



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**
Facultad de química

**Expresión y caracterización cinética
de las mutantes de la enzima colina
sulfatasa de *S. meliloti***

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERA QUÍMICA**

PRESENTA

CARLA L. SEGOVIA TRINIDAD



MÉXICO, D.F. Enero 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor ROGELIO RODRIGUEZ SOTRES

VOCAL: Profesor LUIS TONATIHUT SANCHEZ LINARES

SECRETARIO: Profesor LUIS FERNANDO OLGUÍN CONTRERAS

1er. SUPLENTE: Profesora MARTHA PATRICIA COELLO COUTIÑO

2° SUPLENTE: Profesora BEATRIZ RUIZ VILLAFAN

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio 309 Edificio F, Facultad de Química, UNAM

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Luis Fernando Olgúin Contreras _____

SUSTENTANTE (S):

Carla Lizbeth Segovia Trinidad _____

Índice general

| | | |
|------|---|----|
| 1. | Otros índices y abreviaciones | 4 |
| 1.1. | Índice de tablas..... | 4 |
| 1.2. | Índice de figuras | 5 |
| 1.3. | Abreviaturas | 7 |
| 2. | Resumen | 8 |
| 3. | Marco teórico..... | 10 |
| 3.1. | Sobre <i>Ensifer (Sinorhizobium) meliloti</i> | 10 |
| 3.2. | Sulfatasas | 13 |
| 3.3. | Mutagénesis de sitio dirigida..... | 25 |
| 3.4. | Calorimetría de Titulación Isotérmica (ITC)..... | 27 |
| 3.5. | Cooperatividad e histéresis | 33 |
| 4. | Justificación | 36 |
| 5. | Objetivo..... | 37 |
| 6. | Hipótesis..... | 37 |
| 7. | Materiales y métodos | 38 |
| 8. | Resultados y discusión | 62 |
| 9. | Resumen de resultados..... | 78 |
| 10. | Conclusión | 78 |
| 11. | Perspectivas..... | 79 |
| 12. | Bibliografía | 80 |
| 13. | Anexo..... | 88 |

1. Otros índices y abreviaciones

1.1. Índice de tablas

| | |
|----------|--|
| Tabla 1 | Funciones propuestas para los residuos del sitio catalítico |
| Tabla 2 | Condiciones de digestion |
| Tabla 3 | Oligonucleotidos utilizados |
| Tabla 4 | Condiciones de PCR |
| Tabla 5 | Programa de PCR |
| Tabla 6 | Programa de desnaturalización-alineamiento PCR |
| Tabla 7 | pruebas de estabilidad con buffers a distintas concentraciones |
| Tabla 8 | Mezcla para pruebas de actividad mutante C54S |
| Tabla 9 | Condiciones indagatorias de actividad. |
| Tabla 10 | Concentración final de C54S para pruebas indagatorias de actividad |
| Tabla 11 | Mezclas de reacción para la caracterización cinética |
| Tabla 12 | Prueba de niveles de actividad para las mutantes C54A, C54T, C54D |
| Tabla 13 | Resumen de las condiciones de caracterización cinética por ITC |
| Tabla 14 | Eficiencias de la transformación |
| Tabla 15 | Pruebas indagatorias de actividad |
| Tabla 16 | Resultados pruebas cinéticas rigurosas de C54T, C54A y C54D |
| Tabla 17 | Resumen de los parámetros cinéticos de C54S-COS y COS con ρ NPS como sustrato |
| Tabla 18 | Resumen de los parámetros cinéticos de C54S-COS y COS con sulfato de colina |

1.2. Índice de figuras

- Figura 1 Operón *bet*CBA
- Figura 2 Vía de síntesis de glicina betaina por los genes *betC*, *betA* y *betB* en *E.meliloti*.
- Figura 3 *Leucaena leucocephala*.
- Figura 4 Reacciones de hidrólisis de ésteres de sulfato y sulfamatos de las sulfatasas.
- Figura 5 Alineación de secuencias proteicas consenso del sulfatasas tipo I humanas, de eucariotas inferiores y de procariotas
- Figura 6 Representación ilustrativa del proceso de modificación postraduccional de colin sulfatasa por FGE
- Figura 7 Superposición (por mínimos cuadrados) de cuatro estructuras cristalográficas de sulfatasas
- Figura 8 Estructura modelo (PARS).
- Figura 9 Descripción genérica del sitio activo de una sulfatasa que resalta los residuos altamente conservados observados en estructuras cristalográficas
- Figura 10 Esquemas de mecanismos propuestos para la hidrólisis de ésteres de sulfato por el residuo FGly.
- Figura 11 Mecanismo de reacción detallado de Transesterificación-Eliminación derivado experimentalmente por Boltes para PAS
- Figura 12 Mecanismo de desulfonación
- Figura 13 Representación conformacional comparativa de las mutaciones realizadas en el residuo cisteína 54 del sitio catalítico
- Figura 14 Componentes principales del ITC
- Figura 15 Termogramas representativos de un proceso exotérmico y endotérmico
- Figura 16 Termograma representativo de un proceso reactivo y no reactivo
- Figura 17 Termograma y curva de Michaelis-Menten de la reacción enzimática de COS contra sulfato de colina
- Figura 18 Representación de cooperatividad en un diagrama de Michaelis-Menten
- Figura 19 Plásmido pET26b+COS
- Figura 20 Reacciones de PCR realizada

- Figura 21 Mezcla reacciones PCR
- Figura 22 Proceso de desnaturalización y enfriamiento paulatino que promueve la alineación de cadenas mezcladas
- Figura 23 Digestión de las cadenas metiladas con *DpnI*.
- Figura 24 Región de expresión/clonación del plásmidos pET-26b(+)
- Figura 25 Electroforesis del plásmido pET26b+COS
- Figura 26 Electroforesis de las purificaciones de las mutantes C54A, C54T, C54D, C54S
- Figura 27 Secuenciaciones de las mutantes C54D, C54A, C54T, C54S
- Figura 28 seguimiento fracciones por His-trap
- Figura 29 Cromatograma representativo de la purificación de las mutantes C54S, C54D, C54T Y C54T
- Figura 30 Gel de poliacrilamida de la mutante C54T y C54A
- Figura 31 Gel de poliacrilamida de las mutantes C54D y C54S
- Figura 32 Curva patrón 4-nitrofenol a 420 nm a un pH de 7.4
- Figura 33 Gráfica de velocidad inicial de la hidrólisis de pNPS contra la concentración de la mutante C54S
- Figura 34 Cinética de Michaelis-Menten para la hidrólisis del pNPS a 25
- Figura 35 Gráfica del curso de reacción de C54S
- Figura 36 Termograma representativo resultado de la reacción enzimática de C54S contra el sulfato de colina..
- Figura 37 Gráfica de velocidad inicial contra la concentración de sustrato
- Figura 38 Esquema del mecanismo propuesto seguido por COS-C54S

1.3. Abreviaturas

| | |
|--------------------|--|
| <i>E. meliloti</i> | <i>Ensifer meliloti</i> |
| <i>S. meliloti</i> | <i>Sinorhizobium meliloti</i> |
| COS | colina sulfatasa |
| pNPS | <i>p</i> -nitrofenilsulfato |
| FGly | Formilglicina |
| FGE | Enzima Generadora de Formilglicina |
| C54S | mutación del residuo cisteína 54 por serina |
| C54A | mutación del residuo cisteína 54 por alanina |
| C54D | mutación del residuo cisteína 54 por ácido aspártico |
| C54T | mutación del residuo cisteína 54 por una treonina |
| FGS | Formilglicina-sulfato |
| SDS | Dodecil Sulfato de Sodio |
| HARSA | Aril Sulfatasa Humana A |
| HARSB | Aril Sulfatasa Humana B |
| HARSC | Aril Sulfatasa Humana C |
| PAS | Aril Sulfatasa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |

2. Resumen

Ensifer meliloti (*E. meliloti*) es una bacteria gram negativa fijadora de nitrógeno que forma nódulos en las raíces de ciertas leguminosas. Con la formación de nódulos se establece una relación simbiótica de tipo mutualismo en la que la bacteria recibe compuestos carbonados proporcionados por la planta mientras que ésta última se beneficia de los productos nitrogenados de la fijación del nitrógeno.

Debido al entorno donde se desarrolla *E. meliloti*, la presión osmótica cambia constantemente por lo que ha desarrollado, como mecanismo adaptativo, el uso de compuestos osmoprotectores. Uno de los compuestos osmoprotectores más potentes es la glicina betaína la cual puede ser obtenida del medio o puede ser sintetizada a través de una ruta metabólica codificada por el operón *bet/CBA*.

La enzima colina sulfatasa (COS), es codificada por el gen *betC* y cataliza la primera reacción de la vía metabólica. El residuo 54 es un aminoácido vital para la actividad catalítica. Se encuentra conformado por una formil-glicina que se obtiene tras la modificación postraducciona del aminoácido precursor cisteína. La modificación es llevada a cabo por la Enzima Generadora de Formil-glicina (FGE). El residuo formil glicina se encuentra en forma de diol y es quien realiza el ataque nucleofílico sobre el enlace tipo éster del sulfato de colina para generar colina.

El presente trabajo se centró en la generación de las mutantes serina, alanina, ácido aspártico y treonina (todas localizadas en el residuo 54) y su caracterización cinética contra el sustrato natural (sulfato de colina) y artificial (*p*-nitrofenilsulfato) por métodos espectrofotométricos y calorimétricos.

Los parámetros cinéticos de la mutante C54S contra el sustrato *p*-nitrofenilsulfato (pNPS) obtenidos son 116 mM, $3.2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ y $6,7 \times 10^{-9} \text{ Ms}^{-1}$ para la K_m , k_{cat} y V_{max} , respectivamente, mientras que contra su sustrato natural (sulfato de colina) se obtuvo una K_{half} de 14.9 mM, una V_{max} de $5.3 \times 10^{-7} \text{ M/s}$ y un coeficiente de hill de 1.6. En base a los múltiples ciclos catalíticos, se determinó que la enzima era

capaz no sólo de hidrolizar los ésteres de sulfato, sino que además de llevar a cabo la desulfonación.

Por otro lado, no fue posible determinar los parámetros cinéticos para las mutantes C54D y C54T debido a su baja actividad e inestabilidad. La mutante C54A tampoco mostró actividad apreciable, lo cual es concerniente con su naturaleza no nucleofílica.

3. Marco teórico

3.1. Sobre *Ensifer (Sinorhizobium) meliloti*

3.1.1 Generalidades y osmoprotección

Ensifer meliloti, anteriormente llamada *Sinorhizobium meliloti* (antiguamente denominada *Rhizobium meliloti*) [1] es una α -proteobacteria fijadora de nitrógeno que forma nódulos en las raíces de ciertas plantas leguminosas [2] como *Medicago*, *Melilotus* y *Trigonella* [3] [4] estableciendo una relación simbiótica por la cual la raíz le provee de compuestos carbonados mientras que *E. meliloti* aporta amoníaco [2], producto de la fijación del nitrógeno.

Debido al ambiente donde se desarrolla (rizosfera), *Ensifer meliloti* se encuentra sometido a cambios constantes en la presión osmótica debidos a periodos de sequía, inundación o lluvias por lo cual ha desarrollado, como mecanismo osmoprotector, la acumulación de glicina betaína (N,N,N-trimetilglicina) que resulta ser uno de los osmolitos más efectivos [5] [6]. La glicina betaina puede ser tanto sintetizada como también transportada al interior de la bacteria y cuando es degradada, es utilizada como fuente de carbono y nitrógeno [7].

La síntesis de glicina betaina en *E. meliloti* puede ser iniciada a partir de sulfato de colina utilizando tres enzimas codificadas en el operón *bet*1CBA (Figura 1): colina sulfatasa [COS] (*bet*C), betaina aldehído deshidrogenasa (*bet*B) y colina deshidrogenasa (*bet*A) que son regulados por el gen represor (*bet*1)[5] (figura 2).



Figura 1. Ilustración del perón *bet*1CBA. Figura adaptada de referencia [5] que muestra el orden de los genes que conforman el operón así como las regiones intergénicas

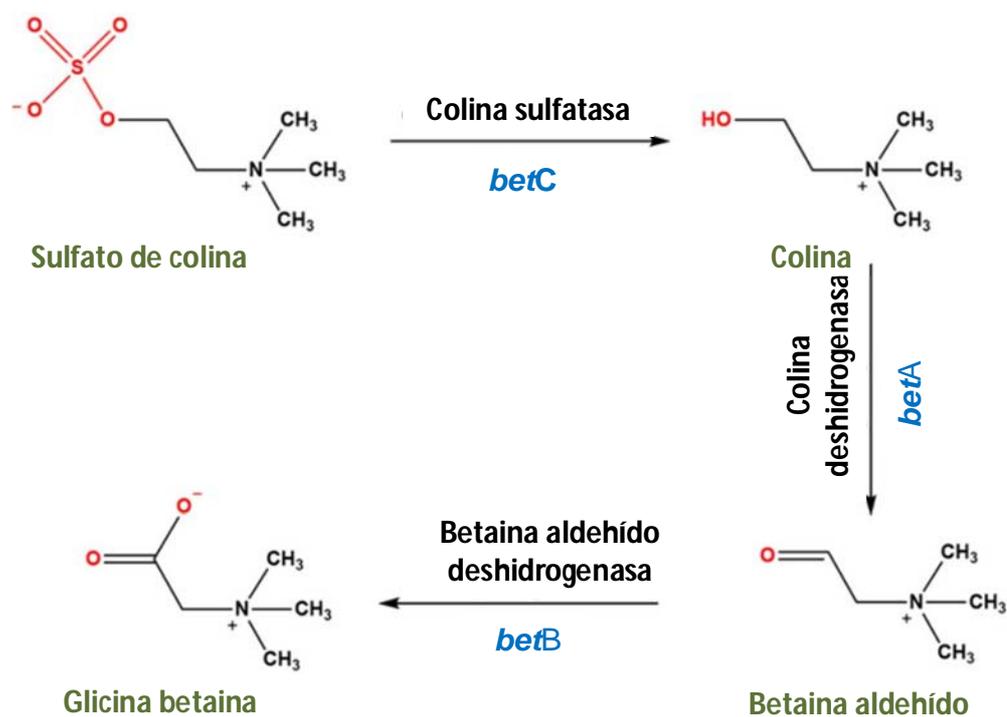


Figura 2. Vía de síntesis de glicina betaina por los genes *betC*, *betA* y *betB* en *E. meliloti*.

La transcripción del operón es inducida por la presencia de colina en el medio, y en menor medida por sulfato de colina pero, curiosamente, no es inducida por la presencia de altas concentraciones de sales [8]. Se ha observado que *E. meliloti* puede también utilizar colina como osmoprotector cuando la ruta metabólica se encuentra truncada en algún punto, aunque es menos eficientemente que la glicina betaina [5].

3.1.2 Uso de *E. meliloti* como biofertilizante

Los nutrientes que necesitan las plantas se toman del aire y del suelo. Si los requerimientos de la planta no son satisfechos, el crecimiento de la planta es limitado y los rendimientos de cultivo escasos. Es por esto que durante mucho tiempo se ha hecho uso de fertilizantes químicos que proporcionan los nutrimentos esenciales para la planta [9]. Sin embargo, su uso ha ocasionado desastres ambientales como son la contaminación de aguas subterráneas, erosión de suelos, cambios de la composición fisicoquímica del suelo, además de una notable destrucción de la biota y microbiota del suelo.

Una alternativa para el uso de fertilizantes químicos es el uso de biofertilizantes, los cuales son microorganismos fijadores de nitrógeno inoculados a las raíces de las plantas. Esta actividad parece ser una alternativa segura, efectiva y económica para recuperar la calidad y productividad de los suelos. Se han encontrado algunos grupos de rhizobia clasificados como *Sinorhizobium* en suelos mexicanos asociados a la leguminosa *Leucaena leucocephala* [10] (Figura 3) y a ciertas especies de acacias mexicanas (*Vachellia* y *Senegalia*) [4].

Así mismo, *E. meliloti* puede formar nódulos del frijol común [4] [11] y alfalfa [12] [13]. Otras plantas de gran interés en México que establecen relaciones simbióticas con organismos del género *Rhizobium* son el maíz [14], el cacahuate [15] y la soya [16].



Figura 3. *Leucaena leucocephala*.

Imagen tomada de <http://www.tropicalforages.info>

3.2. Sulfatasas

3.2.1. Características generales

Las sulfatasas (CE 3.1.6.6) [17] son una familia de enzimas que catalizan la hidrólisis de ésteres de sulfato (CO-S) y sulfamatos (CN-S) [18] (figura 4) aunque se ha visto que éstos últimos son potentes inhibidores de sulfatasas [19]. Tienen una gran variedad de sustratos como son los ésteres de sulfato, glicosaminoglicanos sulfatados [20] y pequeños compuestos aromáticos sulfatados [21]. Su actividad está relacionada con regulación hormonal, degradación celular, modulación en la señalización de rutas metabólicas y patogénesis bacteriana [20]. Se han encontrado sulfatasas en el citoplasma, periplasma y regiones extracelulares.

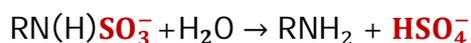
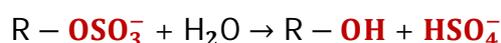


Figura 4. Reacciones de hidrólisis de ésteres de sulfato y sulfamatos de las sulfatasas.

Esta familia constituye una clase de enzimas altamente conservadas en secuencia, estructura y mecanismo tanto en especies eucariotas y procariotas: 1) presentan del 20 al 60% de similitud en toda su secuencia, 2) presenta una región N-terminal que contiene motivos conservados, y 3) un único sitio activo conformado por un residuo α -formilglicina (FGly), el cual es modificado postraduccionalmente [20].

En el primer tercio de la región N-terminal se encuentra un motivo muy importante que permite clasificar a las enzimas como sulfatasas del tipo I (posteriormente se ahondará en la clasificación) [22]. La secuencia característica de las sulfatasas tipo I comprende los 12 aminoácidos C/S-X-P-S/X-R-X-X-X-L/X-

T/X-G/X-R/X (figura 5). Más allá de la clasificación, dicho motivo es crítico para guiar la modificación postraduccional del residuo cisteína o serina para dar lugar a la FGly (2 amino 3 al-propanoico). La modificación puede ser llevada a cabo mediante tres rutas dependiendo del organismo, en una de ellas interviene la Enzima Generadora de α -Formilglicina (FGE) que requiere específicamente un residuo cisteína [23]. El segundo mecanismo involucra la Enzima Maduradora anaerobia de Sulfatasas (anSME) que es capaz de convertir cisteína o serina [24]. Se propone la existencia de un tercer mecanismo de maduración observado en *Escherichia coli* que presentaba sulfatasas funcionales aún cuando los mecanismos de maduración antes mencionados se encontraban deshabilitados [25].

| | 1* | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | Position of FGly (1*) | Length | Accession No. [4] | |
|---|----|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|-----------------------|--------|-------------------|--|
| Human Sulfatasas | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ARSA | C | T | P | S | R | A | A | L | L | T | G | R | 69 | 507 | P15289 | |
| ARSB | C | T | P | S | R | S | Q | L | L | T | G | R | 75 | 533 | NP_000037 | |
| ARSC | C | T | P | S | R | A | A | F | M | T | G | R | 83 | 583 | P08842 | |
| ARSD | C | T | P | S | R | A | A | F | L | T | G | R | 89 | 593 | CAA58555 | |
| ARSE | C | T | P | S | R | A | A | F | L | T | G | R | 86 | 589 | I37187 | |
| ARSF | C | S | P | S | R | S | A | F | L | T | G | R | 79 | 591 | X97868 | |
| ARSG | C | S | P | S | R | A | S | L | L | T | G | R | 82 | 525 | [130] | |
| GalN6S | C | S | P | S | R | A | A | L | L | T | G | R | 79 | 522 | P54793 | |
| GlcN6S | C | C | P | S | R | A | S | I | L | T | G | K | 91 | 552 | CAA78164 | |
| GlcNS | C | S | P | S | R | A | S | L | L | T | G | L | 70 | 502 | P51688 | |
| IdcA2S | C | A | P | S | R | V | S | F | L | T | G | R | 84 | 550 | P22304 | |
| Sulf1 | C | C | P | S | R | S | S | M | L | T | G | K | 87 | 871 | AAM76860 | |
| Sulf2 | C | C | P | S | R | S | S | I | L | T | G | K | 88 | 870 | AAM76861 | |
| Invertebrate and Lower Eukaryotic Sulfatasas | | | | | | | | | | | | | | | | |
| HeARS | C | T | P | S | R | S | A | I | M | T | G | R | 106 | 559 | AAC27821 | |
| HpARS | C | T | P | S | R | S | A | I | M | T | G | R | 100 | 551 | P14000 | |
| SARS | C | T | P | S | R | S | A | I | V | T | G | R | 115 | 567 | P50473 | |
| HpSulf1 | C | T | P | T | R | S | Q | L | M | S | G | R | 80 | 508 | AAF30402 | |
| PGSS | C | S | P | A | R | T | A | V | L | T | G | K | 70 | 532 | CAC86342 | |
| CARS | C | C | P | S | R | T | N | L | C | A | A | S | 73 | 646 | KJKM | |
| NARS | C | C | P | A | R | V | S | L | W | T | G | K | 89 | 639 | AAC02716 | |
| VARS | C | C | P | S | R | T | N | L | W | R | G | Q | 72 | 649 | Q10723 | |
| Prokaryotic Sulfatasas | | | | | | | | | | | | | | | | |
| FHS2S | C | T | P | S | R | S | A | I | F | S | G | K | 82 | 464 | [58] | |
| KARS | S | A | P | A | R | S | M | L | L | T | G | N | 72 | 577 | T45548 | |
| PARS | C | S | P | T | R | S | M | L | L | T | G | T | 51 | 533 | P51091 | |
| PMdS | S | T | P | A | R | A | C | L | L | T | G | L | 79 | 517 | AAF72520 | |
| SChoS | C | A | P | A | R | A | S | F | M | A | G | Q | 54 | 512 | AAC13371 | |

Figura 5. Alineación de secuencias proteicas consenso del sulfatasas tipo I humanas, de eucariotas inferiores y de procariontas. Nótese el motivo presente en colín sulfatasa de *Sinorhizobium meliloti* (residuo 54: cisteína). Imagen tomada de referencia [20]

En general, se ha determinado que el aminoácido destinado a ser modificado para formar FGly puede ser cisteína, tanto para eucariotes como procariones, o serina sólo para procariones [20]. Dependiendo de su residuo catalítico, las sulfatasas que presentan cisteína suelen encontrarse en el citosol, mientras las sulfatasas que tienen serina, se localizan típicamente en el periplasma [26].

En el caso de colín sulfatasa (*betC*) de *S. meliloti*, se tiene que ésta es una sulfatasa de tipo I localizada en el citosol. Tiene en su residuo 54 una cisteína que, muy posiblemente, es modificada postraduccionalmente por una FGE [27] ya ésta enzima requiere específicamente de cisteína y experimentalmente se trabajó en condiciones aerobias lo cual descarta la posibilidad de que sea anSME (descrita anteriormente) quien realice la modificación (figura 6); la hidroxilación de α -formilglicina por una molécula de agua es necesaria para la actividad catalítica [21] siendo su sustrato natural el sulfato de colina.

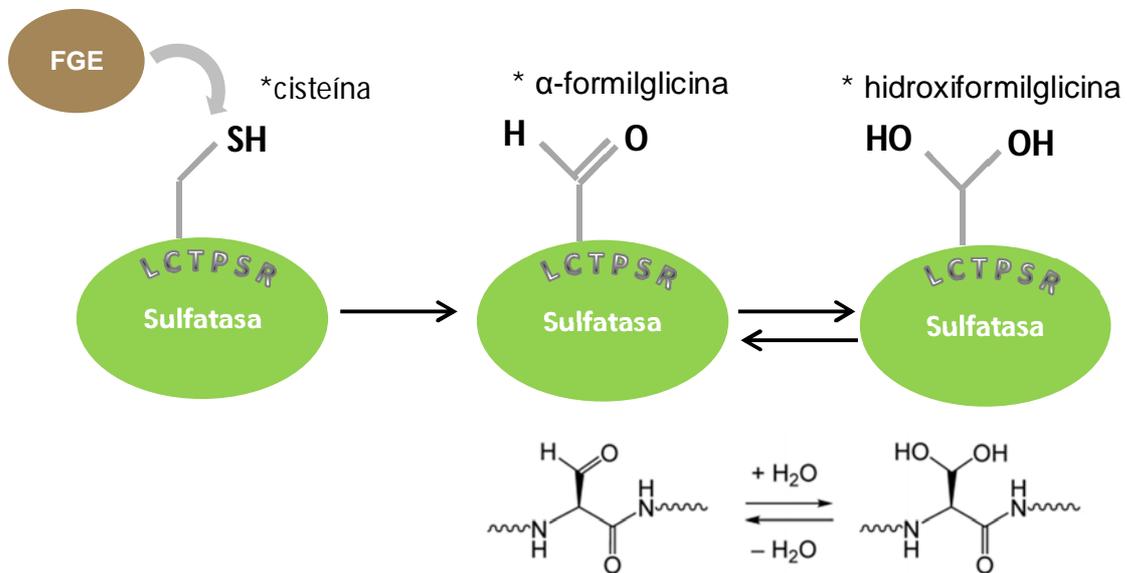


Figura 6. Representación ilustrativa del proceso de modificación postraduccional de colín sulfatasa por FGE en su residuo 54 (cisteína) de la secuencia consenso. α -formilglicina se encuentra en solución en equilibrio predominando la forma de diol.

3.2.2. Clasificación de las sulfatasas

Anteriormente, las sulfatasas eran clasificadas de acuerdo a su sustrato de modo que se tenían arilsulfatasas, carbohidrato sulfatasas y alquilsulfatasas [28]. El nombre de la clase de las arilsulfatasas deriva del sulfato aromático p-nitrofenilsulfato (pNPS), que es usado como sustrato estándar para la detección de actividad. La clase de las alquilsulfatasas deriva de la observación de que la bacteria *Pseudomonas sp.* es capaz de crecer en dodecil sulfato de sodio (SDS) [26] lo que sugirió que éste se podía utilizar como fuente de carbono y azufre. Por otro lado, las carbohidrato sulfatasas son capaces de degradar glicoproteínas sulfatadas [29].

Actualmente, las sulfatasas pueden ser clasificadas en tres grupos distintos en base a su mecanismo:

Grupo I (mencionado en la sección 3.2.1): Son dependientes de formilglicina que actúan sobre carbohidratos sulfatados [18] resaltando así la importancia de la modificación postraduccional ya que incluso a partir de 1960 su estudio se incrementó enormemente cuando se descubrió que ciertos padecimientos hereditarios estaban relacionados con la deficiencia (o reducción de actividad) de sulfatasas [20] debido a la ausencia de la modificación postraduccional del residuo de cisteína a FGly que causaba un raro desorden autosómico recesivo llamado Deficiencia Múltiple de Sulfatasas (MSD, *Multiple Sulfatase Deficiency*) que ocasiona un cuadro neurológico similar al de la leucodistrofia metacromática infantil [30].

Muchas sulfatasas tipo I son denotadas como arilsulfatasas simplemente porque pueden catalizar la hidrólisis de sustratos arilsulfatados colorimétricos *in vitro* [31].

Grupo II: Incluye las Fe (II) α -cetoglutaratodependiente dioxigenasas [18] y [32]. Esta familia de enzimas oxida ésteres de sulfato a sulfato inorgánico y al aldehído correspondiente; requiere hierro (II) como cofactor y α -cetoglutarato como co-sustrato (aceptor de electrones) el cual es descarboxilado para formar succinato.

Un ejemplo de este grupo de enzimas es la alkilsulfatasa AtsK de *Pseudomonas putida* S-313 [33].

Grupo III: Las sulfatasas tipo III son alkilsulfatasas Zn-dependientes y fueron descubiertas recientemente y solo unos pocos ejemplos pueden describirse [18], uno de los cuales es la sulfatasa SdsA1 de *P. aeruginosa* [32] cuya estructura cristalográfica revela tres dominios distintos; el dominio N-terminal con dos Zn^{2+} es distinto al de la familia de las β -lactamasas, ya que permite resistir altas concentraciones de SDS mientras que el dominio C-terminal provee un surco hidrofóbico presumiblemente para reclutar sustratos alifáticos largos. Las estructuras cristalográficas de apo-SdsA1 y complejos con sustratos análogos indican un mecanismo enzimático que involucran una molécula de agua activada indirectamente por los átomos de Zn^{2+} [32].

3.2.3. Estructura

Varias son las sulfatasas tipo I que han sido cristalizadas y su estructura elucidada, pero no la de la sulfatasa de *E. meliloti*.

Hanson[20] y Ghosh [21] analizaron independientemente las estructuras de distintas enzimas entre las que se encuentran HARSA (de sus siglas en inglés, Human Arylsulfatase A) , HARSB (Human Arylsulfatase B), HARSC (Human Arylsulfatase C) y PAS (*Pseudomonas aeruginosa* arylsulfatase). Las estructuras resultan ser muy similares a pesar de pertenecer a especies distintas (figura 7)

Las estructuras revelaron a un monómero esférico globular con una topología α/β mezclada que se divide en dos dominios: el dominio C-terminal y el dominio N-terminal (figura 8).

El dominio N-terminal es el más grande y está compuesto de α -hélices que rodean hojas β -plegadas. El dominio C-terminal contiene cuatro hojas β -plegadas antiparalelas recubiertas por α -hélices expuestas. El sitio activo suele encontrarse anidado por el extremo del C-terminal con el residuo FGly localizado al fondo del centro catalítico [20].



Figura 7. Superposición de cuatro estructuras cristalográficas de sulfatasas [21]: esteroide sulfatasa (verde), ARSA (azul claro), ARSB (rosa) y PAS (amarillo).

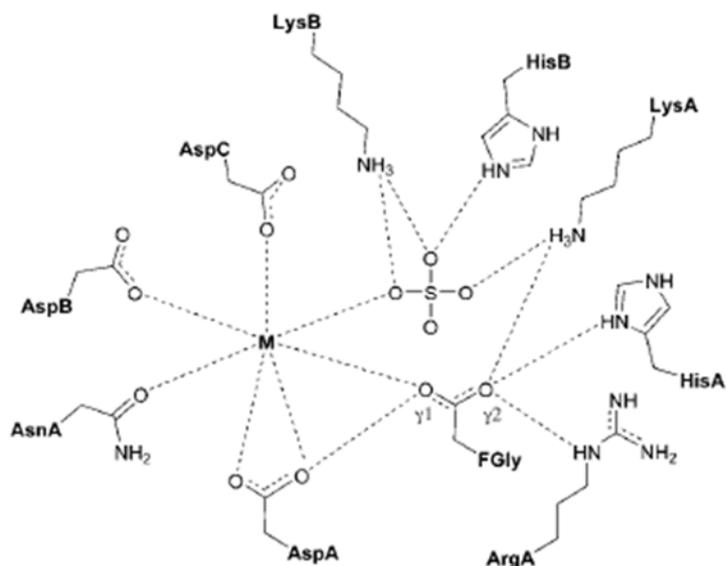


Figura 9. Descripción genérica del sitio activo de una sulfatasa que resalta los residuos altamente conservados observados en estructuras cristalográficas; en líneas punteadas se muestran las principales interacciones de tipo puente de hidrógeno[20] .

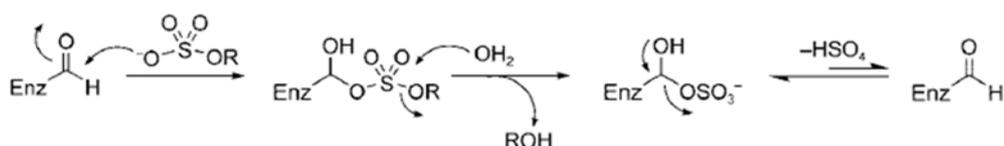
Tabla 1. Funciones propuestas para los residuos del sitio catalítico de las sulfatasas [20]

| Residuo | Función propuesta |
|---------|---|
| FGly | Catálisis nucleofílica como formilglicina hidratado (FGH) |
| Metal | Unión y activación de sustrato, estabilización FGH |
| AsnA | Coordinación del metal, activación de FGH |
| AspA | Coordinación del metal |
| AspB | Coordinación del metal |
| AspC | Coordinación del metal |
| ArgA | Estabilización de FGH |
| HisA | Estabilización de FGH, eliminación FGly-sulfato |
| HisB | Unión y activación de sustrato, protonación de alcohol [34] |
| LysA | Unión y activación de sustrato, estabilización FGH |
| LysB | Unión y activación de sustrato, protonación de alcohol |

3.2.4. Mecanismo

El mecanismo de la hidrólisis de los ésteres de sulfato fue desconocido por mucho tiempo, hasta que con ayuda de estructuras cristalográficas y la comparación estructural con las fosfatasas alcalinas se propusieron dos mecanismos principales, el mecanismo de Adición-Hidrólisis (figura 10a) y el de Transesterificación-Eliminación (figura 10b) [20] y [31]. Sin embargo, ambos mecanismos fueron sujeto de debate.

a) Mecanismo Adición-Hidrólisis



b) Mecanismo Transesterificación-Eliminación

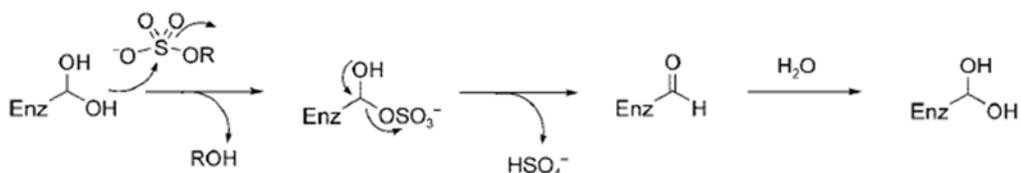


Figura 10. Esquemas de mecanismos propuestos para la hidrólisis de ésteres de sulfato por el residuo FGly. a) Mecanismo de Adición-Hidrólisis y b) Mecanismo de Transesterificación-Eliminación.

El mecanismo de adición-hidrólisis comienza con un ataque nucleofílico por un átomo de oxígeno del grupo sulfato sobre el aldehído electrofílico de la FGly para formar un diéster. El alcohol conjugado es liberado por la acción de un nucleófilo como es el agua. Sin embargo, este mecanismo presenta ciertas discrepancias mostradas en estudios con mutantes de HARSA y HARSB en los cuales era posible la transesterificación pero las mutantes no eran capaces de liberar el sulfato. También, se consideró poco probable que fuese el oxígeno del grupo

sulfato quien realizara el ataque nucleofílico, lo cual fue confirmado con estudios estructurales que revelaron lo contrario: la orientación adecuada para el ataque nucleofílico por parte de un grupo hidroxilo de la FGly al sulfato. Finalmente, estudios de quiralidad en substratos de arilsulfatasas de *Aspergillus* mostraron inversión de la configuración, cambio que no se lleva a cabo por el mecanismo de adición-hidrolisis [20].

El segundo mecanismo propuesto fué el de Transesterificación-Eliminación el cual comienza con un ataque S_N2 de uno de los grupos hidroxilo ($O\gamma_1$) de FGly hidratado sobre el átomo de azufre del sulfato generando la hidrólisis del grupo hidroxilo del sulfato y la formación de un intermediario covalente Formilglicina-Sulfato (FGS). El segundo grupo germinal hidroxilo ($O\gamma_2$) es desprotonado y reacciona para eliminar el sulfato y regenerar el aldehído. Finalmente, el ciclo

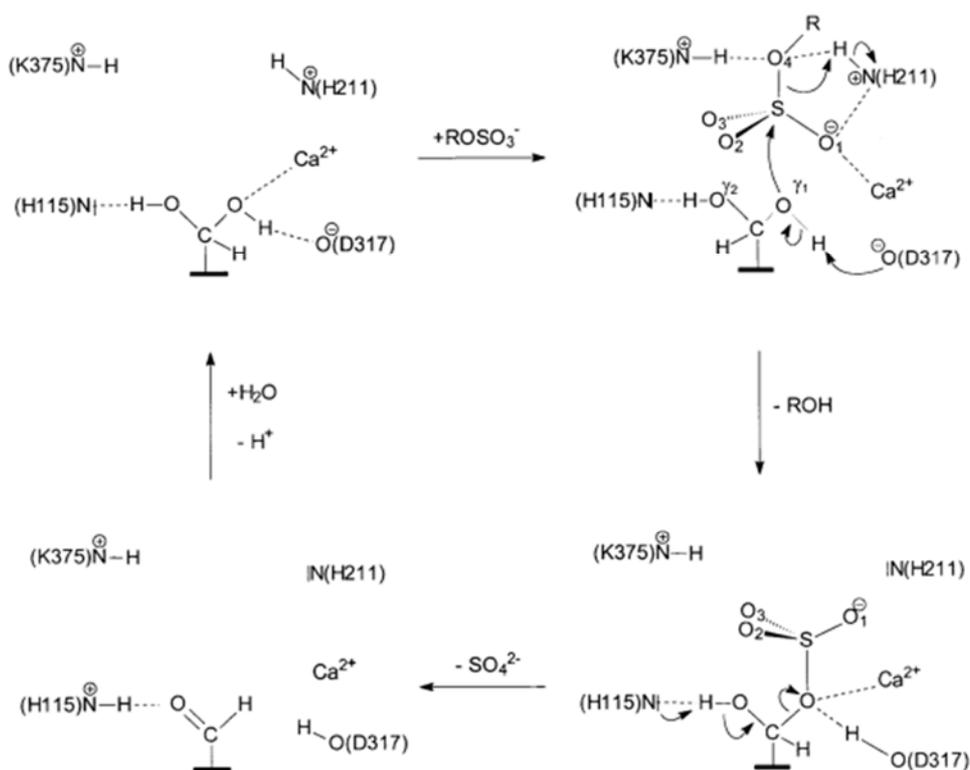


Figura 11. Mecanismo de reacción detallado de Transesterificación-Eliminación derivado experimentalmente por Boltes para PAS [35].

catalítico se completa con la hidratación del aldehído para formar la FGly hidratada (diol). Se han propuesto más mecanismos para la hidrólisis enzimática de ésteres

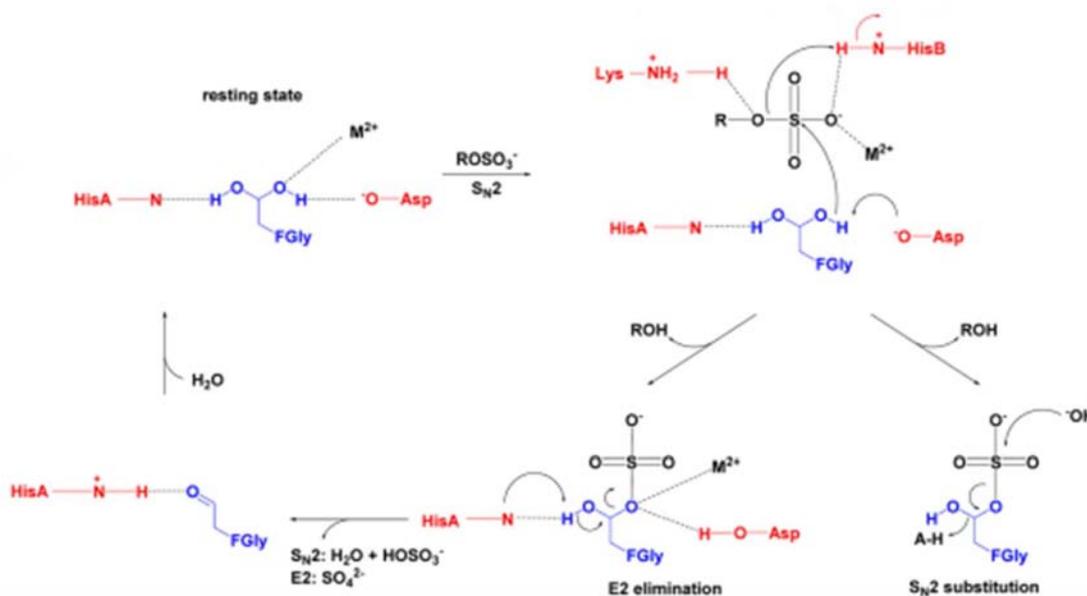


Figura 12. Mecanismo de desulfonación. Una vez formada la sulfoenzima, la desulfonación puede ocurrir por uno de dos mecanismos, el segundo grupo germinal hidroxilo (Oy2) reacciona para eliminar el sulfato y reformar el aldehído o bien, por hidrólisis que involucra un ataque nucleofílico posiblemente por agua. Imagen tomada de referencia 20.

de sulfato en procariones[20] y [35] (como se muestra en la figura 12), sin embargo, de los mecanismos más aceptados es aquel mostrado en la figura 11 que ilustra el esquema del mecanismo enzimático de Transesterificación-Eliminación propuesto por Boltes [35] a partir de evidencia experimental cristalográfica de rayos X para PAS. Como se mencionaba anteriormente, las sulfatasas constituyen una familia altamente conservada, lo que incluso sugiere que tienen un origen común y comparten un ensamblaje y un centro catalítico, lo que permite hacer ciertas generalizaciones sobre el mecanismo consenso de las sulfatasas.

Ahora bien, se ha propuesto que el grupo sulfato unido covalentemente puede ser tanto liberado por hidrólisis que involucra un ataque nucleofílico posiblemente por agua [36] (como se ha visto en el caso de las fosfatasas alcalinas[37]) o por un

enlace relativamente débil y pueda existir un equilibrio con entre la forma libre del aldehído FGly y la forma FGS [36] a diferencia del mecanismo de Transesterificación-Eliminación donde el segundo grupo germinal hidroxilo (Oγ2) reacciona para eliminar el sulfato y reformar el aldehído (figura 12, página 24).

3.2.5. Actividad catalítica de la colina sulfatasa de *Ensifer meliloti*

La sulfatasa de colina silvestre de *E. meliloti* no modificada fue anteriormente estudiada por Sánchez [27]. La proteína se expresó en células de *E.coli* para después ser purificada por cromatografía de afinidad (HisTrap) y de exclusión molecular (HiLoadSuperdex). La filtración en gel y análisis de Dispersión Dinámica de Luz (DLS) mostraron que la colina sulfatasa existe en solución en forma de dímero. Los parámetros cinéticos contra el sulfato de colina obtenidos fueron $k_{cat}= 2.7 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$ y una $K_m=11.1 \text{ mM}$. Para el *p*-nitrofenilsulfato, $k_{cat}= 3.5 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ y una $K_m = 75.8 \text{ mM}$.

Se determinó la falta de la modificación postraduccional mediante la cuantificación de cisteínas presentes en la proteína utilizando la reacción de Ellman. Adicionalmente, se realizó un análisis de espectroscopía de masas que confirmó la ausencia total del residuo FGly en la proteína lo que significa que en el sitio catalítico se tiene un residuo de cisteína y es muy probable que sea el responsable de la baja actividad mostrada por esta enzima[27].

A lo largo de éste texto se hará referencia y se comparará las enzimas recombinantes mutadas con la sulfatasa de colina (COS) silvestre no modificada.

Ciertas sulfatasas como aquellas aisladas de *A. carrageenovora* y *Campylobacter jejuni* que no muestran homología significativa con el sitio catalítico de sulfatasas comunes (no tienen incluso el sitio de reconocimiento para la modificación de la FGly) pueden llevar la hidrólisis de ésteres de sulfato, lo que sugiere que existen otros mecanismos enzimáticos que no han sido elucidados para explicar su actividad [20].

3.3. Mutagénesis de sitio dirigida

La mutagénesis es una herramienta cuyos usos son delimitados por el ingenio. Se ha utilizado, por ejemplo, para conocer los aminoácidos esenciales para la catálisis enzimática o aquellos que son importantes para mantener la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria, permite también conocer sitios que soporten una inserción o deleción y con ello crear moléculas por ingeniería genética.

En este estudio, la mutagénesis de sitio dirigida tiene el fin de obtener mayor información sobre el mecanismo enzimático mediante la mutación de la cisteína 54 la cual es modificada postraduccionalmente a FGly. Las mutaciones llevadas a cabo en la cisteína 54 de la sulfatasa de colina son: a serina (C54S-COS), alanina (C54A-COS), treonina (C54T-COS) y ácido aspártico (C54D-COS) que se muestran en la figura 13.

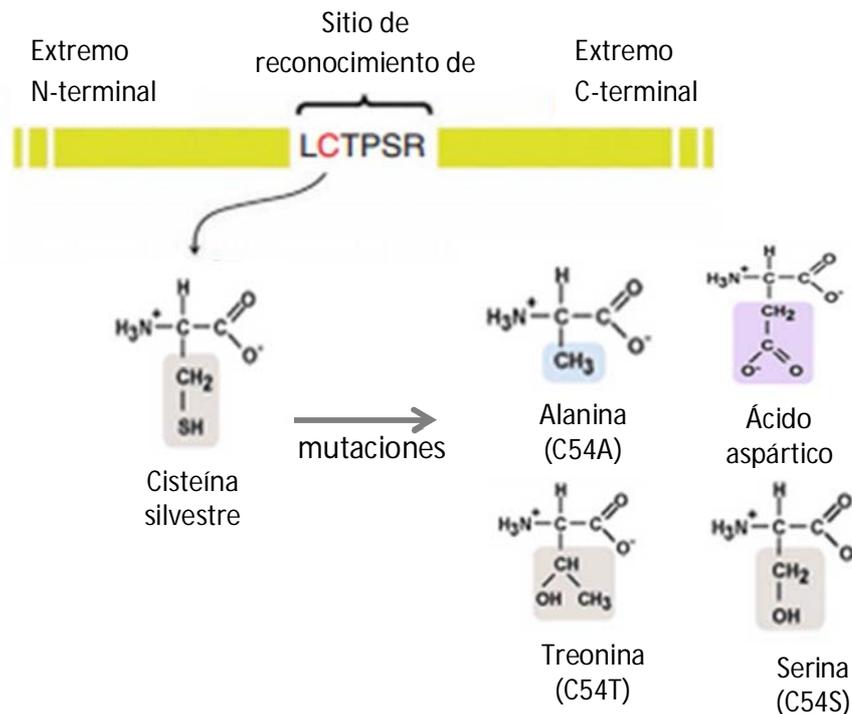


Figura 13. Representación esquemática comparativa de las mutaciones realizadas en el residuo cisteína 54 del sitio catalítico de la sulfatasa de colina de *E. meliloti*.

Conformacionalmente hablando, cada átomo en la FGly juega un papel importante en la hidrólisis de los ésteres de sulfato, por lo que se planteó variar cada uno de los grupos para conocer el efecto que tienen en la catálisis, así por ejemplo, la serina tiene un único grupo hidroxilo, por lo que carece del otro grupo hidroxilo geminal de la FGly. Por otro lado, la treonina tiene el grupo hidroxilo de la serina pero también un grupo metilo geminal que no es capaz de donar los electrones al sulfato para completar el ciclo catalítico y que pudiera generar impedimentos estéricos [38]. En el caso del ácido aspártico, su grupo carboxilo no es generalmente un buen nucleofílico sin embargo existen algunos ejemplos en los que es capaz de llevar a cabo la catálisis actuando como nucleófilo importante [39] pero presumiblemente de manera distinta a la serina. Finalmente, la alanina mostró actividad apreciable, lo cual es concerniente con su naturaleza no nucleofílica.

3.4. Calorimetría de Titulación Isotérmica (ITC)

3.4.1 Generalidades

La Calorimetría de Titulación Isotérmica (ITC, por sus siglas en *inglés* Isothermal Titration Calorimetry) mide directamente el calor generado o absorbido cuando dos o más moléculas interactúan, estas interacciones pueden ser del tipo: proteína-molécula pequeña, enzima-inhibidor, proteína-proteína, proteína-ADN[40], etc. El ITC permite determinar también de manera directa y precisa la constante de afinidad (K_a), la energía libre de Gibbs (ΔG°), la entalpía (ΔH°), la entropía (ΔS°) y la capacidad calorífica (C_p) asociada a la interacción entre estas moléculas, lo cual representa una ventaja con respecto a otras técnicas como medición de fluorescencia, absorbancia, RMN, entre otras, que permiten determinar solamente la constante de afinidad y de manera indirecta los parámetros antes mencionados cuando se realizan repetidos experimentos a distintas temperaturas [41]. Dado que todas las reacciones químicas, incluyendo aquellas que son catalizadas enzimáticamente,

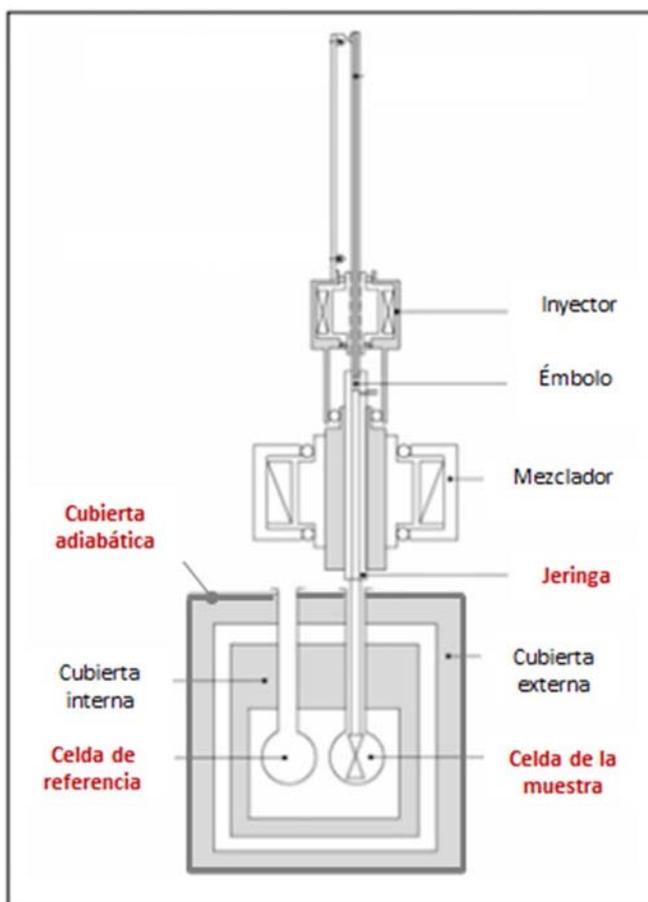


Figura 14. Componentes principales del ITC. [43]

ocurren con algún efecto calorífico (calor absorbido o liberado) las técnicas calorimétricas pueden servir para determinar la cinética de una reacción ya que el

calor involucrado es proporcional al número de moles de producto y a la entalpía molar de la reacción [42].

De manera general, el ITC consiste de una jeringa con agitador y un control de unidad conectado a una computadora (figura 14). El control de unidad es una cubierta adiabática que resguarda dos celdas idénticas con forma de moneda con un volumen de trabajo de 1.4 mL, una de ellas es la celda donde se coloca la muestra, y la otra es una celda de referencia[43]. Cada una de ellas está rodeada por sensores de temperatura y por sistemas de calentamiento o enfriamiento. El sistema es más complejo de lo que se describe, sin embargo, para nuestros fines, no se explicará más a detalle.

El ITC opera bajo el principio de compensación dinámica de potencia, de manera que es capaz de medir calores de dilución, de mezclado, de unión entre dos moléculas, de reacción (entre otros) mediante la medición de un Potencial Diferencial (DP, *Differential Power*) en $\mu\text{cal}/\text{sec}$ entre la celda de referencia y la celda de la muestra [43], de manera que ambas celdas se mantienen a la misma y constante temperatura a través de proveer o extraer calor a la celda de la muestra [42]. Valores positivos de DP significa que la celda de referencia se encuentra más caliente que la celda de la muestra (proceso endotérmico), mientras que valores negativos de DP significa que la celda de la muestra se encuentra más caliente que la celda de referencia (proceso exotérmico). Los sensores de temperatura detectan la diferencia de temperaturas entre las dos celdas y la compensan. Lo anterior es la razón de la dirección de los picos que se muestran

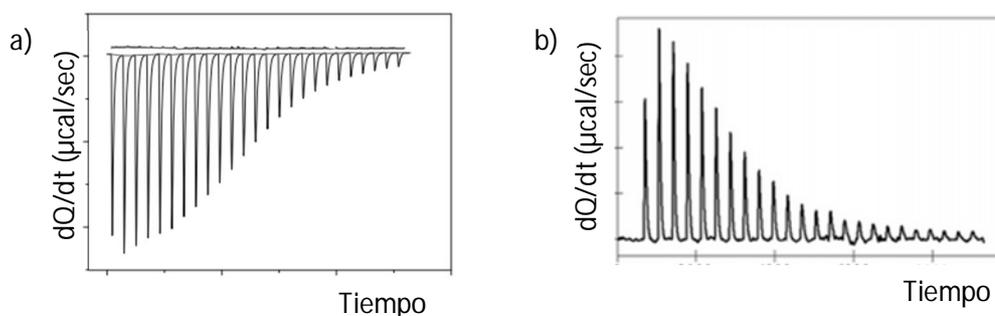


Figura 15. a) Termograma representativo de un proceso exotérmico. b) Termograma representativo de un proceso endotérmico.

en los termogramas resultantes , es decir, si son hacia arriba (proceso endotérmico) o hacia abajo (proceso exotérmico) [43] (figura 15). Cada pico completo, representa una inyección.

En una titulación directa se coloca la macromolécula en la celda de la muestra [M] y se hacen inyecciones del ligando [L], mientras que en una titulación inversa, la macromolécula es la que se inyecta a la celda de muestra donde ahora se encuentra el ligando. Ambas titulaciones arrojan información relevante que depende de cada caso de estudio. La titulación inversa es especialmente importante cuando la solubilidad del ligando es baja [41].

Cuando no existe reacción química, la línea base (ver figura 16a) regresa a su posición original, sin embargo, cuando hay reacción química (Figura 16b), no hay regreso a la línea base ya que conforme transcurre la reacción se va absorbiendo/generando calor hasta llegar al equilibrio.

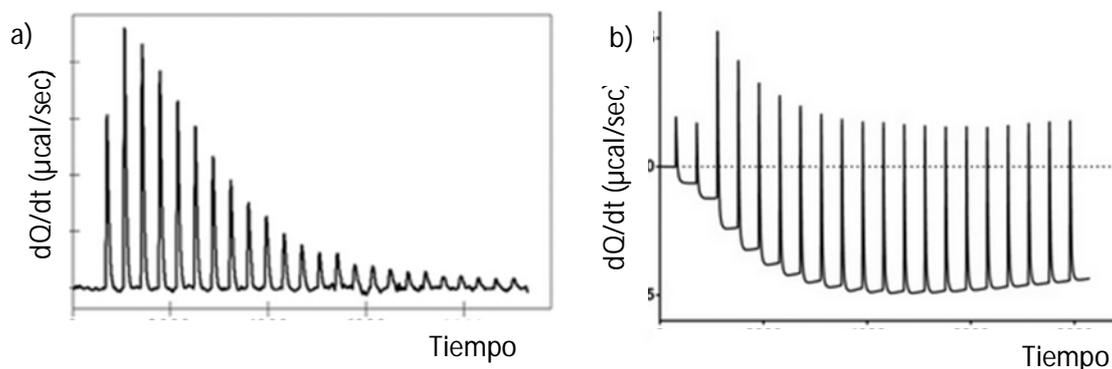


Figura 16. a) Termograma representativo de un proceso endotérmico donde no hay reacción química endotérmica. b) Termograma representativo de una reacción química endotérmica.

3.4.2 Caracterización cinética de una reacción enzimática utilizando ITC

El progreso de una reacción enzimática puede seguirse utilizando ITC mediante dos técnicas: una única inyección y con inyecciones múltiples. En ambas técnicas se lleva a cabo el siguiente tratamiento matemático [42]:

1. Dado que el calor involucrado (Q) es proporcional a la entalpía molar de la reacción (ΔH) y al número de moles (n), se tiene la ecuación (1a).

$$Q = n \cdot \Delta H \dots (1a)$$

De la definición de concentración $[P]_{total}=n/V$, donde $[P]$ es la concentración del producto y V el volumen de reacción, se despeja n y se sustituye en (1a) resultando la ecuación (1b).

$$Q = [P]_{total} \cdot V \cdot \Delta H \dots (1b)$$

2. Dado que el ITC detecta flujos de calor con respecto al tiempo (dQ/dt , potencia térmica), la ecuación (1b) se puede expresar como una diferencial con respecto al tiempo obteniendo la ecuación (2).

$$\frac{dQ}{dt} = \Delta H \cdot V \cdot \frac{d[P]}{dt} \dots (2)$$

3. Dado que el cambio en la concentración de producto con respecto al tiempo ($d[P]/dt$) es una medida de la velocidad de reacción, la ecuación 2 puede expresarse como:

$$v = \frac{d[P]}{dt} = \frac{1}{V \cdot \Delta H} \frac{dQ}{dt} \dots (3)$$

Es importante ver que la ecuación (3) permite establecer una velocidad de reacción conociendo la potencia (dQ/dt) que es proporcionada por el ITC, el volumen de reacción y el ΔH molar de la reacción.

4. El ΔH de reacción que se necesita para obtener la velocidad de reacción (retomando ecuación 1a), es obtenido experimentalmente permitiendo que la reacción enzimática de una sola inyección transcurra en su totalidad lo cual arroja un calor total de reacción Q y se divide entre el número total de moles de sustrato consumido n , se obtiene la ecuación (6).

$$Q = \int_0^t \frac{dQ}{dt} dt \dots (4)$$

$$n = [S]_{total} V \dots (5)$$

$$\Delta H = \frac{1}{[S]_{total} V} \int_0^t \frac{dQ}{dt} dt \dots (6)$$

La técnica utilizada en el presente trabajo fue la de inyecciones múltiples. Ésta técnica consiste en poner la enzima en la celda de muestra y el sustrato en la jeringa a una concentración muy por encima de la K_m esperada (~5 veces mayor) Una vez que el equipo está equilibrado térmicamente, se realiza una pequeña inyección de sustrato, y se mide la potencia registrada por el ITC generada por la reacción enzimática. Momentos después de la inyección y antes de que se consuma más de un 1% de sustrato inicial, se hace una segunda inyección para aumentar la concentración de sustrato y se determina la nueva potencia. Este proceso se repite consecutivamente para obtener las potencias a concentraciones cada vez más elevadas de sustrato. Con los valores de potencia y la ecuación (3) se determinan los valores de velocidad inicial para cada una de las concentraciones empleadas en el experimento de manera que al obtener los valores de velocidad de reacción para cada inyección (pico) y graficarlos con respecto a la concentración de sustrato correspondiente, se obtienen curvas ajustables a distintos modelos como de Michaelis-Menten, de inhibición por sustrato, de cooperatividad, etc.

Todo el procedimiento anteriormente descrito, es realizado de manera automática por el programa MicroCal® Origin®, al cual se le especifica la concentración de sustrato en la jeringa (el volumen varía de acuerdo al modelo de ITC), la concentración de enzima en la celda y el ΔH_{app} de la reacción.

En la figura 17, se muestra el ajuste del termograma a una curva de Michaelis Menten para COS contra el sulfato de colina obtenida por Olgúin y colaborador [27], quienes obtuvieron una k_{cat} de $0.27 \pm 0.02 \text{ s}^{-1}$, K_m de $11.1 \pm 1.0 \text{ mM}$, K_i de $11.4 \pm 1.1 \text{ mM}$ y el cociente de k_{cat}/K_m de $24.32 \pm 2.84 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$. En la figura 17B observa una disminución de la velocidad a partir de los 4000 segundos indicando que existe una inhibición por sustrato [27].

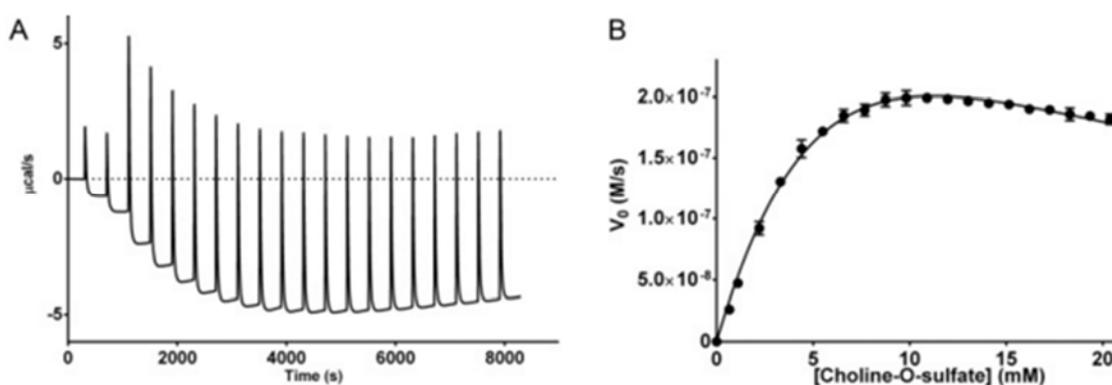


Figura 17. A) Termograma de la reacción enzimática de COS contra sulfato de colina. B) Isoterma de saturación de COS contra sulfato de colina

3.5. Cooperatividad

La cooperatividad es una característica de una enzima u otra proteína en la que la unión de una primera molécula de ligando resulta en un rearrreglo estructural que cambia la afinidad hacia una segunda molécula [44] [35]. Este fenómeno es descrito por la ecuación de Hill (ecuación 7) que es una expresión derivada de la ecuación de Michaelis-Menten.

$$v_o = \frac{V_{max}[S]^h}{K_{half}^h + [S]^h} \dots (7)$$

Donde V_{max} es la velocidad máxima, $[S]$ la concentración de sustrato, K_{half} es la concentración a la cual el sustrato produce la mitad de la velocidad máxima, K' ($K = (K_{half})^h$) es el análogo a la K_m y h es el coeficiente de Hill [45].

Cooperatividad positiva: Se observa cuando la unión de la primera molécula de sustrato facilita la unión de la siguiente molécula de sustrato mediante el aumento de las afinidades. Este efecto se ve reflejado en un valor mayor a 1 del coeficiente de Hill ($n > 1$) [44]. Al graficar la velocidad inicial vs concentración de sustrato se observa una curva sigmoidea característica (Figura 18), en la que la pendiente inicial es pequeña ya que la afinidad es baja pero conforme la concentración aumenta la pendiente también aumenta ya que la afinidad ha aumentado producto de la primera unión del ligando a la enzima [46]. Un sistema ampliamente estudiado prototipo de la cooperatividad positiva es la asociación del oxígeno con la hemoglobina tetramérica.

Cooperatividad negativa: Se genera cuando la unión del sustrato produce la disminución de la afinidad de la segunda molécula de sustrato [47]. El valor del coeficiente de Hill es menor a 1 ($n < 1$) [44]. La apariencia de la curva de velocidad inicial vs concentración de sustrato es parecida a la curva de Langmuir pero con una aproximación más lenta al valor máximo (figura 18).

Nótese que cuando el coeficiente de Hill es igual a 1, la unión es no cooperativa y la ecuación de Hill es igual a la ecuación de Michaelis-Menten.

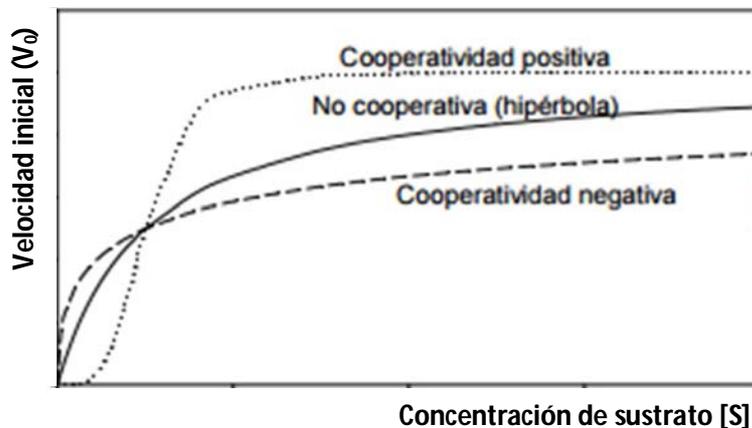


Figura 18. Formas representativas de cooperatividad positiva, no cooperatividad y cooperatividad negativa.

La cooperatividad puede impactar tanto a las propiedades termodinámicas como a las cinéticas de un sistema biológico. Los efectos termodinámicos de cooperatividad son usualmente observados como una alteración de la afinidad de unión que resulta de los sitios múltiples de unión. Por otro lado, los efectos cinéticos de la cooperatividad se observan en la desviación de la cinética hiperbólica en el estado estacionario (lo descrito en el párrafo anterior) [44].

Tradicionalmente, la cooperatividad se asocia a sitios múltiples de unión que se comunican vía rearrreglos estructurales inducidos por la unión de los ligandos, sin embargo, se han encontrado cooperatividad en ciertas enzimas monoméricas que poseen un solo sitio de unión. El ejemplo mejor estudiado de este tipo es la glucocinasa humana, que juega un papel esencial en la homeostasis de la glucosa. La cooperatividad en enzimas monoméricas con un sitio único de unión es exclusivamente cinética [44] de manera que afecta la velocidad de reacción y con ello la forma sigmoideal característica de las isotermas de reacción; cabe mencionar que existen fenómenos cooperativos que presentan cinéticas michelianas.

Para sistemas que describen cooperatividad termodinámica, como el caso de la asociación del oxígeno con la hemoglobina, el coeficiente de Hill representa el número de sitios de unión comunicados [48][49]. Sin embargo, en el caso de las enzimas mononéricas con un solo sitio de unión, el coeficiente de Hill no tienen significado estructural, es decir, no indica en número de sitio de unión y más bien es una medida de la magnitud relativa del efecto de cooperatividad [44].

Existen distintos modelos que explican los mecanismos de unión cooperativa, el primer modelo fue propuesto por Monod, Wyman y Changeux es el llamado modelo MWC o modelo concertado en el que se considera que las subunidades de una proteína con unión cooperativa son funcionalmente idénticas, que cada subunidad puede existir en dos conformaciones, como mínimo y que todas las subunidades sufren la transición de una conformación a otra de manera simultánea. En este modelo ninguna proteína tiene subunidades con conformaciones diferentes. Las dos conformaciones del oligómero están en equilibrio. El ligando puede unirse a cualquiera de ellas aunque con diferente afinidad (la cual sería más estable en ausencia de ligando) hace más probable la transición a la conformación de alta afinidad [50].

En un segundo modelo, el modelo secuencial propuesto en 1966 por Koshland y colaboradores, la unión del ligando puede inducir un cambio de conformación en una subunidad individual. Un cambio de conformación en una subunidad provoca un cambio similar en la subunidad adyacente, así como hace más probable la unión de una segunda molécula.

Se tienen modelos de estados múltiples, que son modelos más complejos que conservan el concepto de MWC de un cambio concertado de conformación pero consideran más de dos estados para la molécula completa [50].

4. Justificación

La osmoprotección es vital para la supervivencia de los microorganismos, dentro de este proceso la sulfatasa de colina juega un papel muy importante en la síntesis de glicina betaina el cual es un osmolito ampliamente utilizado por bacterias y plantas. Debido a su importancia, fue de gran interés, en un trabajo previo, caracterizar cinéticamente la enzima nativa [27] (sin modificación postraducciona) el cual es complementado con el presente trabajo en el que se caracterizaron las mutantes C54S, C54A, C54T y C54D y que ha arrojado mayor información sobre el mecanismo enzimático. El aminoácido mutado (serina o cisteína dependiendo de la especie) se encuentra altamente conservado en la familia de las sulfatasas, lo que concuerda con su vital participación en la catálisis de la hidrólisis de ésteres de sulfato.

El presente trabajo se suma al estudio sobre *Ensifer meliloti* cuyo mejor entendimiento eventualmente conllevará a su mejor aplicación como biofertilizante que tendrá impacto directo en el rendimiento de las cosechas[51] y la disminución del uso de fertilizantes químicos que dañan el medio ambiente. La utilización del conocimiento íntimo de los procesos vitales (como es la osmoprotección) por la biotecnología agrícola servirá para el mejoramiento de la agricultura.

5. Objetivo

Estudiar la actividad enzimática de las mutantes C54S, C54D, C54A, C54T de la enzima sulfatasa de colina contra su sustrato natural y artificial, sulfato de colina y *p*-nitrofenilsulfato respectivamente, por medios espectrofotométricos y calorimétricos.

6. Hipótesis

Dadas la característica nucleofílica de la FGly, las mutantes C54S, C54D Y C54T serán capaces de llevar a cabo el ataque nucleofílico sobre el grupo sulfato del sulfato de colina y el *p*-nitrofenilsulfato y con ello la hidrólisis del éster de sulfato sin embargo la enzima no podrá ser regenerada puesto que ninguna de las mutantes presenta un grupo ácido.

7. Materiales y métodos

MATERIALES

Reactivos Químicos

Generales

| Reactivo | Marca |
|---|----------------------------|
| Alcohol Etilico | - |
| Extracto de Levadura | Fluka |
| Triptona | Fluka |
| Agar | Fluka |
| NaCl | Distribuidora química Alvi |
| Tris-HCl | SIGMA |
| Bradford | BIO-RAD |
| Acrilamida 40% | BIO-RAD |
| Agarosa | PROBIOTEK |
| Kanamicina | GOLDBIO |
| IPTG [isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido] | GOLDBIO |
| Bromuro de Etidio | SIGMA-ALDRICH |
| Glicerol | BIO BASIC INC. |
| Hidróxido de Sodio | Distribuidora química Alvi |
| Ácido clorhídrico | J.T. Baker |
| Imidazol | SIGMA |
| PIPES [ácido piperazin-N,N'-bis(2-etanosulfónico)] | SIGMA |
| MnCl ₂ | M&B |
| KCl | PETROQUIFIN |
| D-Glucosa | ALDRICH |
| MgSO ₄ | SIGMA-ALDRICH |

| | |
|-------------------------------|--------------------------------|
| pNP (4-nitrofenol) | ALDRICH |
| pNPS (p-nitrofenilsulfato) | SIGMA |
| Sulfato de colina | Cambridge Isotope Laboratories |
| SDS (DodecilSulfato de Sodio) | SIGMA-ALDRICH |
| TAE (Tris Acetato EDTA) | SIGMA-ALDRICH |
| Marcador de peso de ADN | BIOLINE (HyperLadder I) |
| Buffer de carga ADN | BIOLINE |
| Isopropanol | J.T.Baker |
| Persulfato de amonio | J.T. BAKER |
| TEMED | SIGMA |

Kits

| Kit | Marca | Descripción |
|-----------------------------------|---------|---|
| DNA polimerasa KOD Hot Start | Novagen | 10X Buffer para la DNA polimerasa KOD Hot Start, MgSO4 y dNTPs |
| Fast-n-Easy Plasmid Mini-Prep Kit | Nalgene | Buffers: de lisis, de neutralización, de activación, de lavado, de elución, columnas, tubos de recolección, Rnasa A |

Enzimas utilizadas

| Enzima | Marca |
|------------------------------|-------------------|
| DNA polimerasa KOD Hot Start | Novagen |
| Dpnl | Biolabs |
| XhoI | Thermo Scientific |
| NdeI | Fermentas |

Cebadores y plásmidos

| Plásmido | procedencia |
|------------|---|
| pET26b+COS | Trabajo anterior [27] *COS fue clonada entre los sitios de restricción <i>Xho</i> I y <i>Nde</i> I así como optimizada para la expresión en <i>E. coli</i> |

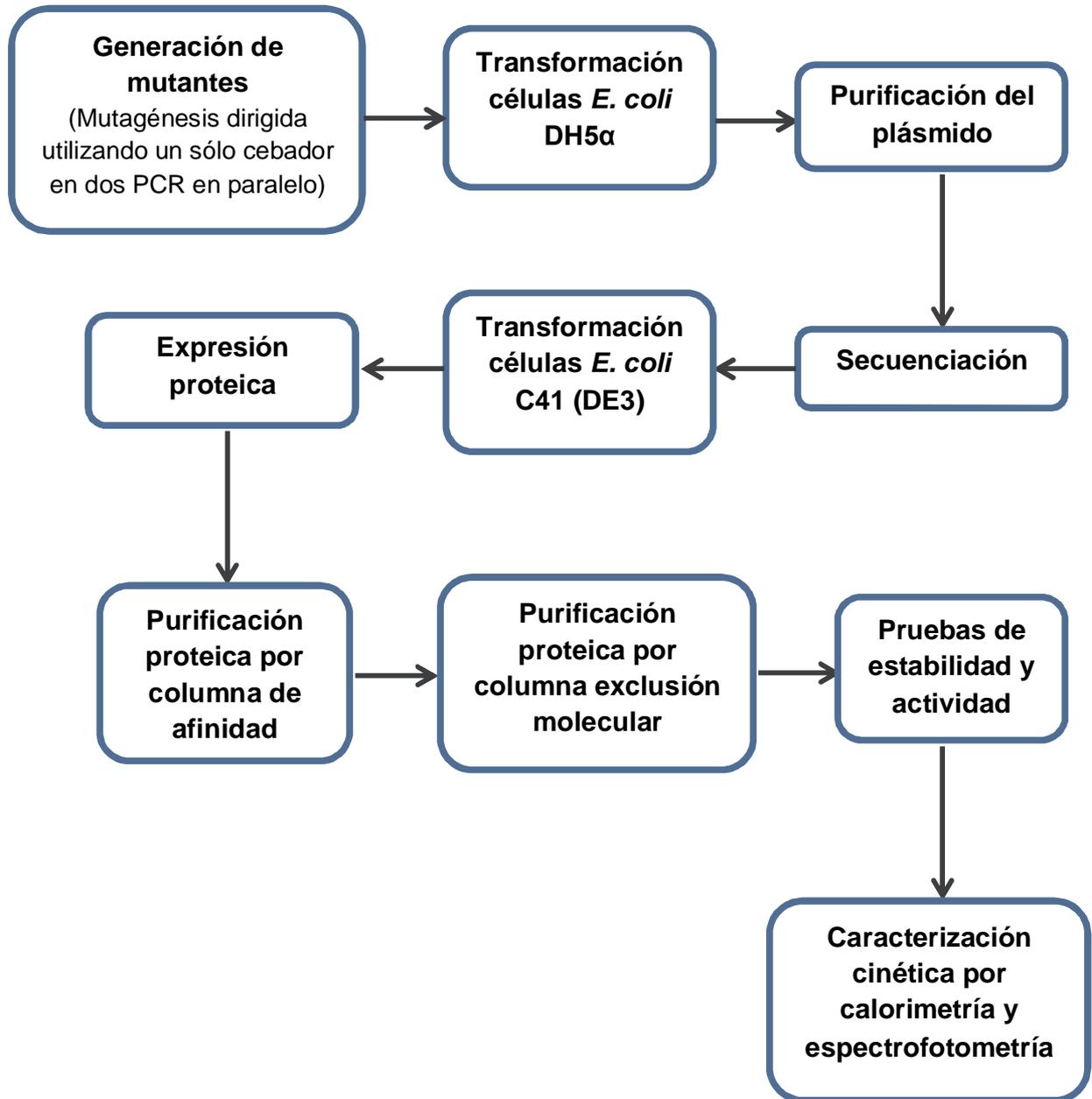
| Cebador | Secuencia | procedencia |
|----------|-----------------------------------|--|
| For C54S | ccggtgctggacagcggagagctcg | Sigma Diseñadas por autor de referencia [27]. |
| Rev C54S | cgagctctccgctgtccgcaccgg | |
| For C54A | gcacgagccggtgccgacggagagctcg | |
| Rev C54A | cgagctctccgctggcggcaccggctcgtgc | |
| For C54T | cacgagccggtgctgagcggagagctc | |
| Rev C54T | gagctctccgctgaccgcaccggctcgtg | |
| For C54D | cgcacgagccggtgcatccagcggagagctcgt | |
| Rev C54D | acgagctctccgctggatgcaccggctcgtgcg | |

Instrumentos y equipos

| Instrumento/Equipo | Marca |
|---------------------------------------|-----------------------------|
| Autoclave SK 101C/111C | Yamato Scientific America |
| Balanza analítica AT250 | Mettler Toledo |
| Baño de agua 5 | Julabo |
| Cámara de electroforesis | Thermo Scientific |
| Cámara de electroforesis Mini-protean | Bio-Rad |
| Centrífuga Siemensster | Hemle LaborTechnik |
| Columna de afinidad HisTrap HP | GE Healthcare Life Sciences |

| | |
|--|-----------------------------|
| Columna de exclusión molecular HiLoadSuperdex 200 16/600 GL | GE-Healthcare Life Sciences |
| Desionizador de agua Rios-D UV3 | Millipore |
| Espectrofotómetro 50 Bio UV-Visible | Varian Cary |
| Fuente de poder EC-300XL | Thermo Scientific |
| Fuente de poder Power Pac Basic | Bio-Rad |
| HPLC | Shimadzu Serie 20 |
| Incubadora IC103C/103CW | Yamato Scientific America |
| Incubadora New Brunswick Excella | Eppendorf |
| Lámpara UV MultiDoc-It | UVP |
| Megacentrífuga 16 Heraeus | Thermo Scientific |
| Pipetas (P2,P100,P200,P1000) | Eppendorf |
| Pipetas (P20,P100,P200,P1000) | Pipetman |
| Potenciómetro Orion Star pH A211 | Thermo Scientific |
| Roto-shake Genie | Scientific Industries |
| Sistema de purificación de agua UV | Millipore |
| Termociclador TC-3000 | Techne |
| Vortex | Scientific Industries |
| VP-ITC microcalorímetro | MicroCal |

Esquema general de trabajo



Reconocimiento del plásmido

Como control antes de iniciar todo el trabajo experimental, y con el fin de identificar el plásmido pET26b+*COS*, éste se analizó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% con amortiguador TAE. El gel se colocó en la cámara de electroforesis, se cargaron las muestras y se aplicó una diferencia de potencial de 80 volts por 30 minutos. También, se llevó a cabo la restricción del plásmido con las enzimas *Xho*I y *Nde*I, las cuales fueron utilizadas originalmente para la clonación (Figura 19).

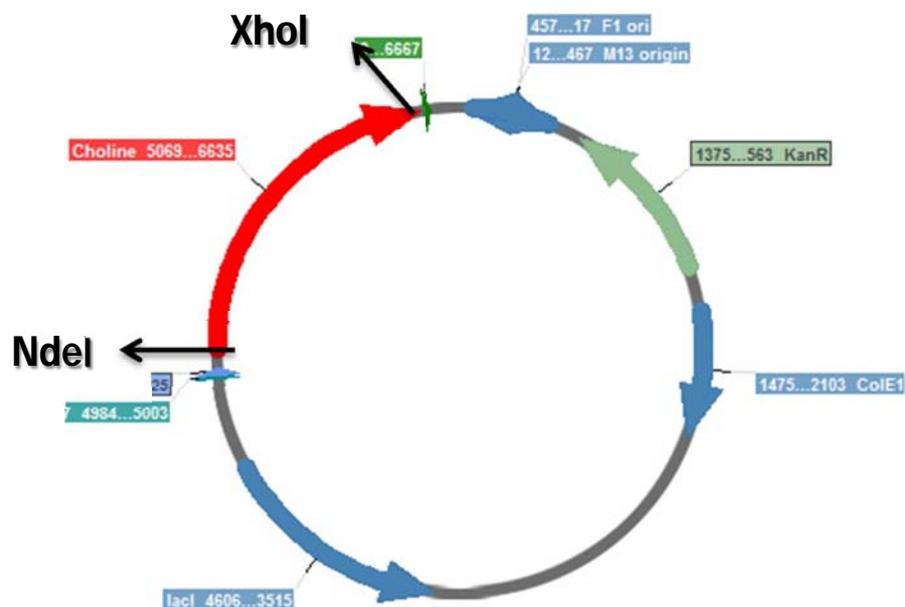


Figura 19. Plásmido pET26b+*COS*. Sitios de clonación (*Nde*I y *Xho*I) para *COS*

La longitud del gen del plásmido y de la sulfatasa de colina es de 5231 y 1575 pb, respectivamente. En la tabla 2 se muestran las condiciones a las que se llevó a cabo la digestión, la mezcla se incubó a 37 °C durante 4 horas.

Tabla 2. Condiciones de digestión

| Componente | Volumen (μL) |
|---|---------------------------|
| pET26b+COS [134 $\mu\text{g}/\text{mL}$] | 1.5 |
| Buffer cut smart | 1 |
| NdeI [20 U/ μL] | 0.2 |
| XhoI [10 U/ μL] | 0.4 |
| H ₂ O desionizada | 6.9 |

Tanto la muestra del plásmido digerido como la del plásmido no digerido se sometieron a electroforesis SDS-PAGE al 10%; se mezclaron 4 μL de muestra y 1 μL de buffer de carga de DNA 5X.

Mutagénesis dirigida utilizando dos PCRs en paralelo con un sólo cebador

La generación de mutantes se realizó por el método de Edelheit [52] que se distingue de los otros procedimientos de mutagénesis dirigida por utilizar dos PCR por separado, cada una con un sólo cebador del par que contienen la mutación de manera que se minimizan las alineaciones no deseadas entre cebadores y con ello las repeticiones en tándem. La reacción de polimerización comenzará por el cebador y recorrerá todo el plásmido completo (que contiene al gen de la proteína de interés COS) hasta alcanzar el otro extremo del cebador.

Ambas mezclas de reacción se mezclan una vez terminada los ciclos de polimerización. Posteriormente se realiza un proceso de desnaturalización-re naturalización lenta para promover distintas hibridaciones además de aquellas que se forman entre la cadena molde y la cadena sintetizada. Es importante notar que únicamente la cadena recién sintetizada porta la mutación y que el templado se encuentra metilado (como proceso natural de marcaje de DNA propio de la célula). Finalmente, se adiciona *DpnI* para degradar las moléculas metiladas.

Experimentalmente, se llevaron a cabo tres reacciones de PCR (figura 20), una de ellas contenía sólo uno de los cebadores que contenían la mutación (ver sección de cebadores utilizados), otra reacción contenía el cebador complementario (que también contenía la mutación) y la última se utilizó como control negativo pues no se le agrago cebador alguno. Los cebadores utilizados se habían diseñado ya anteriormente y se muestran en la tabla 3 [27]. Se trabajó con un volumen de reacción de 12.53 μ L descritas en la tabla 4.

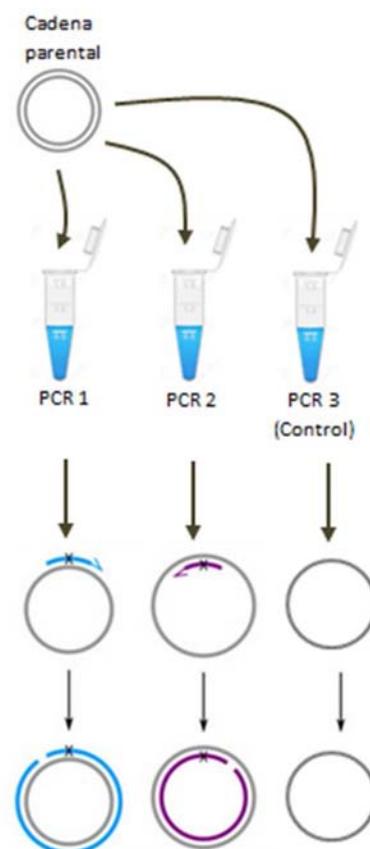


Figura 20. Reacciones de PCR independientes cada una con un cebador correspondiente y su control negativo.

Tabla 3. Cebadores utilizados

| Nombre del oligonucleotido | Secuencia 5' a 3' |
|----------------------------|-----------------------------------|
| For C54S | ccggtgcggacagcggagagctcg |
| Rev C54S | cgagctctccgctgtccgcaccgg |
| For C54A | gcacgagccggtgccccagcggagagctcg |
| Rev C54A | cgagctctccgctggcggcaccggctcgtgc |
| For C54T | cacgagccggtgcggtcagcggagagctc |
| Rev C54T | gagctctccgctgaccgcaccggctcgtg |
| For C54D | cgcacgagccggtgcatccagcggagagctcgt |
| Rev C54D | acgagctctccgctggatgcaccggctcgtgcg |

Protocolo general para la generación de mutantes (C54S, C54A, C54T y C54D).

1. Realizar la mezcla de reacción acorde a la tabla 4.

Tabla 4. Componentes de la mezcla de reacción de PCR

| Concentración final de cada componente | PCR 1 (µL) | PCR 2 (µL) | Control (µL) |
|---|------------|------------|--------------|
| 10X Buffer para la DNA polimerasa KOD Hot Start | 1.25 | 1.25 | 1.25 |
| 25 mM MgSO ₄ | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| dNTPs [2 mM cada uno] | 1.25 | 1.25 | 1.25 |
| cebador For [10 mM] | 0,2 | - | - |
| cebador Rev [10 mM] | - | 0.2 | - |
| DNA pET26b+COS [250 ng] | 2.5 | 2.5 | 2.5 |
| H ₂ O desionizada | 5.7 | 5.7 | 6.07 |
| Polimerasa KOD Hot Start DNA | 0.63 | 0.63 | 0.63 |
| Volumen total | 12.53 | 12.53 | 12.53 |

Se utilizó un termociclador TC-3000 (Techne) en el cual se llevó a cabo el programa descrito en la tabla 5.

Tabla 5. Programa de PCR

| | | |
|---------------------------|-----------|-------|
| Calentamiento de tapa | 105 °C | |
| Pre calentamiento de tapa | encendido | |
| Pausa | apagado | |
| | | |
| Desnaturalización inicial | 95.0 °C | 2 min |
| calentamiento inicial | apagado | |
| Etapa 1 | | |

Continuación tabla 5

| | | |
|----------------------|---------|--------------|
| Número de ciclos | 30 | |
| Paso 1 | 95.0 °C | 30 seg |
| Paso 2 | 57.0 °C | 30 seg |
| Paso 3 | 72.0 °C | 3 min 10 seg |
| | | |
| Fin de la extensión | apagado | |
| Conservación muestra | 10.0 °C | |

2. Mezclar las dos reacciones prestando especial atención en el óptimo mezclado. Se obtiene un volumen de 25.06 μL (excepto el control que no se mezcla) (figura 21).

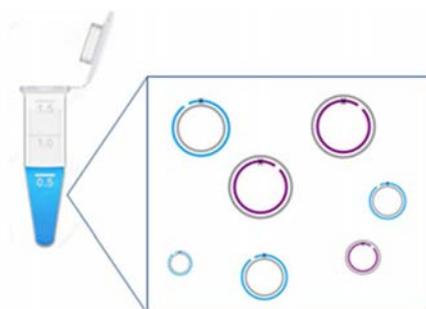


Figura 21. Mezcla de los productos de las dos PCR correspondientes.

3. Realizar el programa de desnaturalización-alineamiento descrito en la tabla 6, de manera que se tienen alineaciones del tipo: cadena parental-cadena sintetizada, cadena sintetizada-cadena sintetizada, cadena parental-cadena parental (figura 22).

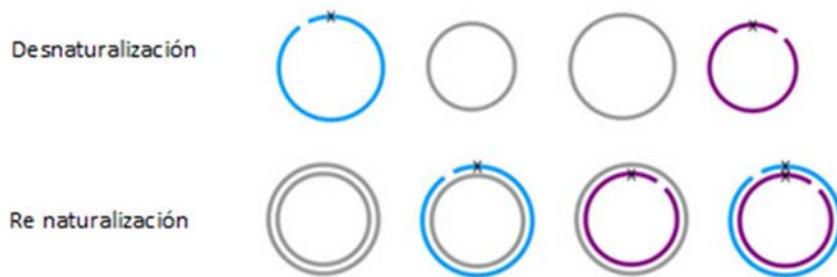


Figura 22. Proceso de desnaturalización y enfriamiento paulatino que promueve la alineación de cadenas mezcladas.

Tabla 6. Programa de desnaturalización-alineamiento PCR

| Paso | Temperatura (°C) | Tiempo (min) |
|------|------------------|--------------|
| 1 | 95 | 5 |
| 2 | 90 | 1 |
| 3 | 80 | 1 |
| 4 | 70 | 0.5 |
| 5 | 60 | 0.5 |
| 6 | 50 | 0.5 |
| 7 | 40 | 0.5 |
| 8 | 37 | Espera |

4. Digerir las cadenas metiladas con 15 unidades de la enzima *DpnI* (0.8 μ L, stock 20 000 U/ μ L) durante 16 horas a 37°C (figura 23) .

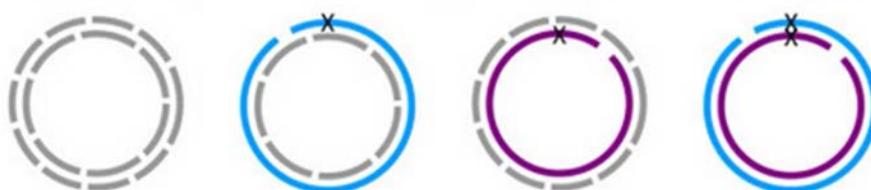


Figura 23. Digestión de las cadenas metiladas con *DpnI*.

5. Finalmente, utilizar la mezcla resultante para transformar bacterias de *E. coli* DH5 α utilizando el protocolo que se describe en el siguiente apartado. Sólo aquellos plásmidos de doble cadena y clonados en su totalidad serán los que transformen células de *E. coli* competentes.

Transformación de células de *E. coli* DH5 α

La transformación se realizó con células de *E. coli* DH5 α químicamente competentes preparadas según el método de Inoue [53]. Se realizaron modificaciones menores al procedimiento de transformación (descrito en el mismo protocolo del método de Inoue).

Protocolo:

- 1.-Agregar 25 ng de DNA (de 0.4 a 3 μ L de DNA, según la concentración de la muestra) a 50 μ L de células químicamente competentes. Mezclar cuidadosamente. Es importante manejar una muestra de bacterias a la cual no se le adicione ADN (control negativo) y transformar células con los “blancos” de la reacción de mutagénesis lo que permitirá saber si la enzima *DpnI* funcionó.
- 2.- Incubar en hielo durante 20 min.
- 3.-Tranferir las células a un baño de agua precalentado a 42 °C. La exposición se realizó durante exactamente 45 segundos.
- 4.-Inmediatamente después de transcurrido el shock térmico, la muestra se incubó en hielo durante 1 minuto (máximo 2 minutos).
- 5.-Adicionar cada muestra de células a 950 μ L de medio SOC independientes. Incubar el medio con células a 37 °C durante 1.5 horas con agitación vigorosa (250 rpm).
- 6.-Sembrar 150 μ L de cada muestra en placas independientes de agar SOB [MgSO₄ 20 mM]-Kan [50 μ g/mL].

7.- Posteriormente, centrifugar las células a 5000 rpm durante 3-4 minutos y retirar aproximadamente 700 μ L de medio. Volver a resuspender el pellet formado, incrementando así su concentración de células. Utilizar esta muestra para sembrar placas independientes de agar SOB [MgSO_4 20 mM]-Kan [50 μ g/mL].

8.- Almacenar las placas a temperatura ambiente hasta que todo el líquido sea absorbido.

9.-Incubar las placas en posición invertida a 37 °C durante 16-18 horas.

Purificación del plásmido

La purificación del plásmido se realizó siguiendo el protocolo del proveedor para el uso del kit de purificación de Jena Bioscience (Fast-n-Easy Plasmid Mini-Prep Kit)[54]. De las colonias resultantes de la transformación, se eligió una colonia aislada que se apostaba, tenía la mutación.

Dado que esta purificación es usada para realizar secuenciación, es esencial que la muestra se encuentre altamente concentrada por ello, se realizaron tres mini-preps independientes pero todas se conjuntaron en una sola columna y se eluye con un volumen reducido (40-50 μ L). Se observó que la elución del DNA es más efectiva si se realiza de manera fraccionada, es decir, adicionar 20 μ L (que es el volumen mínimo que se requiere para mojar la columna) y posteriormente el volumen restante para completar el volumen deseado.

La cuantificación de los plásmidos se realizó midiendo la absorbancia de una dilución 1:10 a una longitud de onda de 260 nm. Esta concentración se corrobora con un gel de agarosa al 1% con amortiguador TAE. No se realizó digestión del plásmido debido a que el objetivo principal es estimar una concentración adecuada para la secuenciación.

Secuenciación del ADN plasmidico

La secuenciación del ADN plasmidico recombinante se realizó en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Se utilizaron los cebadores universales para el promotor y el terminador T7 (ver figura 24). El equipo utilizado fue un secuenciador automático ABI PRISM 310 Genetic Analyser de Perkin-Elmer Applied Biosystems.

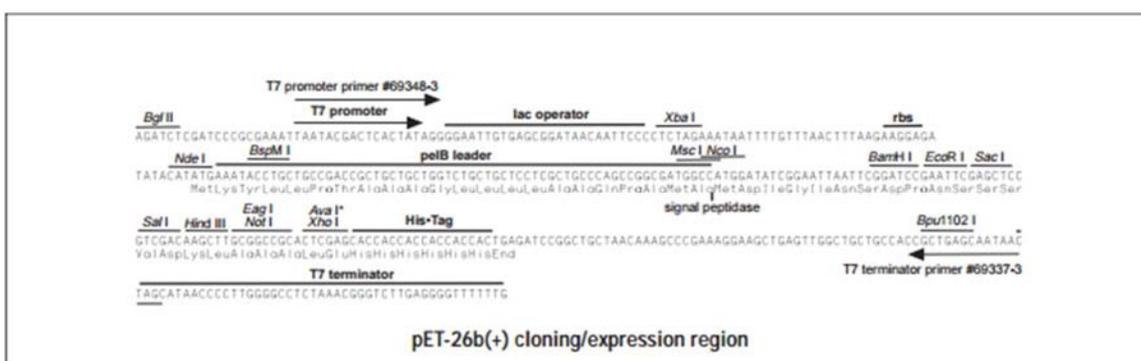


Figura 24. Región de expresión/clonación del plásmidos pET-26b(+). Se encuentra delimitada por secuencias correspondientes al promotor y terminador T7, los cebadores correspondientes son utilizados para amplificar el segmento y llevar a cabo la secuenciación.

Los electroferogramas se visualizaron utilizando el software gratuito FinchTV (<http://www.geospiza.com/ftvdinfo.html>). El análisis de las secuencias se realizó utilizando ExpASY-Translate tool [22] (<http://web.expasy.org/translate/>) al cual se exporta la secuencia de ADN en formato FASTA y se traduce automáticamente a secuencia de aminoácidos, esto permite identificar fácilmente codones de inicio. La alineación múltiple de secuencias de aminoácidos se realizó con ClustalW2 [55] (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) lo que permitió saber si se había llevado a cabo la mutación deseada además de identificar si existían mutaciones no deseadas.

Transformación de células de *E. coli* C41 DE3

Una vez que se corroboró mediante la secuenciación del ADN que se tenía la mutación deseada (y ninguna mutación no deseada) se llevó a cabo la transformación de células *E. coli* C41 DE3.

Al igual que la transformación de células de *E. coli* DH5 α , las células de *E. coli* C41 DE3 se trataron químicamente siguiendo el método de Inoue [53] con modificaciones menores para hacerlas competentes. El protocolo se detalla en la sección de “Transformación de células de *E. coli* DH5 α ”.

Expresión proteica

El plásmido pET26b se encuentra bajo el control del promotor del bacteriófago T7. En cepas con el sistema de expresión DE3 integrado a su cromosoma (como C41 (DE3) o BL21 (DE3)), el gen que codifica para la polimerasa originaria del virus T7 se encuentra a su vez bajo el control del promotor lacUV5 (codificado también en el cromosoma bacteriano), de manera que los niveles de expresión pueden ser regulados añadiendo IPTG al medio [56].

Protocolo:

1. Inocular de 3-5 mL de medio LB-kanamicina [50 $\mu\text{g}/\text{mL}$] con una colonia de *E. coli* C41 (DE3) transformada con el plásmido de interés (mutantes C54S, C54D, C54A, C54T). Dejar crecer durante 16 horas.
2. Utilizar el precultivo para inocular a 500 mL de medio LB-kanamicina [50 $\mu\text{g}/\text{mL}$] e incubar a 37 °C por aproximadamente 3 horas (cuando son diluciones 1:100) y con agitación vigorosa (250 rpm) hasta que se alcance una $D_{\lambda=600\text{ nm}}$ de 0.5-0.6.
3. Una vez alcanzada la densidad óptica adecuada, adicionar 500 μL de IPTG [1 M] de modo que obtenga una concentración final de 1 mM.

4. Incubar a 30 °C durante 6 horas.
5. Recolectar las células por centrifugación a 10 000 rpm durante 5 minutos.
6. El sobrenadante puede ser desechado y el pellet almacenado a -20 °C para su posterior utilización.

Purificación proteica

Lisis celular

Debido a que la proteína expresada se almacena en el citoplasma celular, se necesitan lisar las células para extraer la proteína.

Protocolo

1. Resuspender el pellet en 20 mL de buffer de Lisis (NaCl 500 mM, Imidazol 20 mM, Tris-HCl 50 mM pH 7.4), es decir 1/25 del volumen original de cultivo.
2. Adicionar 2 mL de lisozima [10 mg/mL], para alcanzar una concentración final de 1mg/mL. Incubar en hielo durante 30 minutos.
3. Sonicar en ciclos alternados de 15 segundos de sonicación y 30 segundos de reposo, durante un tiempo total de sonicado de 8 minutos con una potencia de 4 W.
4. Centrifugar la muestra a 15 000 rpm durante 45 minutos a temperaturas preferentemente bajas (4 °C).

5. Recuperar el sobrenadante (extracto crudo) y filtrar con filtro de 0.22 μM para asegurarse de que no queden partículas que pudieran obstruir las columnas de purificación.

Se recomienda mantener en hielo la muestra durante todo el proceso.

Purificación por columna de afinidad

Una característica muy útil de las proteínas recombinantes que permite su fácil purificación, es que pueden estar provistas de una cola de histidinas. En este caso, todas las mutantes expresadas (C54S, C54D, C54T, C54A) tienen una cola de seis histidinas en su extremo carboxilo terminal, de modo que fue posible purificarlas por medio de la columna de afinidad HisTrap HP cargadas con níquel.

Protocolo:

1. Lavar la columna con al menos tres volúmenes de agua.
2. Equilibrar la columna con 5 volúmenes de buffer de lisis (NaCl 500 mM, Imidazol 20 mM, Tris-HCl 50 mM pH 7.4).
3. Aplicar el extracto crudo a la columna por la parte inferior de la columna para lo cual se necesita tener un acoplador hembra-hembra que permita conectar a la jeringa con la parte saliente de la columna. Este proceso permite obtener, en cierta medida, la muestra concentrada en un volumen pequeño al final de la purificación. Se aplica mejor a volúmenes pequeños de muestra.
4. Lavar la columna con 5 volúmenes de buffer de lisis/bajo imidazol (NaCl 500 mM, Imidazol 20 mM, Tris-HCl 50 mM pH 7.4). El imidazol permite disminuir las uniones inespecíficas de proteínas.

5. Invertir el sistema de modo que se introduzca el buffer de alto imidazol por la parte superior de la columna. Eluir la proteína con 7 volúmenes de columna de buffer de alto imidazol (NaCl 500 mM, Imidazol 250 mM, Tris-HCl 50 mM pH 7.4). Recolectar fracciones de 1 mililitro incubadas siempre en hielo. Por lo general la proteína se encuentra concentrada en las primeras cuatro fracciones. La concentración de proteína se puede estimar utilizando el reactivo de Bradford. En el presente trabajo se manejaron 80 μ L del reactivo de Bradford y 1.6 μ L de cada fracción.

Purificación por columna de exclusión molecular

A pesar de que la purificación por columna de afinidad es buena, es recomendable realizar una purificación adicional con la columna de exclusión molecular que además de separar las proteínas por tamaño ajenas a la proteína de interés y agregados de la misma, también permite desalar la muestra y hacer cambio de buffer. Los extractos resultantes de la columna de afinidad pueden ser sometidos directamente a la purificación por exclusión molecular.

Para usar la columna de filtración en gel se requiere usar HPLC ya que la presión a la que se trabaja la columna así como los volúmenes manejados son grandes.

Protocolo:

1. Asegurarse que el HPLC se encuentre limpio de sustancias externas. Conectar la columna.
2. Hacer pasar 2 volúmenes de columna de agua para eliminar restos de etanol al 20% en el que se debe almacenar la columna.
3. Equilibrar la columna con 2 volúmenes de buffer Tris-HCl (20 mM) pH 7.4.

4. Preparar y establecer las condiciones de elución a 0.25 mL/min. Fijar presión máxima a no rebasar, en este caso 25 bar. Establecer absorbancia a 280 nm y 220 nm.
5. Inyectar la muestra. En la columna utilizada y bajo las condiciones antes mencionada, la proteína sale de la columna al minuto 39-45 por lo que son estas fracciones las que deben ser recolectadas. Se recuerda mantener las muestras siempre en hielo.

Es importante mencionar que es poco recomendable almacenar las proteínas manejadas en este trabajo cuando éstas se encuentran en buffer de alta concentración de sales pues son poco estables y gran parte de la muestra se precipita. Se optó por hacer todo el proceso de purificación en un solo día o bien, hacer cambio de buffer (por diálisis o utilizando unidades centricon), almacenar y dejar la purificación por filtración en gel para otro momento.

Las fracciones de proteína resultantes de la purificación de proteína por las columnas antes mencionadas, se analizaron en un gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 10% al cual se le aplicó una diferencia de potencial de 120 V por 120 minutos. (Buffer de carga 5X: 4.8 ml H₂O; 0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 1.2 ml; Glicerol 1 ml; SDS al 10%, 2ml; Azul de bromofenol al 0.1%, 0.5ml), BME (Beta-Mercaptoethanol).

Cuantificación de proteína

La concentración de todas las sulfatasas recombinantes se realizó por medio de espectrofotometría, midiendo la absorbancia de la muestra (en buffer de reacción) a una longitud de 280 nm. Además, se utilizó el coeficiente de extinción molar teórico calculado con ProtParam tool de ExPASy (<http://web.expasy.org/protparam/>) el cual tiene un valor de 97,750 M⁻¹ cm⁻¹ para todas las proteínas recombinantes. Partiendo de la ley de Beer-Lambert, se

despeja la concentración. El peso molecular de la proteína nativa fue determinado detallada y experimentalmente por Sanchez [27], obteniendo que COS tiene un peso molecular de 59 kDa, sin embargo, se observó que en solución la proteína se encontraba en forma dimérica con un peso de 118 kDa.

Pruebas de estabilidad

Se prepararon cinco buffers 5x (1 M Tris) con distinta concentración de sal (tabla 7) para conocer las mejores condiciones de reacción de las enzimas recombinantes. Los volúmenes agregados se muestran en la tabla 8. La mutante utilizada para esta prueba fue la C54S ya que se había utilizado para pruebas utilizando ITC. Las muestras se incubaron también en hielo durante 30 minutos.

Tabla 7. Buffers 5X (1M Tris) con distintas concentraciones de NaCl con C54S

| | Tris-HCl [M] | NaCl [mM] |
|----------|--------------|-----------|
| Buffer 1 | 1 | 500 |
| Buffer 2 | 1 | 250 |
| Buffer 3 | 1 | 100 |
| Buffer 4 | 1 | 50 |
| Buffer 5 | 1 | 0 |

Tabla 8. Mezcla para pruebas de actividad mutante C54S

| | Buffer 1 | Buffer 2 | Buffer 3 | Buffer 4 | Buffer 5 |
|---|----------|----------|----------|----------|----------|
| Buffer 5X (µL) Concentración final 1x | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| C54S [1.17×10^{-4} M] (µL) Concentración final 82×10^{-6} M | 14 | 14 | 14 | 14 | 14 |
| H ₂ O desionizada (µL) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Volumen total (µL) | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 |

Pruebas cinéticas indagatorias

Inmediatamente después de la purificación por HisTrap HP, se realizaron pruebas indagatorias de actividad utilizando la fracción más concentrada de proteína. La mezcla de reacción se incubó a 37 °C durante 24 horas. Las condiciones de reacción se describen en la tabla 9.

Se utilizó el sustrato artificial de las enzimas recombinantes, el p-nitrofenilsulfato (pNPS), que al ser hidrolizado produce un color amarillo que permite seguir la reacción midiendo su absorbancia a una longitud de onda de 420 nm.

Tabla 9. Condiciones indagatorias de actividad.

| | C54S | C54A | C54D | C54T |
|--|------|------|------|------|
| Enzima (fracción HisTrap HP) (μL) | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Buffer de reacción 5X [1 M NaCl, 1M Tris-HCl] (μL) Concentración final 1x | 5 | 5 | 5 | 5 |
| pNPS [0.1 M] (μL) Concentración final 24 mM | 6 | 6 | 6 | 6 |
| H ₂ O desionizada (μL) | 4 | 4 | 4 | 4 |
| Volumen total (μL) | 25 | 25 | 25 | 25 |

De las cuatro mutantes, la que mayor actividad mostró fue la mutante C54S. Estos resultados se discutirán ampliamente en la sección de resultados, sin embargo, tomando esto en cuenta, se midió la cinética de tres reacciones enzimáticas con distintas concentraciones de C54S para determinar qué concentración de enzima producía un delta de absorbancia adecuado para poder caracterizar cinéticamente a C54S (Tabla 10).

Tabla 10. Concentración final de C54S para pruebas indagatorias de actividad

| Concentración de C54S→ | 1 μ M | 5 μ M | 10 μ M | Blanco |
|--|-----------|-----------|------------|--------|
| H ₂ O desionizada (μ L) | 30.22 | 23.11 | 14.21 | 32 |
| Buffer 5X [1 M NaCl, 1M Tris-HCl] (μ L) Concentración final 1x | 16 | 16 | 16 | 16 |
| pNPS [0.1 M] (μ L) Concentración final 40 mM | 32 | 32 | 32 | 32 |
| C54S [4.5×10^{-5} M] (μ L) | 1.78 | 8.89 | 17.79 | 0 |
| Volumen final (μ L) | 80 | 80 | 80 | 80 |

Caracterización cinética por espectrofotometría

De acuerdo a las pruebas indagatorias de estabilidad y actividad, se procedió a caracterizar propiamente la enzima bajo las condiciones de reacción descritas en la tabla 11. Se tiene entonces una concentración de 12 μ M de C54S.

Tabla 11. Mezclas de reacción para la caracterización cinética

| | Concentración de pNPS (mM) | | | | | |
|--|----------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | 20 | 40 | 60 | 80 | Blanco 1 | Blanco 2 |
| H ₂ O desionizada (μ L) | 45 | 34 | 23 | 12 | 54 | 21 |
| Buffer 5X [1 M Tris 1 M NaCl] (μ L) Concentración final 1x | 16 | 16 | 16 | 16 | 16 | 16 |
| pNPS [150 mM] (μ L) Concentración final variable | 10 | 20 | 32 | 43 | 10 | 43 |
| C54S [1.011×10^{-4}] (μ L) Concentración final 12 μ M | 9 | 9 | 9 | 9 | 0 | 0 |
| Volumen final (μ L) | 80 μ L | 80 μ L | 80 μ L | 80 μ L | 80 μ L | 80 μ L |

Para minimizar el error experimental, se recomienda hacer mezclas maestras considerando los componentes comunes, como lo es el buffer y la enzima. Las mediciones se realizaron en celdas de cuarzo de 80 μ L (ver sección de equipo).

También se realizaron pruebas formales para las mutantes C54A, C54T Y C54D que descartarán la viabilidad de caracterizarlas contra el *p*-nitrofenilsulfato por técnicas convencionales (tabla 12). Se manejó una concentración final de enzima de 40 μ M de 30 mM de *p*NPS. Las muestras se incubaron durante 24 horas a 20 $^{\circ}$ C.

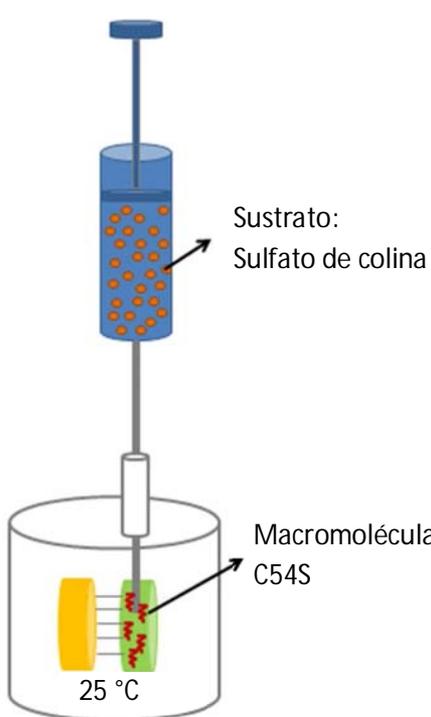
Tabla 12. Prueba de niveles de actividad para las mutantes C54A, C54T, C54D

| | C54T | C54D | C54A |
|--|-------------|-------------|-------------|
| Enzima [concentración inicial variable] [concentración final 40 μ M] (μ L) | 69 | 27 | 9 |
| Buffer 5x (μ L) concentración final 1X | 24 | 24 | 24 |
| <i>p</i> NPS [190 mM] concentración final 30 mM | 19 | 19 | 19 |
| H ₂ O (μ L) | 8 | 51 | 68 |
| | 120 μ M | 120 μ M | 120 μ M |

Caracterización cinética por calorimetría (ITC)

La mutante C54S también se caracterizó contra su sustrato natural, el sulfato de colina por medio de calorimetría de titulación isotérmica con el equipo VP-ITC. Las condiciones finales de reacción se muestran en el tabla 13. Se recomienda leer el manual de usuario para el correcto uso del ITC [43].

Tabla 13. Resumen de las condiciones de caracterización cinética por ITC

| | | | | | | |
|--|---|-----------------------------|--------|---|--------------|------|
|  <p>Sustrato: Sulfato de colina</p> <p>Macromolécula C54S</p> <p>25 °C</p> | Concentraciones finales | | | | | |
| | <table border="1"> <tbody> <tr> <td>Sulfato de colina (jeringa)</td> <td rowspan="2">150 mM</td> </tr> <tr> <td>*En buffer 1X [200 mM Tris 200 mM NaCl]</td> </tr> <tr> <td>C54S (celda)</td> <td>5 μM</td> </tr> </tbody> </table> | Sulfato de colina (jeringa) | 150 mM | *En buffer 1X [200 mM Tris 200 mM NaCl] | C54S (celda) | 5 μM |
| Sulfato de colina (jeringa) | 150 mM | | | | | |
| *En buffer 1X [200 mM Tris 200 mM NaCl] | | | | | | |
| C54S (celda) | 5 μM | | | | | |
| | Condiciones de experimento | | | | | |
| | Número de inyecciones | 20 | | | | |
| | Temperatura de la celda | 25 °C | | | | |
| | Potencia de referencia (μcal/sec) (1-34.9) | 25 | | | | |
| | Retardo inicial | 300 | | | | |
| | Velocidad de mezclado | 300 | | | | |
| | Modo de retroalimentación | alto | | | | |
| | Volumen de inyección | 10 μL | | | | |
| | Duración | 17.1 s | | | | |
| | Espaciamiento | 400 s | | | | |
| | Periodo de filtro | 2 (Hertz) | | | | |
| | Mezcla de reacción: celda ITC | | | | | |
| | | Volumen (μL) | | | | |
| | H ₂ O desionizada | 1515 | | | | |
| | Buffer 5X [1 M Tris 1 M NaCl] | 400 | | | | |
| | C54S | 85 | | | | |
| | Volumen total | 2000 | | | | |

8. Resultados y discusión

Reconocimiento del plásmido pET-26b+

En la figura 25 se muestra la electroforesis realizada al plásmido pET26b-COS digerido y se compara con el plásmido sin digerir. Los pesos en los que se ubican las dos bandas del carril (2) corresponden a COS (1575 pb) y al plásmido vacío (5231 pb). El plásmido sin digerir (carril 1) muestra tener un peso aparentemente mayor a 6806 pb lo que se explica por la asociación no específica entre más de un plásmido.

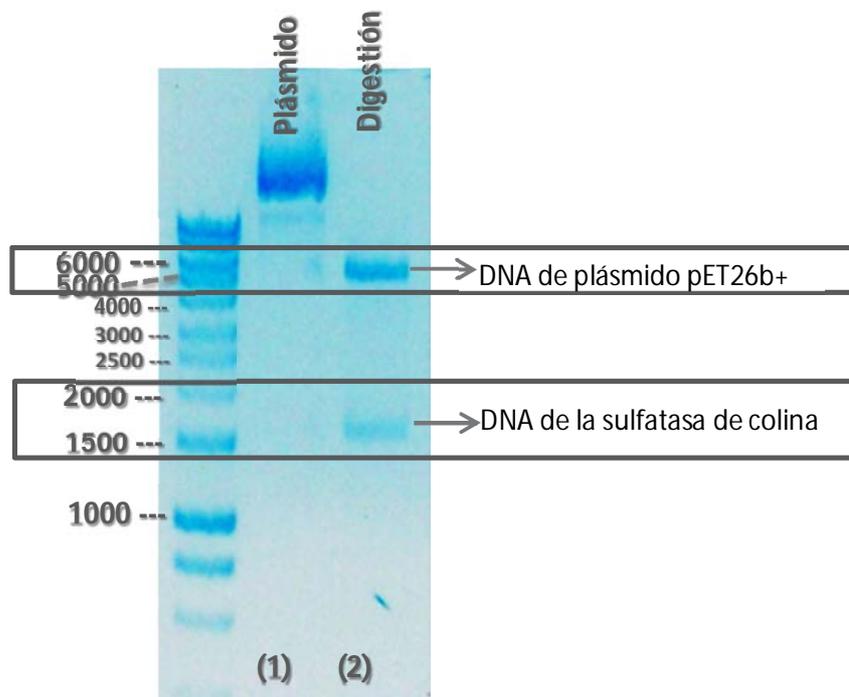


Figura 25. Electroforesis (en agarosa al 1%) del plásmido pET26b+*COS*: sin digerir (carril 1) y ya digerido (carril 2) con *Xho*I y *Nde*I.

Transformación de células DH5 α

Las eficiencias de la transformación, se muestran en la tabla 14.

Tabla 14. Eficiencias de la transformación

| Muestra | Número de colonias | |
|---------|--------------------|--------|
| | mutagénesis | blanco |
| C54A | 11 | 0 |
| C54T | 15 | 5 |
| C54S | 34 | 0 |
| C54D | 23 | 0 |

Purificación del plásmido

La confirmación de la concentración e identidad del plásmido para la secuenciación se muestra en la figura 26.

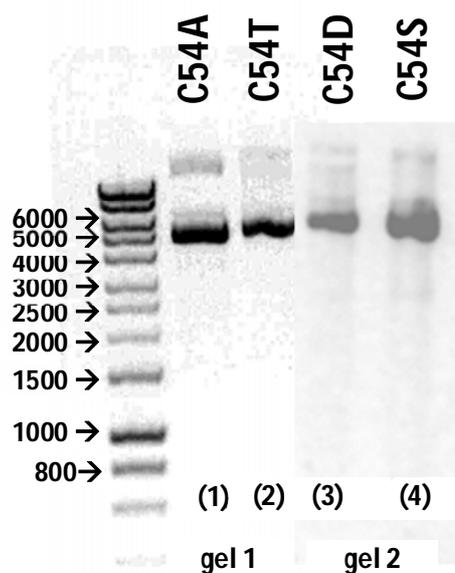
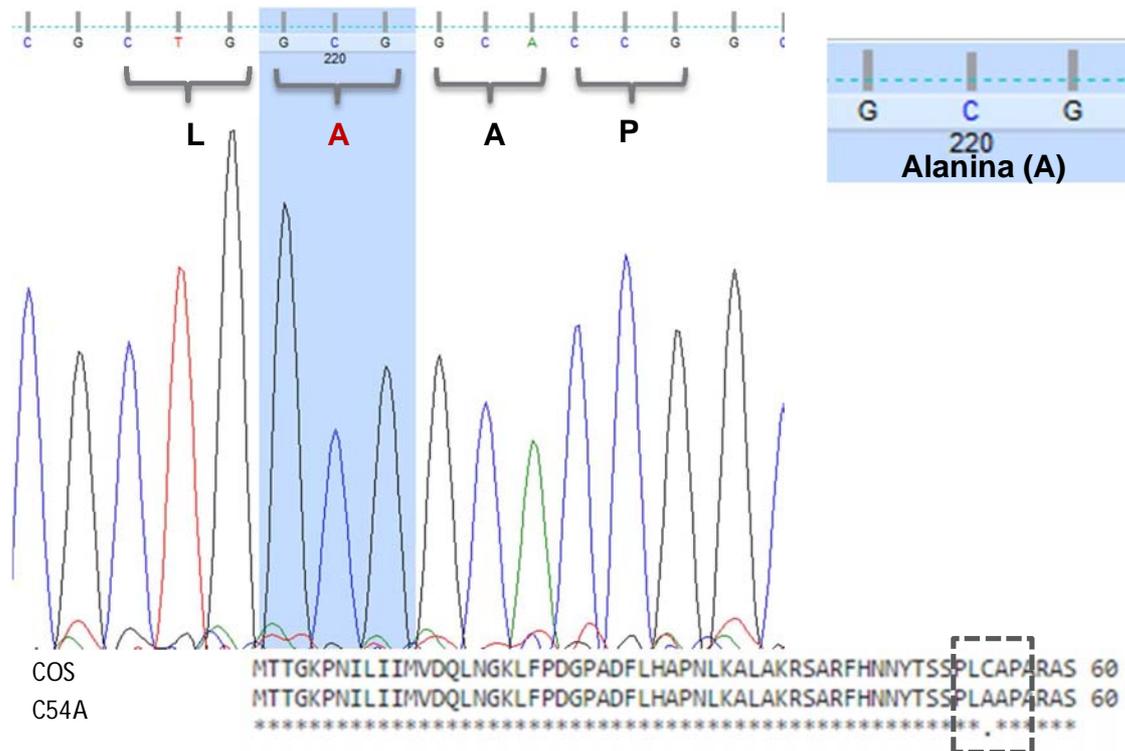
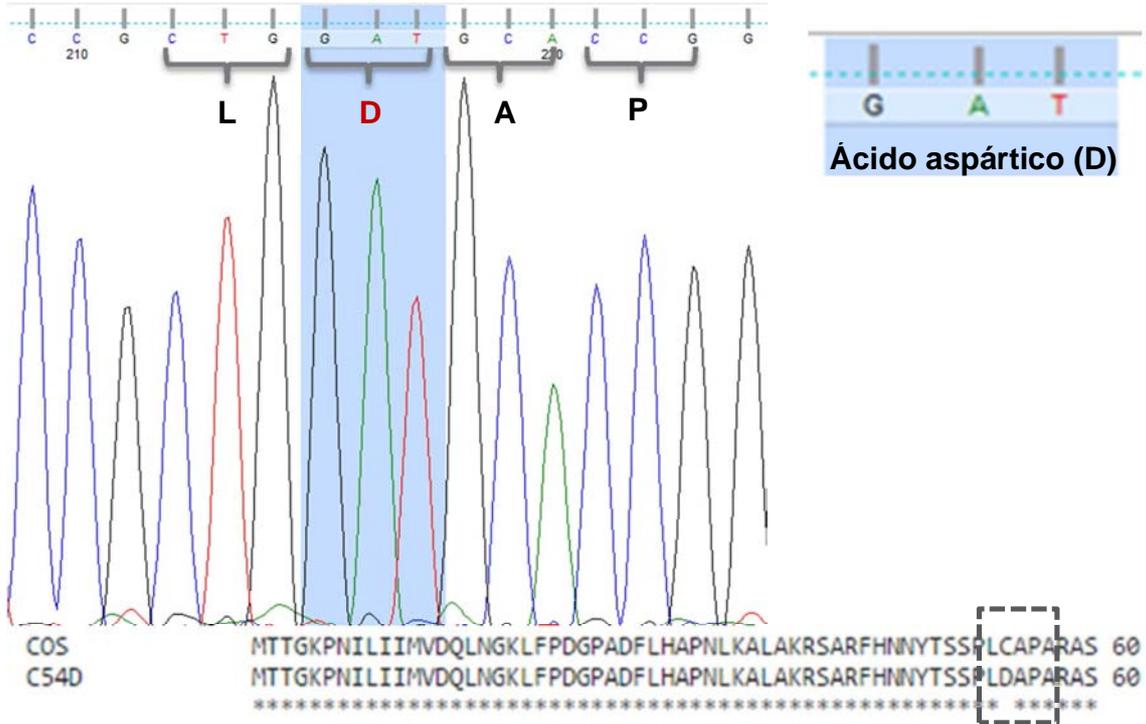


Figura 26. Electroforesis de agarosa al 1% de las purificaciones de las mutantes (pET26b + mutante de sulfatasa de colina) C54A, C54T, C54D, C54S en el carril (1), (2), (3) y (4) respectivamente.

Secuenciación

En la figura 27, se muestra el análisis de la secuencia de cada una de las mutantes. Se pueden observar el cambio en la secuencia de DNA y el cambio en la secuencia de aminoácidos. Las secuencias completas se muestran en el anexo.



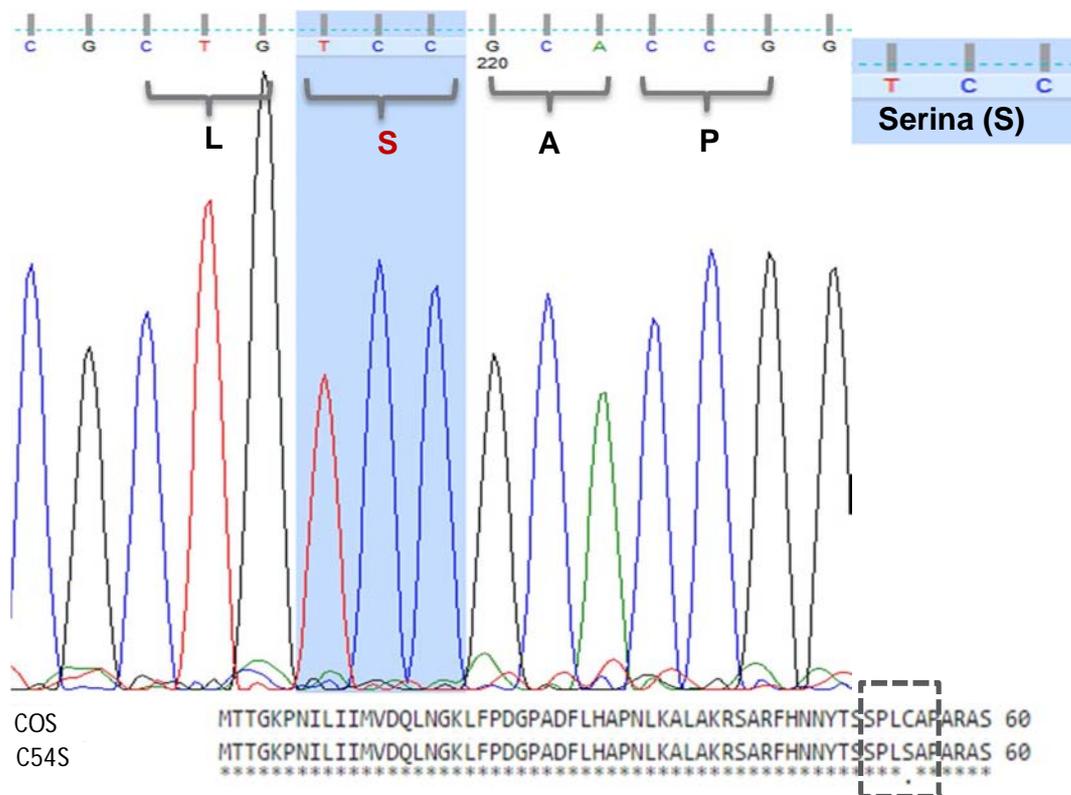
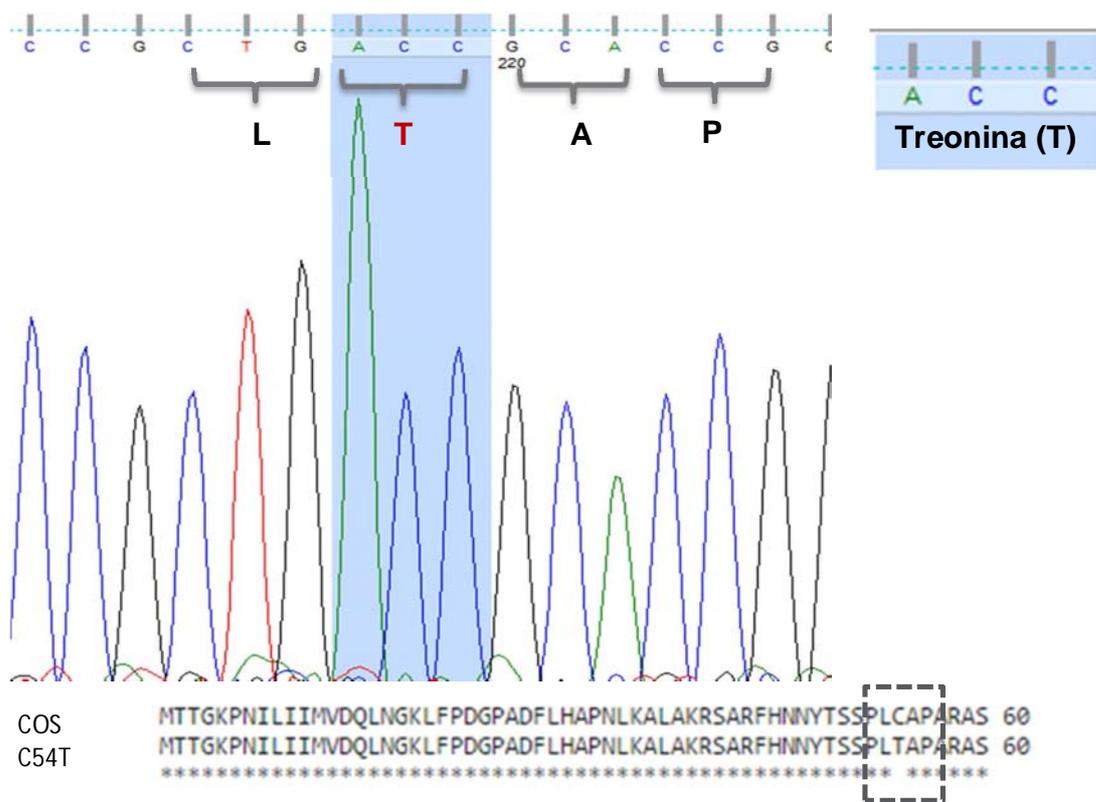


Figura 27. Secuenciaciones de las mutantes C54D, C54A, C54T, C54S

Purificación y cuantificación de proteína.

Columna de afinidad: HisTrap HP

Como se describió en la sección de materiales y métodos, la primera fase de la purificación proteica realizada con la columna HisTrap HP se realizó en un solo paso (no se aplicó un gradiente de imidazol). Usar el reactivo de Bradford permitió seguir de manera adecuada las concentraciones relativas (con respecto al blanco) y cualitativas de proteína (figura 28).



Figura 28. Fotografía representativa de una sección de un plato de 96 pozos donde se llevó a cabo el seguimiento cualitativo de la concentración de proteína de las fracciones obtenidas de la purificación por columna de afinidad HisTrap HP de las mutantes C54S, C54D, C54T y C54A.

Purificación por cromatografía de filtración en gel

En la figura 29 se muestra un cromatograma representativo de la purificación de las mutantes de COS por columna de exclusión molecular. Como se puede observar, la proteína eluye de la columna al minuto 40 aproximadamente.

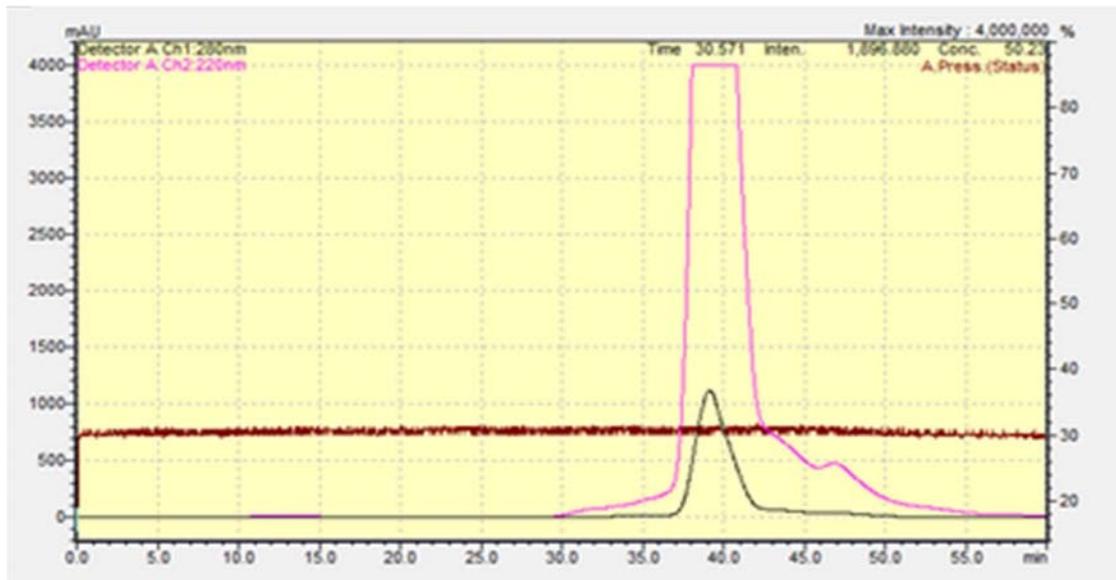


Figura 29. Cromatograma representativo de la purificación de las mutantes C54S, C54D, C54D Y C54T por cromatografía de exclusión molecular HiLoadSuperdex 200 16/600 GL. La enzima eluye de la columna al minuto 40 aproximadamente con un flujo de 0.25 mL/min.

En las figuras 30 y 31 se muestra los geles de poliacrilamida SDS-PAGE al 10% que reúne las distintas muestras obtenidas tras la purificación por columna de afinidad (HisTrap) y de exclusión molecular (HiLoadSuperdex 200 16/600 GL).

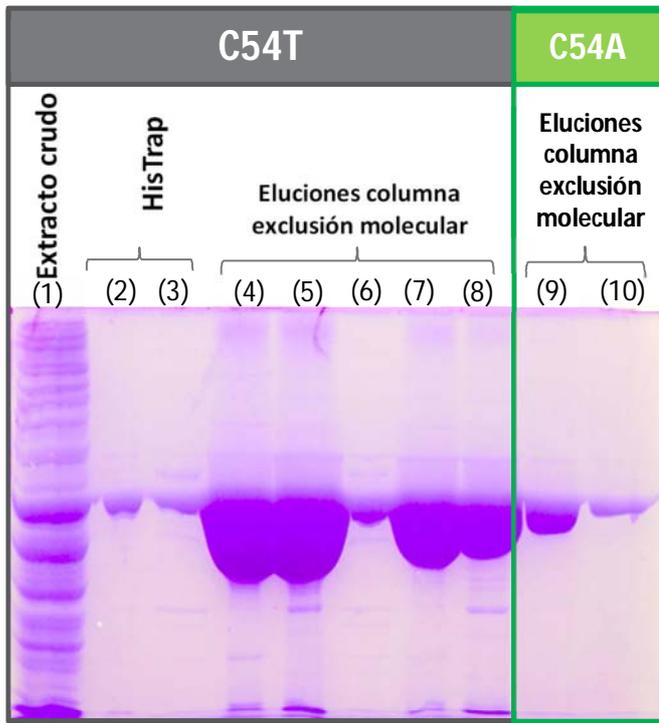


Figura 30. Gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 10% de las fracciones finales recolectadas de las purificaciones por cromatografía afinidad (HisTrap) y de exclusión molecular (HiLoadSuperdex 200 16/600 GL) de las mutantes C54T y C54A. Las fracciones se describen arriba de su carril correspondiente.

(1) → Extracto crudo mutante C54T
 (2)(3) → Fracciones HisTrap mutante C54T
 (en buffer 500 mM NaCl, 250 mM imidazol, 50 mM Tris-HCl)
 (4) a (8) → Fracciones columna de exclusión molecular mutante C54T
 (en buffer 20 Mm)
 (9) y (10) → Fracciones columna de exclusión molecular mutante C54A
 (en buffer 20 Mm)

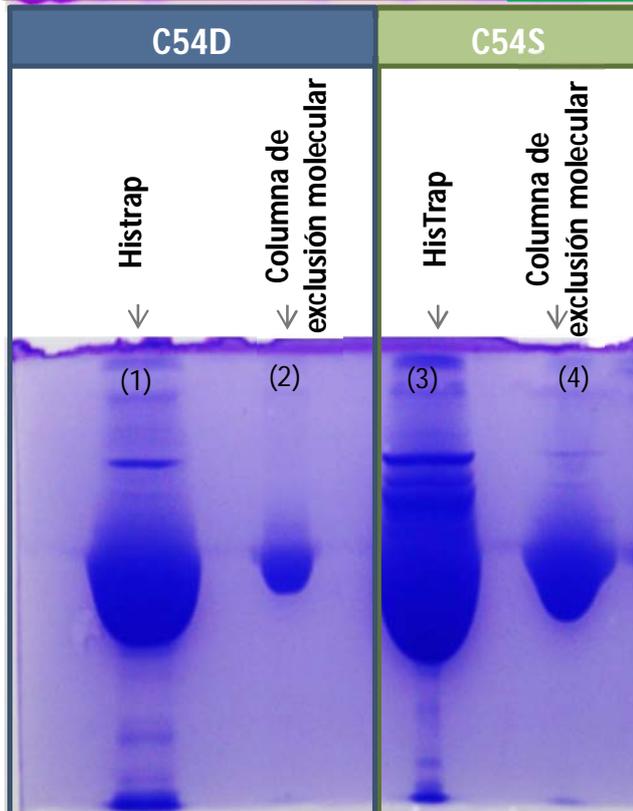


Figura 31. Gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 10% de las fracciones recolectadas de las purificaciones por cromatografía afinidad (HisTrap) y de exclusión molecular (HiLoadSuperdex 200 16/600 GL) de las mutantes C54D y C54S.

(1) → Fracciones HisTrap mutante C54D
 (en buffer 500 mM NaCl, 250 mM imidazol, 50 mM Tris-HCl)
 (2) → Fracciones columna de exclusión molecular mutante C54d
 (en buffer 20 Mm)
 (3) → Fracciones HisTrap mutante C54S
 (en buffer 500 mM NaCl, 250 mM imidazol, 50 mM Tris-HCl)
 (4) → Fracciones columna de exclusión molecular mutante C54S
 (en buffer 20 Mm)

Las muestras resultantes de la purificación tenían una concentración promedio de 4.35×10^{-5} M (2.74 mg/mL) y, por lo general, se obtenían de 5-6 mL de disolución de proteína, de manera que se obtenían 16.44 mg de proteína en promedio por cada medio litro de cultivo.

Resultados de pruebas de estabilidad previas

Todas las muestras de C54S resultaron ser estables en todo el rango de concentración de NaCl (tabla 7), es decir, no se observó precipitación alguna, recordando que esta mutante se tomó como modelo representativo de estudio de todas las mutantes. Las muestras fueron también estables cuando se incubaron en hielo, la precipitación tampoco se hizo visible.

Curva patrón

Mediante una curva patrón de 4-nitrofenol (p-nitrofenol, pNP) a 420 nm a un pH de 7.4 se obtuvo un coeficiente de absortividad molar de $4820.27 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (figura 32).

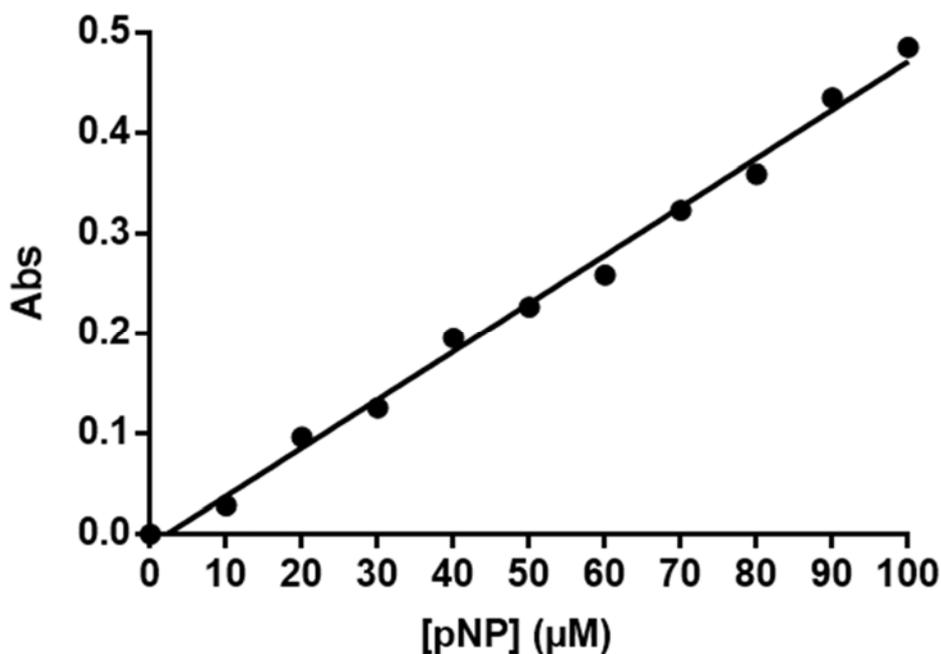


Figura 32. Curva patrón 4-nitrofenol a 420 nm a un pH de 7.4

Pruebas cinéticas indagatorias de actividad

Con las pruebas indagatorias de actividad (Tabla 15) fue posible estimar el nivel de actividad que tenía cada una de las mutantes. Esta prueba permitió observar que las enzimas recombinantes eran inestables a temperaturas “altas” (20-30 °C) y que además, la que presentaba mayor actividad era C54S. Se tomó una fracción directa de la purificación por HisTrap HP porque, como se menciona en el protocolo, es una muestra altamente concentrada.

Tabla 15. Pruebas indagatorias de actividad

| Mutante | Observaciones | Δ Abs |
|---------|---------------|---------------|
| C54A | precipitación | No detectable |
| C54T | precipitación | No detectable |
| C54D | precipitación | No detectable |
| C54S | precipitación | Detectable |

Con respecto a la mutante C54S, se determinó que una concentración adecuada de ésta para obtener la curva de velocidades iniciales vs concentración de sustrato era de 12 μ M de acuerdo al delta de absorbancia presentado (figura 33). Así mismo, permitió observar la linealidad entre concentración de enzima y la velocidad inicial.

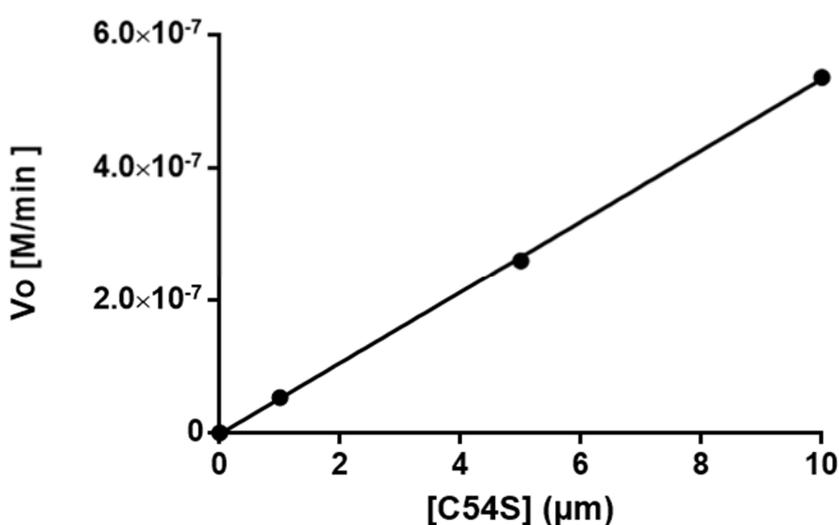


Figura 33. Gráfica de velocidad inicial de la hidrólisis de pNPS contra la concentración de la mutante C54S.

Resultados de la caracterización cinética por espectroscopía UV-VIS

En la tabla 16, se puede observar que para las mutantes C54A, C54T y C54D no fue posible detectar actividad en el tiempo establecido. Este comportamiento concuerda con lo esperado para C54A pues ésta no es por lo general un buen nucleófilo.

Tabla 16. Resultados pruebas cinéticas rigurosas de C54T, C54A y C54D con pNPS

| Mutante | Observaciones | Δ Abs |
|---------|---------------|---------------|
| C54A | precipitación | No detectable |
| C54T | precipitación | No detectable |
| C54D | precipitación | No detectable |

Con respecto a C54S, los valores de las velocidades iniciales graficadas contra la concentración de sustrato (figura 34), corroboraron que el comportamiento se ajusta al modelo de Michaelis-Menten obteniendo los valores de **116.00 mM \pm 30.90**, **3.19 x 10⁻³ s⁻¹ \pm 3.08 x 10⁻⁴** y **6.66 x 10⁻⁹ Ms⁻¹ \pm 3.68 x 10⁻¹⁰** para la **K_m , k_{cat} y V_{max}** respectivamente. Como puede observarse en la figura 33, no se llegó a la saturación debido a que se alcanzó el límite de solubilidad del sustrato lo cual ocasiona los altos errores de los parámetros.

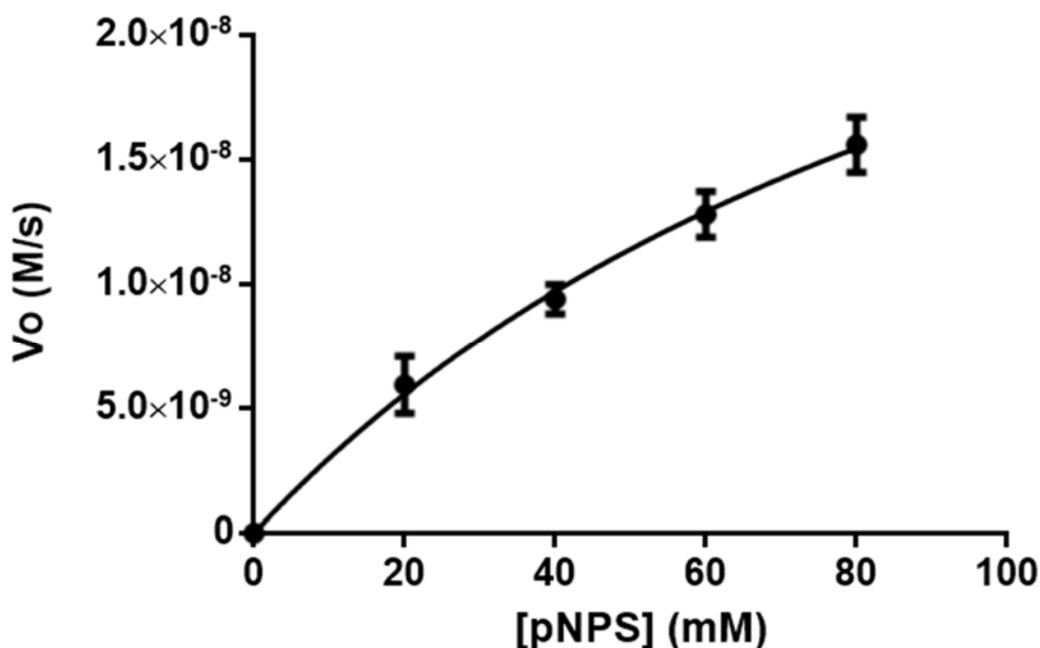


Figura 34. Cinética de Michaelis-Menten para la hidrólisis del pNPS a 25°C y pH 7.5

En la tabla 17, se muestran los parámetros cinéticos tanto de COS como de C54S-COS. La comparación de K_m arroja que C54S-COS es 1.5 veces menos a fin por su sustrato artificial *p*-nitrofenilsulfato y una eficiencia 20 veces menor (k_{cat}/K_m). En la figura 35 se demuestra la existencia de múltiples ciclos catalíticos (6.5 ciclos en una hora)

Tabla 17. Resumen de los parámetros cinéticos de C54S-COS y COS con *p*NPS como sustrato

| | C54S-COS | COS |
|--|----------------------|----------------------|
| K_m (Mm) | 116.0 | 75.8 |
| k_{cat} (s ⁻¹) | 3.2×10^{-3} | 3.5×10^{-2} |
| k_{cat}/K_m (M ⁻¹ s ⁻¹) | 2.7×10^{-2} | 4.6×10^{-1} |

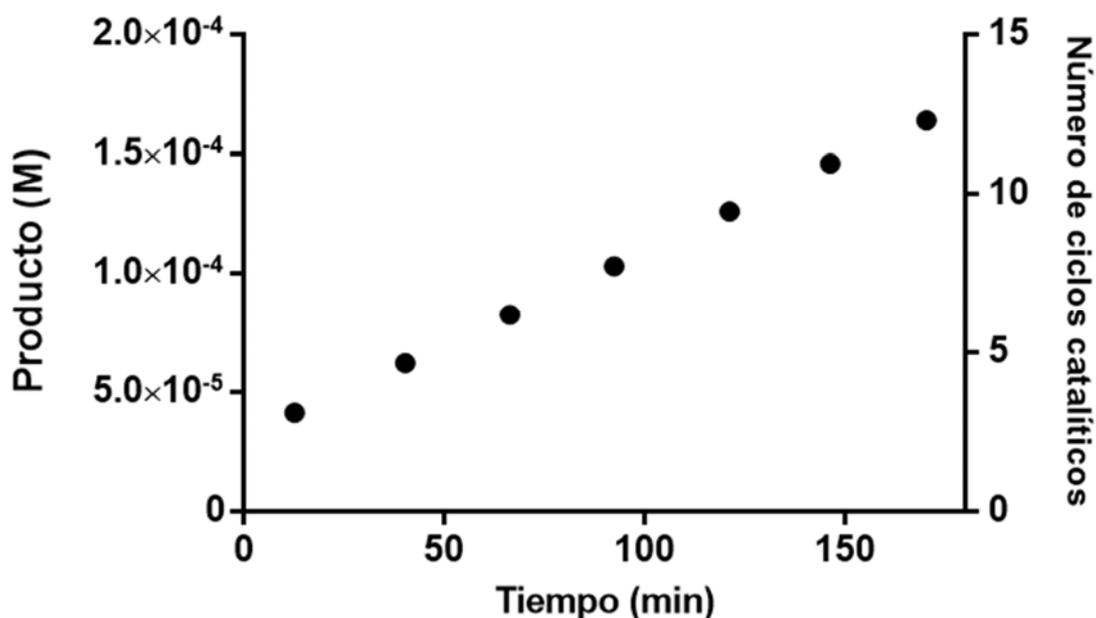


Figura 35. Gráfica del curso de reacción de C54S (12 μM) a una concentración de 80 mM de *p*NPS a 25°C y pH. 7.4 que demuestra los múltiples ciclos catalíticos.

Resultados de la caracterización cinética por calorimetría (ITC)

El mismo comportamiento de inestabilidad observado para las mutantes C54T, C54D Y C54A se repitió con las pruebas calorimétricas (no se detalla), por lo que se procedió a caracterizar la mutante C54S contra el sulfato de colina por calorimetría (figura 36).

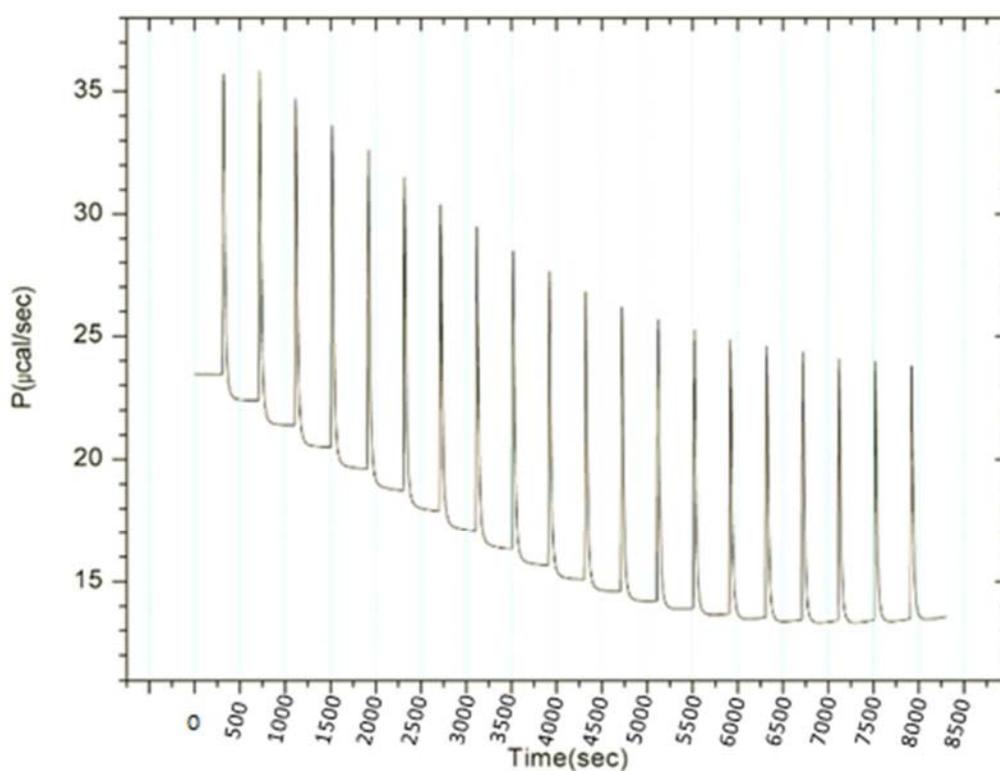


Figura 36. Termograma representativo resultado de la reacción enzimática de C54S contra el sulfato de colina.

El modelo que mejor representa el comportamiento enzimático es el modelo de cooperatividad (Figura 37).

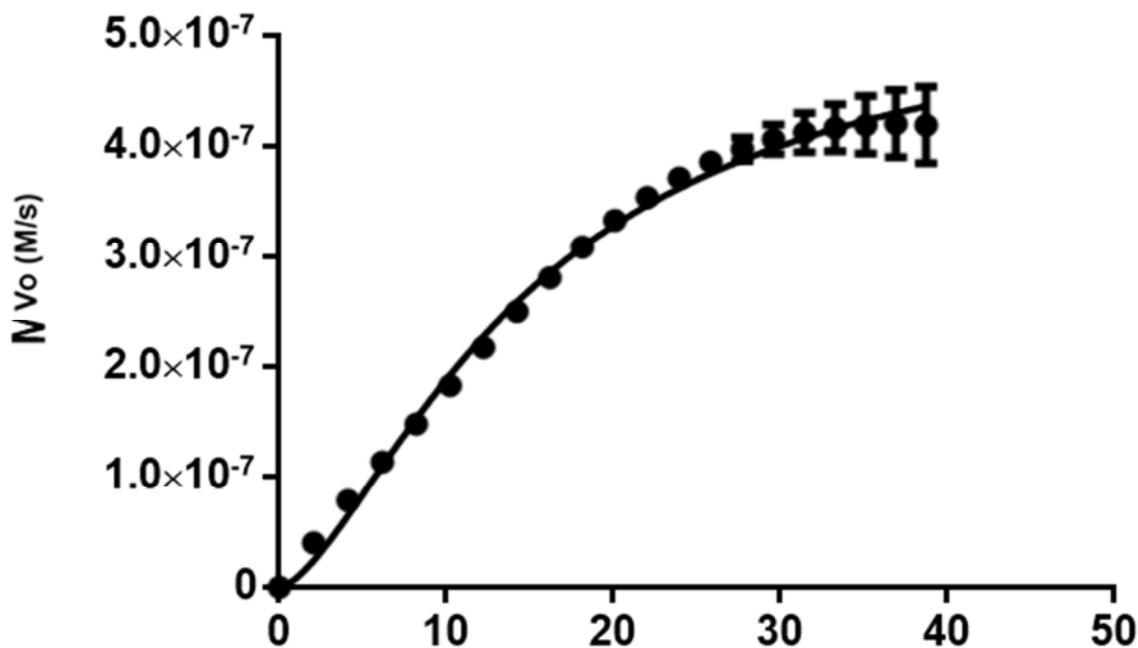


Figura 37. Gráfica de velocidad inicial contra la concentración de sustrato. El mejor modelo encontrado que describe este comportamiento es cooperativo. Los parámetros se describen en la tabla 18.

En la tabla 18, se reúnen los parámetros cinéticos de COS y C54S-COS. Para el sulfato de colina, el mejor modelo encontrado para describir su comportamiento es el modelo cooperativo positivo (que se discute en párrafos posteriores) obteniendo un valor de K_{half} de $14.90 \text{ mM} \pm 3,34$, una V_{max} de $5.36 \times 10^{-7} \text{ M/s} \pm 7,93 \times 10^{-8}$ y un coeficiente de hill de $1.6 \pm 0,10$.

Para hacer la comparación entre C54S y la enzima silvestre, se tomará la K' (K prima) como análoga a la K_m [45].

Tabla 18. Resumen de los parámetros cinéticos de C54S-COS (figura 37) y COS con sulfato de colina

| | C54S-COS | COS |
|--|-----------------------|-------|
| K_m ó $K_{(prima)}$ (Mm) | 64.36 | 11.1 |
| k_{cat} (s ⁻¹) | 0.11 | 0.27 |
| k_{cat} / K_m ó $k_{cat} / K_{(prima)}$ (M ⁻¹ s ⁻¹) | 1.67X10 ⁻³ | 24.32 |
| h | 1.6 | 1 |

La naturaleza poco nucleofílica de la mutante C54A explica la falta de actividad contra el *p*-nitrofenilsulfato lo cual concuerda con Usón y colaboradores[34] que también realizaron mutaciones que carecían del aminoácido FGly y en su lugar presentaba alanina y serina . La estructura cristalográfica del complejo de la mutante inactiva Arilsulfatasa A (ASA) C69A y *p*-nitrocatecol sulfato (Pncs) imita el intermediario que se forma durante la hidrólisis del éster de sulfato lo cual ofrece la ventaja experimental pues permite obtener una estructura cristalográfica del complejo enzima-sustrato con relativa facilidad, en comparación con la enzima silvestre que lleva a cabo la catálisis tan rápido que es difícil obtener la estructura justo al momento de la formación del complejo, incluso manejando bajas temperaturas.

Así mismo, la naturaleza no nucleofílica el grupo metilo de la alanina evita la formación del enlace covalente entre el sustrato y la enzima razón por la cual es inactiva, sin embargo, esta situación permite estudiar las interacciones en el sitio catalítico del resto de los aminoácidos indispensables para la catálisis.

Por otro lado, Usón y colaboradores también determinaron que C69S-ASA es capaz de unir covalentemente al sustrato e hidrolizarlo, pero es incapaz de liberar el sulfato resultante sólo un pequeño porcentaje es recuperado (20%). Sin embargo, colina sulfatasa muestra múltiples números de recambios, por lo que se demuestra que en este caso si se está llevando a cabo la hidrólisis de los sustratos y que también si se está desorbiendo el sulfato resultante, se piensa que el mecanismo que permite la desulfonación hidrolítica involucra el ataque nucleofílico por una molécula de agua[36]. El esquema del mecanismo propuesto

se muestra en la figura 38 en donde la serina 54 de COS-C54S realiza un ataque nucleofílico sobre el grupo sulfato del éster de sulfato formándose así el intermediario covalente diéster de sulfato. Una molécula de agua activada (OH^-) del medio es quien realiza un segundo ataque nucleofílico sobre el azufre del intermediario covalente y de esta manera se libera el alcohol conjugado, regenerándose a su vez la enzima.

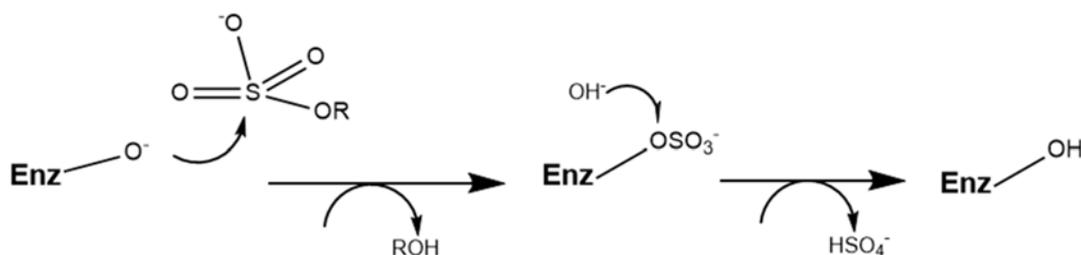


Figura 38. Esquema del mecanismo propuesto seguido por COS-C54S.

Con respecto a las mutantes C54D y C54T, las mediciones no mostraron actividad detectable en las primeras 24 horas, sin embargo sí se observó actividad catalítica con *pNPS* a concentraciones de enzima de 45 μM (no mostrado) a las 120 horas acompañado siempre de precipitación enzimática por lo que su estudio se reserva para condiciones de reacción especiales que permitan seguir la reacción por periodos de tiempo largos, o incluso mediante estudios de tipo competitivo en el que la actividad de la enzima silvestre COS sea afectada por la enzima competitiva (en este caso la mutante). Di Cera y colaboradores [38] trabajaron con mutantes de proteasas las cuales son caracterizadas por presentar serina como nucleófilo para realizar la ruptura al enlace peptídico. Se observó que la mutante treonina, a pesar de retener la nucleofilicidad de la serina, su capacidad de formar puentes de hidrógeno y tamaño de cadena similar carecía completamente de actividad atribuido a su grupo metilo (el cual no presenta la serina) por lo que se piensa que posibles efectos estéricos importantes también se presentan en C54T. La baja actividad mostrada podría ser resultado de su inestabilidad aunado al proceso lento de liberación del sulfato.

El análisis del comportamiento de C54S resultante de los ensayos contra el sulfato de colina que arroja un coeficiente de Hill de aproximadamente 2, es consistente con los sitios de reacción de la forma dimérica de COS que prevalece en solución[27] , uno por cada monómero.

9. Resumen de resultados

- Los parámetros cinéticos de la mutante C54S contra su sustrato artificial (*p*NPS) son 116 mM, $3.19 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ y $6.66 \times 10^{-9} \text{ Ms}^{-1}$ para la K_m , k_{cat} y V_{max} respectivamente
- Los parámetros cinéticos de la mutante C54S contra su sustrato natural (sulfato de colina) son: K_{half} de 14.90 mM, una V_{max} de 5.363×10^{-7} y un coeficiente de hill de 1.6.
- No fue posible determinar los parámetros cinéticos para las mutantes C54D y C54T debido a su baja actividad e inestabilidad.

10. Conclusión

C54S es capaz de llevar a cabo múltiples ciclos catalíticos por lo que es capaz no sólo de hidrolizar ésteres de sulfato, sino que además se lleva a cabo la desulfonación que permite a la enzima regenerarse.

11. Perspectivas

La generación de mutantes es el inicio de todo un estudio sistemático del mecanismo de reacción de la sulfatasa de colina. A partir de este punto, se plantea encontrar las condiciones óptimas que permitan seguir adecuadamente la actividad de C54D y C54T como lo son, cinéticas interrumpidas por largos periodos de tiempo a temperaturas bajas que eviten la precipitación de las enzimas. Se piensa también, que al poner a reaccionar dos sulfatasas, una de las cuales puede ser una de las mutantes, la velocidad de la sulfatasa predominante (COS) disminuiría por la presencia de la mutante que compite por el sustrato, dicho cambio podrá ser medido cuidadosamente. Finalmente, se podría realizar las estructuras cristalográficas de las mutantes para saber si existen cambios estructurales debido a la presencia de grupos voluminosos como lo es el ácido aspártico, o bien, C54A permitirá tomar una foto al intermediario que se forma durante la hidrólisis del éster de sulfato y descartar el proceso de histéresis como causante del comportamiento de C54S.

12. Bibliografía

- [1] J. M. Young
Note Sinorhizobium versus Ensifer : may a taxonomy subcommittee of the ICSP contradict the Judicial Commission ?
International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, no. 2010, pp. 1711–1713, 2015
- [2] K. M. Jones, H. Kobayashi, B. W. Davies, M. E. Taga, & G. C. Walker
How rhizobial symbionts invade plants: the Sinorhizobium-Medicago model
Nature Reviews Microbiology, vol. 5, no. 8, pp. 619–33, 2007.
- [3] S. R. Long
Sinorhizobium meliloti genome
UNI Bielefeld, Dept. of Biology at Stanford and DNA Sequencing & Technology Center at Stanford pp.13-15, 2001
- [4] R.Mhandi, J. Ardley, R. Tian, R. Seshadri, T.B.K. Reddy, A. Pati, T. Woyke, V. Markowitz, N. Ivanova, N. Kryrpides & W. Reeve.
High-quality permanent draft genome sequence of *Ensifer meliloti* strain 4H41, an effective salt- and drought-tolerant microsymbiont of *Phaseolus vulgaris*
Standars in Genomic Sciences. vol. 10,no 1, pp. 34, 2015
- [5] M. Osterås, 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 betaina
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 95, no. 19, pp. 11394–9, 1998.
- [6] D. Lerudulier, A.R. Strom, A.M. Dandekar, L.T. Smith & R.C. Valentine
Molecular-biology of Osmoregulation
Science, 224, pp. 1064–1068, 1984.
- [7] M. Cregut, M.J. Durand, G. Thouand
The diversity and functions of choline sulphatases in microorganisms
Microbial Ecology, 67, pp. 350–357, 2014

- [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
 Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 95, pp. 11394–11399, 1998.
- [9] D. S. Jenkinson, R. H. Fox & J. H. Rayner
Interactions between fertilizer nitrogen and soil nitrogen—the so-called ‘priming’ effect
 Journal of Soil Science. vol. 36, issue 3, pp.425-444, 1985
- [10] Zárata, R.S
Leucaena leucocephala
 Phytología 63 (4), pp. 304-306. 1987
- [11] L. Road
Selecting *Rhizobium phaseoli* strains for use with beans (*Phaseolus vulgaris* L .) in Kenya: Tolerance of high temperature and antibiotic resistance
 Plant Soil, vol. 22, pp. 15–22, 1988.
- [12] Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural.
Producción y utilización de la alfalfa en la zona norte de México
 Libro técnico no. 2, 2000
- [13] K. Guerrouj, E. Pérez-Valera, H. Abdelmoumen, E. J. Bedmar & M. Missbah
***Ensifer meliloti* is the preferred symbiont of *Medicago arborea* in eastern Morocco soils**
 Canadian Journal of Microbiology, vol. 59, no. 8, pp. 540–8, 2013.
- [14] N. N. Zhang, Y. M. Sun, E. T. Wang, J. S. Yang, H. L. Yuan, and K. M. Scow
Effects of intercropping and Rhizobial inoculation on the ammonia-oxidizing microorganisms in rhizospheres of maize and faba bean plants
 Applied Soil Ecology, vol. 85, pp. 76–85, 2014

- [15] P: R. Guzman & C. R. Ferrera
La endomicorriza vesículo arbuscular en las leguminosas.
Colegio de Posgraduados, Chapingo, México, pp. 1-119.
- [16] H. H. Zahran
Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate
Microbiology and Molecular Biology Reviews. Rev., vol. 63, no. 4, pp. 968–989, table of contents, 1999
- [17] B. Link, K. Link & M. Link
Information on EC 3.1.6.6 - choline-sulfatase
no. 1, pp. 1–5, 2015
- [18] C. Wegner, T. Richter-heitmann, A. Klindworth, C. Klockow, M. Richter, T. Achstetter, F. Oliver & J. Harder
Marine Genomics Expression of sulfatases in Rhodopirellula baltica and the diversity of sulfatases in the genus Rhodopirellula
Marine Genomics vol. 9, pp. 51–61, 2013
- [19] L. W. L. Woo, N. M. Howarth, A. Purohit, H. A. M. Hejaz, M. J. Reed & B. V. L. Potter
Steroidal and Nonsteroidal Sulfamates as Potent Inhibitors of Steroid Sulfatase
Journal of Medicinal Chemistry. vol. 2623, no. i, pp. 1068–1083, 1998
- [20] S. R. Hanson, M. D. Best & C. Wong
Sulfatases: Structure , Mechanism , Biological Activity , Inhibition , and Synthetic Utility Angewandte
Angewandte Chemie International Edition, pp. 5736–5763, 2004
- [21] D. Gosh
[16] Three - Dimensional Structures of Sulfatases
Methods in Enzymology. vol. 400, 2005
- [22] C.J.A. Sigrist, E. de Castro, L. Cerutti, B.A. Cucho, N. Hulo, A., Bridge, L. Bouguelere & L. Xenarios.
New and continuing developments at PROSITE
Nucleic Acids Res. 2012

- [23] T. Dierks, M. R. Lecca, P. Schlotterhose, B. Schmidt & K. Von Figura,
Sequence determinants directing conversion of cysteine to formylglycine in eukaryotic sulfatases
The EMBO Journal, vol. 18, no. 8, pp. 2084–2091, 1999.
- [24] O. Berteau, A. Guillot, A. Benjdia & S. Rabot
A New Type of Bacterial Sulfatase Reveals a Novel Maturation Pathway in Prokaryotes
The Journal of Biological Chemistry, vol. 281, no. 32, pp. 22464–22470, 2006.
- [25] A. Benjdia, G. Dehò, S. Rabot & O. Berteau
First evidences for a third sulfatase maturation system in prokaryotes from E. coli asIB and ydeM deletion mutants
FEBS Lett., vol. 581, no. 5, pp. 1009–14, Mar. 2007.
- [26] M. Toesch, M. Schober & K. Faber
Microbial alkyl- and aryl-sulfatases: mechanism , occurrence , screening and stereoselectivities
Applied Microbiology and Biotechnology, pp. 1485–1496, 2014
- [27] J. J. Sánchez-Romero & L. F. Olguin
Choline sulfatase from Ensifer (Sinorhizobium) meliloti: Characterization of the unmodified enzyme
Biochemistry and Biophysics Reports, vol. 3, pp. 161–168, 2015
- [28] T. Knaus, M. Schober, B. Kepplinger, M. Faccinelli, J. Pitzer, K. Faber, P. Macheroux & U. Wagner
Structure and mechanism of an inverting alkylsulfatase from Pseudomonas sp . DSM6611 specific for secondary alkyl sulfates
The FEBS Journal. vol. 279, pp. 4374–4384, 2012.
- [29] R. V. Stick & S. Williams
Carbohydrates: The Essential Molecules of Life: The Essential Molecules of Life
ELSEVIER, Segunda edición, 2008

- [30] B.W. Soong, A. C. Casamassima, J. K. Fink, G. Constantopoulos & A. L. Horwitz
Multiple sulfatase deficiency
Neurology, vol. 38 no. 8 1273, 1988
- [31] M. J. Appel & C. R. Bertozzi
Formylglycine, a Post-Translationally Generated Residue with Unique Catalytic Capabilities and Biotechnology Applications
ACS Chemical biology, 10, 72-84, 2015
- [32] G. Hagelueken, T. M. Adams, L. Wiehlmann, U. Widow, H. Kolmar, B. Tümmler, D. W. Heinz & W. D. Schubert
The crystal structure of SdsA1, an alkylsulfatase from Pseudomonas aeruginosa, defines a third class of sulfatases.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 103, no. 20, pp. 7631–7636, 2006
- [33] I. Mu, A. Kahnert, T. Pape, G. M. Sheldrick, W. Meyer-klaucke, T. Dierks, M. Kertesz, & I. Uso
Crystal Structure of the Alkylsulfatase AtsK : Insights into the Catalytic Mechanism of the Fe (II) R -Ketoglutarate-Dependent Dioxygenase Superfamily
Biochemistry, no. 43, pp. 3075–3088, 2004
- [34] B. Schmidt, T. Dierks, K. Von Figura, I. Uso & H. Du
Crystal Structure of an Enzyme-Substrate Complex Provides Insight into the Interaction between Human Arylsulfatase A and its Substrates During Catalysis
Journal of Molecular Biology, 305, pp. 269–277, 2001
- [35] I. Boltes, H. Czapinska, A. Kahnert, R. Von Bu, T. Dierks, B. Schmidt, K. Von Figura, M. A. Kertesz & I. Uso
Structure of Arylsulfatase from Pseudomonas aeruginosa Establishes the Catalytic Mechanism of Sulfate Ester Cleavage in the Sulfatase Family
Structure, vol. 9, no. 01, pp. 483–491, 2001.
- [36] C. S. Bond, P. R. Clements, S. J. Ashby, C. A. Collyer, S. J. Harrop, J. J. Hopwood & J. M. Guss
Structure of a human lysosomal sulfatase
Current Biology, 5, pp. 277–289, 1997

- [37] J. M. Sowadskit, M. D. Handschumacher, H. M. K. Murthy, B. A. Fostert, H. W. Wyckoff & N. Haven
Refined Structure of Alkaline Phosphatase from *Escherichia coli* at 2-8 Å Resolution
Journal of Molecular Biology, 186, pp. 417-433, 1985
- [38] L. A. Pelc, Z. Chen, D. W. Gohara, A. D. Vogt, N. Pozzi & E. Di Cera,
Why ser and not thr brokers catalysis in the trypsin fold
Biochemistry, vol. 54, no. 7, pp. 1457–64, 2015
- [39] S. Howard, S. He, and S. G. Withers
Identification of the active site nucleophile in jack bean alpha-mannosidase using 5-fluoro-beta-L-gulosyl fluoride
Journal of Molecular Biology, vol. 273, no. 4, pp. 2067–2072, 1998
- [40] S. Milev
**Isothermal titration calorimetry : Principles and experimental design
Agenda Overview of Isothermal Titration Calorimetry ITC experimental design
Data analysis Troubleshooting**
GE HEALTHCARE
- [41] E. Freire
Lead optimization Isothermal titration calorimetry : controlling binding forces in lead optimization
Drug Discovery Today: Technology, Vol. 1, N. 3 pp. 295–299, 2004.
- [42] M.L. Bianconi
Calorimetry of enzyme-catalyzed reactions
Biophysical Chemistry., 126, pp. 59–64, 2007.
- [43] MicroCal
VP-ITC microcalorimeter user's manual
MicroCal, LLC, 2003
- [44] C. M. Porter and B. G. Miller
Cooperativity in monomeric enzymes with single ligand-binding sites
Bioorganic Chemistry, vol. 43, pp. 44–50, 2012
- [45] GraphPad Curve Fitting Guide
Equation : Allosteric sigmoidal
pp. 2014–2015, 2015

- [46] A. C. Notides, N. Lerner & D. E. Hamilton
Positive cooperativity of the estrogen receptor
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 78, No. 8, pp. 4926-4930, 1981
- [47] J. E. Ferrell
Question & Answer Q & A: Cooperativity
Journal of Biology, 8:53, 2009
- [48] J. N. Weiss
The Hill equation revisited: uses and misuses
FASEB Journal., 11(11):835-41, 1997
- [49] T.W. Kwon & W.D. Brown
Augmentation of Aldolase Activity by High Concentration of Fructose 1,6-Diphosphate
The Journal of Biological Chemistry, vol. 241, No. 7, 1966
- [50] D. L. Nelson & M. M. Cox
Principles of Biochemistry
W.H FREEMAN AND COMPANY, Quinta edición, New York,
- [51] Narendra Tuteja, Sarvajeet S. Gill, Renu Tuteja
Improving Crop Productivity in Sustainable Agriculture
John Wiley & Sons, pp.536
- [52] O. Edelheit, A. Hanukoglu, and I. Hanukoglu
Simple and efficient site-directed mutagenesis using two single-primer reactions in parallel to generate mutants for protein structure-function studies
BMC Biotechnology., vol. 9, no. 1, pp. 61, 2009
- [53] J. Sambrook and D. W. Russell
The Inoue Method for Preparation and Transformation of Competent E. Coli: 'Ultra-Competent' Cells
Cold Spring Harbor Protocols., vol. 2006, no. 2, p. 3944, 2006
- [54] Jena Bioscience data sheet
Fast-n-Easy Plasmid Mini-Prep Kit
pp. 1–2, 2015

- [55] Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ & Higgins DG *Bioinformatics*
ClustalW and ClustalX version 2
23(21): 2947-2948, 2007
- [56] J. Sambrook and D. W. Russell
Expression of Cloned Genes in *Escherichia coli*, Chapter 15
Cold Spring Harbor Protocols., vol. 2006, no. 2, p. 15.2 ,2006

13. Anexo

Alineaciones completas de las mutantes C54S, C54T, C54D y C54A con el promotor y terminador universal T7.

```
COS          MTTGKPNIL IIMVDQLNGKLPDGPADFLHAPNLKALAKRSARFHNNYTSSPLCAPARAS
C54A-COS    MTTGKPNIL IIMVDQLNGKLPDGPADFLHAPNLKALAKRSARFHNNYTSSPLAAPARAS
*****

COS          FMAGQLPSRTRVYDAAEQSSIPTYAHHLRRAGYYTALSGKMHFVGPDQLHGFEERLTT
C54A-COS    FMAGQLPSRTRVYDAAEQSSIPTYAHHLRRAGYYTALSGKMHFVGPDQLHGFEERLTT
*****

COS          DIYPADFGWTPDYRKPERIDWYHNLGSVTGAGVAEITNQMEYDDEVAFLANQKLYQLS
C54A-COS    DIYPADFGWTPDYRKPERIDWYHNLGSVTGAGVAEITNQMEYDDEVAFLANQKLYQLS
*****

COS          RENDESRRPWCLTVSFTHPHDPYVARRKFWDLYEDCEHLTPEVGAIPLDEQDPHSQRIM
C54A-COS    RENDESRRPWCLTVSFTHPHDPYVARRKFWDLYEDCEHLTPEVGAIPLDEQDPHSQRIM
*****

COS          LSCDYQNFVDTEENVRRSRRAYFANISYLDEKVGELIDTLTRTRMLDDTLILFCSDHGDM
C54A-COS    LSCDYQNFVDTEENVRRSRRAYFANISYLDEKVGELIDTLTRTRMLDDTLILFCSDHGDM
*****

COS          LGERGLWFKMNF FECSARVPLMIAGPGIAPGLHLTPTSNLDVTPTLADLAGISLEEVRPW
C54A-COS    LGERGLWFKMNF FECSARVPLMIAGPGIAPGLHLTPTSNLDVTPTLADLAGISLEEVRPW
*****

COS          TDGVS LVP MVNGVERTEPVLMEYAAEASYAPLVAIREGKWKYVYCALDPEQLFDLEADPL
C54A-COS    TDGVS LVP MVNGVERTEPVLMEYAAEASYAPLVAIREGKWKYVYCALDPEQLFDLEADPL
*****

COS          ELTNLAENPRGPVDQATLTAFRDMRAAHWDMEAFDAAVRESQARRWVVEALRNGAYYPW
C54A-COS    ELTNLAENPRGPVDQATLTAFRDMRAAHWDMEAFDAAVRESQARRWVVEALRNGAYYPW
*****

COS          DHQPLQKASERYMRNHMNLDTLEESKRYPRGEHHHHHH
C54A-COS    DHQPLQKASERYMRNHMNLDTLEESKRYPRGEHHHHHH
*****
```

COS MTTGKPNILIIIMVDQLNGKLPDGPADFLHAPNLKALAKRSARFHNNYTSSPLCAPARAS
 C54T-COS MTTGKPNILIIIMVDQLNGKLPDGPADFLHAPNLKALAKRSARFHNNYTSSPLTAPARAS

COS FMAGQLPSRTRVYDAAEYQSSIPTYAHHLRRAGYYTALSGKMHFVGPDLHGFEERLTT
 C54T-COS FMAGQLPSRTRVYDAAEYQSSIPTYAHHLRRAGYYTALSGKMHFVGPDLHGFEERLTT

COS DIYPADFGWTPDYRKPGERIDWYHNLGSVTGAGVAEITNQMEYDDEVAFLANQKLYQLS
 C54T-COS DIYPADFGWTPDYRKPGERIDWYHNLGSVTGAGVAEITNQMEYDDEVAFLANQKLYQLS

COS RENDESRRPWCLTVSFTHPHDPYVARRKFWDLYEDCEHLTPEVGAIPLDEQDPHSQRIM
 C54T-COS RENDESRRPWCLTVSFTHPHDPYVARRKFWDLYEDCEHLTPEVGAIPLDEQDPHSQRIM

COS LSCDYQNFVDVTEENVRRSRRAYFANISYLDEKVGELIDTLTRTRMLDDTLILFCSDHGDM
 C54T-COS LSCDYQNFVDVTEENVRRSRRAYFANISYLDEKVGELIDTLTRTRMLDDTLILFCSDHGDM

COS LGERGLWFKMNF FECSARVPLMIAGPGIAPGLHLTPTS NLDVTPTLADLAGISLEEV RPW
 C54T-COS LGERGLWFKMNF FECSARVPLMIAGPGIAPGLHLTPTS NLDVTPTLADLAGISLEEV RPW

COS TDGVS LVP MVNGVERTEPVLMEYAAEASYAPLV AIREGKWKVYVCALDPEQLFDLEADPL
 C54T-COS TDGVS LVP MVNGVERTEPVLMEYAAEASYAPLV AIREGKWKVYVCALDPEQLFDLEADPL

COS ELTNLAENPRGPVDQATL TAFRDMRAAHWDMEAFDAAVRESQARRWVVYEALRNGAYYPW
 C54T-COS ELTNLAENPRGPVDQATL TAFRDMRAAHWDMEAFDAAVRESQARRWVVYEALRNGAYYPW

COS DHQPLQKASERYMRNHMNLDTLEESKRYPRGEHHHHHH
 C54T-COS DHQPLQKASERYMRNHMNLDTLEESKRYPRGEHHHHHH

COS MTTGKPNIL IIMVDQLNGKLFDPGADFLHAPNLKALAKRSARFHNNYTSSPLCAPARAS
 C54S-COS MTTGKPNIL IIMVDQLNGKLFDPGADFLHAPNLKALAKRSARFHNNYTSSPLSAPARAS

COS FMAGQLPSRTRVYDAAEYQSSIPTAHHLRRAGYYTALSGKMHFVGPDLHGFEERLTT
 C54S-COS FMAGQLPSRTRVYDAAEYQSSIPTAHHLRRAGYYTALSGKMHFVGPDLHGFEERLTT

COS DIYPADFGWTPDYRKPGERIDWYHNLGSVTGAGVAEITNQMEYDDEVAFLANQKLYQLS
 C54S-COS DIYPADFGWTPDYRKPGERIDWYHNLGSVTGAGVAEITNQMEYDDEVAFLANQKLYQLS

COS RENDESRRPWCLTVSFTHPHDPYVARRKFWDLYEDCEHLTPEVGAIPLDEQDPHSQRIM
 C54S-COS RENDESRRPWCLTVSFTHPHDPYVARRKFWDLYEDCEHLTPEVGAIPLDEQDPHSQRIM

COS LSCDYQNFVDVTEENVRRSRRAYFANISYLDEKVGELIDTLTRTRMLDDTLILFCSDHGDM
 C54S-COS LSCDYQNFVDVTEENVRRSRRAYFANISYLDEKVGELIDTLTRTRMLDDTLILFCSDHGDM

COS LGERGLWFKMNFEGSARVPLMIAGPGIAPGLHLTPTSNLDVTPTLADLAGISLEEVRPW
 C54S-COS LGERG-----SARVPLMIAGPGIAPGLHLTPTSNLDVTPTLADLAGISLEEVRPW

COS TDGVSLVPMVNGVERTEPVLMEYAAEASYAPLVAIREGKWKYVYCALDPEQLFDLEADPL
 C54S-COS TDGVSLVPMVNGVERTEPVLMEYAAEASYAPLVAIREGKWKYVYCALDPEQLFDLEADPL

COS ELTNLAENPRGPVDQATLTAFRDMRAAHWDMEAFDAAVRESQARRWVVYEALRNGAYYPW
 C54S-COS ELTNLAENPRGPVDQATLTAFRDMRAAHWDMEAFDAAVRESQARRWVVYEALRNGAYYPW

COS DHQPLQKASERYMRNHMNLDTLEESKRYPRGEHHHHHH
 C54S-COS DHQPLQKASERYMRNHMNLDTLEESKRYPRGEHHHHHH

COS MTTGKPNILIIIMVDQLNGKLPDGPADFLHAPNLKALAKRSARFHNNYTSSPLCAPARAS
 C54D-COS MTTGKPNILIIIMVDQLNGKLPDGPADFLHAPNLKALAKRSARFHNNYTSSPLDAPARAS

COS FMAGQLPSRTRVVDNAAEQSSIPTAHHLRAGYYTALSGKMHFVGPDQLHGFEERLTT
 C54D-COS FMAGQLPSRTRVVDNAAEQSSIPTAHHLRAGYYTALSGKMHFVGPDQLHGFEERLTT

COS DIYPADFGWTPDYRKPGERIDWYHNLGSVTGAGVAEITNQMEYDDEVAFLANQKLYQLS
 C54D-COS DIYPADFGWTPDYRKPGERIDWYHNLGSVTGAGVAEITNQMEYDDEVAFLANQKLYQLS

COS RENDESRRPWCLTVSFTHPHDPYVARRKFWDLYEDCEHLTPEVGAIPLDEQDPHSQRIM
 C54D-COS RENDESRRPWCLTVSFTHPHDPYVARRKFWDLYEDCEHLTPEVGAIPLDEQDPHSQRIM

COS LSCDYQNFVDTEENVRRSRRAYFANISYLDEKVGELIDTLTRTRMLDDTLILFCSDHGDM
 C54D-COS LSCDYQNFVDTEENVRRSRRAYFANISYLDEKVGELIDTLTRTRMLDDTLILFCSDHGDM

COS LGERGLWFKMNFEGSARVPLMIAGPGIAPGLHLTPTSNLDVTPTLADLAGISLEEVPRW
 C54D-COS LGERGLWFKMNFEGSARVPLMIAGPGIAPGLHLTPTSNLDVTPTLADLAGISLEEVPRW

COS TDGVS LVP MVNGVERTEPVLMEYAAEASYAPLVAIREGKWKYVYCALDPEQLFDLEADPL
 C54D-COS TDGVS LVP MVNGVERTEPVLMEYAAEASYAPLVAIREGKWKYVYCALDPEQLFDLEADPL

COS ELTNLAENPRGPVDQATLTAFRDMRAAHWDMEAFDAAVRESQARRWVVEALRNGAYYPW
 C54D-COS ELTNLAENPRGPVDQATLTAFRDMRAAHWDMEAFDAAVRESQARRWVVEALRNGAYYPW

COS DHQPLQKASERYMRNHMNLDTLEESKRYPRGEHHHHHH
 C54D-COS DHQPLQKASERYMRNHMNLDTLEESKRYPRGEHHHHHH
