W. Burchiel, L.H. Segel, Choline sulfatase of *Pseudomonas aeruginosa*, Arch. Biochem. Biophys. 153 (1972) 664–672.
- [31] E. Gasteiger, A. Gattiker, C. Hoogland, I. Ivanyi, R.D. Appel, A. Bairoch, ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis, Nucleic Acids Res. 31 (2003) 3784–3788.
- [32] M.J. Todd, J. Gomez, Enzyme kinetics determined using calorimetry: a general assay for enzyme activity? Anal. Biochem. 296 (2001) 179–187.
- [33] M.J. Baumann, L. Murphy, N. Lei, K.B. Krogh, K. Borch, P. Westh, Advantages of isothermal titration calorimetry for xylanase kinetics in comparison to chemical-reducing-end assays, Anal. Biochem. 410 (2011) 19–26.
- [34] M.L. Bianconi, Calorimetry of enzyme-catalyzed reactions, Biophys. Chem. 126 (2007) 59–64.
- [35] G.L. Ellman, Tissue sulfhydryl groups, Arch. Biochem. Biophys. 82 (1959) 70–77.
- [36] J. Sedlak, R.H. Lindsay, Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent, Anal. Biochem. 25 (1968) 192–205.
- [37] D. Rabuka, J.S. Rush, G.W. deHart, P. Wu, C.R. Bertozzi, Site-specific chemical protein conjugation using genetically encoded aldehyde tags, Nat. Protoc. 7 (2012) 1052–1067.
- [38] M.M. Hossain, Y. Kawarabayasi, M. Kimura, Y. Kakuta, Expression and functional analysis of a predicted AtsG arylsulphatase identified from *Mycobacterium tuberculosis* genomic data, J. Biochem. 146 (2009) 767–769.
- [39] J.R. Myette, Z. Shriver, C. Claycamp, M.W. McLean, C. Venkataraman, R. Sasisekharan, The heparin/heparan sulfate 2-O-sulfatase from Flavobacterium heparinum. Molecular cloning, recombinant expression, and biochemical characterization, J. Biol. Chem. 278 (2003) 12157–12166.
- [40] O. Berteau, A. Guillot, A. Benjdia, S. Rabot, A new type of bacterial sulfatase reveals a novel maturation pathway in prokaryotes, J. Biol. Chem. 281 (2006) 22464–22470.
- [41] L.F. Olguin, S.E. Askew, A.C. O'Donoghue, F. Hollfelder, Efficient catalytic promiscuity in an enzyme superfamily: an arylsulfatase shows a rate acceleration of 10(13) for phosphate monoester hydrolysis, J. Am. Chem. Soc. 130 (2008) 16547–16555.
- [42] A. Rodriguez, A.J. Espejo, A. Hernandez, O.L. Velasquez, L.M. Lizaraso, H. A. Cordoba, O.F. Sanchez, C.J. Almciga-Diaz, L.A. Barrera, Enzyme replacement therapy for Morquio A: an active recombinant N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase produced in *Escherichia coli* BL21, J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 37 (2010) 1193–1201.
- [43] E.D. Morales-Alvarez, C.M. Rivera-Hoyos, A.M. Baena-Moncada, P. Landazuri, R. A. Poutou-Pinales, H. Saenz-Suarez, L.A. Barrera, O.Y. Echeverri-Pena, Low-scale expression and purification of an active putative iduronate 2-sulfate sulfatase-Like enzyme from *Escherichia coli* K12, J. Microbiol. 51 (2013) 213–221.
- [44] J.R. Myette, V. Soundararajan, Z. Shriver, R. Raman, R. Sasisekharan, Heparin/heparan sulfate 6-O-sulfatase from Flavobacterium heparinum: integrated structural and biochemical investigation of enzyme active site and substrate specificity, J. Biol. Chem. 284 (2009) 35177–35188.
- [45] J.R. Myette, V. Soundararajan, J. Behr, Z. Shriver, R. Raman, R. Sasisekharan, Heparin/heparan sulfate N-sulfamidase from Flavobacterium heparinum: structural and biochemical investigation of catalytic nitrogen-sulfur bond cleavage, J. Biol. Chem. 284 (2009) 35189–35200.
- [46] U. Wittstock, M. Fischer, I. Svendsen, B.A. Halkier, Cloning and characterization of two cDNAs encoding sulfatases in the Roman snail, *Helix pomatia*, IUBMB Life 49 (2000) 71–76.
- [47] S. Jonas, B. van Loo, M. Hyvonen, F. Hollfelder, A new member of the alkaline phosphatase superfamily with a formylglycine nucleophile: structural and kinetic characterisation of a phosphonate monoester hydrolase/phosphodiesterase from *Rhizobium leguminosarum*, J. Mol. Biol. 384 (2008) 120–136.
- [48] B. van Loo, S. Jonas, A.C. Babbie, A. Benjdia, O. Berteau, M. Hyvonen, F. Hollfelder, An efficient, multiply promiscuous hydrolase in the alkaline phosphatase superfamily, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107 (2010) 2740–2745.
- [49] M. Recksiek, T. Selmer, T. Dierks, B. Schmidt, K. von Figura, Sulfatases, trapping of the sulfated enzyme intermediate by substituting the active site formylglycine, J. Biol. Chem. 273 (1998) 6096–6103.
- [50] M.C. Reed, A. Lieb, H.F. Nijhout, The biological significance of substrate inhibition: a mechanism with diverse functions, BioEssays 32 (2010) 422–429.
- [51] D.R. Edwards, D.C. Lohman, R. Wolfenden, Catalytic proficiency: the extreme case of S-O cleaving sulfatases, J. Am. Chem. Soc. 134 (2012) 525–531.
- [52] R.M.C. Dawson, Data for Biochemical Research, 2nd ed, Oxford University Press, Oxford, 1982.