

IDENTIFICACIÓN DE LOS RESIDUOS DE AMINOÁCIDOS IMPORTANTES PARA LA FUNCIÓN DE LA ENZIMA FOSFATIDILCOLINA SINTASA.

Solís-Oviedo R. L.¹, Sohlenkamp C.¹, Geiger O.¹

¹Centro de Ciencias Genómicas, UNAM, Avenida Universidad s/n, Colonia Chamilpa; C.P. 62210; Cuernavaca, Morelos, MEXICO; teléfono: +52-777-3131697; fax: +52-777-317 55 81; rlsolis@ccg.unam.mx

Fosfatidilcolina (PC) es el fosfolípido más abundante en la membrana celular de eucariotes. En eucariota se conocen dos rutas metabólicas para la biosíntesis de PC: la ruta de CDP-colina (citidina-5-bisfosfato-colina) y la ruta de metilación. En procariontes solo se conocía la ruta de la metilación, sin embargo, durante el análisis de mutantes deficientes en esta ruta en *Sinorhizobium meliloti*, se descubrió una segunda ruta, en la cual se condensa colina con CDP-diacilglicerol (CDP-DAG) catalizada por la enzima fosfatidilcolina sintasa (Pcs). Se han descrito condiciones para medir la actividad enzimática de la Pcs de *S. meliloti* y por complementación de mutantes incapaces de incorporar colina radioactiva, se identificó el gen (*pcs*) codificante para dicha actividad. El gen *pcs* de *S. meliloti* codifica para una proteína altamente hidrofóbica de 241 aminoácidos, la cual según predicciones computacionales tiene entre 6 y 8 hélices transmembranales. En la Pcs se encuentra una variación del patrón de aminoácidos conservados (DG(X)2AR-(X)8G(X)3D(X)3D) que se había descrito para otros CDP- alcohol fosfatidiltransferasas. La distancia entre la arginina conservada y la segunda glicina conservada es de 12 aminoácidos en lugar de 8.

Un primer objetivo es la identificación de residuos de aminoácidos importantes para la actividad de Pcs, para lo cual se iniciaron dos estrategias: una consistió en la realización de un banco de mutantes al azar del gen de *pcs*, por medio de PCR-propenso al error, introduciendo aproximadamente de entre 6 y 9 mutaciones por secuencia. Se analizaron hasta ahora 108 cepas, para probar la calidad del banco. El otro método consistió en la mutagénesis sitio dirigido de aminoácidos conservados de la Pcs en *S. meliloti*. Se identificaron los aminoácidos conservados, mediante un alineamiento entre la Pcs de *S. meliloti* y la Pcs de otras especies cuya función ha sido comprobada. Hasta ahora, se han realizado 26 mutaciones en aminoácidos conservados del gen de *pcs* de *S. meliloti* reemplazándolos por alanina. Por medio de marcajes *in vivo*, expresando las enzimas mutadas en *E. coli*, se ha demostrado la ausencia de la formación de PC en seis mutantes. En cuatro mutantes la disminución de formación de PC es entre 20 a 50% y en seis mutantes tienen una disminución de formación de PC entre 50 a 70% de PC.