



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



## INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

Control Escolar de Licenciatura



### VOTOS DE APROBATORIOS

Secretaria Ejecutiva del Instituto de Investigación en Ciencias Básicas Aplicadas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.  
P r e s e n t e .

Por medio de la presente le informamos que después de revisar la versión escrita de la tesis que realizó la C. **SÁNCHEZ TRUJILLO ANA CECILIA** con número de matrícula **20164012189** cuyo título es:

**“Caracterización funcional de variantes de katG que confieren resistencia a isoniazida en *M. tuberculosis*”**

Consideramos que **SI** reúne los méritos que son necesarios para continuar los trámites para obtener el título de **LICENCIADO EN CIENCIAS ÁREA TERMINAL DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

Cuernavaca, Mor a 04 de febrero del 2022

Atentamente  
Por una universidad culta

Se adiciona página con la e-firma UAEM de los siguientes:

DRA. CARMEN NINA PASTOR COLÓN	(PRESIDENTE).
DRA. LINA RIVILLAS ACEVEDO	(SECRETARIO).
DR. FRANCISCO XAVIER SOBERON MAINERO	(VOCAL).
M. EN C. BRENDA GEORGINA URIBE VÁZQUEZ	(SUPLENTE).
DR. HUMBERTO FLORES SOTO	(SUPLENTE).



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**CARMEN NINA PASTOR COLON** | Fecha:2022-02-04 15:59:27 | Firmante

RgWIRkV8etqt1WWNfiHr6eWFOComjpPnjdSJ1TTPRG+6dYSss6g0bkbPydwERfSU0mFlrRkc9b+bVDMJZk9jPV+bC66BtOQcyv6kURW6EhKkj+GQaySBu2rGYXe9bAwDiWtdNt19AiY//pjzkkSuvqcQ/QUUnwRXYbEqY9gr8edv2MOKJhqovWMWTPuak+usaFnSKg04uNowYHfBNN6O28qWxLA4zNOaV1ra2VlvxUT+5oUFSPOHNQakmBrDxFR9VX1e4P8fnB0fHS7h1TywygHLgylGCmsZP0Fmr6Jo8sN4fAqfRHO/xglRRZdFAuse1m0YoynQEwBtYoFWRIn94w==

**LINA ANDREA RIVILLAS ACEVEDO** | Fecha:2022-02-04 18:40:14 | Firmante

DNn0jCl5I8AvgPLcWpnk3BwTiT+Yb2aJemgRAwv1ZLAGw8LyfAPAQzfkIUtsz+/n0RXMJOVD9xWg9tOOJWb1IM8orlsqVSGrTstWaQMtleBij3KjdyIFpxljVv3M9ijWDSHmT+Ay7hMj7wg61hxummKr+9T/3sMs52GZHKH9i6KX+rU/yjGseJnhvATu4is8Zu9Uth3ntvr1XJx2/GCr01gQU4tFXUTqX6gTWspMgJWRrhmgBsbx2h4ShJsaOkfF1Qp9ZKK/7pJ+jiQ4I2+q22KPn5uyWgy+kLzrZiN9GMvynQwLttaCW+Thd/TSWvkVPzehfC58qRYUw3UliZA==

**BRENDA GEORGINA URIBE VAZQUEZ** | Fecha:2022-02-11 12:19:45 | Firmante

JLPHDqgB5ImzchSdVaH07ATmyUpU1kMR5J1aVYoGrjfQluSZVbNITJz2KUsGCaYjth6GdBqywsMi4+4sPGS0vL85c6s80NbfQUtrSE+e+Jm7CMDOKiCNArk/qCPsSpp4d0W7tvqDWfjGLPgP0L17wolbM9mCW+kg6nVlv8dP/nM4kxJmoAIEdlG9cBgbACREodnlMfkmqRrUxg+7pJlnM2BC65PTN8UU2zFylghgn/0w4kEmWRAYnKIjERVI/+00nMnsqAf9OLDSdkwX29ESw9vLkNlpz+Fhd+F9t4WeMrveSyUgMkPkw9JDQ7zHVWwRbE6cHWkpJtQpQJ1Nh5qW==

**HUMBERTO FLORES SOTO** | Fecha:2022-02-11 12:24:32 | Firmante

uGRk6I7OVnYihicXB+4eH1E7UbeGAtRmvQ+xlDnsW8E0dJ4PXbxt4jx62EGBVp6fwYlg3tHoNDhs6rYKzRAJTALE0gUvvsW0A6OBih7qxSunXNJWmjvwbq6i6GUTFID0rgZ4pNk13nv69RNeji8yT+550KQqbnUSBmJ19rcYrcLPHpI3gA8axkM5GDkmf9yB7Q8Hi3LuHuV4A4d1QAXAs4SKW54xZkhk35L9eK/Cm1GXqEEe7xrNRRFzjVrviP9ab5IMauJDebhX8c0uPyu77Hkkok2RhbVxJ1skf6bahMvj0hXiRZIII1MB52Wh7eY2YsdYeGr50AovVjYyExWg==

**XAVIER SOBERÓN MAINERO** | Fecha:2022-02-15 12:17:38 | Firmante

W4BRqnK64bKnegFWGobafDYpyQB1iOgOcve2bdDzhKUEjjwXwr6B/VgWdPHbvXPzMsEg/kmiPsyVgz8Qh0UHFxCJCwPC+F00n12/De9ZvW76b6rxJ01qqcYjHRQFbOceE8RTXE8/vjA1lqV2ezKbVID4QQFRGLkomH77ltxbns4hJ3GWfVv8HPbngdfH3cz4tWfVLDIhbPfqfGE+ZPGnkKSOZg/LLEJ78OuYO9trK6yvES8M9kEv+QmYbaLbiKsSobWjoATHb5H8w/k+nKniUdrpWNTmdzqQNIe3VarMreCwj2XHWOCKz2Z5H9TEUpf0L2mM+jlnZ8qRS2V6wCvBQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



L3qJe5CNr

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/TGOvozRolcjp0vKkYOE7qcuUZqJa9rYB>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y  
APLICADAS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR

CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE VARIANTES DE KATG QUE CONFIEREN  
RESISTENCIA A ISONIAZIDA EN *M. TUBERCULOSIS*

**T E S I S**

QUE PRESENTA:

**ANA CECILIA SÁNCHEZ TRUJILLO**

Para obtener el Grado de:  
LICENCIADO EN CIENCIAS

Director de la Tesis:  
Dr. Xavier Soberón Mainero  
(Instituto en Biotecnología de la UNAM)

Sinodales:

Nina Pastor Colon (Centro de Investigación en Dinámica Celular)  
Lina Andrea Rivillas Acevedo (Centro de Investigación en Dinámica Celular)  
Humberto Flores Soto (Instituto en Biotecnología de la UNAM)  
Brenda Georgina Uribe Vázquez (Instituto en Biotecnología de la UNAM)

Cuernavaca Morelos

2021

## AGRADECIMIENTOS

A Dios, creador de todo y a quien rindo mi vida y todos mis logros.

A la M.C. Brenda Uribe por la asesoría brindada a lo largo de todo el desarrollo del trabajo, por la paciencia en su enseñanza y por estar al pendiente de los resultados obtenidos. Igualmente, al Dr. Humberto Flores y Xavier Soberón por su disposición para aclarar mis dudas, por estar al pendiente de mi avance y las retroalimentaciones a lo largo del trabajo.

A mis padres y hermano por su amor y apoyo incondicional durante toda mi vida, por las capacidades que ven en mi y su cuidado en cada etapa. Sus palabras y amor me han impulsado a poder concluir esta etapa de mi vida.

Dedico mi tesis a mis tíos Angélica Trujillo y Gustavo Yáñez quienes este 2020 impactaron mi vida al enseñarme a nunca rendirme y dar todo de mí, aun cuando las circunstancias parezcan negativas; a esforzarme al máximo en cada reto, pero también a saber disfrutarlo. Gracias tíos por su cariño para conmigo y por siempre interesarse por mis logros.

## RESUMEN

La Tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa causada por el agente patógeno *Mycobacterium tuberculosis*, se encuentra entre las diez principales causas de muerte en el mundo. La isoniazida (INH), el compuesto más utilizado para el tratamiento de la TB a nivel mundial, es un pro-fármaco de primera línea activado por la catalasa-peroxidasa de *M. tuberculosis* codificada por el gen *katG*. INH es convertido por KatG en un radical que se une al NAD<sup>+</sup>, formando el aducto INH-NAD, que actúa como un potente inhibidor de la enzima InhA, lo que afecta la biosíntesis de la pared celular. La resistencia a INH es el resultado de la acumulación de mutaciones, entre ellas las que alteran la función de la proteína activadora KatG (~70% de los aislados resistentes tienen la mutación S315T). México es uno de los países que presenta más casos de TB resistente a INH en América Latina y se sabe poco sobre las características moleculares de estas cepas. Con el fin de proporcionar una mayor comprensión, el INMEGEN identificó la presencia de diversas mutaciones en cepas de *M. tuberculosis* asociadas a resistencia a INH utilizando secuenciación de nueva generación directamente de aislados clínicos de pacientes de diversas regiones de México. El objetivo de este estudio es la caracterización funcional de variantes de KatG, encontradas por el INMEGEN y en distintos estudios publicados a nivel mundial.

Se construirán 6 variantes de KatG seleccionadas a partir de la información sobre la ubicación de los residuos en la estructura y se compararán con dos controles KatG-WT y KatG-S315T. Se determinarán los parámetros catalíticos para tres actividades enzimáticas (catalasa, peroxidasa, formación del aducto INH-NAD) de todas las variantes. Con el fin de comprender mejor los orígenes de la resistencia de las variantes de KatG, se compararán las propiedades catalíticas ( $K_m$ ,  $k_{cat}$ ,  $k_{cat}/K_m$ ) de las variantes con los controles.

# Contenido

Glosario.....	VI
Lista tablas.....	VII
Lista figuras.....	VII
1. Introducción .....	1
1.1 Tuberculosis .....	1
1.2 Isoniazida .....	2
1.3 Mecanismo de acción de INH .....	3
1.4 KatG .....	4
1.4.1 Estructura .....	4
1.4.2 Activación de INH por KatG .....	6
1.4.3 Mutaciones de KatG relacionadas con resistencia a INH .....	8
2. Antecedentes.....	9
3. Justificación .....	11
4. Hipótesis .....	11
5. Objetivo .....	12
<b>Objetivos particulares:</b> .....	12
6. Metodología .....	13
6.1 Selección de variantes. ....	13
6.2 Construcción de variantes .....	14
6.3 Expresión de variantes de KatG en <i>E.coli</i> . ....	16
6.4 Purificación de las enzimas KatG .....	16
6.4 Cuantificación de la proteína purificada y visualización en gel SDS-PAGE al 10% .....	16
6.5 Medición de parámetros catalíticos. ....	17
6.4.1 Actividad de catalasa .....	17
6.4.2 Actividad de peroxidasa .....	18
6.4.3 Formación del aducto IN-NAD. ....	18
7. Resultados y Discusión .....	19
7.2 Secuenciación .....	22
7.3 Expresión y purificación de las proteínas .....	23
7.4 Caracterización de parámetros catalíticos. ....	26
7.4.1 Actividad de catalasa .....	26
7.4.2 Actividad de Peroxidasa .....	27

7.4.3 Actividad de formación de aducto IN-NAD .....	28
Conclusiones.....	29
Bibliografía.....	30
Apéndice.....	31

## Glosario

- TB: Tuberculosis
- TB-MDR: Tuberculosis multirresistente
- INH: Isoniazida (ácido isonicótino hidrazido)
- InhA: enoil-ACP reductasa dependiente de NADH
- NAD: Nicotinamida adenina dinucleótido
- IN-NAD: Aducto covalente entre un radical isonicotinoil y una molécula de NAD
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : Peróxido de hidrógeno
- Mt-KatG: KatG de *M. tuberculosis*.
- H: His (Histidina)
- W: Trp: Triptófano
- T: Tyr (Tirosina)
- Y: Thr (Treonina)
- G: Gly (Glicina)
- S: Ser (Serina)
- I: Ile (Isoleucina)
- L: Leu (Leucina)
- V: Val (Valina)
- P: Pro (Prolina)
- R: Arg (Arginina)
- A: Ala (Alanina)
- D: Asp (Aspártico)
- N: Asn (Asparagína)



## Lista tablas

**Tabla 1.** Variantes seleccionadas en este estudio.

**Tabla 2.** Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la construcción de las variantes.

**Tabla 3.** Concentración de proteína pura de las variantes purificadas.

## Lista figuras

**Figura 1.** Línea del tiempo del descubrimiento de INH en la búsqueda por mejores tratamientos contra la tuberculosis. Fuente: (Vilchèze and Jacobs 2007).

**Figura 2.** Formación del aducto covalente INH-NAD que inhibe a InhA, implicada en la síntesis de ácidos micólicos, principales componentes de la pared celular de *M. tuberculosis*. Fuente: (Vilchèze and Jacobs 2007)

**Figura 3.** Estructura homodimérica de KatG. El grupo hemo está representado en color gris (Bertrand et al. 2004)

**Figura 4.** Estructura cristalográfica de Mt-KatG. Los sitios de unión con INH reportados se marcan en amarillo. Fuente: (Brossier et al. 2016)

**Figura 5.** Aducto covalente que es indispensable en la actividad de catalasa, está formado por los residuos Met255, Tyr229 y Trp107. (Bertrand et al. 2004)

**Figura 6.** Mecanismo de activación de INH por acción de KatG. Fuente: (Njuma, 2014)

**Figura 7.** Comparación estructural entre KatG-WT y la variante S315T en el sitio de unión con INH Fuente: (Zhao et al. 2006)

**Figura 8.** Datos comparativos entre los parámetros catalíticos de KatG-WT y KatG-S315T. Datos no publicados

**Figura 9.** Número global de personas reportadas que han estado en tratamiento para MDR/RR-TB de 2015-2019 Fuente: (WHO 2020)

**Figura 10.** Localización de la posición de las variantes seleccionadas en la estructura de KatG. En naranja claro están representadas las variantes sensibles (R463L y N238G); en naranja intenso las variantes con sensibilidad baja (A110V y D189G); en rojo las variantes con resistencia media (S135, S315I, S315G) y en amarillo la variante con resistencia alta (L336P). Moléculas de INH están representadas en verde y marcadas con círculos negros.

**Figura 11.** Curva de calibración del método de Bradford para cuantificar la concentración de la proteína purificada.

**Figura 12.** Visualización de los fragmentos de DNA del gen de KatG para la construcción de las variantes S315G (carriles 4-5), S315I (carriles 6-7) y L336P (carriles 2-3)

**Figura 13.** Visualización del gen de katG usando como templado los fragmentos amplificados en la PCR1. Variantes N238G(carril 6), R463L(carril 5), S315G (carril 3), S315I (carril 4), L336P (carril 2).

**Figura 14.** Mapa del vector pkk223-3-katG

**Figura 15.** Patrón de digestión de los plásmidos purificados para la construcción de las variantes 315G (carriles 2-5) y S315I (carriles 6-9)

**Figura 16.** Purificación de enzima KatG de la variante N238G por columna de afinidad Ni-NTA

**Figura 17.** Ensayo de Bradford para obtener la curva estándar para la cuantificación de proteínas.

**Figura 18.** Visualización de las proteínas purificadas en un gel SDS-PAGE para confirmar la purificación de las enzimas

**Figura 19.** Comparación de las mediciones para la actividad de catalasa entre los controles y todas las variantes. Solo se muestra una determinación, sin réplicas.

**Figura 20.** Comparación de las mediciones para la actividad de peroxidasa entre los controles y todas las variantes. Sólo se muestra una determinación, sin réplicas.

**Figura 21.** Comparación de las mediciones para la actividad de formación de INH-NAD variando las concentraciones de NAD entre los controles y todas las variantes. Sólo se muestra una determinación, sin réplicas.

# 1. Introducción

## 1.1 Tuberculosis

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa causada por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis*. Se transmite generalmente por aire a través de gotas de saliva con la bacteria producidas por las personas infectadas cuando tosen, estornudan o hablan. Se establece principalmente en los pulmones y puede permanecer en un estado latente, es decir, en un estado inactivo donde la bacteria no crece ni es virulenta. Se calcula que una cuarta parte de la población mundial tiene TB latente. Sin embargo, las personas que presentan condiciones de inmunosupresión como desnutrición, VIH o diabetes y los consumidores de tabaco corren un riesgo mayor de presentar la enfermedad. Es la principal causa de muerte en personas VIH-positivas. La TB se encuentra entre las diez principales causas de muerte en el mundo y ha sido un problema de salud pública desde hace cientos de años. En 2019, 7.1 millones de personas fueron diagnosticadas con TB, de los cuales el 86% eran pacientes VIH positivos (World Health Organization 2020).

Los síntomas que se presentan con la enfermedad pueden ser moderados durante varios meses y es una de las razones por las que los pacientes tardan en recibir un tratamiento adecuado. La TB activa y sensible a antibióticos es tratada en un periodo de seis meses con los cuatro fármacos de primera línea: isoniazida, rifampicina, etambutol y pirazinamida (Nahid *et al.* 2016).

La tuberculosis multirresistente (TB-MDR) se presenta cuando la cepa no responde al tratamiento con isoniazida, rifampicina o algún otro fármaco de primera línea. El tratamiento para estos casos es más largo y requiere el uso de fármacos más tóxicos y de mayor costo. La resistencia a los fármacos contra la TB se ha desarrollado a lo largo de décadas y se ha potenciado por la interrupción prematura del tratamiento por los pacientes, por mala prescripción médica o por la mala calidad del medicamento (World Health Organization 2020).

## 1.2 Isoniazida

En 1940, el tratamiento más efectivo para tratar la TB era el antibiótico estreptomina y otros medicamentos sintéticos como ácido p-aminosalicílico. A pesar de ser un tratamiento efectivo para erradicar la TB, la estreptomina era muy tóxica a los pacientes, además de que se presentaron rápidamente casos de cepas resistentes (Vilchèze and Jacobs 2007).

Un grupo de investigadores europeos mostraron que la nicotinamida tenía un efecto contra la TB; a partir de ahí y con estudios de desarrollo de moléculas basadas en la nicotinamida se desarrolló la pirazinamida. Sin embargo, la frecuencia con la que *M. tuberculosis* desarrollaba resistencia a esta molécula fue considerada muy alta como para usarse como tratamiento eficaz. Los intentos para seguir desarrollando compuestos a base de nicotinamida y tiosemicarbozono dieron como resultado el descubrimiento de  $\beta$ - y d-piridilaldehído tiosemicarbozonas que incrementaban la actividad antimicrobiana. Uno de los intermediarios en la síntesis del último compuesto, el ácido isonicotínico hidrazido (INH) tuvo una actividad mucho mayor contra la TB en comparación con las otras moléculas. A partir de 1952, la INH se ha usado como fármaco de primera línea contra la TB (Vilchèze and Jacobs 2007).

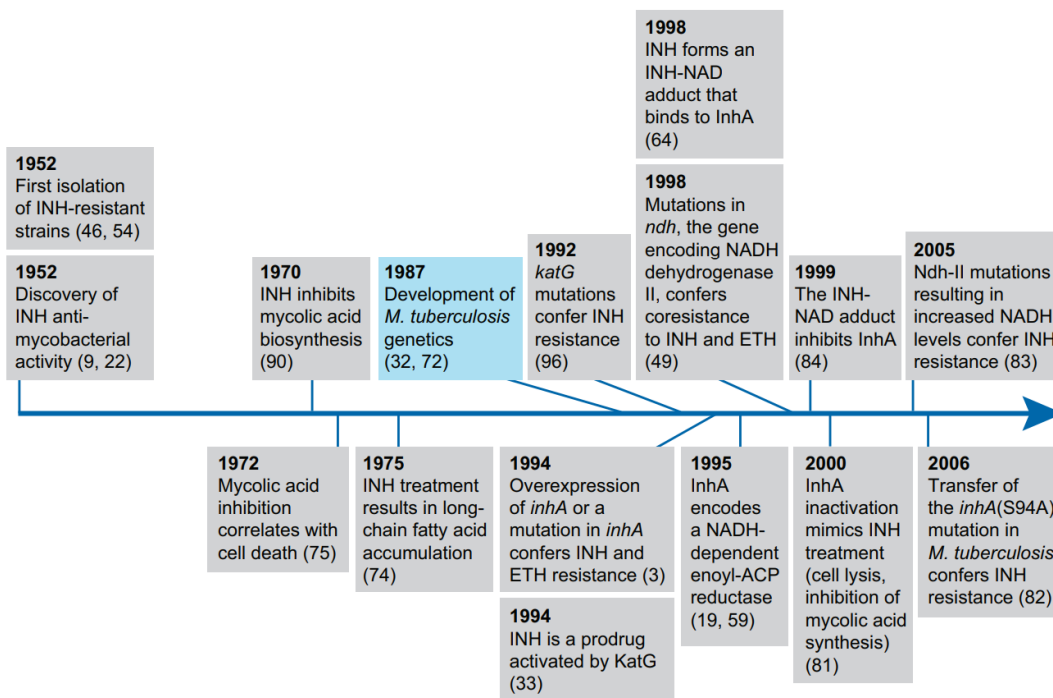


FIGURA 1. LÍNEA DEL TIEMPO DEL DESCUBRIMIENTO DE INH EN LA BÚSQUEDA POR MEJORES TRATAMIENTOS CONTRA LA TUBERCULOSIS. FUENTE: (VILCHÈZE AND JACOBS 2007).

### 1.3 Mecanismo de acción de INH

La activación de INH es a través de una reacción de oxidación catalizada por la enzima KatG de *M. tuberculosis* para formar un radical isonicotinoil que se une a una molécula de NAD<sup>+</sup> formando un aducto covalente que inhibe a la enzima InhA. InhA es una enoil-ACP reductasa dependiente NADH del sistema sintetasa II (FAS II) de ácidos grasos y está involucrada en la biosíntesis de ácidos micólicos. Los ácidos micólicos son cadenas largas (70 a 90 carbonos) de  $\alpha$ -acil  $\beta$ -hidroxiácidos, y son el principal componente de la pared de micobacterias. La inhibición de InhA resulta en la acumulación de largas cadenas de ácidos grasos, lo que conlleva a muerte celular (Vilchèze and Jacobs 2007).

La resistencia a INH en aislados clínicos de *M. tuberculosis* están comúnmente relacionados con mutaciones en el gen *katG*. Sin embargo, se han caracterizado mutaciones en el gen de *inhA* que también confiere resistencia a INH al aumentar la afinidad por NADH, lo que vuelve a la enzima más resistente a la inhibición por el aducto INH-NAD (Vilchèze and Jacobs 2007).

Otra mutación que también genera resistencia tiene lugar en el promotor del gen de *inhA*. Esta mutación incrementa la expresión de la enzima veinte veces (Vilchèze and Jacobs 2007).

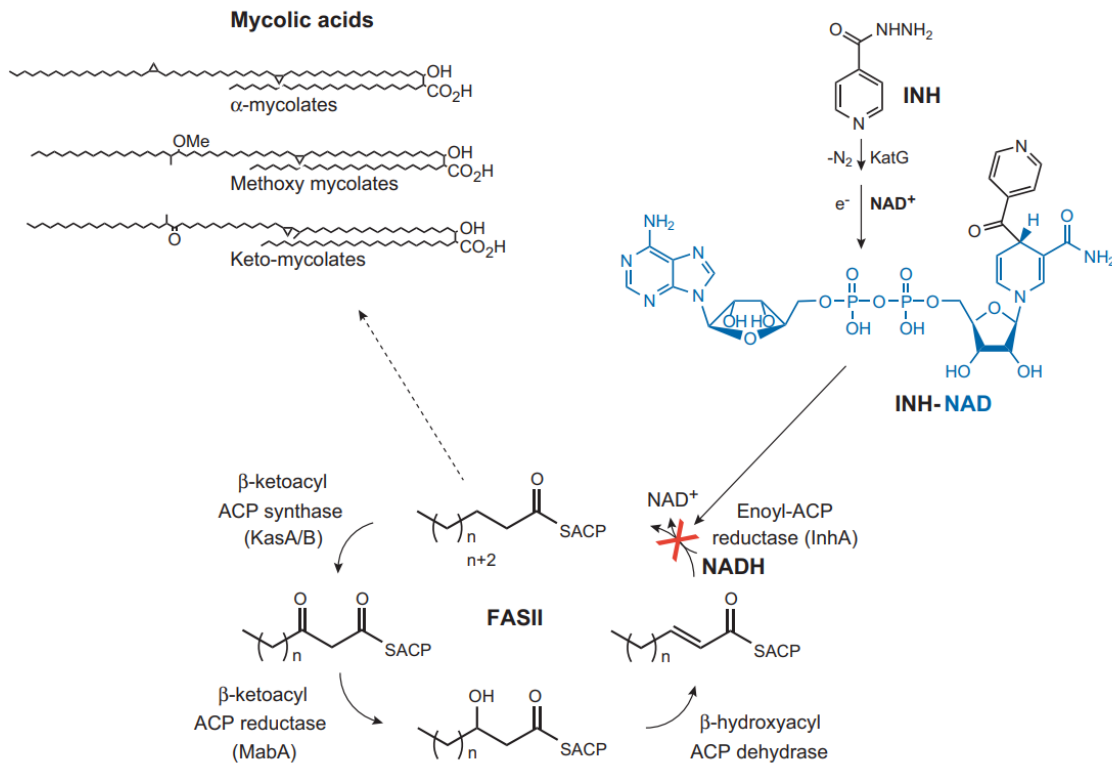


FIGURA 2. FORMACIÓN DEL ADUCTO COVALENTE INH-NAD QUE INHIBE A INHA, IMPLICADA EN LA SÍNTESIS DE ÁCIDOS MICÓLICOS, PRINCIPALES COMPONENTES DE LA PARED CELULAR DE *M. TUBERCULOSIS*. FUENTE: (VILCHÈZE AND JACOBS 2007)

## 1.4 KatG

Las catalasas peroxidadas son enzimas bifuncionales hemodependientes que confieren protección a bacterias contra moléculas tóxicas presentes en ambientes aeróbicos (hiperóxidos, radicales de hidroxilo). Se ha propuesto que presentan una alta promiscuidad catalítica en comparación con las catalasas monofuncionales ya que son capaces de oxidar numerosos compuestos (Njuma, Ndontsa, and Goodwin 2014).

La KatG de *M. tuberculosis* (Mt-KatG) pertenece a la clase I de la superfamilia de peroxidadas, por lo que es capaz de utilizar peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) o de acil hidroperóxido para catalizar la oxidación de varios sustratos, incluyendo a INH (Bertrand *et al.* 2004).

### 1.4.1 Estructura

Mt-KatG es un homodímero de 744 residuos de aminoácidos. Cada monómero está compuesto de dos dominios; el dominio N-terminal que presenta el sitio de unión del grupo hemo y el dominio C-terminal que carece de un motivo de unión al grupo hemo, pero con una secuencia bastante similar al dominio N-terminal, sugiriendo que la enzima pudo surgir por un evento de duplicación del gen ( Figura 3) (Bertrand *et al.* 2004).

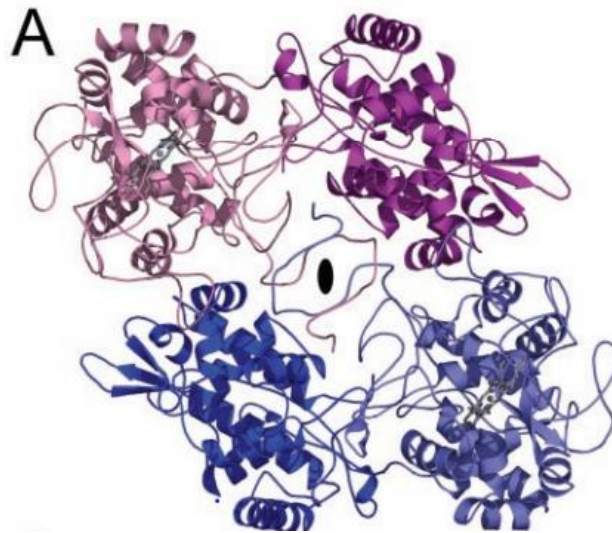
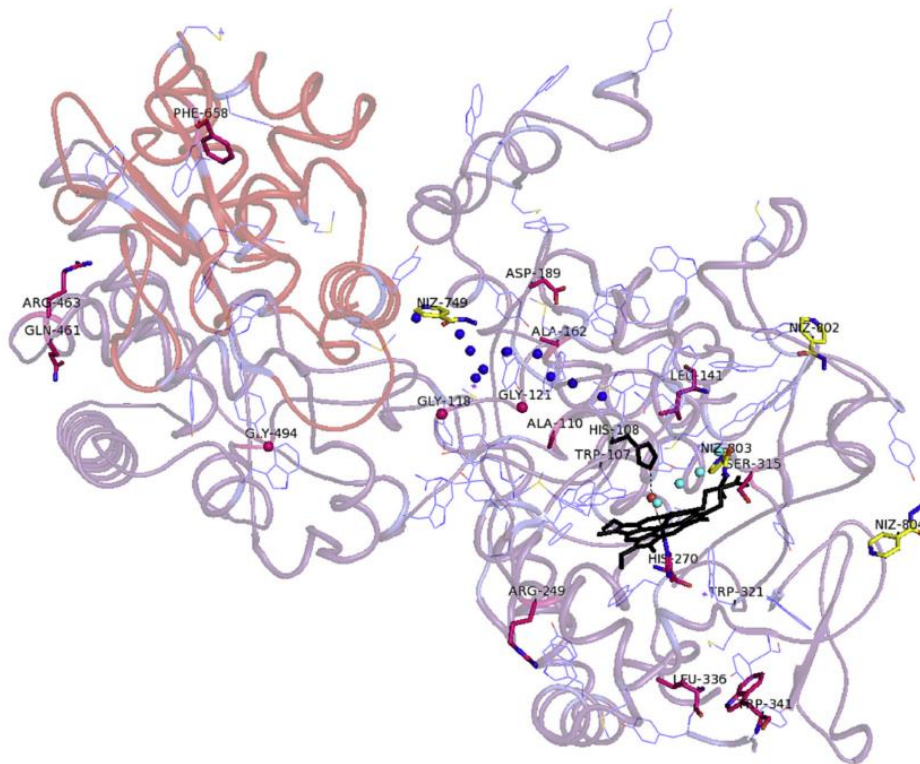


FIGURA 3. ESTRUCTURA HOMODIMÉRICA DE KATG. EL GRUPO HEMO ESTÁ REPRESENTADO EN COLOR GRIS (BERTRAND ET AL. 2004)

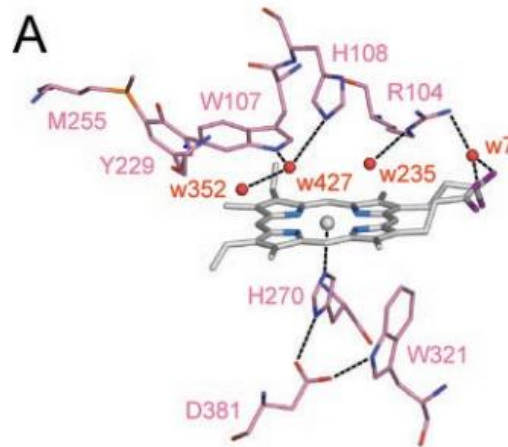
El grupo hemo está rodeado de un “bolsillo” proximal (His 270 y Trp321) y uno distal (Trp107 y His108); este último se encuentra en la superficie de la proteína y crea un canal de acceso al grupo hemo a través de un canal ocupado por moléculas de agua. Se ha demostrado por cristalografía de rayos x que una molécula de INH puede unirse en este sitio, sin embargo, también se ha demostrado que existen otros sitios donde se pueda unir la molécula (Brossier *et al.* 2016).

La cantidad de residuos de triptófano (Trp) y tirosina (Tyr) son considerablemente mayores a los de las catalasas monofuncionales. Mientras que las catalasas monofuncionales presentan máximo siete residuos de triptófano, Mt-KatG tiene 24 residuos de Trp y 21 de Tyr en su secuencia. La presencia de un número elevado de residuos aromáticos provoca la posibilidad de formación de radicales de Tyr de vida corta y la formación de vías de intercambio de electrones (Colin *et al.* 2009).



**FIGURA 4. ESTRUCTURA CRISTALOGRÁFICA DE MT-KATG. LOS SITIOS DE UNIÓN CON INH REPORTADOS SE MARCAN EN AMARILLO. FUENTE: (BROSSIER ET AL. 2016)**

Una estructura muy particular de las Mt-KatG es la presencia de un aducto covalente formado entre los residuos Trp107, Tyr229 y Met255 que es necesario para la actividad de catalasa, la cual es un factor de virulencia de *Mycobacterium* ya que protege a la bacteria de radicales libres que se forman para tratar de combatir la infección (Figura 5) (Bertrand *et al.* 2004).



**FIGURA 5. ADUCTO COVALENTE QUE ES INDISPENSABLE EN LA ACTIVIDAD DE CATALASA, ESTÁ FORMADO POR LOS RESIDUOS MET255, TYR229 Y TRP107. (BERTRAND ET AL. 2004)**

#### 1.4.2 Activación de INH por KatG

El mecanismo por el cual KatG activa a INH es por la oxidación del pro-fármaco a un radical isonicotinoil que reacciona con una molécula de NAD<sup>+</sup> para formar el aducto IN-NAD. La oxidación de INH puede darse por dos mecanismos principales. Uno es un mecanismo dependiente de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y la formación del radical ferril porfirina; el segundo es un mecanismo independiente de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> donde el estado de oxidación del grupo hemo pasa de Fe<sup>IV</sup> a Fe<sup>III</sup> (Figura 6. *Mecanismo de activación de INH por acción de KatG. Fuente: (Njuma, 2014) (Njuma, Ndontsa, and Goodwin 2014)*)



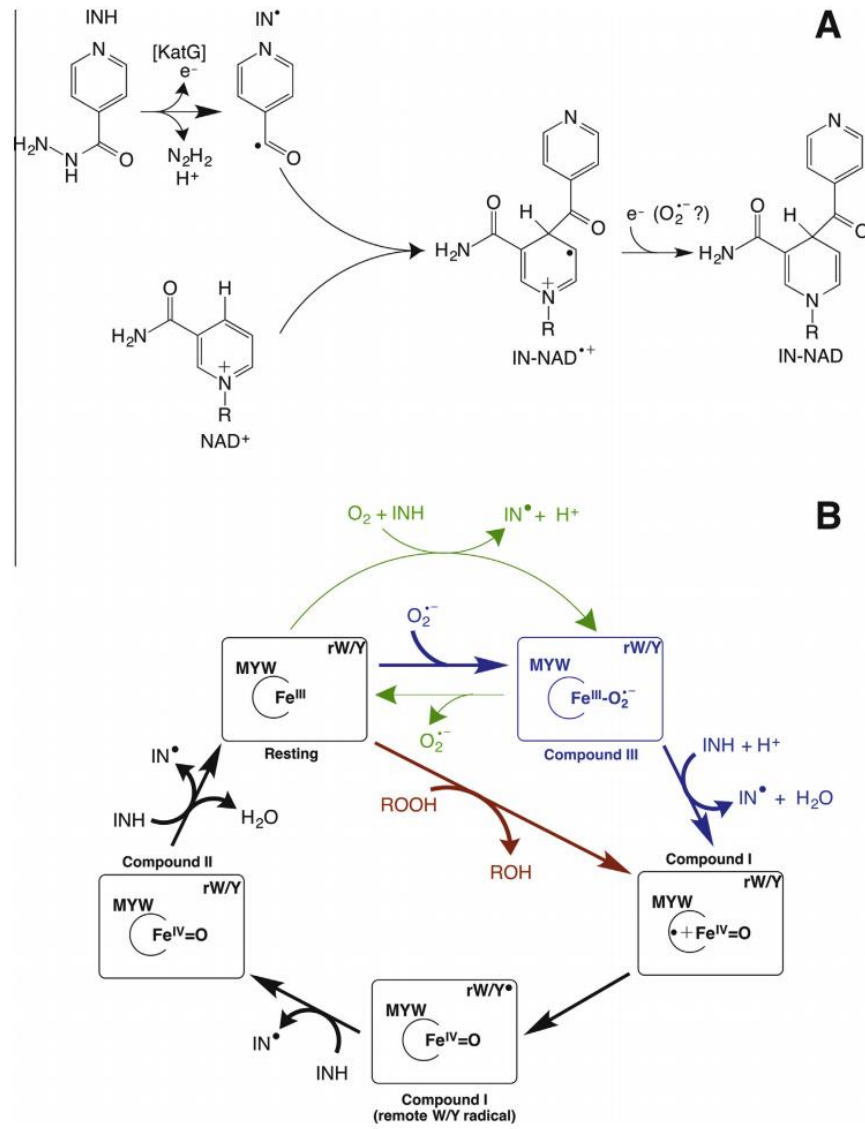


FIGURA 6. MECANISMO DE ACTIVACIÓN DE INH POR ACCIÓN DE KATG. FUENTE: (NJUMA, 2014)

### 1.4.3 Mutaciones de KatG relacionadas con resistencia a INH

El entendimiento del funcionamiento de Mt-KatG es de relevancia ya que se ha demostrado que diversos cambios en su secuencia de aminoácidos están relacionados con la resistencia al tratamiento con INH. Esto sugiere que pequeños cambios en su estructura afectan la función de la enzima (Brossier et al. 2016).

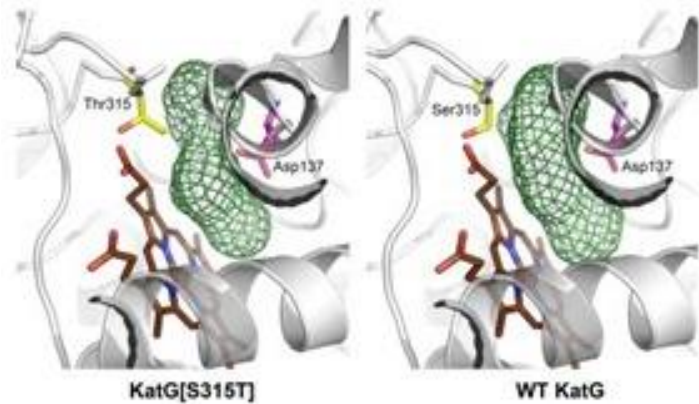


FIGURA 7. COMPARACIÓN ESTRUCTURAL ENTRE KATG-WT Y LA VARIANTE S315T EN EL SITIO DE UNIÓN CON INH FUENTE: (ZHAO ET AL. 2006)

El cambio puntual más común reportado es S315T; el 70% de aislados clínicos lo presentan. Se ha propuesto que el cambio de Thr por Ser afecta el principal sitio de unión de INH reduciendo la afinidad de la enzima por el profarmaco, lo que evita la formación del aducto covalente IN-NAD y por lo tanto inhibe su actividad antimicrobiana. Una característica importante sobre esta mutación es que la actividad de catalasa de la enzima se preserva en niveles parecidos a la silvestre (Figura 8) sugiriendo que la bacteria mantiene la “protección” contra peróxidos (Zhao et al. 2006).

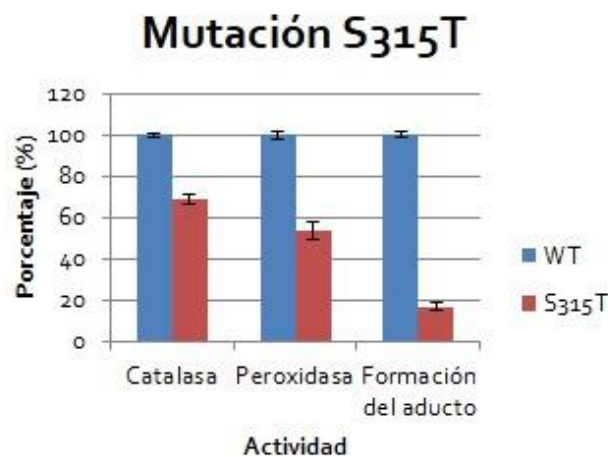


FIGURA 8. DATOS COMPARATIVOS ENTRE LOS PARÁMETROS CATALÍTICOS DE KATG-WT Y KATG-S315T. DATOS NO PUBLICADOS

## 2. Antecedentes

Aunque la aparición de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a los fármacos de primera línea (INH, rifampicina) no han mostrado una diferencia entre el modo de infección, la patología y la transmisibilidad de la enfermedad, es preocupante el creciente número de casos de MDR-TB debido a las reducidas opciones de tratamientos contra dicha enfermedad (Nahid et al. 2016).

La detección de MDR-TB requiere pruebas de cultivo celular o técnicas de secuenciación. En 2019, hubo un aumento del 10% en pruebas realizadas para determinar MDR-TB (Figura 9). Sin embargo, a pesar del incremento de pruebas solo el 38% de los pacientes con MDR-TB tuvieron acceso a un tratamiento (World Health Organization 2020).

Uno de los problemas principales para la determinación de un tratamiento efectivo contra MDR-TB es el extenso número de cambios registrados en Mt-KatG que confieren resistencia a algún fármaco de primera línea. **CRyPTIC** (Consortio Internacional de Predicción Integral de la Resistencia para la Tuberculosis) es un consorcio internacional que registra nuevas mutaciones de MDR-TB mediante predicción genética. Tiene como objetivo ayudar a mejorar el control de la TB mediante un mejor tratamiento, más rápido y específico para MDR-TB. Su visión es contribuir con la Organización Mundial de la Salud en su proyecto de erradicar la enfermedad por medio de tratamientos específicos y más personalizadas dependiendo del tipo de resistencia que presente el paciente (CRyPTIC, 2017).

### The global number of people reported to have been enrolled on treatment for MDR/RR-TB, 2015–2019

Global data disaggregated by age are not available for the years before 2018.

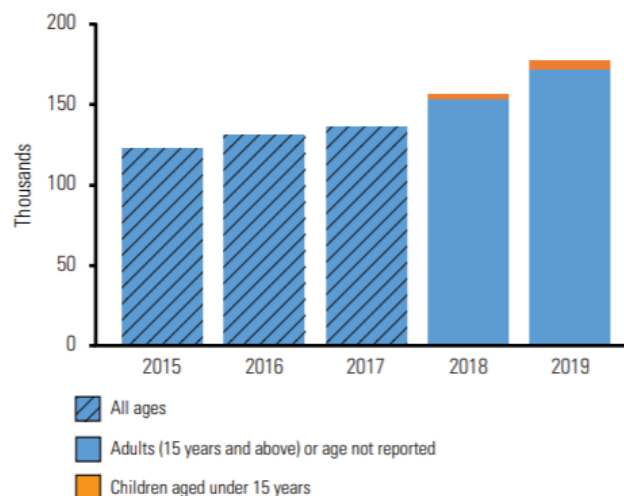


FIGURA 9. NÚMERO GLOBAL DE PERSONAS REPORTADAS QUE HAN ESTADO EN TRATAMIENTO PARA MDR/RR-TB DE 2015-2019 FUENTE: (WHO 2020)

A pesar de que el cambio S315T es el más común, existen cientos que generan resistencia al fármaco, pero solo unas decenas de ellos han podido ser caracterizados y determinados su nivel de resistencia alto o moderado. Poder caracterizar y clasificar las mutaciones con el nivel de resistencia ayudaría en poder determinar un tratamiento eficaz y personalizado contra la enfermedad.

En 2016, Brossier y colaboradores seleccionaron 16 variantes de Mt-KatG para caracterizar y relacionar su nivel de resistencia a INH por el método de proporción Lowenstein-Jensen, usando distintas concentraciones de INH: 0.1, 0.2, 1 y 10 mg/L . Clasificaron a las variantes acorde a su nivel de resistencia como: sensible, bajo, medio y alto. Una variante sensible la definieron por sus actividades casi iguales con la proteína WT; un nivel bajo de resistencia bajo fue definido como  $> 0.2$  pero  $< 1\text{mg/L}$ ; un nivel medio de resistencia fue definido como  $> 1\text{mg/L}$  de INH pero  $< 10\text{mg/L}$  y un nivel de resistencia alto como  $> 10\text{mg/L}$  (Brossier et al. 2016).

### 3. Justificación

Es necesario evaluar la relación que existe entre el nivel de resistencia reportado para las variantes de Mt-KatG con el efecto que tienen en el cambio de sus parámetros catalíticos para una mayor comprensión de la enzima y su papel en la resistencia a INH.

### 4. Hipótesis

Las variantes de Mt-KatG reportadas correlacionan su aumento nivel de resistencia a INH con una disminución de la eficiencia catalítica reflejada en sus parámetros catalíticos.

## 5. Objetivo

Evaluar los cambios en los parámetros catalíticos de variantes de Mt-KatG relacionadas con resistencia a INH

### Objetivos particulares:

- Construir siete variantes de Mt-KatG seleccionadas a partir de la información reportada
- Purificar las variantes de Mt-KatG mediante una columna de afinidad
- Determinar los parámetros catalíticos de tres actividades enzimáticas (catalasa, peroxidasa, formación del aducto INH-NAD) de las variantes
- Comparar los parámetros de las variantes con dos controles, KatG-WT y KatG-S315T
- Comparar los resultados de las variantes con el nivel de resistencia a INH reportado en la literatura
- Proponer una nueva variante que cambie los parámetros catalíticos para la formación del aducto INH-NAD a raíz de los datos obtenidos con las variantes caracterizadas

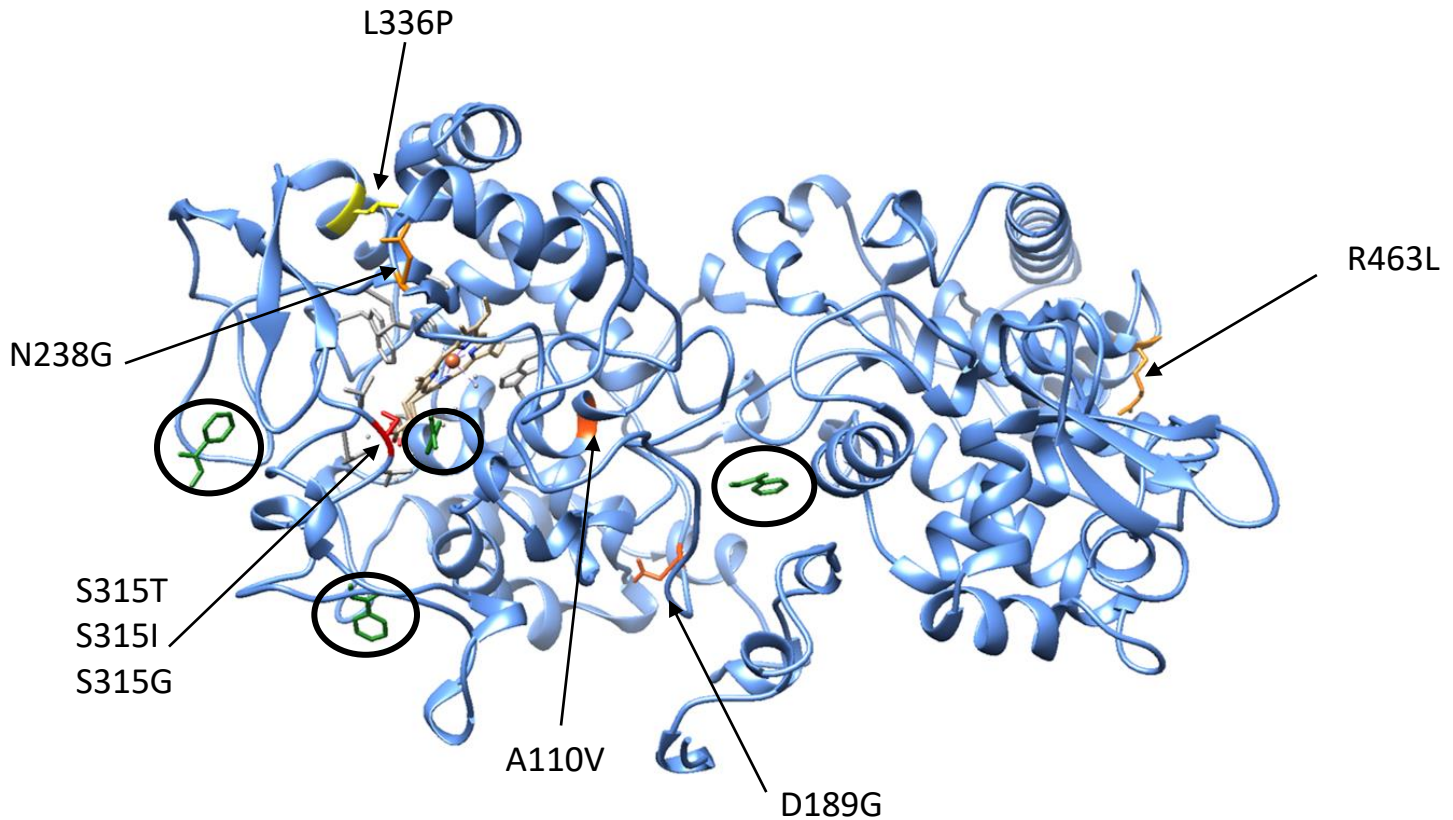
## 6. Metodología

### 6.1 Selección de variantes.

Con base en la clasificación descrita por Brossier y colaboradores, se eligieron las variantes para construir y evaluar su nivel de resistencia con INH. Estas variantes fueron seleccionadas debido a que ya han sido reportadas y clasificadas como sensibles o con resistencia baja, media o alta (Tabla 1) (Brossier et al. 2016). La Figura 10 muestra la localización estructural de las posiciones escogidas para el estudio.

Variante	Resistencia a INH	Localización de la mutación
WT (control)	sensible	
S315T (control)	Media	En el canal de acceso al grupo hemo
R463L	Sensible	Lejos del grupo hemo. Se ha reportado que tiene un incremento en la actividad de peroxidasa
N238G	Sensible	Cercana a una His que coordina con el grupo hemo
A110V	Baja	Cercana a la cavidad del grupo hemo y al aducto Met255-Tyr229-Trp107
D189G	Baja	Lejos del grupo hemo y cerca de un sitio de unión a INH en la KatG de <i>Burkholderia pseudomallei</i>
S315I	Media	En el canal de acceso al grupo hemo
S315G	Media	En el canal de acceso al grupo hemo
L336P	Alta	En la cavidad proximal. Induce críticas alteraciones estructurales en una región esencial para la actividad de catalasa.

TABLA 1. VARIANTES SELECCIONADAS EN ESTE ESTUDIO.



**FIGURA 10. LOCALIZACIÓN DE LA POSICIÓN DE LAS VARIANTES SELECCIONADAS EN LA ESTRUCTURA DE KATG. EN NARANJA CLARO ESTÁN REPRESENTADAS LAS VARIANTES SENSIBLES (R463L Y N238G); EN NARANJA INTENSO LAS VARIANTES CON SENSIBILIDAD BAJA (A110V Y D189G); EN ROJO LAS VARIANTES CON RESISTENCIA MEDIA (S135, S315I, S315G) Y EN AMARILLO LA VARIANTE CON RESISTENCIA ALTA (L336P). MOLÉCULAS DE INH ESTÁN REPRESENTADAS EN VERDE Y MARCADAS CON CÍRCULOS NEGROS.**

## 6.2 Construcción de variantes

La construcción de las variantes se realizó mediante la metodología de mutagénesis sitio dirigida usando el plásmido PKK-KatG-WT como molde. Primero se construyeron dos fragmentos (que corresponden a todo el gen) con diferentes longitudes que contenían el cambio en la secuencia del gen. Para ello se utilizaron los oligos enlistados en la Tabla 2. Posteriormente se ensambló el gen mediante una PCR, usando los fragmentos previamente amplificados para ensamblar y amplificar el gen completo en una máquina termocicladora BIORAD T100 Thermal Cycler. Las PCR se hicieron bajo las siguientes condiciones:

- 95°C ----- 5 min.
- 95°C ----- 40 s.
- 55°C ----- 40 s.
- 68°C ----- 1 min.
- 68°C ----- 5 min.



El producto de PCR fue purificado por el kit de purificación de Roche para productos de PCR. Se visualizó el producto de la PCR en un gel de agarosa al 1% en una cámara de electroforesis de FisherBiotech Electrophoresis System FB 105. Se tiñó el gen con bromuro de etidio (10 mg/ml) y se visualizó en el fotodocumentador BIORAD Gel Doc EZ imager.

El producto de la PCR se digirió con las enzimas de restricción EcoRI y HindIII las cuales generan extremos cohesivos no s entre ellos. Posteriormente, el inserto se ligó al vector PKK223-3 cortado con las mismas enzimas. En la reacción de ligación se usó en una relación 3:1 de inserto:vector.

El producto de ligación fue introducido en células electrocompetentes *E.coli* MC1061 por electroporación. Se purificó el plásmido de algunas clonas de la transformación y se mandó a secuenciar a la Unidad de Secuenciación del IBT. Para ellos se utilizaron los oligonucleótidos pkk-5' y pkk-3' (Tabla 2) según fuera el caso.

De cada una de las construcciones se seleccionó una clona cuya secuencia solo presentara el cambio deseado. Esta clona se utilizó como molde para introducir una secuencia en el extremo 5' del gen que codifica para 6H (Tabla 2) y se repitieron los procedimientos descritos para mandar a secuenciar y verificar la adición de la etiqueta 6H.

OLIGO	SECUENCIA
Mut-R463L	5'GCCTTAAGAGCCAGATCCTGGCATCGGGATTGACTG 3' 5'CAGTCAATCCCGATGCCAGGATCTGGCTCTTAAGGC 3'
Mut-N238G	5'GAGGGGCCGAACGGCGGCCCGGACCCCATGGC 3' 5'GCCATGGGGTCCGGGCCCGCCGTTCCGGCCCTC 3'
Mut-A110V	5'ATGGCGTGGCACGCTGTTCGGCACCTACCGCATC 3' 5'GATGCGGTAGGTGCCGACAGCGTGCCACGCCAT 3'
Mut-D189G	5'GCTTCGGCCGGGTCGGCCAGTGGGAGCCCGAT 3' 5'ATCGGGCTCCCACTGGCCGACCCGGCCGAAGC 3'
Mut-S315I	5'GTAAGGACGCGATCACCATTCGGCATCGAGGTCGTAT 3' 5'ATACGACCTCGATGCCGATGGTGATCGCGTCCTTAC 3'
Mut-S315G	5'GTAAGGACGCGATCACCGGCGGCATCGAGGTCGT 3' 5'ACGACCTCGATGCCGCCGGTGATCGCGTCCTTAC 3'
Mut-L336P	5'ACAGTTTCCTCGAGATCCCGTACGGCTACGAGTGGG 3' 5'CCCACTCGTAGCCGTACGGGATCTCGAGGAAACTGT 3'
Oligo 5' 6H	5'GAAACAGAATTCATATGCACCATCACCATCACCATCCCGAGCAACACCCA 3'
Pkk-5'	5'ATCATCGGCTCGTATAATGTGTGGA 3'
Pkk-3'	3'CGCCAGGCAAATTCTGTTTTATCAGACCGC 5'

TABLA 2. SECUENCIA DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS PARA LA CONSTRUCCIÓN DE LAS VARIANTES.

### 6.3 Expresión de variantes de KatG en *E. coli*.

Los plásmidos que expresan las variantes con la etiqueta de seis histidinas fueron introducidos en células de *E. coli* MC1061  $\Delta bioH/pREP4$  por electroporación. Las células transformadas fueron cultivadas en medio LB sólido con 200  $\mu\text{g}$  de ampicilina y 50  $\mu\text{g}$  de kanamicina y crecidas toda la noche a 30°C.

Se prepararon pre-cultivos (2ml de medio LB con 200  $\mu\text{g}$  de ampicilina y 50  $\mu\text{g}$  de kanamicina) a partir de una sola colonia de células transformadas con la clona de interés y se incubaron toda la noche a 30°C. Se inocularon 50 ml de medio LB que contiene 200  $\mu\text{l}$  de ampicilina con el pre-cultivo en una relación 1:100; se adicionó 30 mg/L de cloruro de hemo disuelta en 0.2N NaOH para asegurar la incorporación estequiométrica del cofactor hemo durante la sobreexpresión de la proteína en *E. coli* (Cade et, al. 2010). Cuando los cultivos tenían una densidad óptica ( $DO_{600\text{nm}}$ ) de 0.6 se indujeron con isopropil  $\beta$ -D-1tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 0.1 mM y se dejaron creciendo tres horas en incubadora Excella E25 New Brunswick Scientific. Las células se recolectaron por centrifugación a 4,500 rpm a 4 °C en la centrifuga Eppendorf centrifuge 5804 R. Después el botón celular fue almacenado a - 70°C.

### 6.4 Purificación de las enzimas KatG

Para la purificación de las proteínas, las células se resuspendieron en buffer de fosfatos  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  a 50 mM (pH 7.5) y se lisaron por sonicación a la máxima frecuencia durante cinco ciclos de diez segundos en el sonicador BRANSON SONIFIER 450. Los restos celulares se sedimentaron a 10,000 rpm durante 20 min en el rotor F-34-6-38; posteriormente se guardó el sobrenadante a 4 °C.

El sobrenadante se hizo pasar por una columna de resina de Ni-NTA siguiendo las instrucciones de purificación del fabricante, descrito brevemente a continuación:

A la columna se agrega 1 mL de resina (Invitrogen) y se lavan con 3 mL de agua y 3 mL de solución de carga ( $\text{NiSO}_4$  50mM). Después con 3 ml del buffer de unión y se carga el sobrenadante de las muestras; posteriormente, la columna se lava con 10 mL de buffer de unión (5 mM Imidazol, 0.5 mM de NaCl y 50 mM de fosfato de sodio pH 7.5) y con 6 mL de buffer de lavada ( 35 mM de Imidazol, 0.5 mM de NaCl y 50 mM de fosfato de sodio pH 7.5 ). Por último, se obtiene la proteína pura al pasar 1mL de buffer de elución (300mM Imidazol, 0.5mM de NaCl y 50mM de fosfato de sodio pH 7.5).

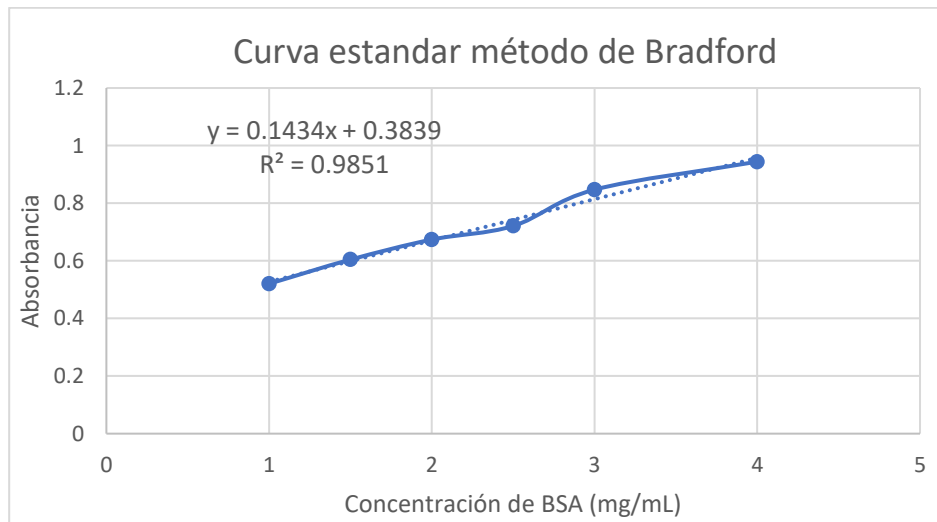
Para evitar contaminación entre las muestras purificadas, se usó una columna diferente para cada variante.

### 6.4 Cuantificación de la proteína purificada y visualización en gel SDS-PAGE al 10%

La cuantificación de la proteína purificada fue calculada usando el método de Bradford. Para ello se utiliza una curva de calibración con diferentes concentraciones de la proteína de suero bovino (BSA) que reacciona con el

colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 dando como resultado una escala de coloración que se relaciona con la concentración de proteína. Una vez obtenida la curva, se toma una muestra de la proteína obtenida de la purificación y se ajusta a la curva con base en la coloración obtenida y midiendo la absorbancia a 600 nm en el espectrofotómetro SOFIRE TECAN GENESIS 150; se hace un triplicado de cada muestra (Figura 11).

Para conocer la concentración de grupo hemo de las proteínas purificadas se hizo un escaneo de longitud de onda de 260 a 700 nm en el espectrofotómetro de luz UV-Visible Beckham Coulter DU 730. A 408 nm se observa el pico máximo de absorción del grupo hemo en su estado basal y a 280 nm la absorbancia de la proteína. La relación de ambas longitudes indica la cantidad de proteína que tiene unido el grupo hemo.



**Figura 11.** Curva de calibración del método de Bradford para cuantificar la concentración de la proteína purificada.

En el gel de acrilamida SDS-PAGE al 10% se colocó una concentración definida de cada variante purificada para confirmar si el tamaño de la banda correlacionaba con el tamaño de la proteína. De cada variante se cargaron 4  $\mu\text{g}$  de proteína para corroborar que la cuantificación era correcta. Las bandas de proteína que corresponden al tamaño de KatG se analizaron por densitometría en el programa Imagelab 4.1.

## 6.5 Medición de parámetros catalíticos.

La caracterización de los parámetros catalíticos se realizó por medición espectrofotométrica del cambio de absorbancia que genera la actividad enzimática a una determinada longitud de onda en un espectrofotómetro de luz UV-visible Beckham Coulter DU 730. Todos los ensayos se hicieron por triplicado.

### 6.4.1 Actividad de catalasa

La actividad de catalasa se determinó mediante la disminución en la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 240nm ( $\epsilon_{240\text{nm}} = 0.0435 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) durante 2 minutos. La mezcla de reacción contenía buffer de fosfatos ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) a pH 7.5 en una concentración de 50 mM,  $\text{H}_2\text{O}_2$  (a concentraciones de 0.5mM hasta 25mM) y KatG (30 nM).

Para calcular los parámetros catalíticos se varió la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Brossier et al. 2016).

#### 6.4.2 Actividad de peroxidasa

La actividad de peroxidasa se determinó mediante la oxidación de O-dianisidina a diferentes concentraciones (de 1.5  $\mu\text{M}$  hasta 200  $\mu\text{M}$ ) a 460nm ( $\epsilon_{460\text{nm}} = 11.3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) durante 2 minutos en presencia de hidroperóxido de terbutilo (tBHP) a 500 nM y buffer de acetatos.

#### 6.4.3 Formación del aducto IN-NAD.

La tasa de formación del aducto se determinó a 326 nm utilizando el coeficiente de extinción ( $\epsilon_{326\text{nm}} = 6,900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). La reacción se llevó a cabo en buffer de fosfatos ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) a pH 7.5 en una concentración de 50 mM, usando KatG (1 $\mu\text{M}$ ),  $\text{NAD}^+$  (1 mM), INH (200  $\mu\text{M}$ ) en presencia de un flujo constante de  $\text{H}_2\text{O}_2$  generado por un sistema de glucosa/glucosa oxidasa (G/Gox), con concentraciones de 16.7 mM y 66.6 mU/mL respectivamente (Wei et, al. 2003).

Para calcular los parámetros catalíticos se variaron las concentraciones de INH (de 400  $\mu\text{M}$  a 6400  $\mu\text{M}$ ), permaneciendo constante la concentración de NAD (1 mM). También se realizaron las mediciones variando la concentración de NAD de 30  $\mu\text{M}$  a 960  $\mu\text{M}$  manteniendo una concentración constante de INH (15mM)

## 7. Resultados y Discusión

### 7.1 Construcción de las variantes:

La representación del tamaño de los fragmentos amplificados en la PCR 1 y la posición de las mutaciones están representados en la Tabla . Todas las mutaciones coincidieron con las de su oligo complementario.

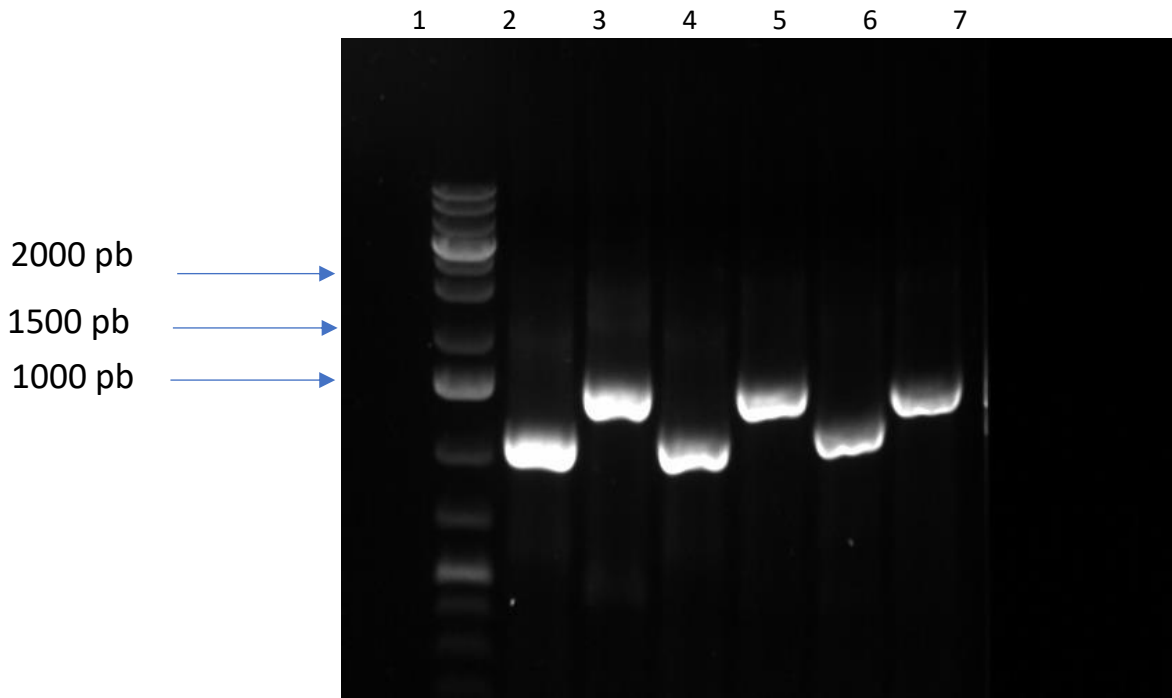
Oligo	Oligo complementario	Tamaño	Representación
<b>R463L (1)</b>	PKK 3'	949	
<b>R463L (2)</b>	PKK 5'	1473	
<b>N238G (1)</b>	PKK 5'	796	
<b>N238G (2)</b>	PKK 3'	1622	
<b>A110V (1)</b>	PKK 5'	413	
<b>A110V (2)</b>	PKK 3'	2006	
<b>D189G (1)</b>	PKK 5'	650	
<b>D189G (2)</b>	PKK 3'	1768	
<b>S315I (1)</b>	PKK 5'	1029	
<b>S315I (2)</b>	PKK 3'	1393	
<b>S315G (1)</b>	PKK 5'	1027	
<b>S315G (2)</b>	PKK 3'	1393	
<b>L336P (1)</b>	PKK 5'	1092	
<b>L336P (2)</b>	PKK 3'	1330	

**TABLA 3. LISTA DE OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS PARA LA CONSTRUCCIÓN DE LAS VARIANTES. SE MUESTRA EL TAMAÑO DEL PRODUCTO QUE SE GENERA EN LA PCR . CADA VARIANTE SE FORMA A PARTIR DEL ENSAMBLE DE DOS FRAGMENTOS.**

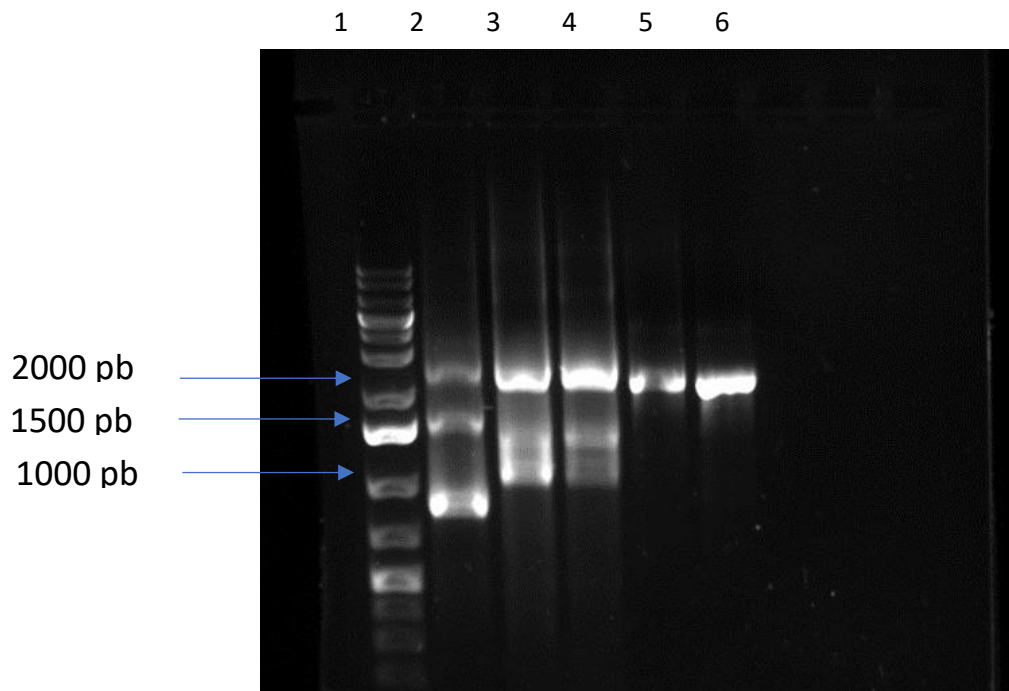
En la Figura 12 se muestran los productos generados para la construcción de las variantes S315G, S315I y L336P; el tamaño del producto de la PCR corresponde al de los fragmentos descritos en la Tabla . Los carriles 2-3 corresponden a la variante L336P; carriles 4-5 a la variante S315G y los carriles 6-7 corresponden a la variante S315I.

Los fragmentos obtenidos se purificaron de gel de agarosa al 1 % para posteriormente usarlos para ensamblar el gen en una segunda PCR. En la

Figura 13 se observa la banda del gen completo cercana a 2000 pb, la cual fue purificada en un gel de agarosa.



**FIGURA 12. VISUALIZACIÓN DE LOS FRAGMENTOS DE DNA DEL GEN DE KATG PARA LA CONSTRUCCIÓN DE LAS VARIANTES S315G (CARRILES 4-5), S315I (CARRILES 6-7) Y L336P (CARRILES 2-3)**



**FIGURA 13. VISUALIZACIÓN DEL GEN DE KATG USANDO COMO TEMPLADO LOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS EN LA PCR1. VARIANTES N238G(CARRIL 6), R463L(CARRIL 5), S315G (CARRIL 3), S315I (CARRIL 4), L336P (CARRIL 2).**

Las enzimas de restricción EcoRI y HindIII generan extremos cohesivos en el fragmento del gen y se ligó en una relación (molar) 3:1 con el vector (mencionado en la metodología) para asegurar por probabilidad la unión del inserto con el vector. La Figura 14 muestra el plásmido producido.

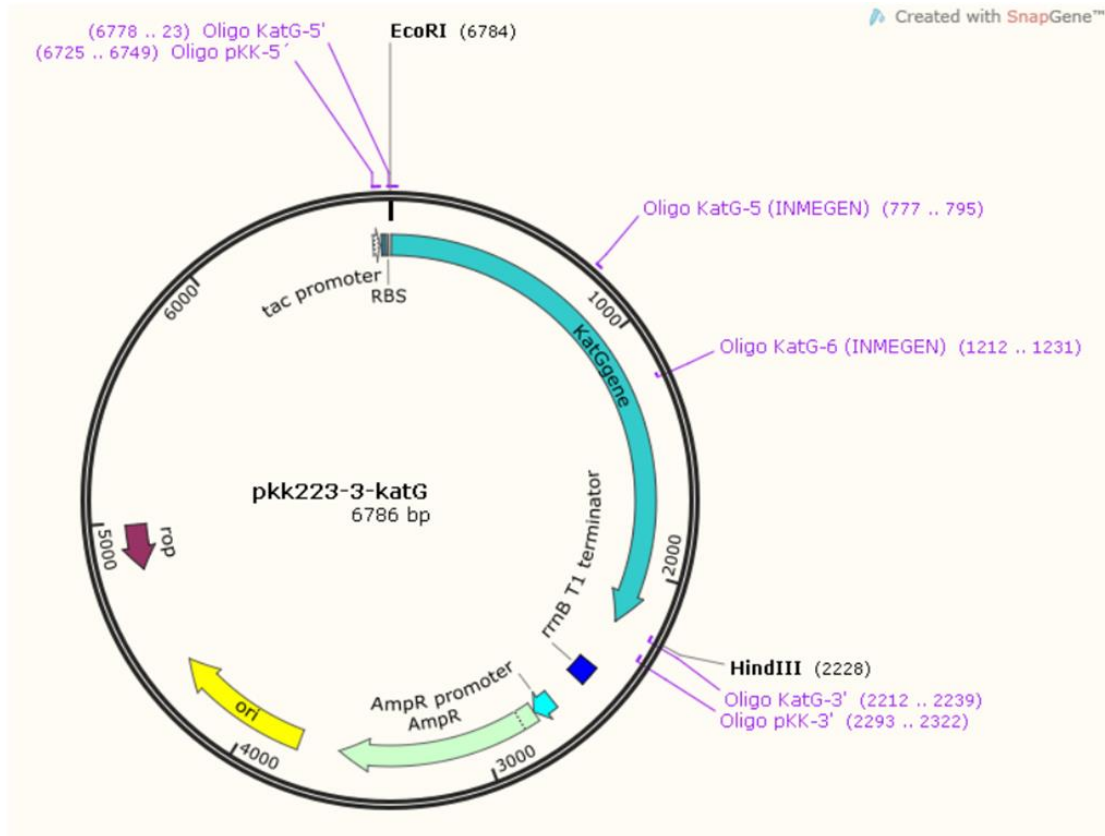
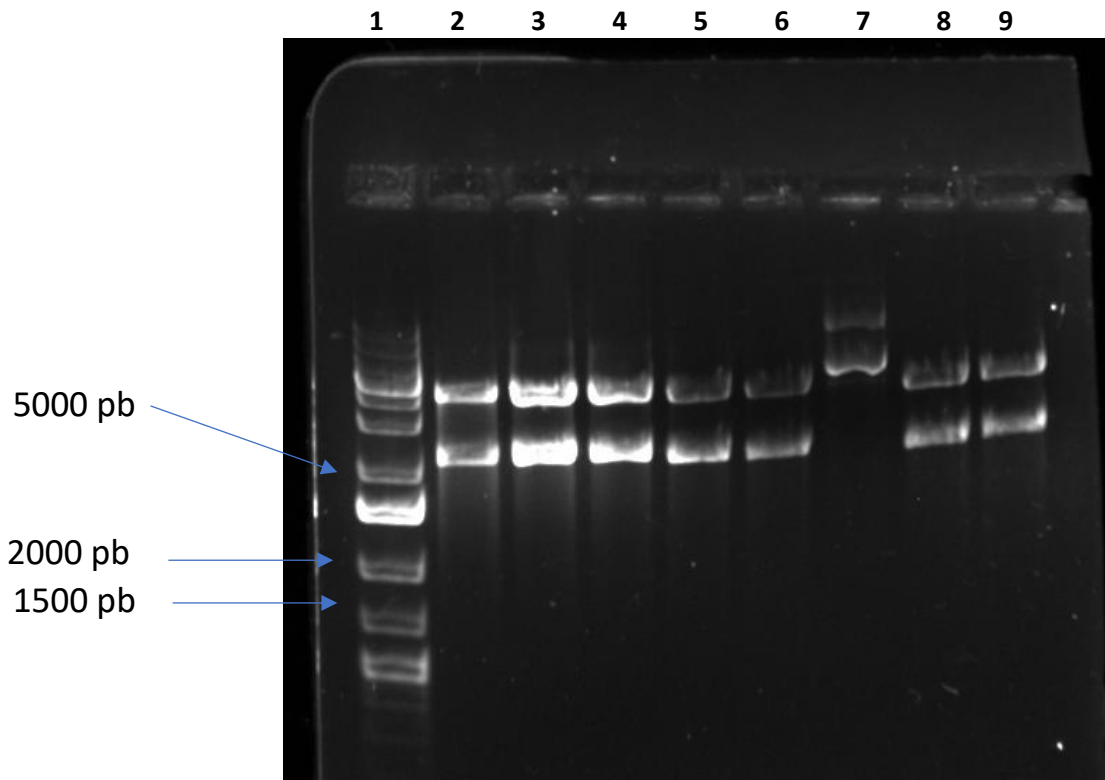


FIGURA 14. MAPA DEL VECTOR PPK223-3-KATG

El producto de la ligación se introdujo por electroporación en células electrocompetentes de la bacteria *E. coli* MC1061. De las clonas obtenidas se obtuvo los plásmidos por purificación como lo describe la metodología. Se comprobó por patrón de restricción que los plásmidos purificados tuvieran el inserto esperado antes de ser mandados a secuenciar.

En la Figura 15 se muestra el patrón de digestión de las variantes S315G (carriles 2-5) y S315I (carriles 6-9). Las bandas cercanas al tamaño de 200 pb corresponden al gen de *katG* mientras que las bandas cercanas al tamaño de 5000 pb corresponden al plásmido linealizado, las muestras que no presentaban la banda del gen fueron desechadas.



**FIGURA 15. PATRÓN DE DIGESTIÓN DE LOS PLÁSMIDOS PURIFICADOS PARA LA CONSTRUCCIÓN DE LAS VARIANTES 315G (CARRILES 2-5) Y S315I (CARRILES 6-9)**

Las construcciones de las variantes fueron realizadas de dos en dos para reducir la probabilidad de error y para ir confirmando que se realizaran de manera correcta.

A todas las variantes se les agregó una secuencia que codifica para una etiqueta de 6H. Para esto fue necesario repetir todos los procedimientos anteriores usando el oligo 5' H6 con la secuencia que codifica para la etiqueta de 6H. Las variantes con la etiqueta de 6H también fueron construidas de manera paulatina para disminuir la probabilidad de error. También se secuenciaron para evitar la introducción de cambios adicionales durante su construcción.

## 7.2 Secuenciación

Los plásmidos fueron secuenciados en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA del IBT y después fueron analizadas en BioEdit por alineamiento con la secuencia silvestre (apéndice 1). El alineamiento muestra un único cambio en la secuencia del gen que corresponde a la mutación construida. Las secuencias en las que se observaron mutaciones adicionales se descartaron.



### 7.3 Expresión y purificación de las proteínas

Para inducir la expresión del gen se siguió la metodología descrita y se almacenaron las células a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Cuando se indujo la expresión de la proteína silvestre y de la variante S315T, la concentración de cloruro de hemina que se agregó a los cultivos fue menor en comparación con lo que se añadió a las demás variantes. Se observó que hubo una disminución en la expresión de las proteínas de estas dos, a pesar de eso, la concentración obtenida para ambas variantes fue alta en comparación con lo reportado en la literatura. Lo anterior sugiere que el añadir el grupo hemo en el medio, se favorece la expresión de la proteína ya que pensamos que la proteína sin hemo se degrada. Sin embargo, se necesitarían realizar más pruebas que confirmen la hipótesis.

Durante la purificación por columna de afinidad, era muy notable la presencia de la proteína una vez cargada en la columna debido a las tonalidades café/rojizas características del grupo hemo. Para todas las variantes las tonalidades fueron diferentes y se pudo observar una relación entre tonalidad rojiza y la concentración de proteína. A mayor concentración de proteína con el grupo hemo, el color era más intenso. La purificación de la variante N238G (Figura 16) presentó un color rojizo intenso, el cuál coincidió con una concentración alta de proteína purificada.



**FIGURA 16. PURIFICACIÓN DE ENZIMA KATG DE LA VARIANTE N238G POR COLUMNA DE AFINIDAD Ni-NTA**

En la Figura 17 está representada la curva estándar utilizada para la cuantificación de unas de las proteínas purificadas. Las muestras representadas en la fila E en los pozos del 6-12 corresponden al triplicado de las

variantes N238G y A110V respectivamente. Se ha visto en el laboratorio que la vida media de la enzima es de aproximadamente 3 días por lo que se iban purificando de dos en dos variantes y midiendo su actividad enzimática justo después de su purificación. La lectura de la absorbancia a 600nm permite conocer la concentración de la proteína cuando se introduce en la ecuación lineal que describe el comportamiento de la curva patrón de concentración.

El rendimiento más alto corresponde a la variante R463L y el más bajo a la variante L336P (Tabla 3), lo cual no está directamente relacionada con la actividad enzimática que puedan presentar. Sin embargo, puede indicarnos sobre el tipo de mutación que presentan. La variante R463L parece no estar siendo afectada en su producción siendo lo contrario para la L336P.

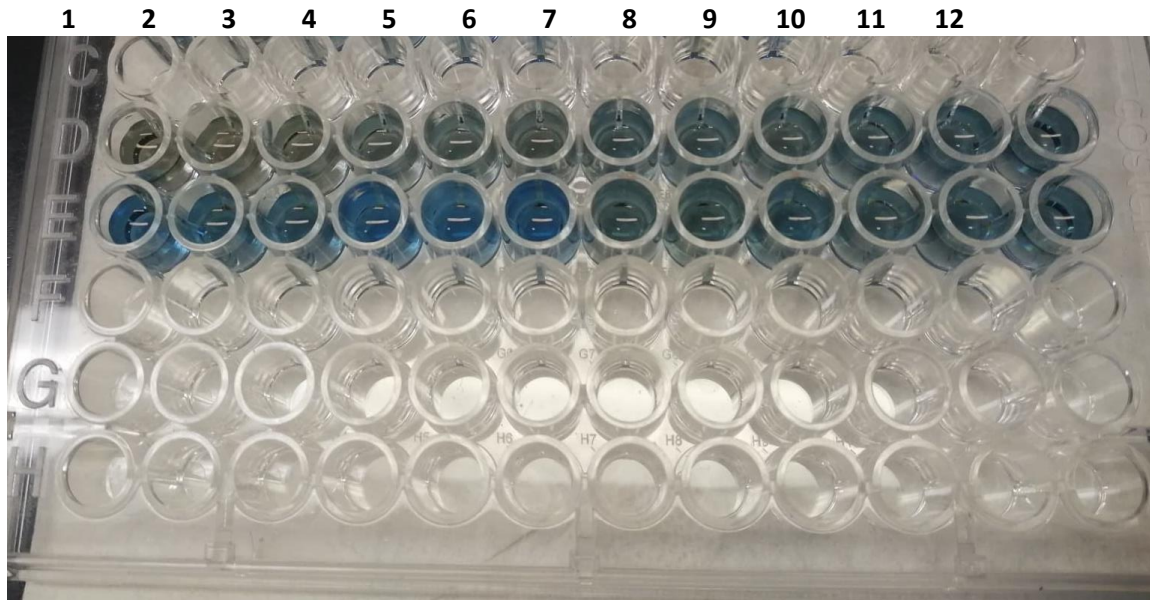


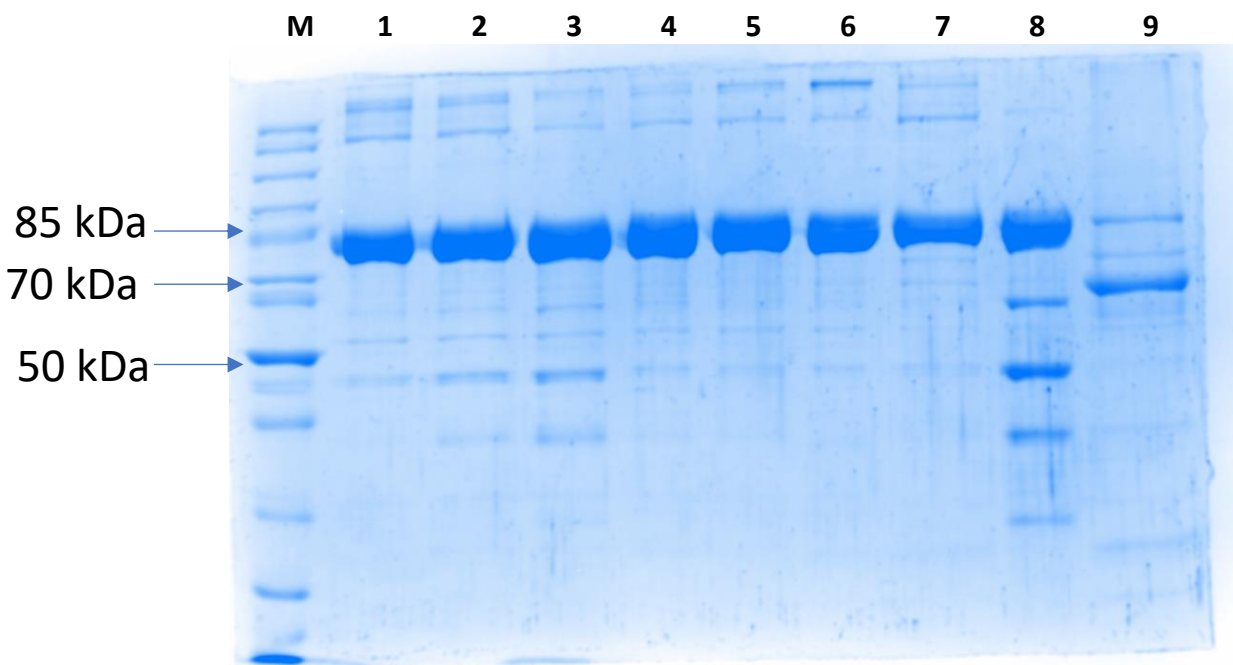
FIGURA 17. ENSAYO DE BRADFORD PARA OBTENER LA CURVA ESTÁNDAR PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.

Carril	Variante	Concentración (mg/mL)	Rendimiento en 50mL de medio
<b>M</b>	Marcador		
<b>1</b>	wt	3.1	3.72mg
<b>2</b>	S315T	2.9	3.48mg
<b>3</b>	R463L	7.43	8.91mg
<b>4</b>	N238G	3.33	3.99mg
<b>5</b>	A110V	4.95	5.94mg
<b>6</b>	D189G	5.06	6.07mg
<b>7</b>	S315I	1.26	1.52mg
<b>8</b>	S315G	4.06	4.87mg
<b>9</b>	L336P	0.0688	0.08mg

TABLA 3. CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA PURA DE LAS VARIANTES PURIFICADAS.

La concentración y pureza de las enzimas se verificó en un gel SDS-PAGE al 10 % al ajustar a una concentración de 4 $\mu$ g de todas las variantes (*Figura 18*). A pesar de que se aprecian otras bandas que no coinciden con el tamaño de la proteína, la banda de 80kDa representa más del 90 % de cada muestra, excepto la banda del carril 9 que corresponde a la variante L336P (*Tabla 3*).

En el caso de la variante L336P la banda de 80 kDa corresponde a un porcentaje de 21.5%, por lo que se ajustó la concentración final determinada por Bradford (*Tabla 3*) para tener la misma cantidad de proteína KatG en los experimentos. Debido a la poca concentración obtenida de esta variante, la caracterización de sus parámetros catalíticos pueden verse comprometidos; aun así, es posible argumentar que la estabilidad de la variante es deficiente y esto puede correlacionar con el alto nivel de resistencia que tiene.



**FIGURA 18. VISUALIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS PURIFICADAS EN UN GEL SDS-PAGE PARA CONFIRMAR LA PURIFICACIÓN DE LAS ENZIMAS**

## 7.4 Caracterización de parámetros catalíticos.

### 7.4.1 Actividad de catalasa

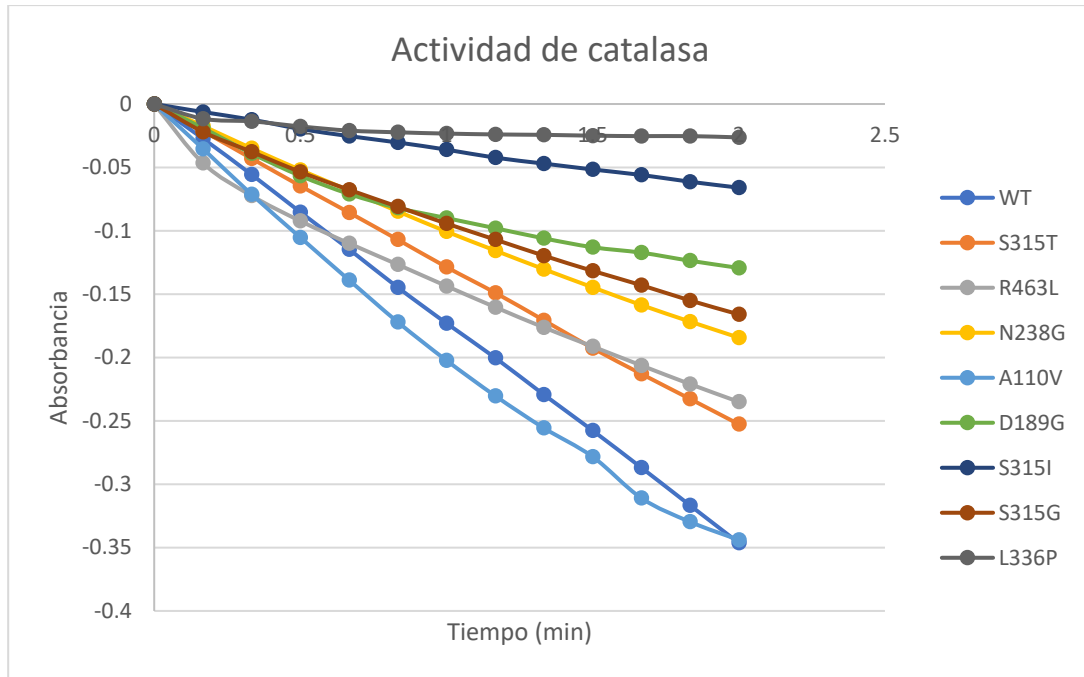


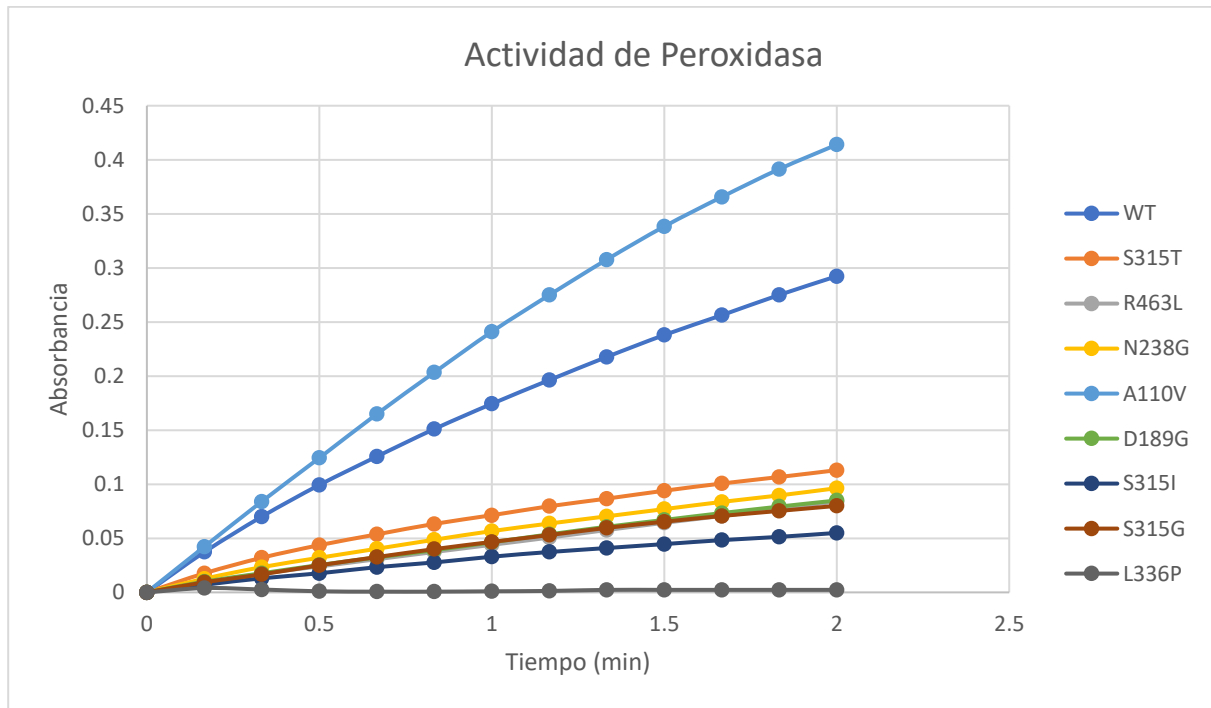
FIGURA 19. COMPARACIÓN DE LAS MEDICIONES PARA LA ACTIVIDAD DE CATALASA ENTRE LOS CONTROLES Y TODAS LAS VARIANTES. SOLO SE MUESTRA UNA DETERMINACIÓN, SIN RÉPLICAS.

La actividad de catalasa de las variantes puede clasificarse en tres grupos de acuerdo con la comparación con los controles (Figura 19). El primer grupo corresponde a la variante A110V que presentó una actividad parecida a la WT; el segundo grupo corresponde a las variantes R463L, N238G, D189G, S315G, que presentaron una actividad parecida a la de la S315T; el tercer grupo corresponde a las variantes S315I y L336P, en las que la actividad de catalasa se redujo drásticamente en comparación con la WT.

La localización de la mutación L336P es en la cavidad proximal del grupo hemo (Tabla 1) cercana a tres aminoácidos esenciales para la actividad de catalasa y la formación del compuesto I, el cuál es necesario para la activación de INH y la formación del aducto IN-NAD. Por lo tanto, se propone que el cambio de Leu a Pro genera un cambio estructural que reduce la actividad de catalasa y de formación del aducto IN-NAD. La presencia de mutaciones con una resistencia alta a INH, pero con una actividad de catalasa deficiente, como la L336P provocaría que *M. tuberculosis* desarrolle otras estrategias dentro de un organismo para asegurar su supervivencia. Esto es debido a que la actividad de catalasa es esencial para la supervivencia de *M. tuberculosis*, de modo que aquellas variantes que conserven parámetros similares a los de la WT podrían tener una selección positiva en el organismo que infecta, aunque su nivel de resistencia a INH no sea alto.

La variante S315I tuvo una deficiencia en la actividad de catalasa por encima que la de la S315T lo cuál se puede explicar por la diferencia del tamaño entre los aminoácidos. Siendo Ile un aminoácido de mayor tamaño, se bloquea el canal de acceso al sustrato en mayor proporción que con la Thr, lo cual restringe la unión de  $H_2O_2$  en el sitio activo de Mt-KatG que es donde se localiza la construcción. Por otra parte, el cambio a una Gly (S315G) provoca un efecto contrario en el canal de acceso, abriéndolo y dejando al grupo hemo más expuesto. Sin embargo, la actividad de catalasa para esta variante también disminuyó en niveles similares a los de la S315T. Esto contradice la restricción al canal de accesos por los aminoácidos anteriores. Por ende, se propone que el cambio de cualquier aminoácido en el canal de acceso al sustrato, o cercano al sitio activo desestabiliza la coordinación que hay entre el grupo hemo con los aminoácidos cercanos y provoca una disminución en la afinidad por el sustrato.

#### 7.4.2 Actividad de Peroxidasa



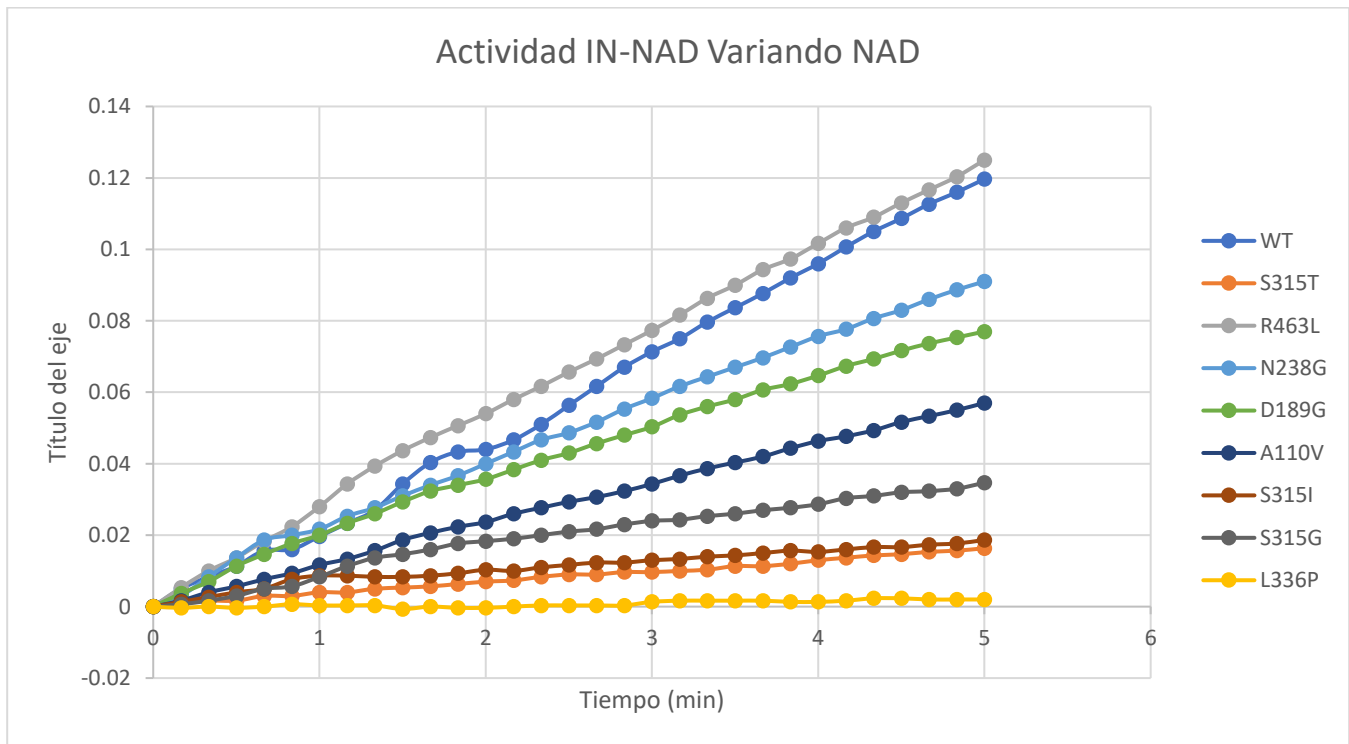
**FIGURA 20. COMPARACIÓN DE LAS MEDICIONES PARA LA ACTIVIDAD DE PEROXIDASA ENTRE LOS CONTROLES Y TODAS LAS VARIANTES. SÓLO SE MUESTRA UNA DETERMINACIÓN, SIN RÉPLICAS.**

La variante A110V presenta un aumento de actividad con respecto a la WT; este aumento en la actividad de peroxidasa ya ha sido reportado anteriormente. La mutación se encuentra en una hélice cercana a la cavidad del grupo hemo y al Trp107 del aducto que confiere la actividad de catalasa (Brossier et al. 2016). El cambio a una Val desestabiliza la hélice y provoca cambios en la cavidad del grupo hemo que resultan en una reducción de la formación del aducto IN-NAD ya que esta variante está clasificada con un nivel de resistencia bajo (Tabla 1) pero un incremento en la actividad de peroxidasa en comparación con la silvestre.

La variante L336P tuvo una disminución considerable de la actividad de peroxidasa en comparación con las variantes de resistencia baja y media como está reportado en la literatura.

Las variantes que presentan sensibilidad a INH tuvieron una disminución en su actividad de peroxidasa en comparación con la proteína silvestre. Puede ser que la activación de INH y formación de IN-NAD no dependa completamente de la actividad de peroxidasa, por lo tanto, a pesar de la disminución, las variantes siguen presentando sensibilidad al fármaco.

### 7.4.3 Actividad de formación de aducto IN-NAD



**FIGURA 21. COMPARACIÓN DE LAS MEDICIONES PARA LA ACTIVIDAD DE FORMACIÓN DE INH-NAD VARIANDO LAS CONCENTRACIONES DE NAD ENTRE LOS CONTROLES Y TODAS LAS VARIANTES. SÓLO SE MUESTRA UNA DETERMINACIÓN, SIN RÉPLICAS.**

La actividad de formación del aducto IN-NAD correlaciona con la clasificación de resistencia de todas las variantes (Figura 21). Para las variantes sensibles, la actividad de formación de IN-NAD fue similar a la silvestre. Las variantes con resistencia baja presentaron una disminución en la formación de IN-NAD con respecto a la silvestre pero sus actividades son mayores que la de las variantes con resistencia media y alta.

La variante L336P es la única que no mostró actividad de formación del aducto IN-NAD en ninguna de las concentraciones usadas, lo cual concuerda con lo reportado en la literatura.

La variante S315G tiene un aumento en la actividad de formación de aducto IN-NAD en comparación con las variantes S315T y S315I. Aunque el aumento en la actividad no es significativo en comparación con el resto de las

variantes, podría explicar que el cambio del aminoácido Ser a Gly no afecta la estabilidad del grupo hemo ni el canal de acceso en la misma medida que lo hacen el cambio con los aminoácidos Thr y Ile en la misma posición.

## Conclusiones

Se construyeron satisfactoriamente todas las variantes seleccionadas, las cuales solo presentan el cambio diseñado en su secuencia con respecto a la silvestre.

El rendimiento de purificación de la KatG silvestre y las variantes es alto con respecto a lo reportado anteriormente en la literatura.

El cambio de un solo aminoácido puede provocar una desestabilización en la estructura de la proteína de KatG y una modificación en su actividad enzimática.

La actividad de catalasa que presentaron las variantes se puede clasificar en tres grupos: A110V presentó una actividad idéntica a la de la WT ; las variantes R463L, N238G, D189G y S315G presentaron una actividad idéntica a la de la S315T; las variantes S315I y L336P reducen drásticamente su actividad de catalasa con respecto a la WT.

La actividad de peroxidasa que presentaron las variantes disminuyó en parámetros similares a los de la S315T con excepción de la variante A110V, que mostró una mayor actividad de peroxidasa en comparación con la WT.

Para que los cambios que confieren resistencia a INH sean viables en la naturaleza deben modificar poco los parámetros de catalasa de la enzima. Por lo tanto, variantes con niveles de resistencia media, podrían tener una ventaja para la célula y ser seleccionadas con mayor frecuencia.

Las variantes resistentes tienen una disminución significativa en la actividad de formación del aducto IN-NAD que coincide con la clasificación de resistencia de la literatura.

## Bibliografía

- Bertrand, Thomas et al. 2004. "Crystal Structure of Mycobacterium Tuberculosis Catalase-Peroxidase." *Journal of Biological Chemistry* 279(37): 38991–99.
- Brossier, Florence et al. 2016. "Comparative Study of Enzymatic Activities of New KatG Mutants from Low- and High-Level Isoniazid-Resistant Clinical Isolates of Mycobacterium Tuberculosis." *Tuberculosis* 100: 15–24.
- Colin, Julie et al. 2009. "Distinct Role of Specific Tryptophans in Facilitating Electron Transfer or as [Fe(IV)=O Trp•] Intermediates in the Peroxidase Reaction of Bulkholderia Pseudomallei Catalase-Peroxidase: A Multifrequency EPR Spectroscopy Investigation." *Journal of the American Chemical Society* 131(24): 8557–63.
- Nahid, Payam et al. 2016. "Official American Thoracic Society/Centers for Disease Control and Prevention/Infectious Diseases Society of America Clinical Practice Guidelines: Treatment of Drug-Susceptible Tuberculosis." *Clinical Infectious Diseases* 63(7): e147–95.
- Njuma, Olive J., Elizabeth N. Ndontsa, and Douglas C. Goodwin. 2014. "Catalase in Peroxidase Clothing: Interdependent Cooperation of Two Cofactors in the Catalytic Versatility of KatG." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 544: 27–39. <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2013.11.007>.
- Vilchèze, Catherine, and William R. Jacobs. 2007. "The Mechanism of Isoniazid Killing: Clarity through the Scope of Genetics." *Annual Review of Microbiology* 61: 35–50.
- World Health Organization, (WHO). 2020. 1 Who *WHO Report on TB 2020*.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cirp.2016.06.001><http://dx.doi.org/10.1016/j.powtec.2016.12.055><http://doi.org/10.1016/j.ijfatigue.2019.02.006><https://doi.org/10.1016/j.matlet.2019.04.024><https://doi.org/10.1016/j.matlet.2019.127252><http://dx.doi.org/>
- Zhao, Xiangbo et al. 2006. "Hydrogen Peroxide-Mediated Isoniazid Activation Catalyzed by Mycobacterium Tuberculosis Catalase-Peroxidase (KatG) and Its S315T Mutant." *Biochemistry* 45(13): 4131–40.



## Apéndice

	10	20	30	40	50	60
WT	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....					
S315T	ATGCACCATCACCATCACCATCCCGAGCAACACCCACCCATTACAGAAACCACCACCGGA					
R463L	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....					
N238G	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....					
A110V	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....					
D186G	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....					
S315I	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....					
S315G	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....					
L336P	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....					
	70	80	90	100	110	120
WT	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....					
S315T	GCCGCTAGCAACGGCTGTCCCGTCGTGGGTCAATATGAAATACCCCGTCGAGGGCGGC					
R463L	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....					
N238G	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....					
A110V	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....					
D186G	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....					
S315I	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....					
S315G	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....					
L336P	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....					
	130	140	150	160	170	180
WT	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....					
S315T	AACCAGGACTGGTGGCCCAACCGGCTCAATCTGAAGGTACTGCACCAAAAACCCGGCCGTC					
R463L	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....					
N238G	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....					
A110V	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....					
D186G	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....					
S315I	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....					
S315G	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....					
L336P	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....					
	190	200	210	220	230	240
WT	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....					
S315T	GCTGACCCGATGGGTGCGGCGTTCGACTATGCCGCGGAGGTCGCGACCATCGACGTTGAC					

S315T .....  
 R463L .....  
 N238G .....  
 A110V .....  
 D186G .....  
 S315I .....  
 S315G .....  
 L336P .....

250 260 270 280 290 300  
 WT GCCCTGACGCGGGACATCGAGGAAGTGATGACCACCTCGCAGCCGTGGTGGCCCCCGGAC  
 S315T .....  
 R463L .....  
 N238G .....  
 A110V .....  
 D186G .....  
 S315I .....  
 S315G .....  
 L336P .....

310 320 330 340 350 360  
 WT TACGGCCACTACGGGCGCTGTTTATCCGGATGGCGTGGCAGCTGCCGGCACCTACCGC  
 S315T .....  
 R463L .....  
 N238G .....  
 A110V ..... T .....  
 D186G .....  
 S315I .....  
 S315G .....  
 L336P .....

370 380 390 400 410 420  
 WT ATCCACGACGGCCGCGGGCGCCGGGGGCGGCATGCAGCGGTTTCGCGCCGCTTAACAGC  
 S315T .....  
 R463L .....  
 N238G .....  
 A110V .....  
 D186G .....  
 S315I .....  
 S315G .....  
 L336P .....

430 440 450 460 470 480  
 WT TGGCCCGACAACGCCAGCTTGGACAAGGCGCGCCGGCTGCTGTGGCCGGTCAAGAAGAAG  
 S315T .....  
 R463L .....  
 N238G .....  
 A110V .....  
 D186G .....  
 S315I .....  
 S315G .....  
 L336P .....

490 500 510 520 530 540





```

S315G .....
L336P .....C.....

          1090      1100      1110      1120      1130      1140
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
WT      GCCAAGGACGGCGCCGGTGCCGGCACCATCCCGGACCCGTTCCGGCGGGCCAGGGCGCTCC
S315T   .....
R463L   .....
N238G   .....
A110V   .....
D186G   .....
S315I   .....
S315G   .....
L336P   .....

          1150      1160      1170      1180      1190      1200
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
WT      CCGACGATGCTGGCCACTGACCTCTCGCTGCCGGTGGATCCGATCTATGAGCGGATCACG
S315T   .....
R463L   .....
N238G   .....
A110V   .....
D186G   .....
S315I   .....
S315G   .....
L336P   .....

          1210      1220      1230      1240      1250      1260
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
WT      CGTCGCTGGCTGGAACACCCCGAGGAATTGGCCGACGAGTTCGCCAAGGCCTGGTACAAG
S315T   .....
R463L   .....
N238G   .....
A110V   .....
D186G   .....
S315I   .....
S315G   .....
L336P   .....

          1270      1280      1290      1300      1310      1320
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
WT      CTGATCCACCGAGACATGGGTCCCGTTGCAGATACCTTGGGCCGCTGGTCCCCAAGCAG
S315T   .....
R463L   .....
N238G   .....
A110V   .....
D186G   .....
S315I   .....
S315G   .....
L336P   .....

          1330      1340      1350      1360      1370      1380
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
WT      ACCCTGCTGTGGCAGGATCCGGTCCCTGCGGTCAGCCACGACCTCGTTCGGCGAAGCCGAG
S315T   .....
R463L   .....
N238G   .....
A110V   .....

```

D186G .....  
 S315I .....  
 S315G .....  
 L336P .....

1390 1400 1410 1420 1430 1440  
 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

WT **ATTGCCAGCCTTAAGAGCCAGATCCGGGCATCGGGATTGACTGTCTCACAGCTAGTTTCG**  
 S315T .....  
 R463L ..... **T** .....  
 N238G .....  
 A110V .....  
 D186G .....  
 S315I .....  
 S315G .....  
 L336P .....

1450 1460 1470 1480 1490 1500  
 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

WT **ACCGCATGGGGCGGCGGGTCGTCGTTCCGTGGTAGCGACAAGCGGGCGGGCGCCAACGGT**  
 S315T .....  
 R463L .....  
 N238G .....  
 A110V .....  
 D186G .....  
 S315I .....  
 S315G .....  
 L336P .....

1510 1520 1530 1540 1550 1560  
 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

WT **GGTCGCATCCGCCTGCAGCCACAAGTCGGGTGGGAGGTCAACGACCCCGACGGGGATCTG**  
 S315T .....  
 R463L .....  
 N238G .....  
 A110V .....  
 D186G .....  
 S315I .....  
 S315G .....  
 L336P .....

1570 1580 1590 1600 1610 1620  
 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

WT **CGCAAGGTCATTTCGCACCCCTGGAAGAGATCCAGGAGTCATTCAACTCCGCGGGCGCCGGGG**  
 S315T .....  
 R463L .....  
 N238G .....  
 A110V .....  
 D186G .....  
 S315I .....  
 S315G .....  
 L336P .....

1630 1640 1650 1660 1670 1680  
 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

WT **AACATCAAAGTGTCCCTTCGCCGACCTCGTCGTGCTCGGTGGCTGTGCCCATAGAGAAA**  
 S315T .....  
 R463L .....

N238G .....  
A110V .....  
D186G .....  
S315I .....  
S315G .....  
L336P .....

1690 1700 1710 1720 1730 1740

WT GCAGCAAAGGCGGCTGGCCACAACATCACGGTGCCCTTCACCCCGGGCCGCACGGATGCG  
S315T .....  
R463L .....  
N238G .....  
A110V .....  
D186G .....  
S315I .....  
S315G .....  
L336P .....

1750 1760 1770 1780 1790 1800

WT TCGCAGGAACAAACCGACGTGGAATCCTTTGCCGTGCTGGAGCCCAAGGCAGATGGCTTC  
S315T .....  
R463L .....  
N238G .....  
A110V .....  
D186G .....  
S315I .....  
S315G .....  
L336P .....

1810 1820 1830 1840 1850 1860

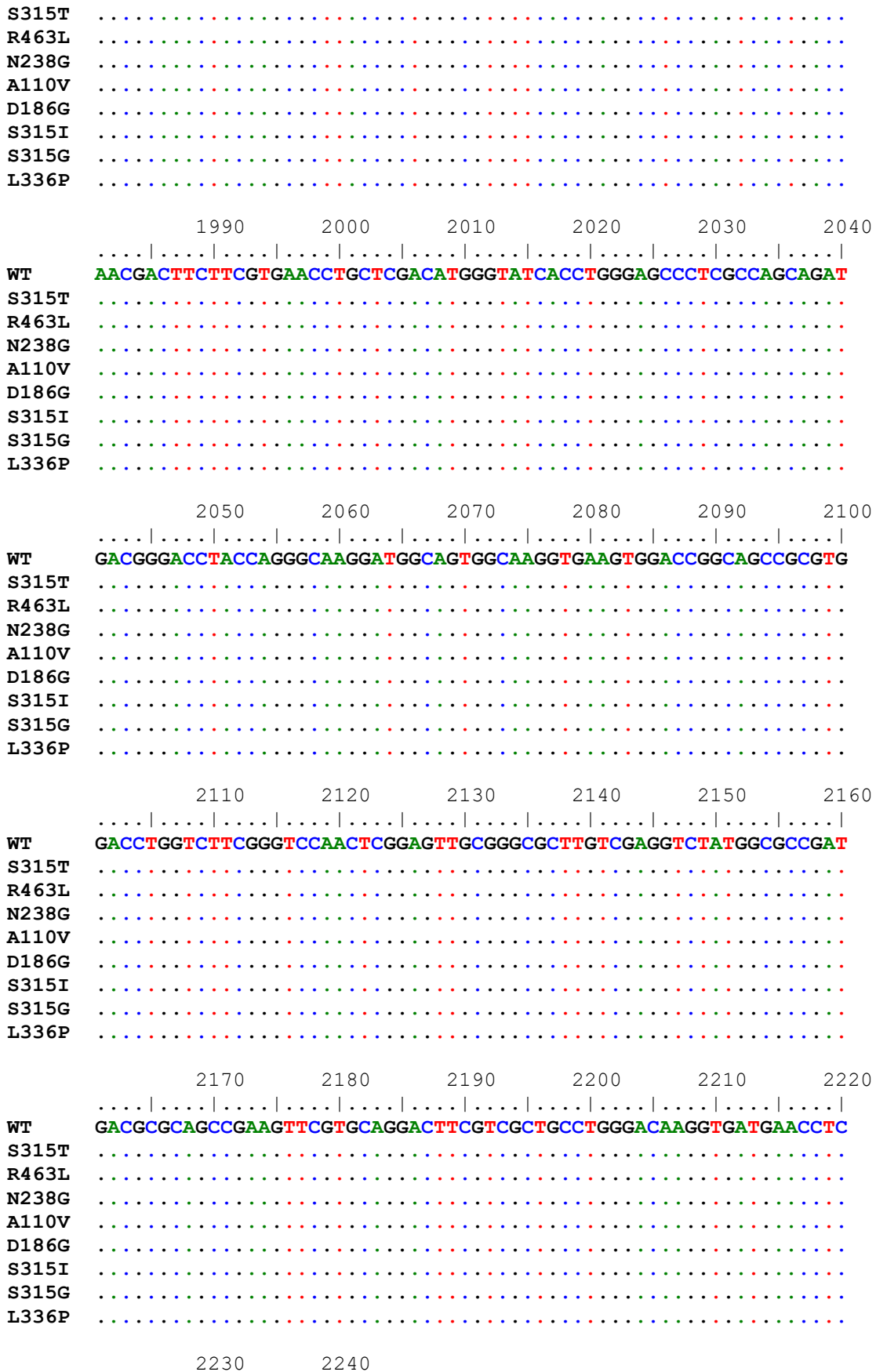
WT CGAAACTACCTCGGAAAGGGCAACCCGTTGCCGGCCGAGTACATGCTGCTCGACAAGGCC  
S315T .....  
R463L .....  
N238G .....  
A110V .....  
D186G .....  
S315I .....  
S315G .....  
L336P .....

1870 1880 1890 1900 1910 1920

WT AACCTGCTTACGCTCAGTGCCCTGAGATGACGGTGCTGGTAGGTGGCCTGCGCGTCCCTC  
S315T .....  
R463L .....  
N238G .....  
A110V .....  
D186G .....  
S315I .....  
S315G .....  
L336P .....

1930 1940 1950 1960 1970 1980

WT GGCGAAACTACAAGCGCTTACCGCTGGGCGTGTTCACCGAGGCCCTCCGAGTCACCTGACC





```
      . . . . | . . . . | . . . . | . . . . | .
WT    GACAGGTCGACGTGCGCTGA
S315T . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
R463L . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
N238G . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
A110V . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
D186G . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
S315I . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
S315G . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
L336P . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
```