



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

“CLONACIÓN, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL Y ESTRUCTURAL DE LAS MUTANTES DE LA GLUCOSA 6 FOSFATO DESHIDROGENASA (G6PD): A+ (N126D) Y DURHAM (K238R), PRESENTES EN LA POBLACIÓN MEXICANA”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

PRESENTA:

SANDRA TOBÓN CORNEJO

TUTOR

DR. SAÚL GÓMEZ MANZO

ASESOR INTERNO

DRA. GILDA FLORES ROSALES

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2014.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUELLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Clonación, purificación y caracterización funcional y estructural de las mutantes de la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PD): A+ (N126D) y Durham (K238R) presentes en la población mexicana

Que presenta la pasante: Sandra Tobón Cornejo

Con número de cuenta: 409022511 para obtener el Título de: Licenciada en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 04 de abril de 2014.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Gilda Flores Rosales	
VOCAL	Q. Arcadia Hernández Beltrán	
SECRETARIO	QFB. Rosalba Bonilla Sánchez	
1er. SUPLENTE	QFB. Gabriela Escalante Reynoso	
2do. SUPLENTE	M. en C. Nydia B. González Angeles	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

AGRADECIMIENTOS

*Agradezco al **Dr. Horacio Reyes Vivas** por haberme abierto las puertas del laboratorio de Bioquímica Genética sin dudar.*

*Al **Dr. Saúl Gómez Manzo** por permitirme trabajar en su proyecto, por sus enseñanzas, consejos y su excelente asesoría brindada durante el desarrollo de este trabajo de tesis.*

*A la **Dra. Gilda Flores Rosales** por haber sido mi tutora durante toda la carrera, por guiarme durante mi búsqueda hacia la investigación, por apoyarme y compartir conmigo mis logros, porque gracias a usted mi pasión por la bioquímica creció día a día al asistir a cada una de sus clases. Por su asesoría brindada durante el desarrollo de mi escrito y ser la persona a quien le debo en gran parte el estar donde me encuentro ahora.*

*Gracias a los investigadores del laboratorio de bioquímica-genética, que con colaboración y recomendaciones contribuyeron a la realización de este proyecto: **Dra. Itzhel García, M. en C. Sara Méndez, M. en C. Ignacio de la Mora, Dr. Jaime Quino, Dr. Gabriel López y la M. en C. Adriana Castillo**. Y de manera especial al **Dr. Sergio Enríquez** y el **Dr. Jesús Oria** que siempre mostraron disponibilidad cuando tenía una duda sin importar lo ocupados que estuvieran. A la **Técnico Carmen** por su ayuda en el aprendizaje de técnicas.*

*A **Jessica Terrón** por tu ayuda, consejos y todos esos buenos y malos momentos que compartimos e hicieron más grato el desarrollo de este trabajo.*

*A mis amigos de la carrera: a **Lulú Torres** y a toda su familia, que me hicieron sentir parte de ella, y a quienes quiero y estimo. A mi comaye **Mara Sánchez** y a su mami que me abrieron las puertas de su casa. A mi amigo **Efrén Zarate** y a los primos Adal, Axel y Tavo, que siempre me ayudaron cuando los necesite. A **Sara Salazar, Rebeca Rodríguez, Irene Solís y Coral Rodríguez** a quienes también les debo muchos buenos momentos durante la carrera. Y por supuesto a mis amigas y compañeras de equipo: **Denisse Flores y Carolina Moreno**, el mejor equipo de trabajo que he tenido.*

*A mis amigos del alma con quienes he reído, llorado y compartido tantas aventuras: **Lucesita, Angela, Abraham y Fabian**.*

*A mi tío **Rafael Hernández** a quien quiero como un segundo padre y me ha apoyado desde que me vine a estudiar la carrera.*

*Por último dedico este trabajo a mis padres **Félix Abel Tobón y María Guadalupe Cornejo** y a mis hermanos **Lupita y Abel**, quienes son mi motor cada día para seguir adelante y a quienes sin duda les debo lo que soy y he logrado. También dedico esta tesis a **Luis Eduardo Bucio** por su apoyo y amor incondicional y con quien anhelo compartir mi vida.*

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS	I
ÍNDICE DE FIGURAS	II
ABREVIATURAS	IV
RESUMEN	V
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Epidemiología de la deficiencia de la G6PD	1
1.2 Manifestaciones clínicas de la deficiencia de la G6PD	3
1.2.1 Anemia hemolítica aguda	3
1.2.2 Anemia hemolítica congénita no esferocítica	6
1.2.3 Ictericia neonatal	6
1.3 Función de la G6PD y el equilibrio redox en el eritrocito	7
1.4 Deficiencia de la G6PD	8
1.4.1 Mutantes enzimáticas de la G6PD	9
1.4.2 Deficiencia de la G6PD en México	12
1.5 Características moleculares del gen <i>g6pd</i>	13
1.6 Estructura de la G6PD	14
1.7 Antecedentes de las mutantes de la G6PD: Durham (K238R) y A+ (N126D)	16
1.7.1 Mutante Durham (K238R)	16
1.7.2 Mutante A+ (N126D)	18
2. JUSTIFICACIÓN	19
3. OBJETIVO GENERAL	20
3.1 Objetivos particulares	20
4. METODOLOGÍA	21
4.1 Diseño de oligonucleótidos mutagénicos	21
4.2 Mutagénesis mediada por PCR	22
4.3 Ligación a un vector de expresión pET-3a	25
4.4 Clonación en células de Escherichia coli TOP 10	25
4.5 Secuenciación	26
4.6 Transformación en células de expresión de <i>E. coli</i> BL21DEpLisS Δ G6PD	26
4.7 Ensayos de sobreexpresión en la proteína soluble de las mutantes Durham (K238R) y A+ (N126D)	27
4.8 Purificación de las mutantes A+ (N126D) y Durham (K238R)	27

4.8.1 Purificación de la proteína mutante A+ (N126D) por la columna Q-sepharose	28
4.8.2 Purificación de la proteína mutante Durham (K238R) por la columna 2'5 ADP sepharose 4B	29
4.9 SDS-PAGE discontinuo al 12 % de los pasos de purificación de las proteínas mutantes Durham (K238R) y A+ (N126D)	29
4.10 Caracterización funcional de las enzimas recombinantes A+ (N126D) y Durham (K238R)	30
4.10.1 Determinación de los parámetros cinéticos	30
4.11 Caracterización mediante ensayos de estabilidad de las proteínas mutantes Durham (K238R) y A+ (N126D) seguido por inactivación por temperatura	31
4.12 Caracterización mediante ensayos estructurales de las proteínas mutantes Durham (K238R) y A+ (N126D)	31
4.12.1 Análisis de la estructura secundaria seguido por Dicroísmo circular (DC)	31
4.12.2 Análisis de la estructura terciaria seguido por Fluorescencia intrínseca	31
4.13 Estabilidad de las proteínas mutantes (K238R) y A+ (N126D) frente a la desnaturalización térmica por Dicroísmo Circular (DC)	32
5. RESULTADOS	33
5.1 Mutagénesis de sitio dirigido por PCR	33
5.2 Secuenciación de las mutantes Durham (K238R) y A+ (N126D)	34
5.3 Transformación en células de expresión de <i>E. coli</i> Bl21 (DE3) pLysS ΔG6PD	36
5.4 Ensayos de sobreexpresión de proteína soluble	37
5.5 Purificación de las proteínas mutantes A+ (N126D) y Durham (K238R)	39
5.5.1 Purificación de la proteína mutante A+ (N126D) por la columna de intercambio catiónico Q-sepharose	39
5.2.2 Purificación por la columna de afinidad a nucleótido 2'5'ADP sepharose 4B de la proteína mutante Durham (K238R)	43
5.6 Caracterización funcional mediante ensayos de cinética enzimática	47
5.7 Estabilidad de las enzimas recombinantes A+ y Durham frente a la inactivación térmica	50
5.8 Propiedades espectroscópicas	51
5.8.1 Estructura secundaria seguida por dicroísmo circular (DC)	51
5.8.2 Estructura terciaria seguida por fluorescencia Intrínseca	51
5.9 Ensayos de estabilidad de las enzimas recombinantes A+ y Durham frente a la desnaturalización térmica por Dicroísmo Circular	53
6. DISCUSIÓN	55
7. CONCLUSIÓN	59
8. REFERENCIAS	60

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Agentes que inducen anemia hemolítica en las personas deficientes de G6PD	4
Tabla 2. Clases de deficiencias de glucosa 6 fosfato deshidrogenasa	10
Tabla 3. Mutantes reportadas en la población mexicana	12
Tabla 4. Características moleculares de la G6PD	13
Tabla 5. Oligonucleótidos mutagénicos para la obtención de las mutantes Durham (K238R) y A+ (N126D)	20
Tabla 6. Oligonucleótidos externos para la amplificación del gen completo de la <i>g6pd</i>	21
Tabla 7. Concentraciones de la reacción de PCR	23
Tabla 8. Tabla de purificación de la mutante A+ (N126D)	41
Tabla 9. Tabla de purificación de la mutante Durham (K238R)	44
Tabla 10. Resumen del rendimiento y actividades específicas obtenidas para la mutante A+ (N126D) y Durham (K238R) respecto a la enzima silvestre de la G6PD	45
Tabla 11. Parámetros cinéticos de las mutantes A+ (N126D) Y Durham (K238R)	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de la deficiencia de la enzima <i>g6pd</i> en porcentaje en todos los países de los estudios incluidos	2
Figura 2. Función de la enzima G6PD y el equilibrio redox en el eritrocito	7
Figura 3. Tipos de mutaciones reportadas en la G6PD	9
Figura 4. Mutaciones en los exones del gen de <i>la g6pd</i>	11
Figura 5. Estructura del dímero de la enzima G6PD humana	16
Figura 6. El NADP+ estructural de la mutante Durham (K238)	16
Figura 7. Estructura de la mutante A+ (N126D)	17
Figura 8. Mutagénesis mediada por PCR	22
Figura 9. Condiciones de PCR para la amplificación de las mutantes Durham (K238R) Y A+ (N126D)	23
Figura 10. Productos de PCR 1, PCR 2 Y PCR 3 de las mutantes Durham (K238R) Y A+ (N126D) en gel de agarosa al 1 %	31
Figura 11. Productos de PCR en cultivo de las clonas seleccionadas de las células de <i>E. coli</i> top 10 para las mutantes Durham (K238R) Y A+ (N126D).	32
Figura 12. Electroferograma de la secuenciación de la mutante A+ (N126D)	33
Figura 13. Electroferograma de la secuenciación de la mutante Durham (K238R)	34
Figura 14. Productos de PCR en cultivo de las clonas seleccionadas de la transformación en células de expresión de <i>E. coli</i> BL21(de3) pLysS Δ <i>g6pd</i> para las mutantes Durham (K238R) Y A+ (N126D)	35
Figura 15. Ensayos de sobreexpresión de proteína soluble de la mutante A+ (N126D)	36
Figura 16. Ensayos de sobreexpresión de proteína soluble de la mutante Durham (K238R)	37

Figura 17. SDS-PAGE discontinuo al 12 % con las fracciones de elución de la columna de afinidad 2'5' ADP sepharose 4b de la mutante A+ (N126D)	38
Figura 18. Cromatograma de elución en Q- sepharose	39
Figura 19. SDS-PAGE discontinuo al 12 % del cromatograma de la q-sepharose de la mutante A+ (N126D)	39
Figura 20. SDS-PAGE discontinuo al 12 % de los pasos de purificación de la mutante A+ (N126D).	40
Figura 21. SDS-PAGE discontinuo al 12 % con las fracciones de elución de la columna de afinidad 2'5' ADP sepharose 4b de la mutante Durham (K238R)	42
Figura 22. SDS-PAGE discontinuo al 12% de los pasos de purificación de la mutante Durham (K28R)	43
Figura 23. Curva de saturación de la mutante A+ (N126D)	46
Figura 24. Curva de saturación de la mutante Durham (K238R)	47
Figura 25. Curva de inactivación térmica de la enzima silvestre G6PD y las mutantes A+ (N126D) y Durham (K238R)	48
Figura 26. Espectros de DC en el UV lejano de las mutantes A+ (N126D) y Durham (K238R), así como la enzima silvestre	49
Figura 27. Espectro de emisión de fluorescencia intrínseca de la enzima G6PD silvestre y mutantes enzimáticas a+ (N126D) y Durham (K238R) excitado a 280 nm	50
Figura 28. Espectro de emisión de fluorescencia intrínseca de la enzima G6PD silvestre y mutantes enzimáticas A+ (N126D) y Durham (K238R) excitado a 295 no	51
Figura 29. Curva de desnaturalización térmica de la enzima silvestre de la G6PD y de las mutantes A+ (N126D) y Durham (K238R) siguiendo el cambio de elipticidad molar a 222 nm	52

ABREVIATURAS

bp	Pares de bases
DC	Dicroísmo Circular
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Etilen diamino tetraacético
G6PD	Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa
GR	Glutación reductasa
GSH	Glutación reducido
G3PDH	Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa
Kcat	Constante catalítica
KDa	Kilodalton
Km	Constante de Michaelis -Menten
NADPH	Nicotinadeninucleotido fosfato reducido
NADP⁺	Nicotinadeninucleotido fosfato oxidado
Nt	Nucleótido
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
ROS	Especies reactivas del oxígeno
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
Tm	Temperatura media de desnaturalización
U	Unidad de actividad enzimática
Vmax	Velocidad máxima

RESUMEN

La deficiencia de la enzima glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PD) es la enzimopatía más frecuente en el humano y el quinto defecto congénito más común a nivel mundial, afectando a más de 400 millones de personas en el mundo. La prevalencia global de la deficiencia de G6PD es de 4.9 % correlacionada geográficamente con áreas habitadas por poblaciones históricamente expuestas a la malaria endémica, incluidos África, Mediterráneo Europeo, Asia Sur-Oriental y Latinoamérica. En México, la deficiencia de la enzima se ha estimado con una frecuencia de 0.75 %. Esta deficiencia es una enfermedad hereditaria ligada al cromosoma X, defecto causado por mutaciones en el gen de la *g6pd*, lo que resulta en mutantes de proteínas con diferentes niveles de actividad de la enzima y que se asocian con una amplia gama de fenotipos clínicos. Las manifestaciones clínicas más frecuentes son: ictericia neonatal, episodios de anemia hemolítica aguda que en la mayoría de los pacientes se activa por un agente exógeno y anemia hemolítica crónica. La G6PD cataliza el primer paso de la vía de las pentosas fosfato, que convierte a la glucosa 6 fosfato en gluconolactona 6 fosfato con la formación de NADPH. La coenzima NADPH es la donante de electrones fundamental para un número importante de reacciones enzimáticas reductoras como la reacción catalizada por la enzima glutatión reductasa (GR), esencial en la protección de la célula contra el estrés oxidativo. Dado que las células rojas de la sangre no contienen mitocondrias, la vía de las pentosa fosfato es su única fuente de NADPH para mantener los niveles intracelulares de glutatión reducido; por lo tanto, la defensa contra el daño oxidativo es dependiente G6PD.

En la actualidad, el análisis genético de la población mexicana ha permitido describir 18 mutantes de la G6PD de las 186 que existen en el mundo. De las mutantes reportadas en México, algunas han sido identificadas a nivel mundial o sólo se han descrito en pacientes mexicanos. Sin embargo, no se han realizado estudios bioquímicos o biofísicos de ninguna de ellas en nuestro país que expliquen la relación de la estructura y función con la manifestación clínica.

Este proyecto se centró en caracterizar funcional y estructuralmente dos mutantes de la G6PD que han sido descritas en la población mexicana y que corresponden a las mutantes Durham (K238R) de clase I y A+ (N126D) de clase IV. Este estudio permitió conocer los parámetros cinéticos que caracterizan cada una de las mutantes; encontrando que ambas mutantes tienen afectada su catálisis enzimática para los dos sustratos. La diferencia radica en que la mutante Durham (K238R) de clase I presenta inestabilidad en la proteína lo que pudiera afectar su plegamiento, mientras que la A+ (N126D) de clase IV presenta una estabilidad normal respecto a la enzima silvestre lo cual podría compensar la baja actividad enzimática, por lo que no presenta manifestaciones clínicas.

1. INTRODUCCIÓN

Los errores innatos del metabolismo son enfermedades monogénicas de herencia autosómica recesiva en su mayoría. Son un producto de la mutación de un gen que produce un defecto enzimático (Colombo, 2005). La naturaleza básica del defecto es conocida en algunos casos y puede representar la síntesis de una enzima estructuralmente alterada con propiedades catalíticas diferentes. En otros casos, se produce una proteína inestable y/o rápidamente degradada en los tejidos, incluso una reducción parcial o completa de la síntesis de la enzima.

Los defectos enzimáticos en el metabolismo del eritrocito son llamados eritroenzimopatías hereditarias e involucran a las siguientes vías: a) vía de Embden-Meyerhof, b) vía de las pentosas fosfato, c) biosíntesis del glutatión y d) metabolismo nucleotídico (Lisker, 1976). Estas deficiencias enzimáticas específicas pueden dar como resultado una disminución en la capacidad de sintetizar ATP o una falla para mantener niveles adecuados de NADPH y de glutatión reducido. Se han descrito alrededor de 20 deficiencias hereditarias en enzimas, de las cuales 14 de ellas están asociadas con hemólisis aguda o crónica (Vaca, 1984).

De las eritroenzimopatías más comunes en humanos se encuentran la deficiencia de la piruvato cinasa (PK) y la glucosa fosfato isomerasa (GPI) ambas de la vía glucolítica y la deficiencia de la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PD) que participa en la vía de las pentosas fosfato.

1.1 Epidemiología de la deficiencia de la G6PD

La deficiencia de la G6PD es la enzimopatía más frecuente, con una incidencia promedio a nivel mundial de alrededor del 1 % y una prevalencia de 4.9 %, estando afectados por ésta deficiencia más de 400 millones de personas (90 % hombres) (Wajcman y Galacteros, 2004). La prevalencia global de deficiencia de la G6PD se encuentra geográficamente relacionada con las zonas habitadas por poblaciones

históricamente expuestas a la malaria endémica, y tienen una proporción de afectados que van de 5 % hasta un 30 % incluyendo África, el Mediterráneo europeo, Asia Sur Oriental y Latinoamérica (Figura 1). Los principales afectados en Estados Unidos, son los varones negros, población en la que un tipo de deficiencia de la G6PD alcanza una prevalencia de 10 % (Nkhoma, 2009).

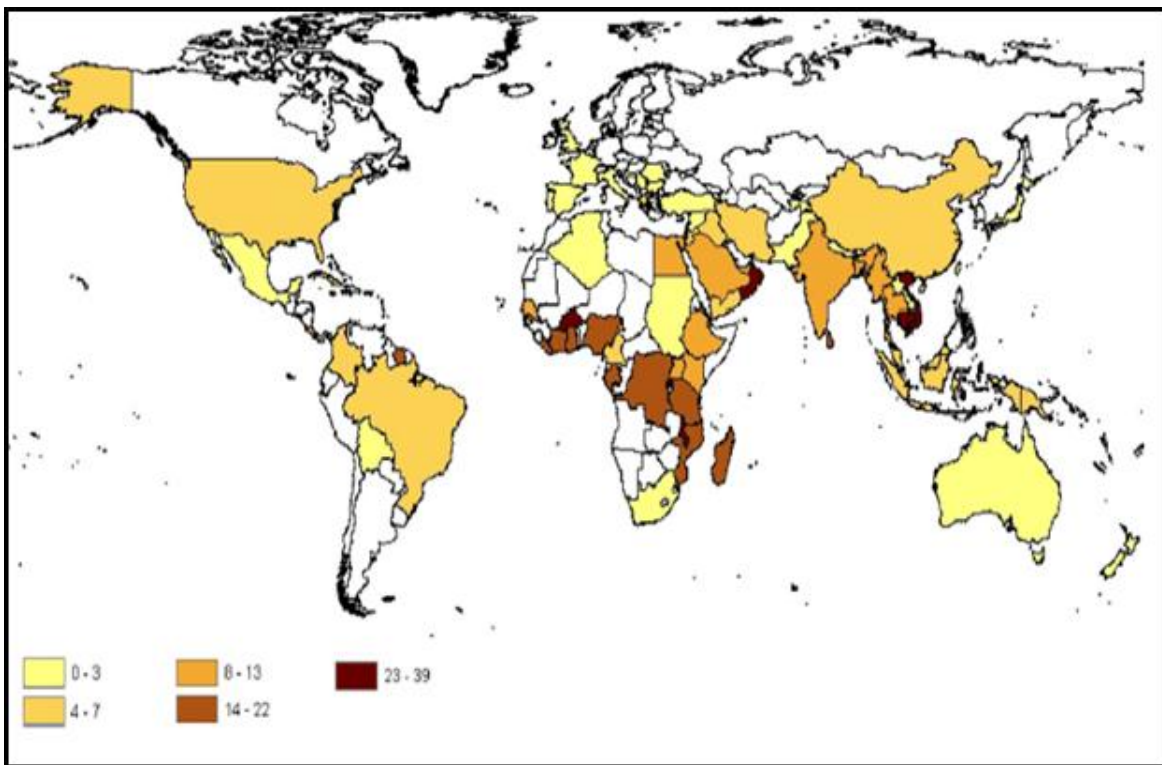


Figura 1. Distribución de la deficiencia de la enzima G6PD en porcentaje en todos los países de los estudios incluidos (Imagen adaptada a partir de Nkhoma, 2009).

En Latinoamérica se han descrito algunas mutantes de la enzima. En Cuba por ejemplo, la mutante A (-) presenta una prevalencia del 4.9 % y del 7 % para la mutante A (+) (Estrada, 1995). En Colombia, la frecuencia calculada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para las mutantes fenotípicamente asociadas con la deficiencia, es entre el 3 y 7 % (Ramírez, 2009).

En México hay una prevalencia del 0.71 % (Vaca, 2002) y la frecuencia de la deficiencia de la G6PD varía de 0.39 % a 4.09 %. Las tasas de prevalencia más altas se producen en los mestizos de la Costa del Pacífico (estado de Guerrero, 4,09 %) y el Golfo de México (Estado de Tabasco, 3.75 %). Las frecuencias más bajas se presentan en varios grupos indígenas (0.57 %), en los mestizos del noreste (0.66%) y el noroeste de México (0.39%) (Medina, 1997).

1.2 Manifestaciones clínicas de la deficiencia de la G6PD

La deficiencia de la G6PD presenta un amplio espectro clínico que incluye desde sujetos asintomáticos hasta estados hemolíticos agudos o crónicos. La mayoría de los sujetos que presentan las mutantes con niveles moderados de deficiencia, se encuentran asintomáticos a través de su vida e inclusive se desconoce el estatus de su enfermedad. En los sujetos con las mutantes deficientes graves, las manifestaciones clínicas pueden dividirse en tres grandes grupos: hemólisis aguda, anemia hemolítica crónica no esferocítica e ictericia neonatal.

1.2.1 Anemia hemolítica aguda

La enfermedad se manifiesta comunmente como hemólisis aguda, que generalmente se presenta cuando los glóbulos rojos se someten a estrés oxidativo provocado por agentes tales como: a) fármacos, b) infecciones o c) la ingestión de habas. La deficiencia de la G6PD no parece afectar a la esperanza de vida, la calidad de vida o la actividad de los individuos afectados (Cappellini y Fiorelli, 2008).

a) Hemólisis inducida por fármacos

La deficiencia de la G6PD fue descubierta por primera vez en pacientes que habían recibido un fármaco antimalarico como la primaquina. Posteriormente, varios fármacos se han relacionado con la hemólisis aguda en personas con deficiencia de la G6PD (Tabla 1). Además de que los fármacos con efectos potencialmente oxidantes a

veces se administran a pacientes con una condición clínica subyacente tal como infección, lo que puede conducir a la hemólisis y que los pacientes suelen tomar más de un tipo de medicamento. También debe considerarse que la hemólisis en la deficiencia de la G6PD es un proceso autolimitado y, por lo tanto, no siempre produce anemia clínicamente significativa o reticulocitosis (Cappellini, 2008). La hemólisis clínicamente detectable e ictericia suele surgir dentro de 24-72 horas de la administración de medicamentos. La anemia empeora hasta los días 7-8. Los cuerpos de Heinz (hemoglobina desnaturalizada y precipitada) en sangre periférica de células rojas, son detectados mediante tinción con violeta de metilo (Cappellini, 2008). Después de dejar los fármacos, las concentraciones de hemoglobina empiezan a recuperarse después de 8-10 días.

Tabla 1. Agentes que inducen anemia hemolítica en las personas deficientes de la G6PD.

Antimalaricos	Primaquina Pamaquina
Sulfonamidas	Sulfanilamida Sulfacetamida Sulfapiridina Sulfametoxazola
Nitrofuranos	Nitrofurantoina
Analgésicos y Antipiréticos	Acetanilida
Otras drogas	Ácido Nalidixico Niridazola Fenazopiridina

*Tabla adaptada y modificada de Cappellini y Fiorelli, 2008.

b) Hemólisis inducida por infección

La infección es quizá la causa más común en quienes sufren deficiencia de la G6PD. El mecanismo de hemólisis inducida por infecciones no es del todo conocida; una explicación puede ser que la generación de H_2O_2 por los neutrófilos polimorfonucleares puede provocar una disminución en la cantidad de glutatión reducido, cuya función es eliminar del glóbulo rojo la acumulación de metabolitos que oxidan a los grupos sulfhidrilos formados por el estrés oxidativo, por lo que disminuye la capacidad protectora de la célula. Por otra parte, la activación de los neutrófilos interviene directamente en la peroxidación de los lípidos de la membrana y provoca de forma directa la destrucción de la célula. La severidad y las consecuencias clínicas están influenciadas por muchos factores que incluyen la administración simultánea de: medicamentos oxidantes, los niveles de hemoglobina previos, la función hepática y la edad (Bonilla, 2007).

c) Favismo

La relación de la deficiencia de la G6PD con el consumo de habas ha sido descrita desde mucho tiempo atrás; los pacientes presentan un cuadro clínico similar al inducido por fármacos, que se desencadena dentro de las 24 y 48 horas siguientes a la ingesta de habas. Se caracteriza por la presencia de un cuadro de hemólisis aguda luego de ingerir habas, sin embargo, no todos los individuos con deficiencia de la G6PD presentan hemólisis cuando comen habas. Los síntomas del favismo se desarrollan pocas horas después de la ingestión. Los más comunes son náuseas, vómitos, malestar y vértigo. A estos síntomas les sigue una hemólisis aguda donde, a menudo, el recuento de eritrocitos cae por debajo de $1 \times 10^{12}/L$. En la mayoría de los glóbulos rojos aparecen cuerpos de Heinz. Están presentes la hemoglobinemia y la hemoglobinuria. Los síntomas por lo general cesan luego de 2 a 6 días (Bonilla, 2007).

1.2.2 Anemia hemolítica congénita no esferocítica

En algunos pacientes, las mutantes de la deficiencia de la G6PD causan hemólisis crónica, lo que lleva a la llamada anemia hemolítica congénita no esferocítica. Estas mutantes se han agrupado como clase 1 de acuerdo a los criterios de clasificación de la OMS (Tabla 2). Las mutantes de la G6PD que causan anemia hemolítica congénita no esferocítica son esporádicas, y casi todos se derivan de mutaciones independientes. El diagnóstico de esta complicación se basa en hallazgos clínicos, el trastorno generalmente se sospecha durante la infancia o la niñez. Muchos pacientes con anemia hemolítica congénita no esferocítica causada por la deficiencia de la G6PD tienen una historia de ictericia neonatal severa dada por la anemia crónica exacerbada por el estrés oxidativo, que por lo general requiere transfusiones de sangre. Las concentraciones de bilirrubina y lactosa deshidrogenasa se elevan, y a diferencia de la anemia hemolítica aguda, la hemólisis es principalmente extravascular (Cappellini y Fiorelli, 2008)

1.2.3 Ictericia neonatal

La ictericia neonatal causada por deficiencia de la G6PD, que lleva a la rápida lisis de los eritrocitos, tiene un pico de presentación entre el segundo y el tercer día de vida. Puede ser subclínica o llevar al kernicterus, que consiste en daño cerebral y de los nervios auditivos por niveles elevados de bilirrubinemia neonatal no conjugada; lo cual puede llevar a discapacidad intelectual, parálisis cerebral, sordera y muerte. La prevalencia varía según el genotipo; los varones hemocigotos y las mujeres homocigotas presentan el doble de riesgo que la población general, mientras que esta condición es rara en las mujeres heterocigotas (Ramírez y Zarante, 2009).

Las consecuencias de padecer hiperbilirrubinemia secundaria por déficit de la G6PD pueden ser graves, implican mayor riesgo de necesidad de fototerapia, transfusión o ambas, y mayor riesgo de kernicterus y muerte. No obstante, esto depende de las mutaciones génicas específicas. Se considera que el kernicterus representa un riesgo significativo para niños afectados en países de ingresos medianos y bajos, donde los

servicios para la detección y el tratamiento de la ictericia neonatal son limitados (Bonilla, 2007).

1.3 Función de la G6PD y el equilibrio redox en el eritrocito

La G6PD participa en la primera reacción de la fase oxidativa de la vía de las pentosas fosfato. La G6PD cataliza la conversión de Glucosa-6-fosfato (G6P) a 6-fosfogluconolactona con la producción concomitante de una molécula de NADPH. Cuando el 6-fosfogluconato se convierte en ribulosa-5-fosfato por la 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGD), se produce una segunda molécula de NADPH (Figura 2). La importancia de la G6PD radica en la trascendencia de los procesos celulares en los que participa, como es la formación de NADPH efectuada a partir de los dos primeros pasos de la vía de las pentosas fosfato mencionados anteriormente.

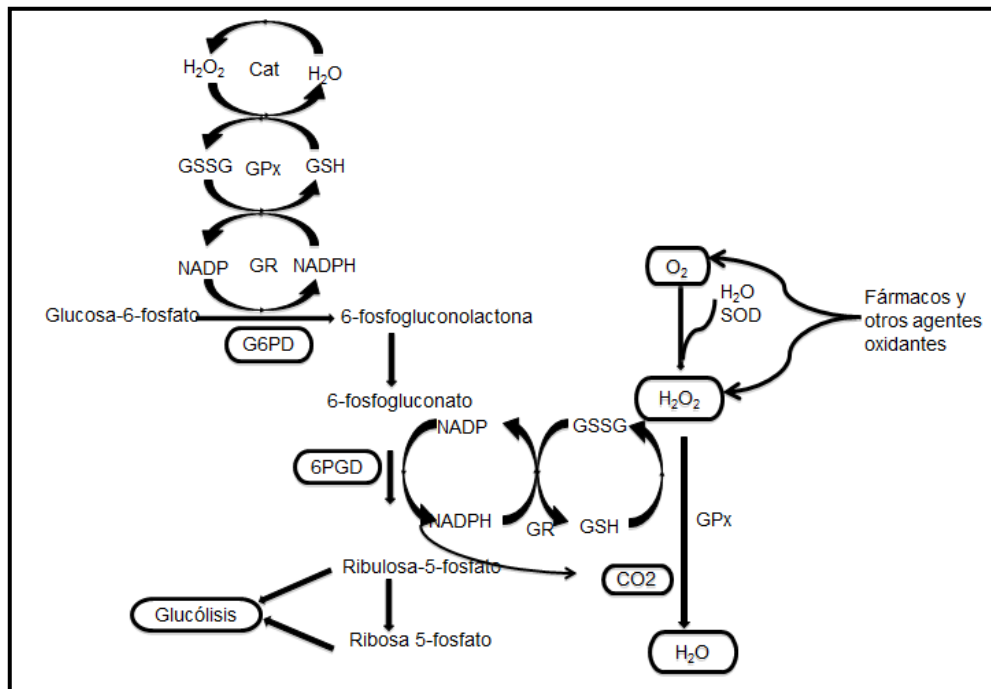


Figura 2. Función de la enzima G6PD y el equilibrio redox en el eritrocito El NADPH sirve como donador de protones para la generación de glutatión reducido el cual sirve como ligando de la cat=catalasa. GPx= glutatión peroxidasa. GR= Glutatión reductasa. G6PD= Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa.

6PGD= 6-fosfogluconato deshidrogenasa. GSH= Glutati3n reducido. GSSG= Glutati3n oxidado (Imagen adaptada y modificada de Masson, 2007).

El NADPH participa en la bios3ntesis reductora del colesterol y de los 3cidos grasos, as3 como tambi3n en la s3ntesis del 3xido n3trico (NO). Por otra parte, interviene en el equilibrio de 3xido reducci3n para eliminar los radicales libres que causan da3o oxidativo en la c3lula, ya que el NADPH se encarga de regenerar el glutati3n (GSH) por la glutati3n reductasa (GR). Los electrones del NADPH se donan durante la reacci3n catalizada por la GR, en el que el glutati3n oxidado (GSSG) se reduce para liberar dos mol3culas de GSH. En el eritrocito, el GSH es esencial para la reducci3n del per3xido de hidr3geno y los radicales libres (Mason, 2007). Por otra parte, la glutati3n peroxidasa (GPX) elimina el per3xido de los eritrocitos, el GSH sirve como sustrato de esta enzima mientras que el NADPH se requiere para reducir el GSSG y los grupos sulfh3dricos oxidados de algunas prote3nas. NADPH y GSH son los responsables del potencial redox efectivo para proteger del estr3s oxidativo tanto a los grupos sulfidrilo, como a las enzimas y a la hemoglobina que compromete la supervivencia del eritrocito (Bonilla, 2007). Dado que las c3lulas rojas de la sangre no contienen mitocondrias, la v3a del fosfato de pentosa es su 3nica fuente de NADPH, por lo tanto, la defensa contra el da3o oxidativo es dependiente de la G6PD.

1.4 Deficiencia de la G6PD

La deficiencia de la G6PD ha sido el prototipo de estudio, dentro de las anemias hemol3ticas, debido a que es una enzimopat3a con una anormalidad primaria en el eritrocito. De igual manera es un ejemplo de anemia hemol3tica debido a una interacci3n entre causas extracelulares e intracelulares; ya que la hem3lisis en la mayor3a de los casos es disparada por agentes ex3genos. La hem3lisis de los hemat3es deficientes ocurre como consecuencia del aumento en la susceptibilidad al da3o oxidativo, debido a la incapacidad de las c3lulas para reducir de forma normal el NADP⁺ a NADPH (Bonilla, 2007).

Diversos mecanismos genéticos producen la deficiencia de la G6PD como deleciones, mutaciones puntuales y sustituciones que afectan la transcripción (Figura 3), procesamiento o estructura primaria de la enzima, lo que funcionalmente lleva a una disminución de la actividad enzimática o pérdida de afinidad por el sustrato (Metha, 2000). La G6PD Sunderland es una mutación consistente en la deleción de 3 pares de bases que lleva a la pérdida de un residuo de isoleucina. Con excepción de la anterior, todas las mutaciones encontradas son puntuales asociadas a la sustitución del aminoácido.

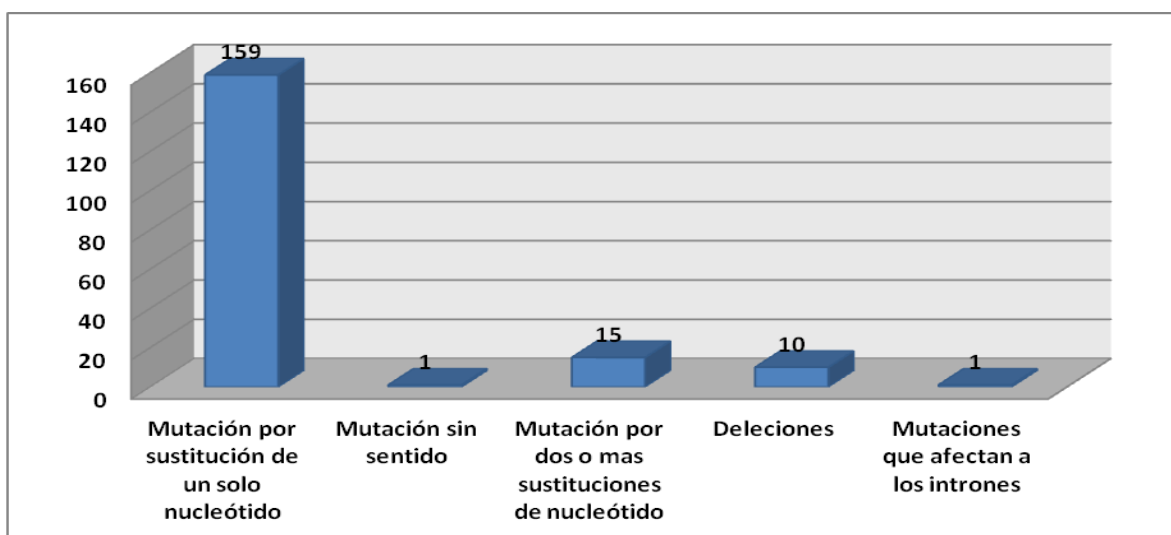


Figura 3. Tipos de mutaciones reportadas en la G6PD (Figura adaptada de Minucci, 2012).

1.4.1 Mutantes enzimáticas de la G6PD

En 1967, el comité de la Organización Mundial de la Salud (OMS) propuso la estandarización de los procedimientos bioquímicos para caracterizar las mutantes de la G6PD, teniendo como parámetros de evaluación: la actividad enzimática, la constante de Michaelis -Menten (k_m) para el sustrato y la coenzima NADP⁺, estabilidad al calor, eficiencia de utilización de glucosa 6 fosfato (G6P), movilidad electroforética y pH óptimo. Gracias a esto aproximadamente 186 mutantes de la G6PD han sido descritas (Minucci, 2012). Existen dos mutantes de la G6PD que han

sido identificadas por movilidad electroforética, la tipo silvestre o enzima común denominada B (lenta) y la mutante A (rápida). Los hombres hemicigotos con tipo A y deficientes de la enzima se les denominan A-; a los tipos B y deficientes de la enzima se les denomina B-. Las mutantes más comunes de G6PD son tipo A+, A- y la tipo Mediterráneo. La diferencia molecular entre la mutante B y A se debe a la sustitución de un aminoácido asparagina en B y aspartato en A. La diferencia clínica de la mutante A- reside en que es producida en igual grado que la enzima normal pero se inactiva más rápidamente que la enzima silvestre; así los eritrocitos jóvenes y nucleados que pueden sintetizar nuevas moléculas enzimáticas tienen actividad normal, pero ésta disminuye rápidamente a medida que el eritrocito madura (Travis, 1982). De igual forma, la OMS clasificó a cada una de las mutantes de acuerdo a su nivel de deficiencia y a los niveles de actividad enzimática como se presenta en la tabla 2.

Tabla 2. Clases de deficiencias de Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa.

Clase	Nivel de deficiencia	Actividad enzimática eritrocitaria	Manifestaciones clínicas
I	Severa	No detectable	Anemia hemolítica crónica no esferocítica
II	Severa	Menos del 10 % de lo normal.	Hemólisis aguda
III	Moderada	Del 10 al 60 % de lo normal.	Hemólisis aguda ocasional
IV	Leve o ausente	Del 60 al 100 % de lo normal.	Sin manifestaciones
V	Ninguna	Mayor del 100 % de lo normal.	Sin manifestaciones

*Tabla adaptada de WHO Working group, 1989.

Las mutantes clase I, que implican la mayor gravedad clínica, suelen ser producto de mutaciones en el extremo carboxilo entre la región de los aminoácidos 362 al 446 en donde se encuentran los sitios de unión a NADP⁺ y el sitio de unión a la glucosa 6-fosfato, ejemplo de mutantes clase I son Durham, Nashville y Sumaré (Fonseca, 2005).

En la Clase II con una deficiencia enzimática severa (menor del 10 %) están las mutantes Mediterránea y Unión. En la Clase III con deficiencia moderada (10-60 %); están las mutantes Africana o A-, Canton y Seattle (Fonseca, 2005). La Clase IV con actividad enzimática normal o ligeramente disminuida (60-100 % de actividad); tiene las mutantes A+ e Insuli. Mientras que la Clase V con un aumento en la actividad enzimática (>100 %) se tiene a la mutante Verona (Beutler, 1988).

A pesar de que las mutaciones se extienden por toda la región de codificación del gen, hay un grupo de mutaciones que causan la deficiencia de clase I en el exón 10. Diversas mutantes de esta región tienen movilidades electroforéticas anómalas y son particularmente inestables a bajas concentraciones de NADP⁺; por lo tanto, se propuso que ésta era la ubicación del dominio de unión a NADP⁺. Sin embargo, cuando la estructura tridimensional de la G6PD de *Leuconostoc mesenteroides* fue descifrada; modelo en el que la enzima humana se basa, se estableció que el dominio catalítico que produce la unión del NADP⁺ estaba codificada en el exón 2 límite con el exón 3 (Figura 4); y que los aminoácidos codificados en el exón 10 representaban el dominio donde se encuentra el NADP⁺ estructural implicados en la formación del dímero activo de la G6PD (Mehta, 2000).

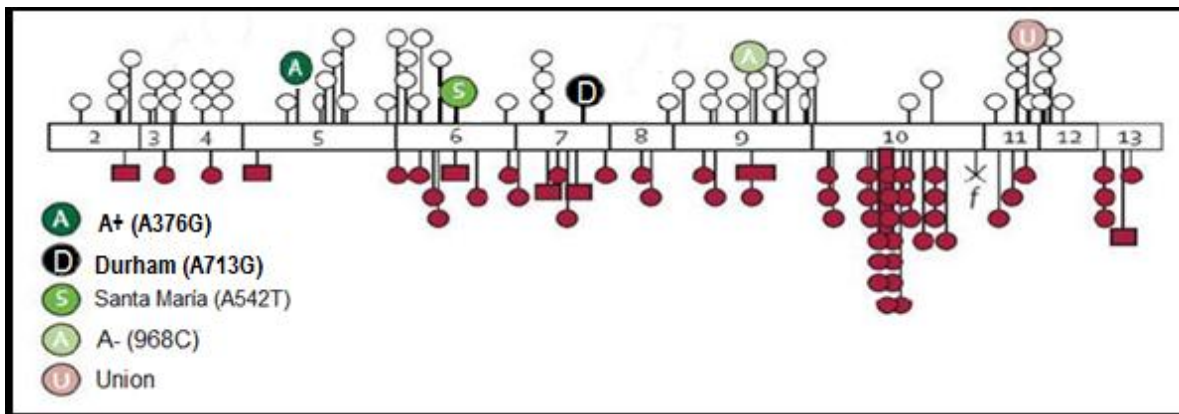


Figura 4. Mutaciones en los exones del gen de la *g6pd*. Los exones son presentados como cuadros abiertos. Círculos abiertos representan a las mutaciones que causan las mutantes de clase II y III. Círculos llenos representan mutaciones esporádicas de la mutante severa clase I. Elipses abiertos son mutaciones que causan las mutantes clase IV. Cuadros llenos representan pequeñas mutaciones (Imagen adaptada Cappellini y Fiorelli, 2008).

1.4.2 Deficiencia de la G6PD en México

En México, la investigación sobre la deficiencia de la enzima G6PD se inició en la década de los 60's con estudios clínicos, hematológicos, genéticos y poblacionales (Lisker, 1963). A partir de la década de los 90's y con la disponibilidad de las técnicas de biología molecular se hizo posible realizar el diagnóstico con certeza que permitió reconocer algunas de las mutaciones presentes en la población mexicana asociadas con la enfermedad (Beutler, 1992; Medina, 1997).

La Deficiencia de G6PD en México es muy heterogéneo, en la tabla 3 se muestran las 18 mutantes que se han reportado. Entre las más frecuentes en sujetos mexicanos se ha reportado que el 80% de los casos corresponden a la mutación A- 202A/376G y A- 376G/968C (Vulliamy, 1991; Beutler y Kuhl, 1990). El origen de estas mutantes es también de común aparición en otras regiones como el continente Africano, el sur de Europa y el Sureste Asiático

Tabla 3. Mutantes reportadas en la población mexicana.

Mutante	Nucleótido substituido	Aminoácido substituido
A-	202 G→A/376 A→G	68Val→Met /126Asn→Asp
A-	376 A→G/968 T→C	126Asn→Asp/323Leu→Pro
Santamaría	376 A→G/542 A→T	126Asn→Asp/181Asp→Val
A+	376 A→G	126Asn→Asp
San Luis Potosí	376 A→T	126Asn→Tyr
Vanua Lava	383 T→C	128Leu→Pro
Valladolid	406 C→T	136Arg→Cys
Tsukui	561-563del	Ser188del

México City	680 G→A	227Arg→Gln
Durham	713 A→G	238Lys→Arg
Zacatecas	770 G→T	257Arg→Leu
Seattle	844 G→C	282Asp→His
Viangchan	871 G→A	291Val→Met
Veracruz	1094 G→A	365Arg→His
Guadalajara	1159 C→T	387Arg→Cys
Nashville	1178 G→A	393Arg→His
Yucatán	1285 A→G	429Lys→Glu
Unión	1360 C→T	454Arg→Cys

* Las mutantes resaltadas en negritas son las que se estudiarán en el presente trabajo. (Tabla adaptada y modificada de Vaca, 2003).

1.5 Características moleculares del gen *g6pd*

El gen fue secuenciado y clonado por dos grupos independientes, Pérsico y Takizawa en 1986. La secuencia completa del gen de la *g6pd* presenta un tamaño de 18.5 Kb y está conformado por 12 intrones y 13 exones que codifican para un producto de 1545 bp (Fiorelli, 2000). Los 13 exones tienen una longitud de alrededor de 20 kb y tienen tamaños que varían entre 38 y 236 bp; el primer exón tiene una secuencia no codificante y los intrones son pequeños, excepto el intrón 2 (11 kb). La longitud total del gen es de 2.4 kb y el RNAm consta de 2269 nucleótidos (Tabla 4). En el extremo 5' del gen existe una isla rica en CpG (dinucleótidos citocina-guanina). La desmetilación diferencial de algunos CpG se asocia con la expresión del gen en el cromosoma X activo (Beutler, 1994).

Tabla 4. Características moleculares de la G6PD

DNA	Localización	Xq2.8
	Tamaño del gen (kb)	18.5
	Número de exones	13
	Número de intrones	12
RNA^m	Tamaño en nucleótidos	2269
Proteína	Número de aminoácidos	515
	Masa molecular (Da)	59265

*Tabla adaptada de Fiorelli, 2000.

1.6 Estructura de la G6PD

La enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (E.C. 1.1.1.49; D-glucosa-6-fosfato: NADP oxidoreductasa) es una enzima citosólica presente en todas las células. En los eritrocitos de humano se ha reportado que se encuentra en forma dimérica o tetramérica. Se sabe poco sobre la importancia fisiológica de la interconversión, sin embargo ensayos *in vitro* demuestran que a pH>8 y gran fuerza iónica cambia el equilibrio hacia el dímero, mientras que las condiciones de pH<6 provoca un desplazamiento hacia el tetrámero; monómeros inactivos también pueden estar formados a pH>8. Estudios han demostrado que los tetrámeros predominan por debajo de pH 6 y dímeros predominan por encima de pH 8. Además el EDTA, NADPH y G6P favorecen la formación del dímero, mientras que el NADP⁺ o ciertos iones metálicos favorecen el tetrámero (Au, 2000).

El monómero tiene una masa molecular de 59,256 daltons y consta de 515 aminoácidos. La estructura secundaria de esta proteína se forma por un total de 15 regiones α -hélices y 15 hebras- β que se arreglan en un dominio de unión de coenzima con un plegamiento tipo Rossmann y una extensa región de interfase formada por la asociación de dominios $\beta+\alpha$ pertenecientes al extremo C-terminal de cada subunidad (Figura 5) (Kotaka, 2005). La actividad catalítica sólo se inicia cuando se establece una asociación en estado de equilibrio entre las formas dimérica y tetramérica (Kirkman y Hendrickson, 1963). Tal asociación requiere de la presencia de NADP⁺, unido fuertemente a la enzima, lo que hace que el NADP⁺ desempeñe un papel dual, tanto de

componente estructural como de coenzima. En 1967, Luzzatto postuló por lo menos dos sitios de unión del NADP⁺ a la enzima; con un estado de transición de baja a alta afinidad cuando aumenta la concentración de NADP⁺, lo que significa que existen dos posibles formas de la enzima, de acuerdo con su afinidad por el NADP⁺. Estas condiciones podrían variar en caso de aparición de un inhibidor competitivo como el NADPH. La baja constante de disociación para el NADPH sugiere que la reacción puede ser un controlador muy eficiente, a manera de retro-alimentador, que regularía la actividad enzimática (Bonilla, 2007). Estos hechos permitieron establecer que la relación de concentración NADP⁺/ NADPH es un mecanismo regulador de la actividad de la G6PD y por tanto de la vía de las pentosas fosfato en el eritrocito.

Un alineamiento múltiple de las 35 secuencias de aminoácidos de la G6PD conocidas en la actualidad muestra más de un 30% de identidad entre la secuencia humana y los de otras especies. Se encontraron dos secuencias en el alineamiento completamente conservadas; de ocho residuos RIDHYLGK (residuos 198-205) que corresponde al sitio de unión al sustrato, la lisina 205 es esencial para la catálisis (Bhadbhade, 1987) y la huella digital de unión al dinucleótido GxxGDLx (residuos 38-44) contiene a la Pro 172 la cual está involucrada en el posicionamiento correcto de los sitios de unión del sustrato y la coenzima (Kotaka, 2005). El análisis tridimensional de la estructura, los estudios cinéticos y la mutagénesis sitio dirigida de la G6PD de *Leuconostoc mesenteroides* se han utilizado para elucidar el sustrato y sitios de unión a la coenzima.

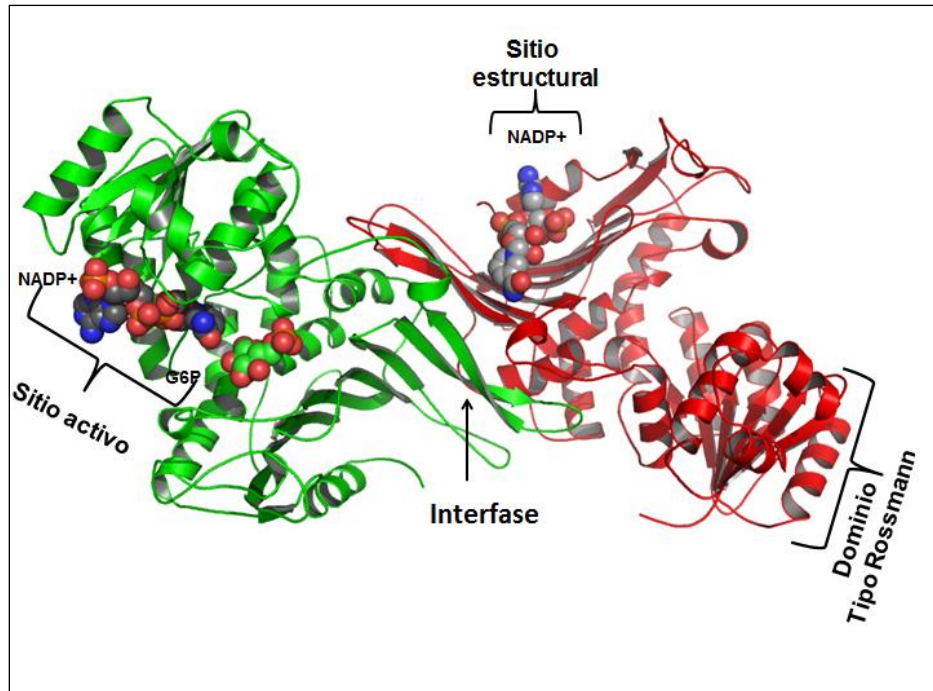


Figura 5. Estructura del dímero de la enzima G6PD humana. En esta figura se observa del dominio del sitio activo y la posición de la molécula de NADP⁺. Una subunidad esta en verde mientras que la otra esta en rojo (Imagen adaptada del Mason, 2007).

1.7 Antecedentes de las mutantes de la G6PD: Durham (K238R) y A+ (N126D)

1.7.1 Mutante Durham (K238R)

La mutante Durham (K238R) perteneciente a la clase I, es una mutación que implica la sustitución de adenina por guanina (A → G) en el nucleótido 713 (exón 7), con un cambio resultante en el aminoácido 238 de lisina a arginina (K→R) (Zimmerman, 1997). Las mutaciones en el gen de la *g6pd* se producen en toda la región de codificación, pero las mutaciones que originan mutantes de clase I, la mayoría se agrupan en torno a los sitios de unión para G6P (nucleótidos 613-615) y NADP⁺/NADPH (nucleótidos 1156-1161) (Beutler, 1994). Durham presenta la mutación en el nucleótidos 713, cerca del nucleótido de unión a G6P. Sin embargo a nivel de conformación cuaternaria, el fosfato de 2' del NADP⁺ estructural forma puentes de hidrógeno con Arg487, Arg357, Lys366 y Lys238 (Figura 6). El cambio de arginina

por lisina en la posición 238 en la mutante Durham (K238R) crea un contacto menos favorable con la 2'fosfato del NADP⁺ estructural (Au, 2000).

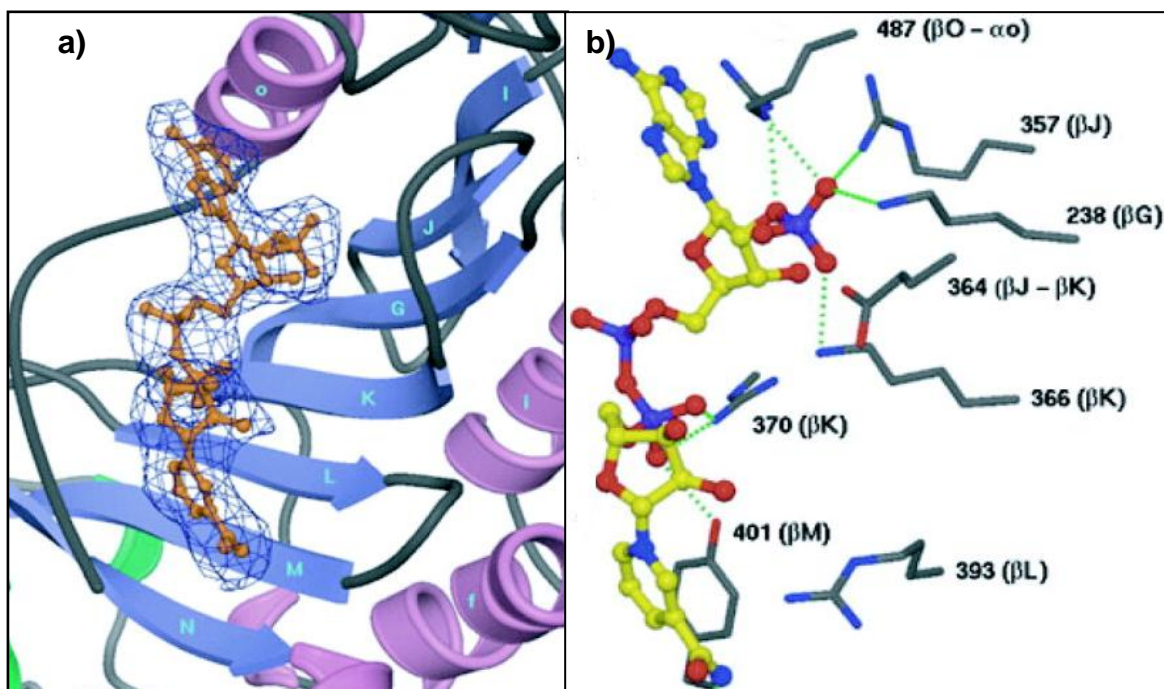


Figura 6. El NADP⁺ estructural de la mutante Durham (K238R). (a) La molécula de NADP⁺ se muestra en color naranja en el modo de bola y palo. Los elementos de estructura secundaria se etiquetan. El esquema de colores es subunidad A del dímero son hélice color morado y hebras β son de color azul; en la subunidad B los cordones son de color verde. (b) Anillo de apilamiento y enlaces de hidrógeno que interaccionan con la molécula de NADP⁺. Los puentes de hidrógeno se muestran como líneas de puntos verdes. Los residuos están coloreados por tipo de átomo: el carbono en gris; el oxígeno en rojo; nitrógeno azul. Con el fin de mostrar el NADP⁺ claramente, sus átomos de carbono son átomos en amarillo y el fósforo son en púrpura. La orientación es la misma que en (a). (Figura adaptada de Au, 2000).

1.7.2 Mutante A+ (N126D)

La mutante A+ (N126D), implica la sustitución de adenina por guanina (A → G) en el nucleótido 376 (exón 5), con un cambio resultante en el aminoácido 126 de asparagina a ácido aspártico (N→D) (Beutler y Vulliamy, 2002). El resultado es una mutante con termoestabilidad normal y niveles de actividad enzimática, entre 60 y 100 %. Según la clasificación de la OMS es una mutante clase IV, no asociada con la anemia hemolítica aguda (WHO, 1989). Un estudio publicado en el 2002 por Vaca y colaboradores, dice que la población mexicana presenta una prevalencia de esta mutación de 1.64%. Sugiere que algunas de las mutantes de la G6PD probablemente fueron importados a México a través de un flujo poblacional del sur de Europa, África y el sudeste de Asia (Vaca, 2002). No se han realizado estudios de esta mutante desde un enfoque funcional y estructural (Figura 7).

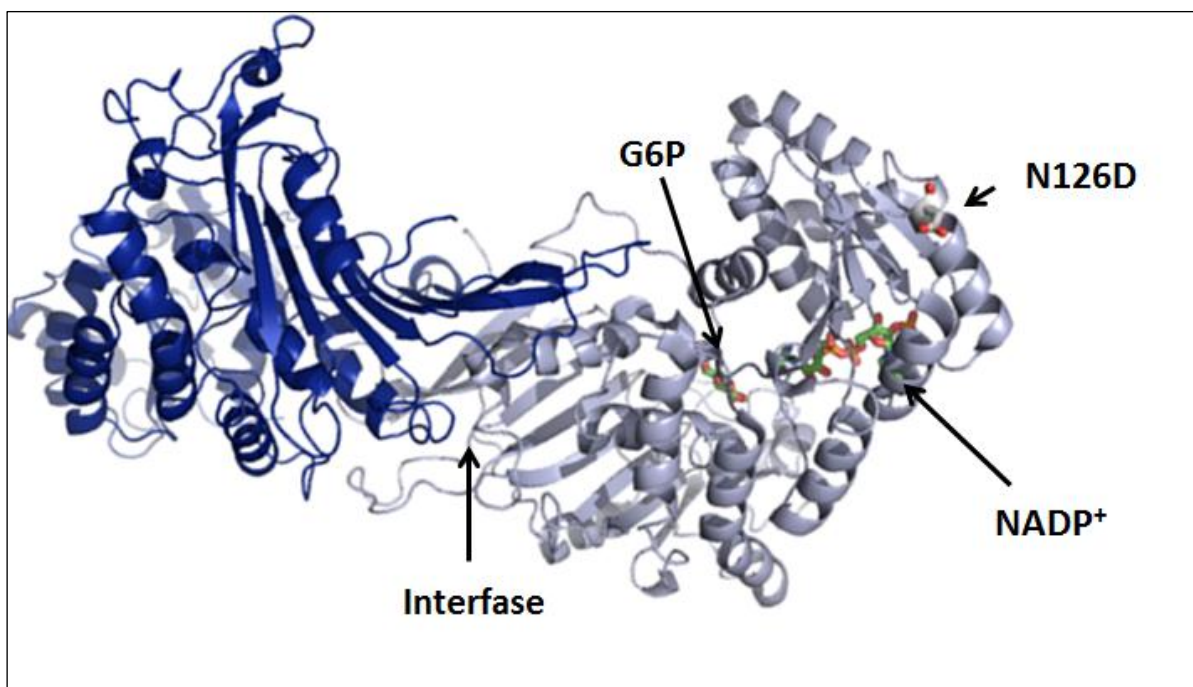


Figura 7. Estructura de la mutante A+ (N126D). En azul y gris se muestra cada uno de los monómeros de la G6PD. En color verde y naranja en el modo de bola y palo se encuentran los sustratos y en rojo la mutación de la mutante N126D. La figura se diseñó utilizando el programa PyMol.

2. JUSTIFICACIÓN

La deficiencia de la enzima G6PD es la enzimopatía más frecuente y es el quinto defecto congénito a nivel mundial, está presente en más de 400 millones de personas en el mundo. En México, la deficiencia de la G6PD está presente hasta en un 4.09% y se han reportado 18 mutantes responsables de la alta frecuencia de la deficiencia de la G6PD. A pesar de los amplios estudios clínicos, epidemiológicos y genéticos que sobre ésta enfermedad se han realizado a nivel mundial, pocos proyectos se han enfocado en entender las bases moleculares de la enfermedad a nivel de la proteína codificada. Este proyecto se enfoca en el estudio molecular tanto de la funcionalidad como la estructura de las dos enzima mutantes de la G6PD, empezando por el estudio de la enzima de clase IV, la A+ (N126D) cuya deficiencia no presenta manifestaciones clínicas y la enzima de clase I llamada Durham (K238R), cuya deficiencia provoca las manifestaciones más severas; buscando de esta manera encontrar la etiopatología de las mutantes y poderla correlacionar con la manifestación clínica.

3. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar funcional y estructuralmente las mutantes de la enzima glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PD): Durham (K238R) y A+ (N126D) a partir de una construcción recombinante, para su posterior comparación con la enzima silvestre.

3.1 Objetivos particulares

1. Mutar el gen de la *g6pd* mediante mutagénesis mediada por PCR para generar las mutantes N126D (A+) y K238R (Durham).
2. Estandarizar las condiciones de sobreexpresión de la proteína soluble de las mutantes Durham (K238R) y A+ (N126D), considerando tiempo de incubación, temperatura y concentración del inductor.
3. Purificar las mutantes Durham (K238R) y A+ (N126D).
4. Caracterizar funcionalmente a las mutantes Durham (K238R) y A+ (N126D).
5. Caracterizar estructuralmente a las mutantes Durham (K238R) y A+ (N126D).

4. METODOLOGÍA

4.1 Diseño de oligonucleótidos mutagénicos

Se diseñaron los oligonucleótidos mutagénicos específicos para crear las 2 mutantes del gen de la *g6pd* de humano a partir del GenBank (N^o de acceso NM_001042351). En la tabla 5 se muestran los oligonucleótidos mutagénicos que constan de 17-21 aminoácidos, para la obtención de las mutantes Durham (K238R) y A+ (N126D).

Tabla 5. Oligonucleótidos mutagénicos para la obtención de las mutantes Durham (K238R) y A+ (N126D).

Residuo mutado	Oligonucleótido mutagénico	Tm (°C)
K238R	Oligonucleótido sentido	63
	5'CCTCACCTTCAGGGACC3'	
	Oligonucleótido antisentido	
	5'GGTCCCTGAAGGTGAGG 3'	
N126D	Oligonucleótido sentido	62
	5'AGCCACATGGATGCCCTCCAC 3'	
	Oligonucleótido antisentido	
	5'GTGGAGGGCATCCATGTGGCT 3'	

* El nucleótido mutado se marca en negritas.

De igual forma se utilizó un par de oligonucleótidos externos para amplificar el gen completo y que además contienen las secuencias específicas que sirven de blanco para la digestión con las enzimas de restricción *NdeI* y *Bpu11021*, los cuales se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Oligonucleótidos externos para la amplificación del gen completo de la *g6pd*.

Sitio de restricción	Oligonucleótido mutagénico	Tm (°C)
<i>NdeI</i>	Oligonucleótido sentido	60
	5'CGACAGCC/ATATGGCAGAG3'	
<i>Bpu1102</i>	Oligonucleótido antisentido	60
	5' TGCGCTGAGCT/CAGAGCTT 3'	

* El sitio de restricción se encuentra marcado con una línea.

4.2 Mutagénesis mediada por PCR

Para la introducción de las respectivas mutaciones dentro del gen estructural, se empleó el método de mutagénesis dirigida por PCR mediante extensión de fragmentos que se solapan. Este método se basó en la utilización de cuatro oligonucleótidos, dos de los cuales contenían la mutación que se deseaba introducir (oligonucleótidos mutagénicos mencionados anteriormente) y dos con los oligonucleótidos externos, que además contenían las secuencias específicas que sirven de blanco para la digestión con las enzimas de restricción *NdeI* y *Bpu11021*. Este método que se ilustra en la figura 8, se realizó mediante tres reacciones de PCR tomando como templado el DNA del gen de la *g6pd* silvestre. En la primera reacción de PCR, llamado PCR 1 se amplificó un primer fragmento con el oligonucleótido externo (*NdeI*) y con el oligonucleótido antisentido mutagénico, en la segunda reacción llamada PCR 2 se

amplifica con el oligonucleótido externo antisentido (*Bpu11021*) y el oligonucleótido sentido mutagénico. Finalmente se llevó a cabo una tercera reacción de PCR en la que se amplifica el gen completo, utilizando los productos de PCR 1 Y PCR 2 como templados y ambos oligonucleótidos externos *NdeI* y *Bpu11021*.

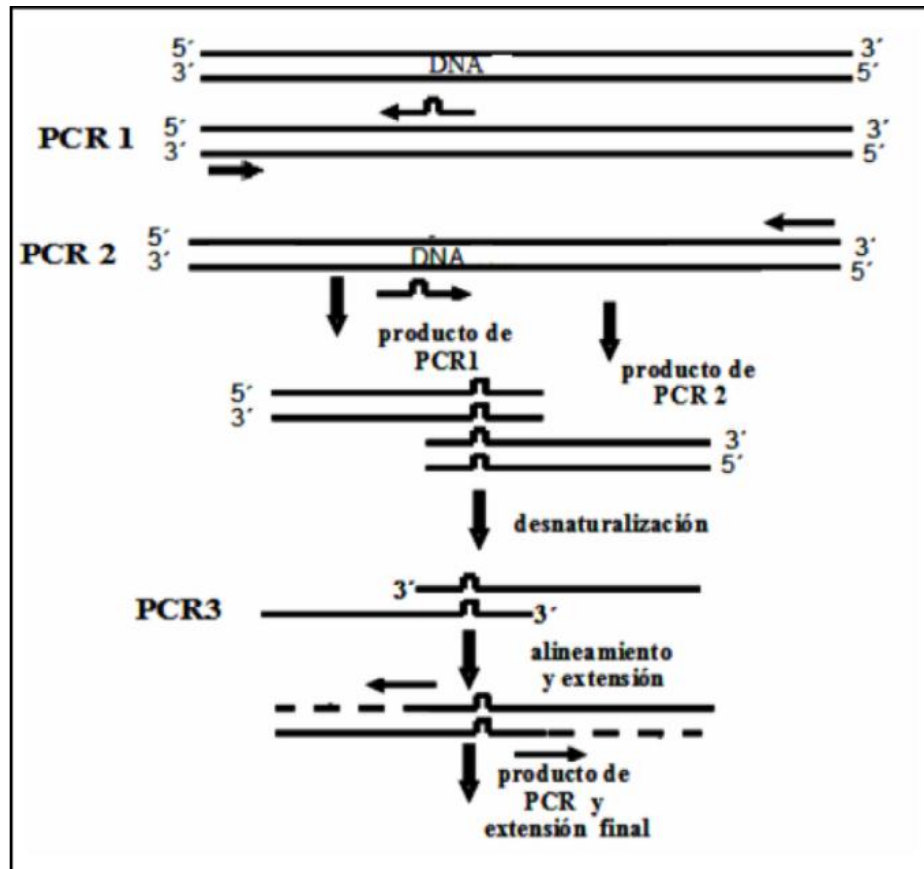


Figura 8. Mutagénesis mediada por PCR. En la primera reacción de PCR 1 se amplifica un primer fragmento con el oligonucleótido externo (*NdeI*) y con el oligonucleótido antisentido mutagénico, en la segunda reacción llamada PCR 2 se amplifica con el oligonucleótido externo antisentido (*Bpu11021*) y el oligonucleótido sentido mutagénico. Finalmente se lleva a cabo una tercera reacción de PCR en la que se amplifica el gen completo, utilizando los productos de PCR 1 y PCR 2 como templados y ambos oligonucleótidos externos *NdeI* y *Bpu11021*.

Para cada reacción de PCR se utilizaron las concentraciones que se detallan en la tabla 7, llevando a un volumen final de 25 μ L con agua bidestilada libre de nucleasas.

Tabla 7. Concentraciones de la reacción de PCR.

REACTIVOS	PCR 1	PCR 2	PCR 3
DNTP'S	20 nM	20 nM	20 nM
Templado	200 ng	200 ng	
Solución amortiguadora	1X	1X	1X
DNA pol	1 u	1 u	1 u
<i>NdeI</i>	200 ng		200 ng
<i>Bpu11021</i>		200 ng	200 ng

* Se utilizó una DNA polimerasa de alta fidelidad (Phusion®).

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un Termociclador (Mastercycler Gradient, Eppendorf®) que consistió en 25 ciclos de reacción en las condiciones que se describen en la figura 9, con un tiempo inicial de desnaturalización de 3 min a 98 °C y un tiempo de extensión final de 10 min a 72 °C.

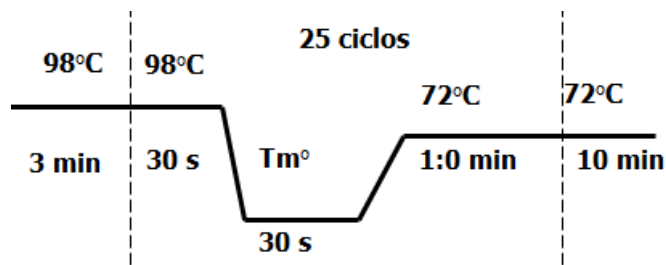


Figura 9. Condiciones de PCR para la amplificación de las mutantes Durham (K238R) y A+ (N126D)

Para corroborar los productos de PCR 1, PCR 2 y PCR 3 se cargaron en un gel de agarosa al 1 % preparado en TBE 1X (50 mM de TRIS, 2.5 mM de EDTA-Na, 50 mM de H₂BO₃; pH 8.2), como revelador se agregó bromuro de etidio. La corrida fue de 100V durante 30 min. El tamaño del producto se determinó incluyendo un marcador de masa molecular (Fermentas®). Los productos de PCR se visualizaron utilizando un transiluminador (UVP®). Los fragmentos de DNA de las mutantes Durham (K238R) y A+ (N126D) fueron purificados del gel, utilizando el kit de extracción (QIAGEN®) y cuantificados en el espectrofotómetro (NanoDrop®).

4.3 Ligación a un vector de expresión pET-3a

La ligación del fragmento de DNA correspondiente a cada mutante y el vector de expresión pET-3a se realizó usando una relación molecular de 1:3 de vector: inserto. En un tubo de 0.5 mL, se agregó 200 ng de producto de PCR seguido de 1 U T4 DNA ligasa, 70 ng vector pET-3a y solución amortiguadora de ligasa 1X ajustado a 10 µL con agua bidestilada libre de nucleasas. La reacción de ligación se incubó a 16 °C por 16 horas.

4.4 Clonación en células de *Escherichia coli* TOP 10

En condiciones de esterilidad en un tubo de 0.5 mL se agregó 30 µL de células competentes de *E. coli* TOP 10 con 5 µL de producto de ligación, incubándose durante 1 hora a 4°C al término de la cual se hizo el choque térmico a 37°C por 3 min. Se transfirió a un tubo de 1.5 mL adicionando 500 µL de medio LB (Luria Bertani). Se crecieron las células incubándolas a 37°C durante 1 hora. El paquete celular se obtuvo centrifugando 1 minuto a 13,000 rpm, se estrió en una placa de agar LB sólido con antibiótico ampicilina 100 ng/µL incubándose durante 12 horas a 37°C. Se seleccionaron 3 colonias positivas y se crecieron en 5 mL de medio LB con ampicilina 100 µg/mL. Se llevó a cabo PCR en cultivo para verificar que la transformación en las colonias seleccionadas se hubiera realizado. Una vez confirmadas las colonias

transformadas, se aisló una colonia y se sembró en placa LB sólido un masivo de la colonia positiva la cual se incubó durante 12 horas a 37°C, para la posterior purificación del plásmido, utilizando la columna GENEJET plasmid miniprep kit (QIAGEN®).

4.5 Secuenciación

Para confirmar que no se hubiese insertado otra mutación además de la deseada se realizó la secuenciación de las respectivas mutantes en el Instituto de Biotecnología (IBT) de la UNAM en Cuernavaca, Morelos. Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo mediante el equipo automatizado ABI PRISM 3700 Genetic Analyzer®. La determinación de la secuencia se realizó usando el sistema de terminadores marcados con fluorocromos. Se realizaron 3 reacciones de secuenciación para incluir todo el gen utilizando un oligonucleótido sentido interno R136C; un oligonucleótido antisentido interno R257L y el oligonucleótido sentido interno V291M. La mezcla de reacción contenía de la secuencia mutagénica 750 ng y oligonucleótido 10 pmol, ajustado con agua bidestilada libre de nucleasas a 16 µL.

4.6 Transformación en células de expresión de *E. coli* BL21DEpLisS Δ G6PD

Las células competentes de *E. coli* BL21DEpLisS Δ G6PD guardadas a -70°C se descongelaron y posteriormente en un tubo de 0.5 mL se les agregó 100 ng de plásmido pET-3a que contenía los fragmentos de las respectivas mutantes ya secuenciadas. Se incubó 1 hora a 4 °C al término del cual se le hizo el choque térmico a 37 °C por 3 minutos. Se transfirió a un tubo de 1.5 mL adicionando 500 µL de medio LB. Las células fueron incubadas a 37 °C durante 1 hora. El paquete celular se obtuvo centrifugando 1 minuto a 13000 rpm, se estirió en una placa de agar LB sólido con antibiótico ampicilina 100 µg/µL incubándose durante 12 horas a 37 °C. Se seleccionaron 3 colonias positivas y se crecieron en 5 mL de medio LB con ampicilina 100 µg/mL. Se llevó a cabo PCR en cultivo para verificar que la transformación en las

colonias seleccionadas se hubiera realizado. Una vez confirmadas las colonias transformadas, se creció una colonia positiva en 5 mL de medio LB con ampicilina 100 µg/mL. Se guardaron las células en tubos de 1.5 mL a -70 °C con glicerol al 10 %.

4.7 Ensayos de sobreexpresión en la proteína soluble de las mutantes Durham (K238R) y A+ (N126D)

Se realizó un precultivo de cada una de las mutantes en un tubo Falcón de 50 mL con 15 mL de medio LB líquido con ampicilina 100 µg/mL. Se incubó durante 12 horas a 37°C. Del precultivo de cada mutante, se tomó 0.5 mL y se inocularon 16 tubos Falcón de 50 mL con 15 mL de medio LB con ampicilina 100 µg/mL. Al llegar a una densidad óptica (D.O) cercana a 1 se separaron en 4 lotes, un lote control y los otros 3 se indujeron con isopropiltio-β-galactosida (IPTG) a una concentración 0.1, 0.5 y 1mM los cuales se incubaron durante 2, 6, 12 y 18 horas, variando la temperatura de incubación de 25 y 37°C. Se centrifugaron las células de cada condición a 7,000 rpm durante 10 minutos en la centrifuga (Hettich®). Se desechó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 5 mL de solución amortiguadora de lisis con 100 mM de TRIS, 0.1 % de β-mercaptoetanol, 0.5 mM de PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo) disuelto en 0.1 % DMSO (Dimetil sulfoxido), 0.15 M de NaCl, 3 mM de MgCl₂ y 1 µM de NADP⁺. Se lisaron las células de cada mutante con 3 ciclos de 20 segundos de sonicación con un descanso de 1.4 minutos. El lisado se centrifugó a 22,000 rpm durante 30 minutos en la ultracentrífuga (Beckman Coulter®). Se desechó el precipitado y al extracto crudo se le midió la actividad enzimática en el espectrofotómetro (Cary 50 Bio®) utilizando una mezcla de reacción de sustratos que contenía 100 mM de TRIS, 2 mM de MgCl₂, 1mM G6P y 1 mM de NADP⁺, pH 8.

4.8 Purificación de las mutantes A+ (N126D) y Durham (K238R)

Se realizó un precultivo para cada una de las respectivas mutantes en medio LB que contenía ampicilina 100 µg/mL, incubándose toda la noche a 37°C. Se inocularon 2L

de LB con 25 mL de precultivo para obtener una densidad óptica (D.O) inicial de 0.5 y se incubó a 37°C hasta llegar a una D.O de 1, posteriormente se indujeron con 0.05 mM de IPTG para la mutante Durham (K238R) y 0.1 mM de IPTG para la mutante A+ (N126D); la temperatura de sobreexpresión fue a 25 °C. Se lisaron las células de cada mutante con 7 ciclos de 45 segundos sonicación y con un descanso de 1.15 minutos. El lisado se centrifugó a 22,000 rpm durante 30 minutos en la ultracentrífuga (Beckman Coulter®), el precipitado se desechó y los extractos crudos de cada mutante se precipitaron con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de 0-25 %, durante 2 horas a 4 °C. Se centrifugó a 22,000 rpm, 30 minutos. Se desechó el sedimento, y posteriormente el sobrenadante se precipitó con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de 25-55 % durante 2 horas a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y el precipitado fue resuspendido en solución amortiguadora de equilibrio (150 mM de NaCl y 50 mM de Na_2PO_4 , pH 7.35).

4.8.1 Purificación de la proteína mutante A+ (N126D) por la columna Q-sepharose

El sedimento que contiene proteína mutante A+ (N126D) se resuspendió en 30 mL de solución amortiguadora de equilibrio que contiene NaCl 150 mM y Na_2PO_4 50 mM, pH 7.35. Después se cargó a la columna de afinidad a nucleótido 2'5 ADP Sepharose 4B (GE Healthcare®) previamente equilibrada con la misma solución amortiguadora, se lavó con 200 mL de la misma solución amortiguadora y se eluyó con 30 mL de solución amortiguadora más 100 μM de NADP^+ . Se recolectaron fracciones de 3 mL en tubos de ensaye. La enzima se monitoreó midiendo la actividad enzimática de cada una de las fracciones. Con el objetivo de visualizar la pureza de la proteína y concentrar las fracciones con menor contaminación de otras proteínas se corrió un SDS-PAGE discontinuo al 12% con las fracciones que presentaron actividad enzimática. Se concentraron por ultrafiltración hasta 200 μL en centricones (Millipore®) con paso de corte de 30 kDa.

Posteriormente se diluyó en 5 mL en solución amortiguadora de fosfatos 25 mM, pH 7.35 (solución amortiguadora A) y se cargó en la columna de intercambio catiónico Q-sepharose previamente equilibrada con solución amortiguadora A. La proteína se lavó

con 200 mL de solución amortiguadora A y se eluyó con un gradiente lineal de 0-350 mM NaCl en solución amortiguadora A, en un sistema acoplado a FPLC (Cromatografía líquida rápida de proteínas). Se recolectaron fracciones de 3 mL con un flujo de 2 mL por minuto. La enzima se monitoreó midiendo la actividad enzimática y se corrió un gel SDS-PAGE al 12%; de esta manera las fracciones con mayor concentración de proteína y menor cantidad de contaminantes se concentraron hasta 200 μ L en centricones (Millipore®) con paso de corte de 30 kDa.

4.8.2 Purificación de la proteína mutante Durham (K238R) por la columna 2'5 ADP sepharose 4B

El sedimento de la mutante Durham (K238R) se resuspendió en 10 mL de solución amortiguadora con 50 mM de K_2HPO_4 , 1mM EDTA y 1 mM DTT; pH 7.35 (solución amortiguadora de equilibrio). Posteriormente se cargó en la columna de afinidad a nucleótido 2'5 ADP sepharose 4B (GE Healtercare®) previamente equilibrada. Se lavó con 150 mL de solución amortiguadora de equilibrio más KCl 80 mM. Después se eluyó con 20 mL de solución amortiguadora de fosfatos que contenía 80mM de K_2PO_4 , 1 mM de EDTA, 80 mM de KCl y 0.1 mM de NADP⁺ (solución amortiguadora de elución), se continuo eluyendo con la misma solución amortiguadora de elución pero sin NADP⁺ hasta que la fracción recolectada dejo de tener actividad enzimática. Cabe mencionar que se recolectaron en fracciones de 3mL en tubos de ensaye desde el momento que se cargó la proteína a la columna de afinidad 2'5'ADP Sepharose 4B. Después de la elución, las fracciones con actividad se cargaron en un gel SDS-PAGE discontinuo al 12 %.

4.9 SDS-PAGE discontinuo al 12 % de los pasos de purificación de las proteínas mutantes Durham (K238R) y A+ (N126D)

Se realizó en un SDS-PAGE discontinuo al 12 % para corroborar la pureza de cada mutante, con 10 μ g de cada uno de los pasos de purificación, utilizando como control de masa molecular la enzima TIM (Triosa fosfato isomerasa Humana) calibrada. El tiempo de corrida fue de 30 minutos a 80 volts y después durante 4 horas a 120 V. Al

terminar la electroforesis, los geles se sumergieron en una solución 41 % v/v metanol, 7 % v/v ácido acético glacial y 0.016 % p/v azul brillante de comassie (R-250) para el revelado de las bandas de las proteínas.

4.10 Caracterización funcional de las enzimas recombinantes A+ (N126D) y Durham (K238R)

4.10.1 Determinación de los parámetros cinéticos

La actividad enzimática de las proteínas mutantes A+ (N126D) y Durham (K238R) se determinó midiendo espectrofotométricamente la reducción del NADP⁺ a una longitud de onda de 340 nm y 25°C. La mezcla de reacción estándar contenía solución amortiguadora de 100 mM de Tris-HCl, 3 mM de MgCl₂ a pH 8, además de 1 mM del sustrato glucosa 6 fosfato (Sigma®) o 1 mM de NADP⁺ que actuaron como el sustrato saturante y se varió las concentraciones de ambos sustratos G6P y NADP⁺ (2.5 a 200 μM). La reacción se inició con la adición de 1 uL de la preparación de la enzima, con una concentración final de proteína en la mezcla de reacción de 200 ng/mL. Los parámetros cinéticos fueron obtenidos por ajuste no lineal de la ecuación de Michaelis-Menten de los datos de velocidad inicial. La *K_m* (constante de afinidad de la enzima por el sustrato) se obtuvo a partir de la cinética de cada una de las mutantes Durham (K238R) y A+ (N126D). Los datos fueron procesados con la fórmula $(V \cdot x) / (K + x)$ por análisis no lineal, donde *V*= ordenada al origen, *K*=pendiente y *x*= concentración del sustrato. La gráfica se ajustó a una hipérbola con la velocidad máxima (*V_{max}* de actividad expresada en μmol·min⁻¹·mg⁻¹) y la *K_m* (que represento ½ de *V_{max}* en μmol·min⁻¹·mg⁻¹). La *K_{cat}* (constante catalítica) se expresó en s⁻¹·M⁻¹. A partir de la fórmula: $(V_{max}) / [(masa\ molecular\ de\ la\ enzima)\ (\mu mol \cdot mg^{-1})]$.

4.11 Caracterización mediante ensayos de estabilidad de las proteínas mutantes Durham (K238R) y A+ (N126D) seguido por inactivación por temperatura

Para realizar este ensayo se preparó una concentración estándar para cada una de las enzimas recombinantes A+ y Durham a 200 μ g/ μ L. En tubos de PCR se incubó durante 20 minutos en un rango de temperatura de 37 a 61 °C y se enfrió durante 5 min. La actividad enzimática fue medida tomando 1 μ L de cada tubo incubado a diferente temperatura y se llevó a un volumen final de 1mL de reacción estándar que contenía solución amortiguadora de 100mM Tris-HCl y 3mM de MgCl₂; pH 8, además de 1 mM de sustrato glucosa 6 fosfato (Sigma®) y 1 mM de NADP⁺. La actividad enzimática residual se expresó como un porcentaje de la actividad de la misma enzima.

4.12 Caracterización mediante ensayos estructurales de las proteínas mutantes Durham (K238R) y A+ (N126D)

4.12.1 Análisis de la estructura secundaria seguido por Dicroísmo circular (DC)

El contenido de estructura secundaria se determinó por medio de análisis por dicroísmo circular (DC) en un espectropolarímetro (Jasco J- 810®) equipado con un soporte de celda Peltier termostatzado. Se usó una celda de cuarzo de paso de luz de 0.1 cm. La elipticidad molar $[\theta]$ se midió en el UV-lejano (260-190 nm). Las mutantes fueron dializadas en solución amortiguadora de fosfatos 25mM; pH 7.35. Los espectros se realizaron con tres repeticiones utilizando una concentración de 800 μ g/mL a 25 °C. Para calcular los valores de elipticidad molar, se determinó la concentración de proteína a 280 nm.

4.12.2 Análisis de la estructura terciaria seguida por fluorescencia intrínseca

Para determinar la estructura terciaria se realizaron experimentos de fluorescencia intrínseca en un espectrofluorómetro (Perkin-Elmer L45®) excitando a 280 y 295 nm respectivamente y midiendo la emisión de fluorescencia entre 300 y 400 nm. Los

experimentos se llevaron a cabo con enzimas dializadas en 25 mM de amortiguador de fosfatos a pH 7.35 y 25 °C con una concentración de proteína de 100 µg/mL. A los valores de los espectros de emisión de cada muestra se le sustrajo el blanco (solución amortiguadora).

4.13 Estabilidad de las proteínas mutantes (K238R) y A+ (N126D) frente a la desnaturalización térmica por Dicroísmo Circular (DC)

La estabilidad de las enzimas recombinantes A+ y Durham se siguió por dicroísmo circular (DC) utilizando el espectropolarímetro (Jasco J- 810®) y las condiciones antes mencionadas. Se siguió el cambio de la elipticidad a 222 nm, en un intervalo de temperatura de 20 a 90°C. El incremento de temperatura (Δ Temp) de las muestras fue de 1 °C por 2.5 minutos. El proceso de desnaturalización fue irreversible en todas las muestras. Cada muestra fue corregida por sustracción del blanco (amortiguador), corrido bajo la misma condición. Los datos obtenidos se ajustaron a la suma de la ecuación sigmoidea de Boltzman.

5. RESULTADOS

5.1 Mutagénesis de sitio dirigido por PCR

Se realizó la mutagénesis empleando oligonucleótidos mutagénicos específicos para obtener las mutantes A+ (N126D) y Durham (K238R). Mediante PCR'S solapados se obtuvo el gen mutado en el nucleótido deseado. Los fragmentos obtenidos de cada PCR se visualizaron en un gel de agarosa 1 %. Como se observa en la figura 10 en el carril 1 y 6 se encuentran los marcadores de masa molecular de 1 kb. Los productos de PCR 3, PCR 2, y PCR 1 se encuentran en el carril 3, 4 y 5 respectivamente para la mutante Durham (K238R). En el carril 7, 8 y 9 se encuentran los productos de PCR 1, PCR 2 y PCR 3 de la mutante A+ (N126D). El producto de PCR 3 de ambas mutantes coincide con el tamaño esperado de 1545 bp del gen de la *g6pd* control que se encuentra en el carril 10.

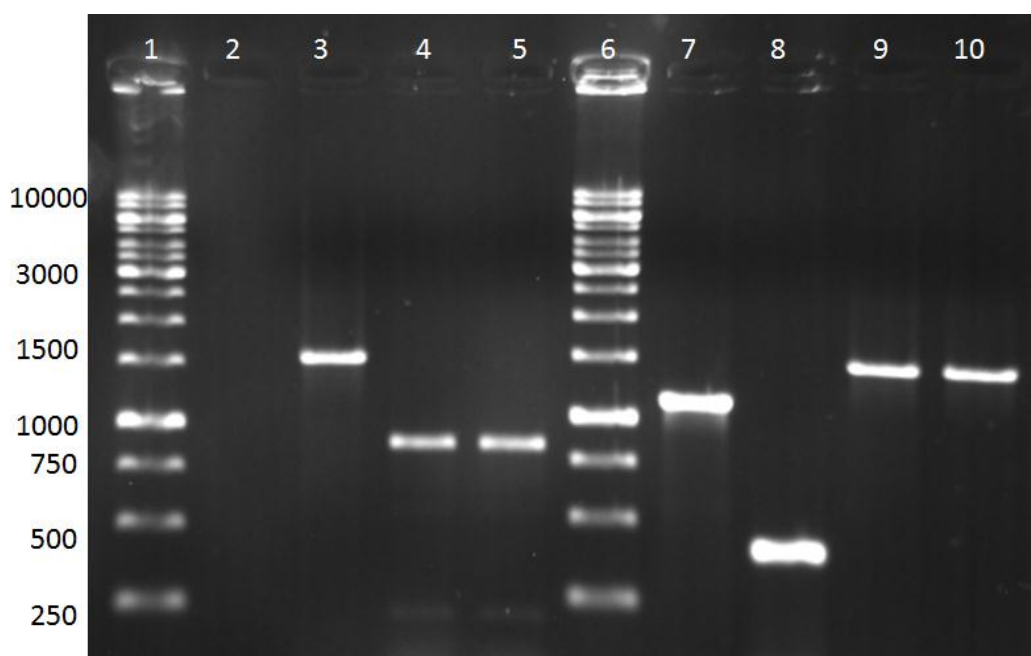


Figura 10. Productos de PCR 1, PCR 2 Y PCR 3 de las mutantes Durham (K238R) y A+ (N126D) en gel de agarosa al 1 %. En la imagen se muestra en el carril 1 y en carril 6 el marcador de masa molecular, en el carril 3, 4 y 5 los productos de PCR 3, PCR 2 y PCR 1 respectivamente de la mutante Durham (K238R). En el carril 7, 8 y 9 los productos de PCR 1, PCR 2 y PCR 3 respectivamente de la mutante A+ (N126D). Como control se utilizó el gen de la *g6pd* con una masa molecular de 1545 bp que se encuentra en el carril 10.

Los productos de PCR3 de las mutantes Durham (K238R) y A+ (N126D) fueron purificados del gel utilizando el kit de extracción (QIAGEN®) y se ligaron al plásmido de expresión pET-3a, posteriormente se transformó a las células competentes de *E. coli* TOP 10 de acuerdo al procedimiento descrito. Para corroborar la transformación se realizó PCR en cultivo como se observa, se tomaron dos clones de cada mutante y se corrieron en un gel de agarosa al 1 %, comprobando así que se hubiese realizado las transformación en las clonas seleccionadas (Figura 11).

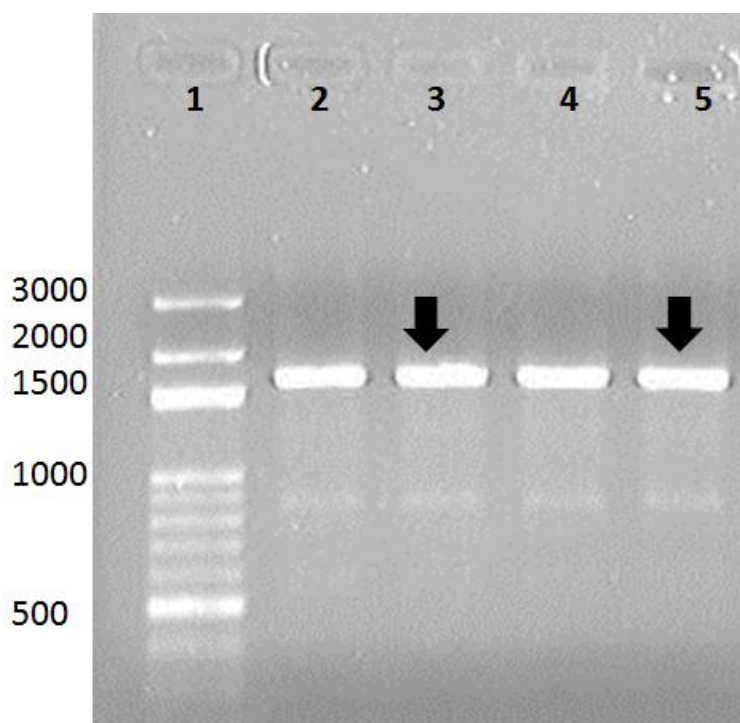


Figura 11. Productos de PCR en cultivo de las clonas seleccionadas de las células de *E. coli* TOP 10 para las mutantes Durham (K238R) y A+ (N126D). En la imagen se observa en el carril 1 el marcador de masa molecular, en el carril 2 y 3 las clonas seleccionadas para la mutante Durham (K238R) y en el carril 4 y 5 las clonas seleccionadas para la mutante A+ (N126D). Las flechas indican las clonas seleccionadas para la secuenciación.

5.2 Secuenciación de las mutantes Durham (K238R) y A+ (N126D)

Para corroborar que las mutaciones puntuales correspondientes a cada mutante estuvieran presentes, se purificó el DNA plasmídico a partir de las células

transformadas en células de *E. coli* TOP 10 usando el kit de purificación Miniprep (QIAGEN®) y se secuenció en la Unidad de Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM, confirmándose la presencia de las respectivas mutaciones. En la figura 12 se muestra el electroferograma de la mutante A+ (N126D) y en la figura 13 se muestra el electroferograma de la mutante Durham (K238R). Sólo se muestra una parte del electroferograma donde aparecen los codones con la mutación subrayada y resaltada. Sin embargo, el gen fue secuenciado completamente y se encontró que no existía otra mutación además de la introducida con los oligonucleótidos mutagénicos.

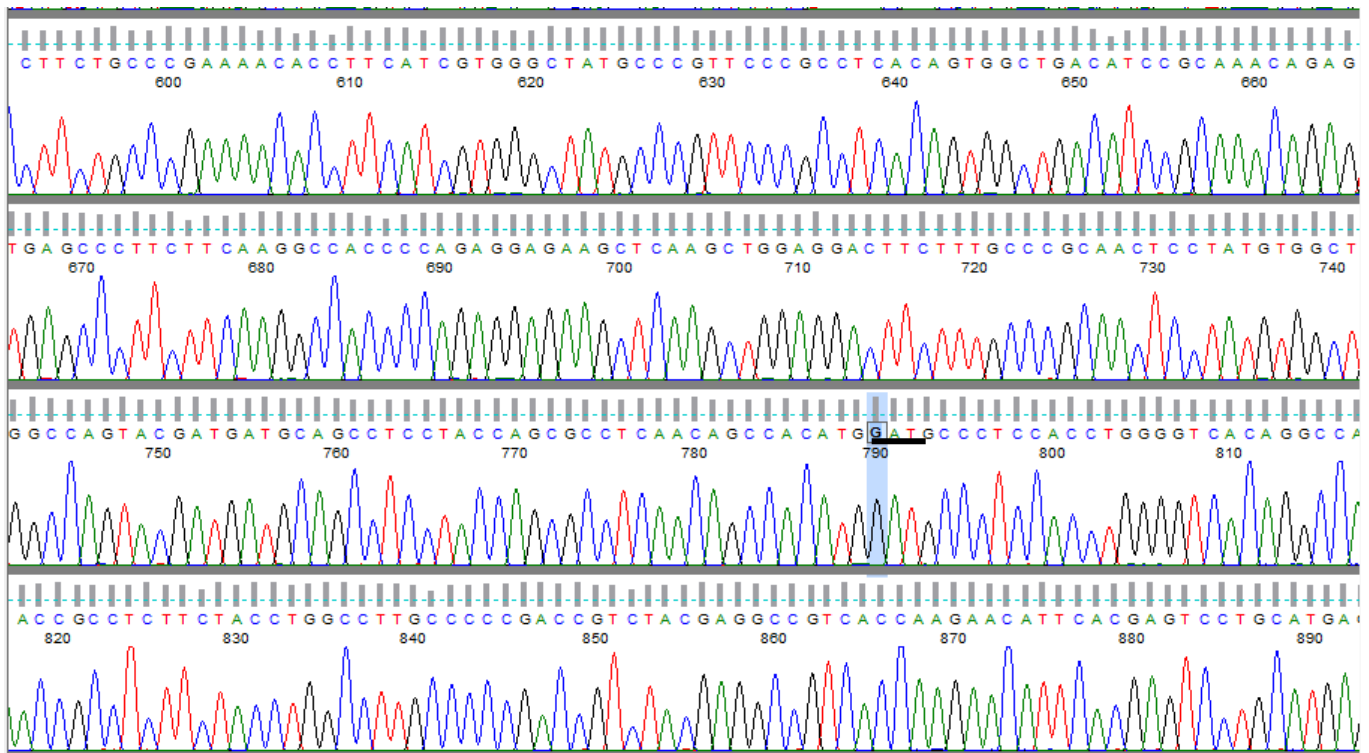


Figura12. Electroferograma de la secuenciación de la mutante A+ (N126D). En la imagen se encuentra subrayado el codón y resaltado en azul la mutación introducida de una guanina (G) por una adenina (A) en el nucleótido A376G.

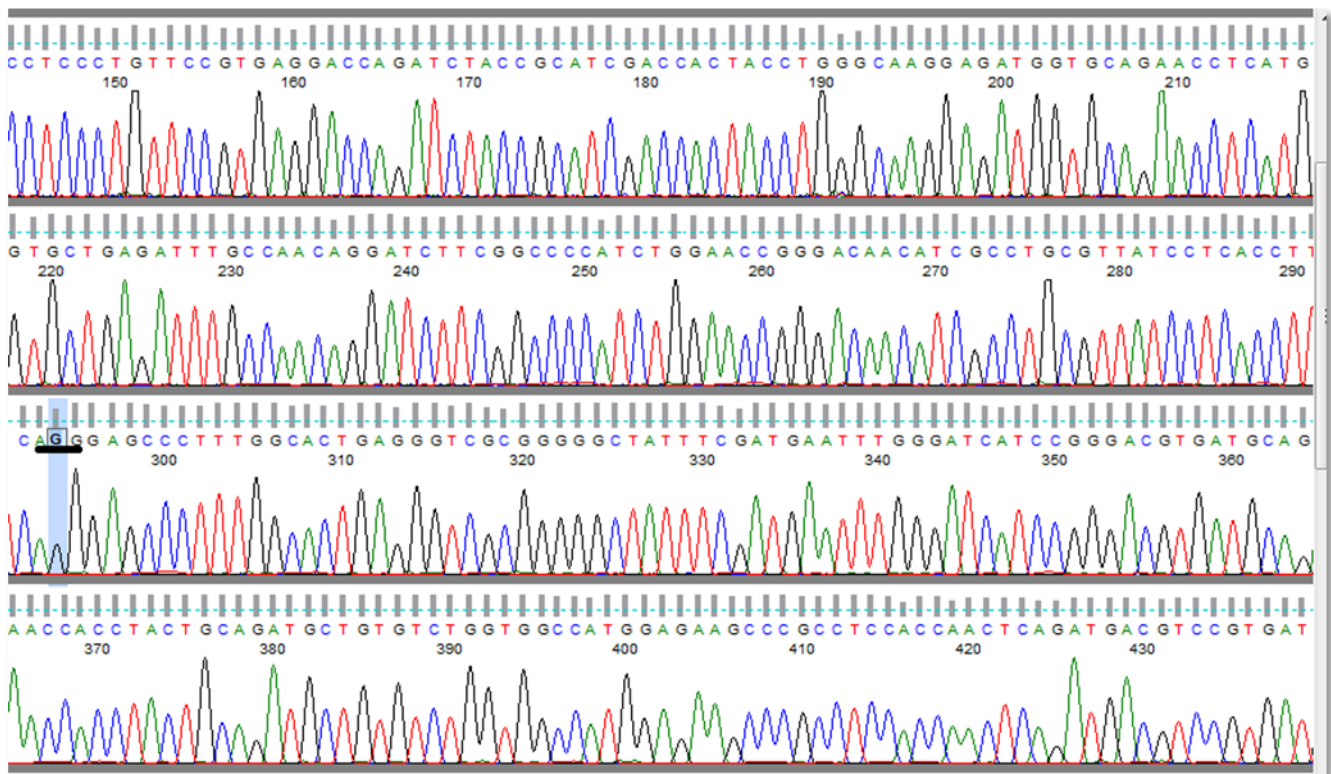


Figura 13. Electroferograma de la secuenciación de la mutante Durham (K238R). En la imagen se encuentra subrayado el codón y resaltado en azul la mutación introducida de una guanina (G) por una adenina (A) en el nucleótido A713G.

5.3 Transformación en células de expresión de *E. coli* Bl21 (DE3) pLysS ΔG6PD

Una vez corroborada la secuencia de las mutantes A+ y Durham se procedió a la transformación en células de expresión de *E. coli* Bl21 (DE3) pLysS. En la Figura 14 se muestra el producto de PCR en cultivo de tres clones seleccionados para cada mutante. En el carril 1 se encuentra el marcador de masa molecular, mientras que en el carril 2, 3 y 4 las clonas pertenecientes a la mutante Durham (K238R), en el carril 5, 6 y 7 se encuentran las clonas pertenecientes a la mutante A+(N126D). Las clonas seleccionadas para los posteriores ensayos se encuentran señaladas con las flechas respectivamente.

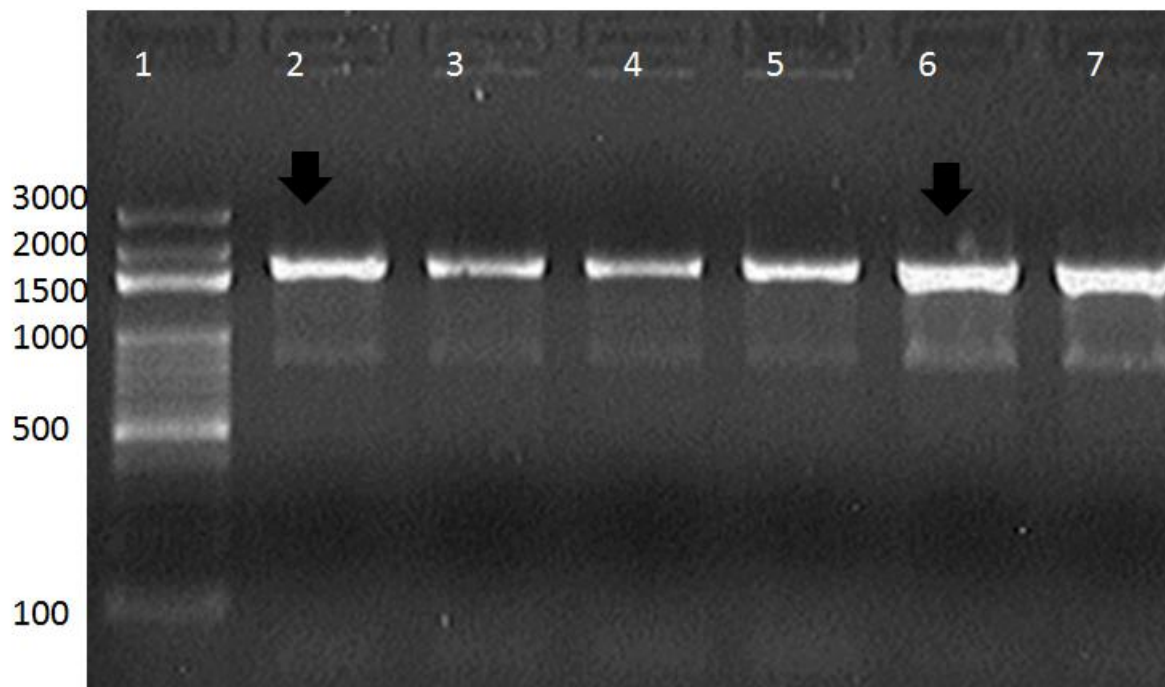


Figura 14. Productos de PCR en cultivo de las clonas seleccionadas de la transformación en células de expresión de *E. coli* Bl21 (DE3) pLysS ΔG6PD para las mutantes Durham (K238R) y A+ (N126D). En el carril 1 corresponde al marcador de masa molecular, en el carril 2, 3 y 4 se encuentran las clonas pertenecientes a la mutante Durham (K238R) y en el carril 5, 6 y 7 las clonas pertenecientes a la mutante A+ (N126D). Las flechas señalan las clonas seleccionadas para posteriores ensayos.

5.4 Ensayos de sobreexpresión de proteína soluble

A partir de las clonas transformadas en células de expresión de *E. coli* Bl21 (DE3) pLysS ΔG6PD de las respectivas mutantes Durham (K238R) y A+ (N126D), se procedió a realizar los ensayos para encontrar las condiciones óptimas de expresión. Primero se incubaron las mutantes a 37 °C y 25 °C con concentraciones del inductor IPTG de 0.1, 0.5 y 1 mM; dejando un control (sin IPTG) para cada condición e incubándose por un tiempo de 2, 6, 12 y 18 horas, al término de cada tiempo, se midió la actividad enzimática. Como se observa en la gráfica 15a no se encontraron diferencias significativas en la actividad específica para la mutante A+ (N126D) a 37 °C. En la figura 15b la mejor condición de sobreexpresión presentó una actividad específica de 0.5 U/mg a una concentración de 1 mM a un tiempo de incubación de 18 horas a 25 °C.

Sin embargo, se consideró la concentración de 0.1 mM con un tiempo de incubación de 18 horas y 25 °C, puesto que era similar en un 80 % en su actividad específica con la condición de 1 mM.

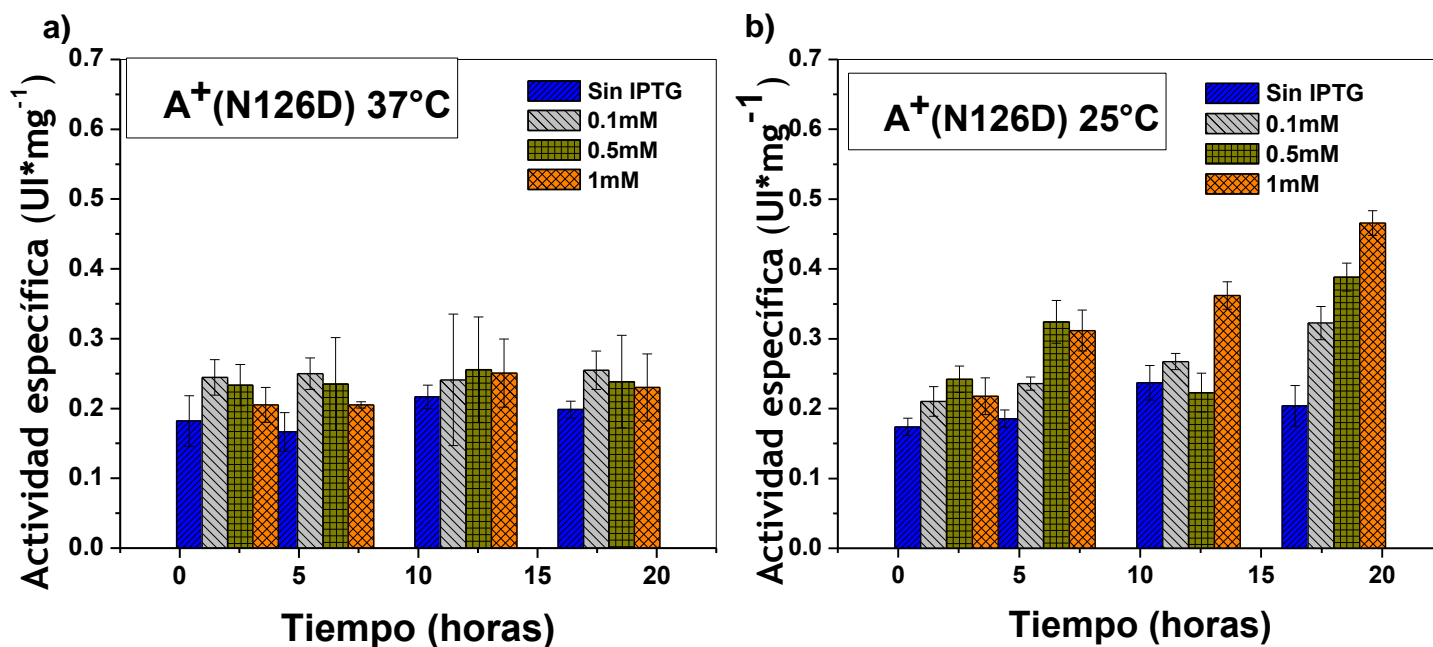


Figura 15. Ensayos de sobreexpresión de proteína soluble de la mutante A+ (N126D). a) Curva de expresión de la mutante a 37 °C, se observa que la mayor actividad específica que presenta es a las 16 horas con una concentración de 0.1 mM de IPTG, apenas la mitad de la observada en las células crecidas a 25 °C. b) Curva de expresión a 25 °C, se observa que la mayor actividad específica es de casi 0.5, el doble de la observada a 37 °C. Se graficó tiempo contra actividad específica, encontrándose una mejor sobreexpresión a 1mM de concentración del inductor IPTG a 25 °C.

Para la mutante Durham (K238R), como se muestra en la figura 15a la actividad específica fue muy baja a la temperatura de 25 °C. En la figura 16b la mejor condición de sobreexpresión presentó una actividad específica de 0.4 U/mg a un tiempo de incubación de 18 horas con una concentración de 0.5 mM de IPTG y 25 °C. Esta diferencia tan significativa es debido a que se favoreció la expresión evitando que la proteína se fuera a cuerpos de inclusión a la temperatura de 25 °C.

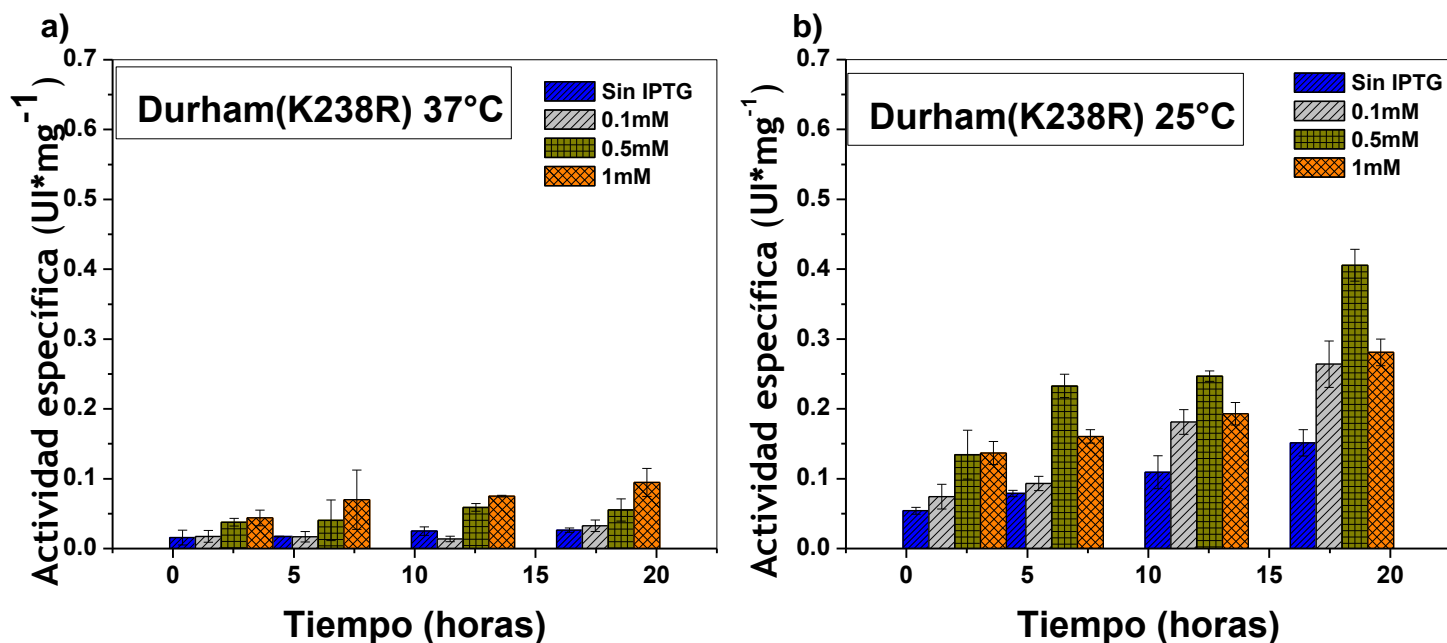


Figura 16. Ensayos de sobreexpresión de proteína soluble de la mutante Durham (K238R). a) Curva de expresión de la mutante a 37 °C, se observa que presenta la mayor actividad específica a las 18 horas con una concentración de 1 mM de IPTG. b) Curva de expresión a 25°C, se observa que la mayor actividad específica fue de 0.5 mM de IPTG a las 18 horas. Se graficó tiempo contra actividad específica.

5.5 Purificación de las proteínas mutantes A+ (N126D) y Durham (K238R)

La purificación de las enzimas recombinantes mutadas, se llevó a cabo mediante 2 métodos de purificación, primero se muestran los resultados obtenidos por el método de purificación según Huang, 2008 utilizado para la mutante A+ (N126D) y después los resultados para la mutante Durham (K238R) obtenidos por el método de purificación según Sevki y Mehmet, 2012.

5.5.1 Purificación de la proteína mutante A+ (N126D) por la columna de intercambio catiónico Q-sepharose

Para la purificación de la mutante A+ (N126D) se partió de células guardadas a -70 °C a las cuales se les dió el tratamiento indicado, posteriormente el extracto se pasó por una columna de afinidad a nucleótido 2'5 ADP sepharose 4B, a la cual se unen las

enzimas que usan NADP^+ como coenzima. Se recolectaron las fracciones que presentaron actividad y se corrieron en un gel SDS-PAGE discontinuo al 12 % (Figura 17), como se puede observar en el procedimiento se logró eliminar la mayoría de las proteínas contaminantes, puesto que sólo se concentraron las fracciones donde se encontraba en mayor cantidad la proteína. El concentrado de proteína se cargó posteriormente a la columna de intercambio catiónico Q-sepharosa y se eluyó con un gradiente de NaCl de 0-350 mM en solución amortiguadora de 50 mM de fosfatos en un sistema acoplado a FPLC. Se midió actividad a las fracciones recolectadas. El primer pico observado en el cromatograma (Figura 18) no presentó actividad sin embargo la actividad fue encontrada en el segundo pico (17-25), las fracciones se analizaron por SDS-PAGE discontinuo al 12 % que se muestra en la figura 19, corroborando así que se tenía a la proteína de interés. Las fracciones se concentraron por ultrafiltración en centricones con paso de corte de 30 KDa y se dializaron con solución amortiguadora de fosfatos 25 mM; pH 7.35.

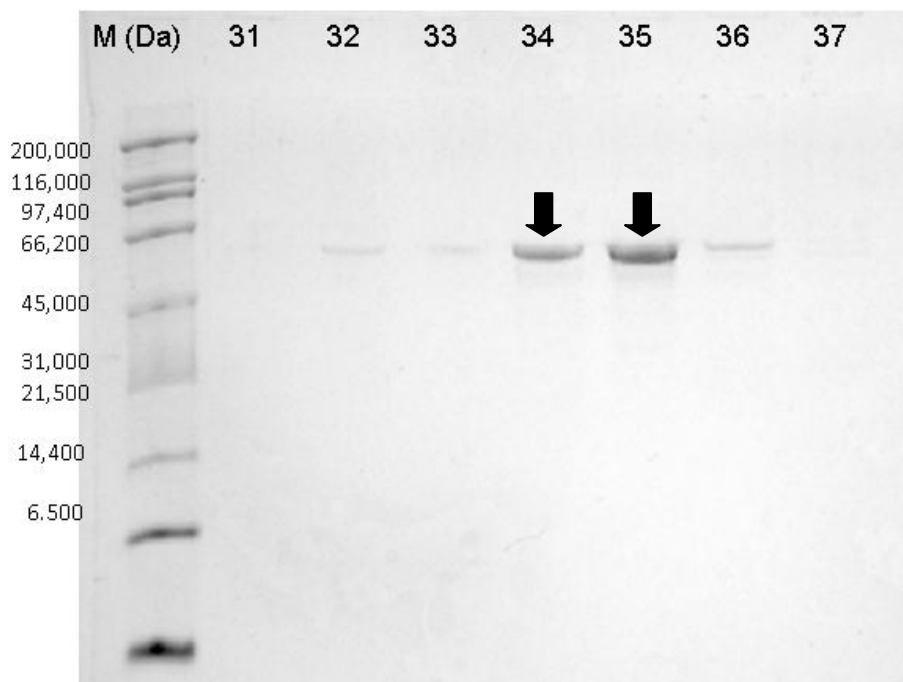


Figura 17. SDS-PAGE discontinuo al 12 % con las fracciones de elución de la columna de afinidad 2'5' ADP sepharose 4B de la mutante A+ (N126D). Se concentraron las fracciones 34 y 35. En cada pozo se cargaron 15 μL de cada fracción.

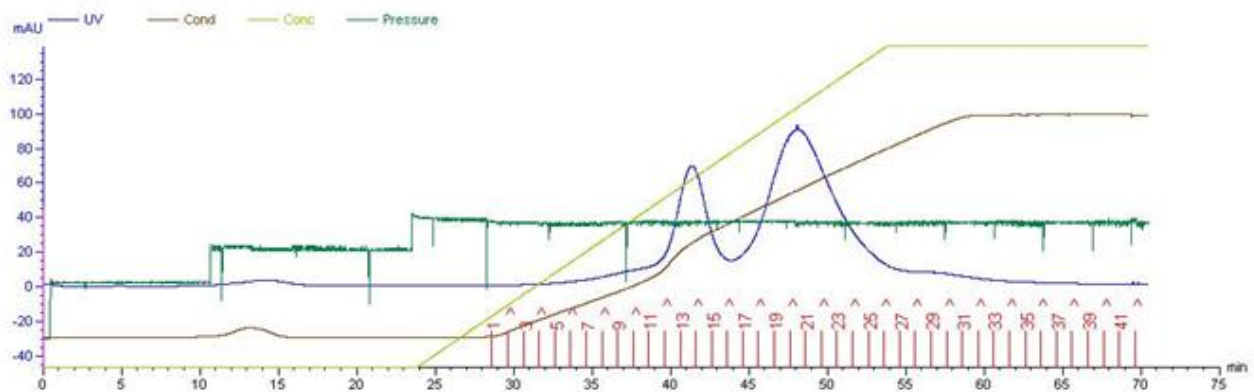


Figura 18. Cromatograma de elución en Q- sepharose (línea azul). Se cargó a la columna un volumen de 2 mL de proteína. Los primeros 24 min de la corrida corresponden al lavado de la columna y a partir del minuto 28 se recolectaron fracciones de 3 mL un gradiente de 0-350mM de NaCl.

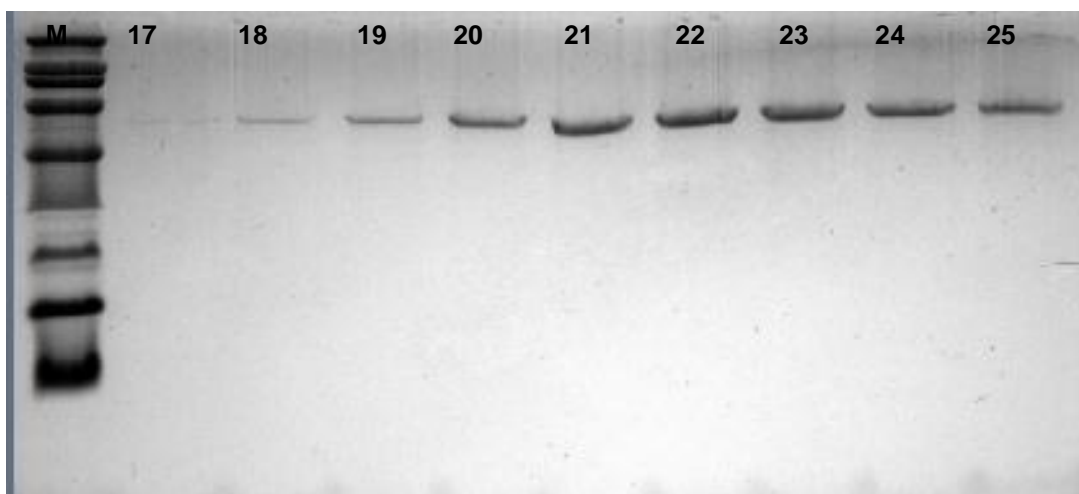


Figura 19. SDS-PAGE discontinuo al 12 % del cromatograma de la Q-sepharose de la mutante A+ (N126D). Se cargó 15 μ L de la fracción 17 a la 25 que corresponden al segundo pico de elución de la columna de Q-sepharose.

Una vez obtenida la fracción concentrada se dializó con solución amortiguadora de fosfatos 25 mM concentricon (Millipore®) de paso de corte de 30 kDa. Se midió la concentración por absorbancia a 280 nm de la mutante A+ (N126D), obteniendo una concentración de 1.8 mg totales.

Con la finalidad de monitorear la pureza de la mutante A+ (N126D) en cada uno de los pasos de purificación se realizó un SDS-PAGE discontinuo al 12 % como se observa en la figura 20, el gel reveló que la proteína tenía un grado de pureza por arriba del 90%.

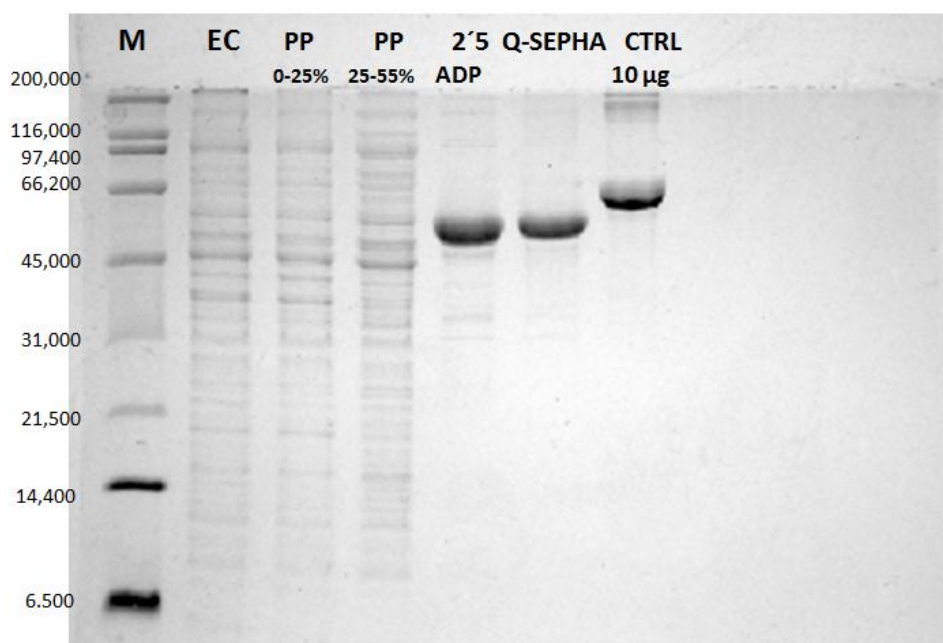


Figura 20. SDS-PAGE discontinuo al 12 % de los pasos de purificación de la mutante A+ (N126D). Se cargaron 10µg de proteína en cada pozo utilizando como control de masa molecular a la proteína BSA calibrada 10 µg. M =marcador de masa molecular, EC = extracto crudo, PP= precipitado, 2'5 ADP= columna de afinidad a nucleótido 2'5 ADP sepharose 4B, Q- sepha = columna de intercambio catiónico Q-sepharose, CTRL= control.

Para dar seguimiento a la mutante A+ (N126D) y conocer en que paso de purificación se perdía proteína se realizó una tabla de purificación (Tabla 8) donde se describe paso a paso el rendimiento obtenido durante la purificación. Se encontró que la mayor

parte de proteína (aproximadamente un 50%) se perdía en los últimos dos pasos de purificación obteniendo un rendimiento del 43.03 %. En vista de que el último paso no representaba una diferencia sustancial en la purificación como se observó en el SDS-PAGE discontinuo al 12 % de la figura 21, se excluyó este paso para la purificación de la mutante Durham (K238R).

Tabla 8. Tabla de purificación de la mutante A+ (N126D).

Pasos de purificación	Proteína total (mg)	Act. Específica ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	Actividad total ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	Rendimiento (%)
Extracto crudo	203.4	2.81	571.55	100
Precipitado 25-55 %	84	6.19	520.65	91.09
2'5 ADP Sepharose 4B	25.3	13.89	351.41	61.48
Q-sepharosa	1.8	136.65	245.97	43.03

* La actividad total de la mutante A+ (N126D) en el extracto crudo refleja tanto el nivel de expresión como la actividad específica. Después de la purificación la actividad específica refleja las verdaderas propiedades catalíticas de la mutante, en cambio la actividad total es un reflejo de la magnitud de la pérdida de proteína durante purificación.

5.2.2 Purificación por la columna de afinidad a nucleótido 2'5'ADP sepharose 4B de la proteína mutante Durham (K238R)

La mutante Durham (K238R) sólo se pasó por la columna de afinidad a nucleótido 2'5'ADP sepharose 4B, para evitar de esta forma que la enzima fuera perdiendo actividad durante los pasos de purificación debido a que es una mutante clase I. Para la purificación de la mutante Durham (K238R) se partió de células guardadas a -70 °C. El extracto se cargó a la columna de afinidad a nucleótido siguiendo la metodología

del Sevki y Mehmet (2012). Las fracciones de elución se recolectaron en tubos de ensaye a un flujo de elución de 2 mL por minuto. En la figura 21 se muestra el SDS-PAGE discontinuo al 12 % donde se cargaron las fracciones que presentaron actividad enzimática (31-39). Las fracciones en las que se observó una mayor cantidad de proteína (36 y 37) se concentraron por ultrapurificación en centricones con paso de corte de 30 KDa.

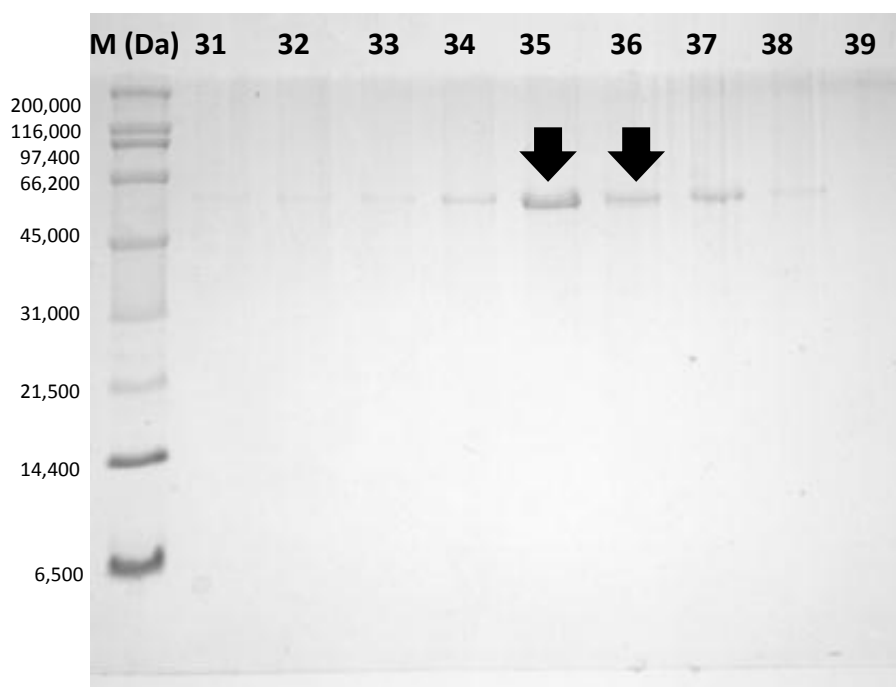


Figura 21. SDS-PAGE discontinuo al 12 % con las fracciones de elución de la columna de afinidad 2'5' ADP sepharose 4B de la mutante K238R. Se cargaron en cada pozo 15 μ L de las fracciones recolectadas (31-39). Solo se concentró las fracciones 35 y 36.

Una vez obtenida la fracción concentrada pura se midió la concentración de la proteína y se obtuvo una concentración de 1.158 mg totales. Como se observa en el SDS-PAGE (figura 22) en la mutante Durham no fue necesario utilizar la columna Q-

sepharose, siendo la columna de afinidad a nucleótido suficiente para obtenerla con una pureza de $\approx 90\%$ y de esta manera evitar la pérdida de actividad de la mutante.

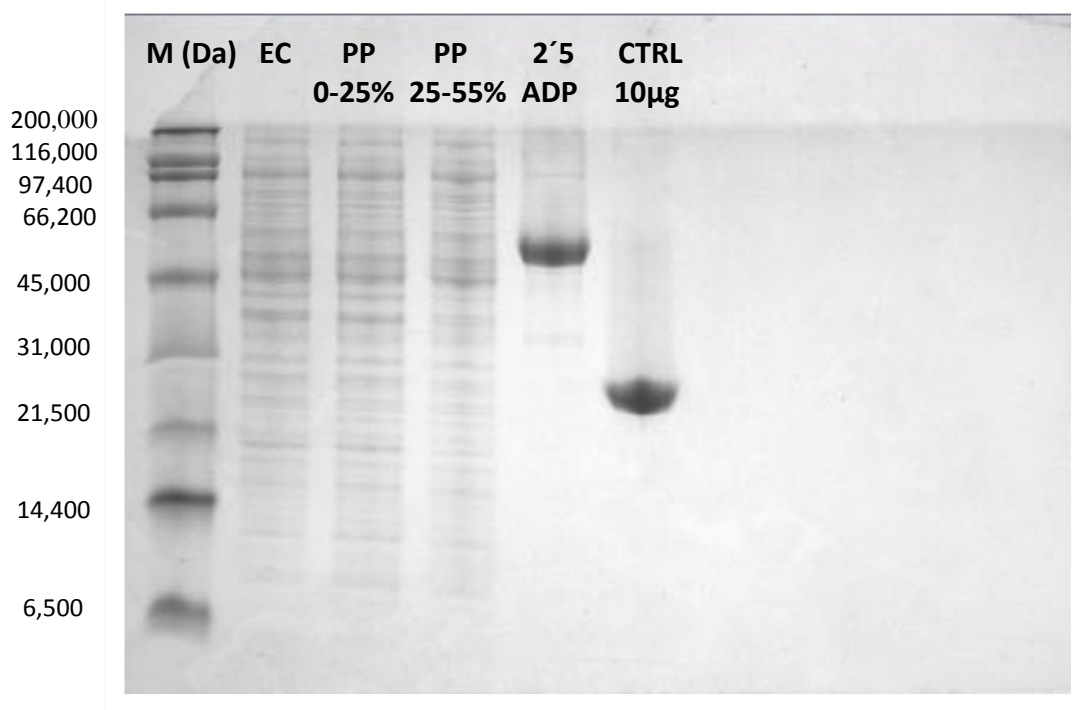


Figura 22. SDS-PAGE discontinuo al 12% de los pasos de purificación de la mutante Durham (K238R). Se cargaron 10µg de proteína en cada pozo utilizando como control de masa molecular la proteína TIM calibrada. M =marcador de masa molecular, EC = extracto crudo, PP= precipitado, 2'5 ADP= columna de afinidad a nucleótido 2'5 ADP sepharose 4B, Q- sepha = columna de intercambio catiónico Q-sepharose, CTRL= control.

Al igual que como se hizo con la mutante A+ (N126D), para dar seguimiento a la mutante y conocer en que paso de purificación se perdía más proteína que no es de nuestro interés, se realizó una tabla de purificación donde se describe paso a paso el rendimiento obtenido durante la purificación como se muestra en la tabla 9 se obtuvo un rendimiento del 20.78%.

Tabla 9. Tabla de purificación de la mutante Durham (K238R)

Pasos de purificación	Proteína total (mg)	Act. Especifica ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	Actividad total ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	Rendimiento (%)
Extracto crudo	440	1.14	501.6	100
Precipitado 25-55 %	240	2	482.31	96.15
2'5 ADP SEPHAROSE 4B	1.158	66	104.28	20.78

* La actividad total de la mutante A+ (N126D) en el extracto crudo refleja tanto el nivel de expresión como la actividad específica. Después de la purificación la actividad específica refleja las verdaderas propiedades catalíticas de la mutante, en cambio la actividad total es un reflejo de la magnitud de la pérdida de proteína durante purificación.

Posteriormente se realizó una tabla de purificación comparativa del rendimiento obtenido de la mutante A+ (N126D) y Durham(K238R) (Tabla 8 y 9) y la enzima silvestre de la G6PD como se muestra en la tabla 10, observándose un mayor rendimiento para la enzima de clase IV la mutante A+ (N126D) con un rendimiento del 43.03 %, mientras que para la mutante Durham (K238R) se obtuvo un rendimiento del 20.78 % y la enzima silvestre presenta un rendimiento del 61 % (en proceso de publicación), lo que nos indica que la mutante A+ (N126D) es más estable que la mutante Durham (K238R) respecto a la enzima silvestre.

Tabla 10. Resumen del rendimiento y actividades específicas obtenidas para la proteína mutante A+ (N126D) y Durham (K238R) respecto a la enzima silvestre de la G6PD.

G6PD	Método de purificación	Proteína total (mg)	Act. Especifica ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	Act. Total ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	Rendimiento (%)
G6PD silvestre	Q- Sepharose	1.95	224	436	61
G6PD A+ (N126D)	Q- Sepharose	1.8	136.65	245.97	43.03
G6PD Durham (K238R)	2'5' ADP Sepharose 4B	1.158	66	104.28	20.78

*La mutante A+ (N126D) de clase IV, presenta un rendimiento cercano al de la enzima silvestre con un 43% mientras que la mutante Durham (K238R) de clase I presenta un rendimiento menor con 20.78%.

5.6 Caracterización funcional mediante ensayos de cinética enzimática

Los parámetros cinéticos fueron obtenidos para las mutantes A+ (N126D) y Durham (K238R) utilizando como sustratos G6P y NADP⁺. En la figura 23 se muestra la curva de saturación de la variante A+ (N126D) para el sustrato G6P (23a) y para el sustrato NADP (23b), manteniendo un sustrato en concentraciones saturadas y variando el otro a diferentes concentraciones (2.5 a 200 μM). De la misma manera se observa en la figura 24 las curvas de saturación para la variante Durham (K238R). En la gráfica 24a se observa la curva de saturación del sustrato G6P y en la gráfica 24b la curva de saturación del NADP. Las curvas de saturación para ambos sustratos de las mutantes A+ (N126D) y Durham (K238R) se ajustaron mediante regresión no lineal a la ecuación de Michaelis-Menten a partir de los datos de velocidad inicial graficados en el programa Origin Lab, versión 7 obteniendo los valores de V_{max} y K_m. Los valores de K_m y k_{cat} para ambos sustratos de las mutantes A+ (N126D) y Durham (K238R) se reportan en la tabla 11. Se encontró que para la mutante Durham (K238R) que es

clase I aumentaba la afinidad por el sustrato G6P ligeramente, mientras que para el sustrato NADP⁺ la afinidad se mantenía igual en comparación a la enzima silvestre. Por otro lado la *K_{cat}* se encontró disminuida hasta un 70 % respecto a la enzima silvestre. En el caso de la mutante A⁺ (N126D) que es de clase IV se encontró que la afinidad por ambos sustratos disminuyó casi al doble con referencia a la enzima silvestre, así como la catálisis disminuyó de igual manera hasta alrededor del 50 % para ambos sustratos. Lo que nos arrojó que ambas mutantes, Durham (K238R) de clase I y la A⁺ (N126D) de clase IV se encontraban severamente afectadas a nivel de catálisis por lo que la relación funcionalidad y nivel de manifestación clínica no podía resolverse aun.

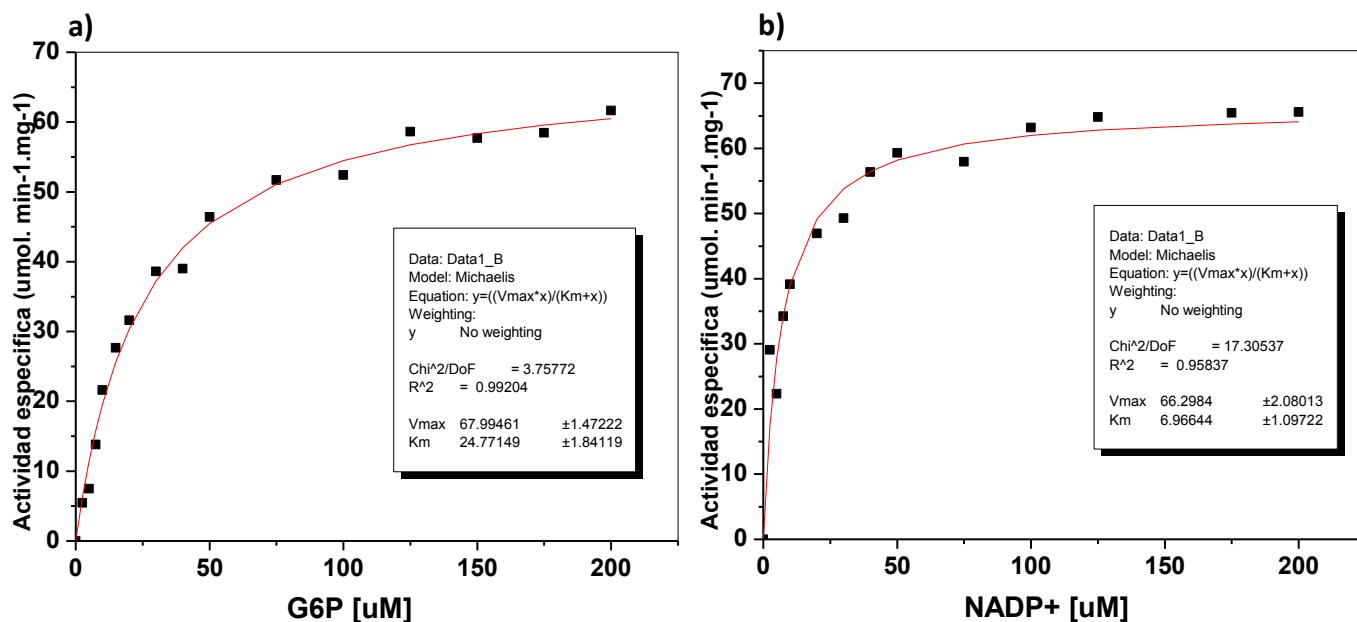


Figura 23: Curva de saturación de la mutante A⁺ (N126D). a) Gráfica de saturación de sustrato contra actividad específica variando las concentraciones de NADP⁺. b) Gráfica de saturación de sustrato contra actividad específica variando las concentraciones G6P. Las curvas de saturación presentan un comportamiento tipo Michaelis-Menten. La mezcla de reacción estándar contenía solución amortiguadora de 100 mM de Tris-HCl, 3 mM de MgCl₂ a pH 8, además de 1 mM de NADP⁺ que actuaban como el sustrato saturante variando la concentración del sustrato G6P (2.5 a 200 μM).

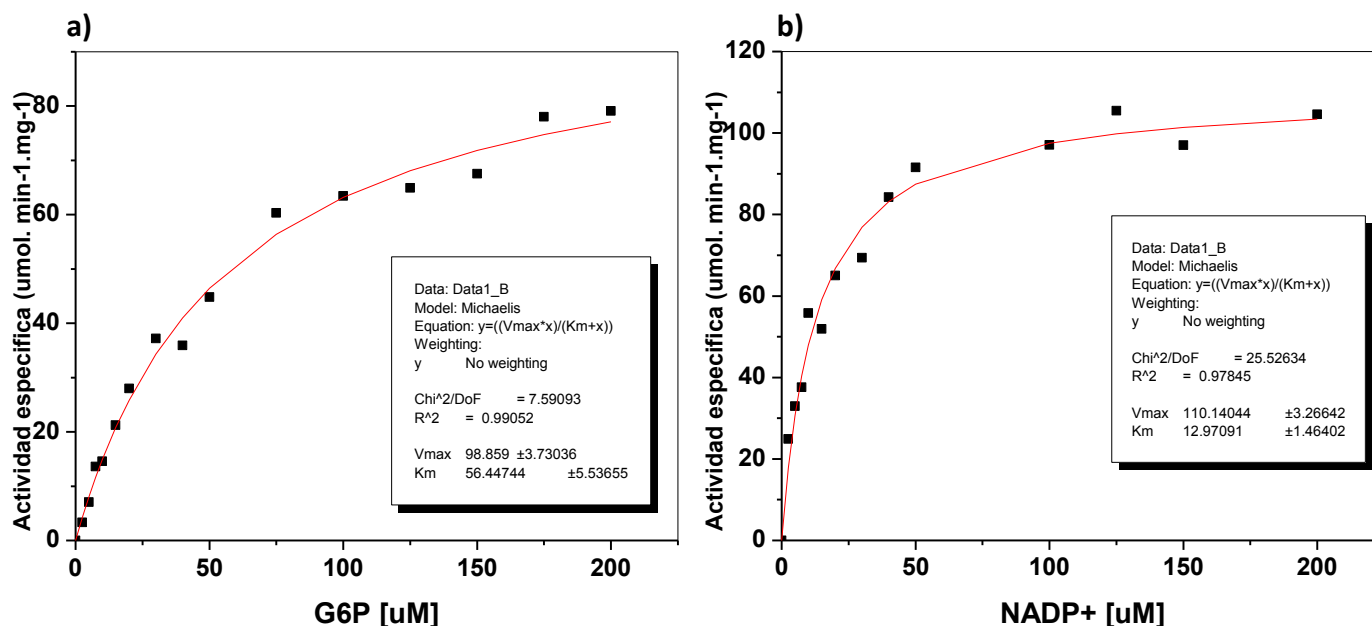


Figura 24: Curva de saturación de la mutante Durham (K238R). a) Gráfica de saturación de sustrato contra actividad específica variando las concentraciones de NADP+. b) Gráfica de saturación de sustrato contra actividad específica variando las concentraciones G6P. Las curvas de saturación presentan un comportamiento tipo Michaelis-Menten. La mezcla de reacción estándar contenía solución amortiguadora de 100 mM de Tris-HCl, 3 mM de MgCl₂ a pH 8, además de 1 mM de NADP⁺ ó G6P que actuaban como el sustrato saturante variando la concentración del sustrato G6P o NADP (2.5 a 200 μM).

Tabla 11. Parámetros cinéticos de las mutantes A+ (N126D) y Durham (K238R).

G6PD	Km G6P (μM)	Km NADP ⁺ (μM)	Kcat (s ⁻¹)	Kcat/Km G6P (s ⁻¹ /μM)	Kcat/Km NADP ⁺ (s ⁻¹ /μM)
G6PD silvestre	38.49	6.16	233	6.05	37.82
Durham (K238R) (I)	24.77	6.96	70.82	2.85	10.17
A+ (N126D) (IV)	56.44	12.97	114.58	2.03	8.83

*Se determinaron los parámetros cinéticos a partir de las curvas de saturación graficadas con las velocidades iniciales y ajustadas a la ecuación de Michaelis-Menten en el programa Origin Lab, versión 7.

5.7 Estabilidad de las enzimas recombinantes A+ y Durham frente a la inactivación térmica

Se analizó la estabilidad térmica de la enzima silvestre de la G6PD, así como las mutantes A+ (N126D) y Durham (K238R), sometiendo a las enzimas a un gradiente de temperatura de 37 a 61°C durante 20 minutos; posteriormente se midió la actividad de las enzimas y se graficó la actividad residual a las distintas temperaturas. Como se observa en la figura 25, el estado de transición en la enzima silvestre y en la mutante A+ (N126D) presentan una T_m de 48.82 y 49.44°C respectivamente; en cambio en la enzima Durham el estado de transición sucede a menor temperatura con una T_m de 46.03°C, alrededor de 3 grados por debajo de la enzima silvestre de la G6PD (48.82). Lo anterior indicó que la mutante Durham (K238R) de clase I presenta mayor inestabilidad frente a la temperatura en comparación de la mutante A+ (N126D) de clase IV respecto a la enzima silvestre, lo cual sugiere una posible correlación con la manifestación clínica la cual no se había encontrado a nivel de la catálisis en experimentos anteriores.

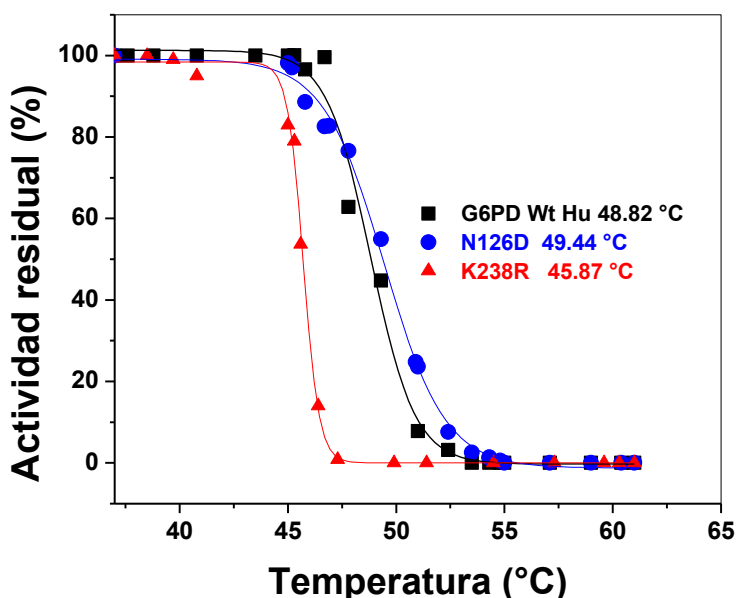


Figura 25. Curva de inactivación térmica de la enzima silvestre G6PD y las mutantes A+ (N126D) y Durham (K238R). Se utilizó una concentración de 200µg/µL. Las líneas son obtenidas del ajuste de los datos experimentales a la ecuación de Boltzman.

5.8 Propiedades espectroscópicas

5.8.1 Estructura secundaria seguida por dicroísmo circular (DC)

A las mutantes A+ (N126D) y Durham (K238R) se les determinó el espectro de DC en el UV lejano con el fin de saber si las mutaciones habían producido un cambio a nivel de estructura secundaria. En la figura 26 se observa que las mutantes presentan espectros característicos de las proteínas a 208 y 222 nm encontrando que no existen diferencias significativas entre los espectros de las mutantes y la enzima silvestre, lo que indica que las mutaciones no afectaron a nivel de estructura secundaria a la enzima con respecto al estado nativo de la proteína.

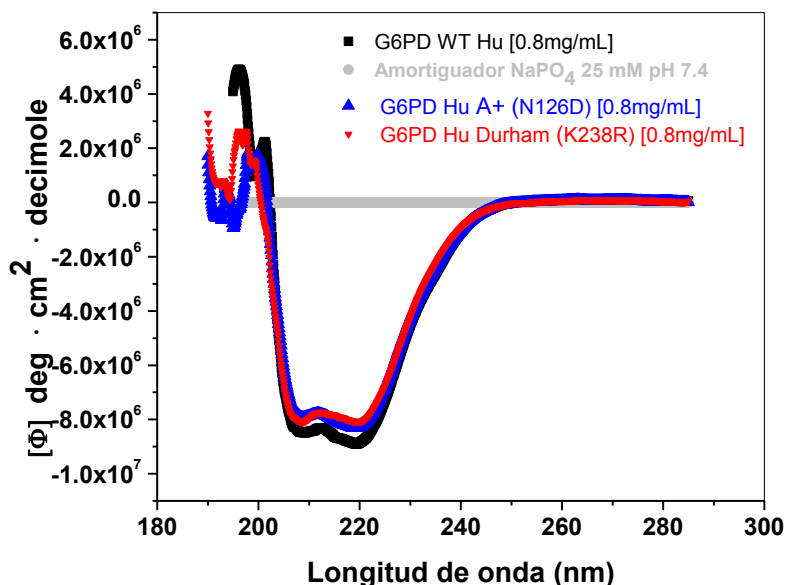


Figura 26. Espectros de DC en el UV lejano de las mutantes A+ (N126D) y Durham (K238R), así como la enzima silvestre. Los espectros se realizaron con tres repeticiones utilizando una concentración de 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 25 $^{\circ}\text{C}$.

5.8.2 Estructura terciaria seguida por fluorescencia Intrínseca

La evaluación de la estructura terciaria se realizó por medio de ensayos de fluorescencia intrínseca de la proteína excitando a una longitud de onda de 280 nm, en la que absorben los aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina y triptófano y posteriormente midiendo el espectro de emisión entre los 300 y 400 nm (Figura 27).

También se excitó a una longitud de onda de 295 nm donde la absorbancia del triptófano es dominante respecto al resto de los aminoácidos aromáticos (Figura 28). Como puede observarse en ambos espectros de emisión de fluorescencia de las mutantes A+ (N126D) y Durham (K238R) respecto de la enzima silvestre, no se observa ningún corrimiento de la longitud de onda máxima de emisión (343nm), lo que indica que los fluoróforos están expuestos al solvente. Sin embargo, la intensidad de fluorescencia si se vio afectada en el caso de la mutante Durham (K238R) (900 U.A) y ligeramente en la mutante A+ (N126D) (700 U.A), respecto a la intensidad de fluorescencia de la enzima silvestre de 690 U.A. Este cambio en la intensidad de fluorescencia probablemente se debe a que en la mutante Durham (K238R) de clase I, la mutación se encuentra a nivel del NADP⁺ estructural y el cambio en la conformación ocasione poco pegado del NADP⁺ estructural, ocasionando que la enzima en ausencia de éste, presente mayor intensidad de fluorescencia respecto de la enzima silvestre, como fue reportado previamente por Wang, 2008.

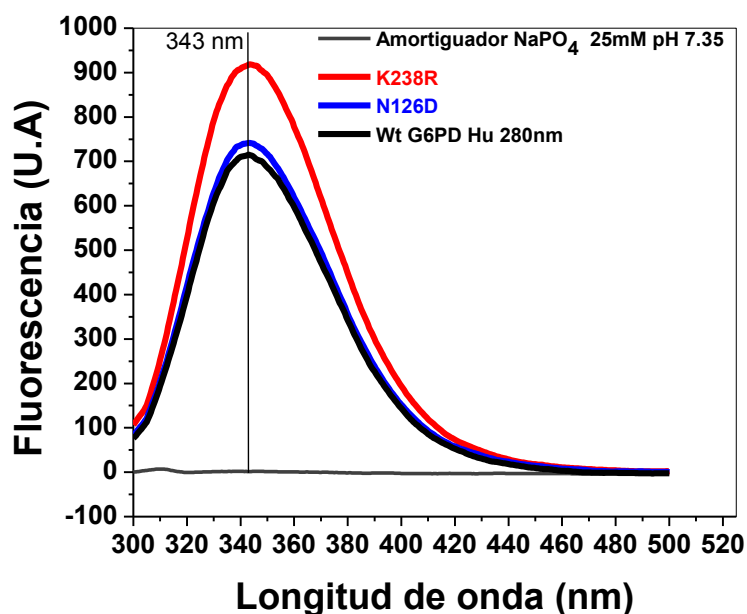


Figura 27. Espectro de emisión de fluorescencia intrínseca de la enzima G6PD silvestre y mutantes enzimáticas A+ (N126D) y Durham (K238R) excitado a 280 nm. La longitud de excitación fue a 280 nm. La concentración de proteína usada fue de 100µg/mL.

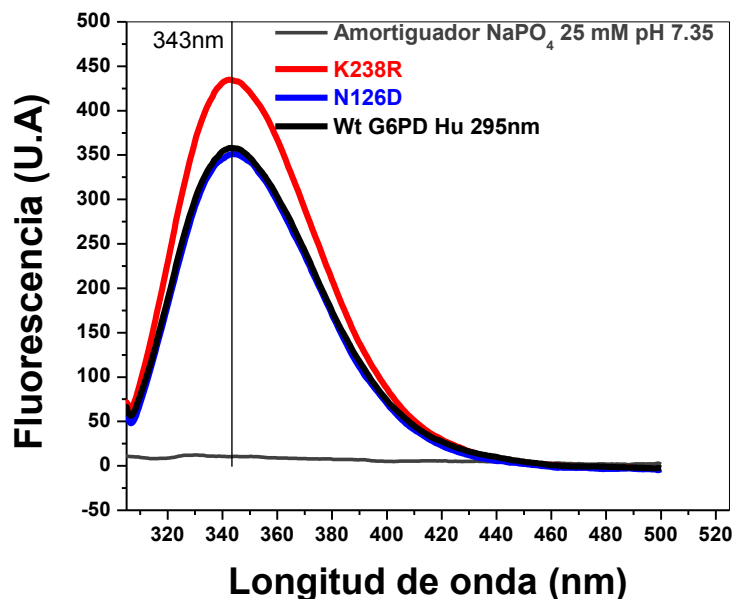


Figura 28. Espectro de emisión de fluorescencia intrínseca de la enzima G6PD silvestre y mutantes enzimáticas A+ (N126D) y Durham (K238R) excitado a 295 nm. La longitud de excitación fue a 295 nm. La concentración de proteína usada fue de 100µg/mL.

5.9 Ensayos de estabilidad de las enzimas recombinantes A+ y Durham frente a la desnaturalización térmica por Dicroísmo Circular

La estabilidad térmica de las enzimas silvestre de la G6PD así como las mutantes A+ (N126D) y Durham (K238R) se midió siguiendo el cambio de la elipticidad a 222 nm conforme fue incrementando la temperatura; lo que muestra los cambios que las proteínas sufren en su estructura secundaria. Como puede observarse en la figura 29 el estado de transición en la enzima silvestre y en la mutante A+ (N126D) es muy similar puesto que su T_m (temperatura media de desnaturalización) es diferente solo dos grados (T_m de 54.27 °C para la enzima silvestre y 56.14 °C para la mutante A+ (N126D), en cambio la enzima Durham (K238R) el estado de transición es evidente que sucede a mucho menor temperatura, presentando una T_m de 49.89 °C, alrededor

de 5 grados por debajo de la enzima silvestre que presenta una T_m de 54.27 °C. Lo que nos indicó que la mutante Durham es más inestable respecto a la enzima silvestre

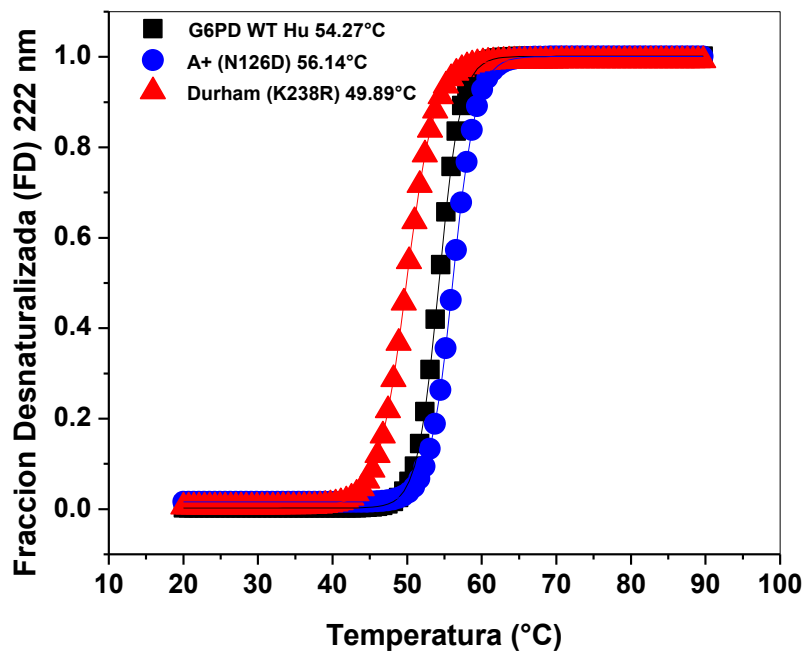


Figura 29. Curva de desnaturalización térmica de la enzima silvestre de la G6PD y de los mutantes A+ (N126D) y Durham (K238R) siguiendo el cambio de elipticidad molar a 222nm. Se utilizó una concentración de proteína de 800µg/mL. Las líneas teóricas fueron obtenidas del ajuste de los datos experimentales a la ecuación de Boltzman.

6. DISCUSIÓN

La deficiencia de la enzima G6PD es normalmente diagnosticada a través de estudios hematológicos, y la clasificación de la gravedad clínica se basa en los niveles de actividad enzimática de la G6PD en los eritrocitos. Las mediciones de los extractos de los eritrocitos pueden dar una indicación razonable de las constantes cinéticas de una proteína. Sin embargo una disminución en los niveles absolutos de actividad pueden reflejar ya sea una disminución en la eficiencia catalítica de la G6PD mutante o un deterioro en el plegado o en la estabilidad. Es por ello que para obtener una visión más clara de la base molecular de la enzimopatía es importante purificar la enzima en concentraciones esenciales para poder compararlas con la enzima silvestre.

En un intento de investigar el mecanismo molecular que subyace en la deficiencia de glucosa-6-fosfato humana (G6PD) causada por las mutaciones de G6PD correspondientes a la mutante A+ (N126D) y Durham (K238R), se construyeron las respectivas mutantes mediante mutagénesis sitio dirigida (Figura 10) y se sobreexpresaron en células de *E. coli* Bl21(DE3)pLysS deficientes de G6PD (Figura 14). La expresión heteróloga de genes clonados en *E. coli*, para la producción de proteínas recombinantes, se ha convertido en una herramienta fundamental para poder llevar a cabo el estudio de la estructura y función de las proteínas; este tipo de expresión utiliza como hospedero a las células de *E. coli* por su rápido crecimiento, su amplio conocimiento genético, la gran variedad de cepas y de vectores de expresión, pero sobre todo por su capacidad de producir proteínas recombinantes a gran escala. El único inconveniente es que no permite la modificación postraduccional de las proteínas, y en muchos casos no proporciona el correcto plegamiento de la misma dando lugar a la formación de cuerpos de inclusión (Baneyx, 1999). Se llevaron a cabo ensayos de sobreexpresión de la proteína soluble con la finalidad de encontrar las condiciones de temperatura, tiempo y concentración de IPTG óptimos para evitar en la menor medida que la proteína se fuera a cuerpos de inclusión y así obtener la mayor cantidad de proteína soluble.

Se encontró que a 25°C y 18 horas se obtenía la mayor cantidad de proteína soluble para ambas mutantes (Figura 15 y 16) variando solo la concentración del inductor. Fue evidente el hecho de que para la mutante Durham (K238R) a 37°C había una notable disminución en la cantidad de proteína soluble esto atribuido probablemente a una menor estabilidad de la mutante que favorecía la formación de cuerpos de inclusión (Huang, 2008). En el sistema de expresión utilizado no fue necesaria la utilización de chaperonas como ha sido reportado en Gómez, 2013.

Primero se purificó la mutante A+ (N126D) y debido a que es de clase IV según la WHO Working Group (1989), tiene una actividad de 60 a 100 %, se utilizó para su purificación la misma metodología que la enzima silvestre (información en preparación para artículo) ya que se esperaba un comportamiento similar. La purificación se llevó a cabo utilizando dos columnas; primero una columna de afinidad 2', 5'-ADP Sepharose 4B la cual tiene una fuerte afinidad hacia las enzimas que utilizan como coenzimas NADP⁺. Sin embargo, las enzimas muestran diferente afinidad y se ha informado en la literatura que tiene una mayor afinidad a la G6PD cuando se compara con otras enzimas (Sevki y Mehmet, 2012). Posteriormente las fracciones con actividad enzimática se cargaron en la columna de intercambio catiónico Q-sepharose (Figura 18), monitoreando en todo momento la proteína por actividad enzimática. Partiendo de 2 L de medio de cultivo se obtuvo tan solo 1.8 mg de proteína total de la mutante A+ (N126D) con un rendimiento del 43.03 % (Tabla 10). Durante la purificación de esta mutante se encontró que utilizando sólo un paso de purificación la proteína se obtenía con una pureza por arriba del 95 %. Esto se manifestó cuando se reveló el gel SDS-PAGE discontinuo al 12% de los pasos de purificación (Figura 20). Por lo cual, se procedió a la purificación de la mutante Durham (K238R) considerando conveniente eliminar el último paso de purificación. Para la mutante Durham (K238R) se obtuvo 1.158 g de proteína total de 2 L de medio de cultivo con un rendimiento menor de 20.78 %. Ambas mutantes presentaron una concentración y rendimiento total inferior al reportado para la enzima silvestre lo que nos indicaría que la mutación *per se*, afecta su plegamiento y por lo tanto el rendimiento en la purificación (Wang y Engel, 2009).

La comparación cinética de las mutantes clínicas (Tabla 11) reveló que los valores de K_m de G6P Y $NADP^+$ (24.77 y 6.96) de la mutante Durham (K238R) fueron muy similares a los valores de K_m la enzima silvestre (38.49 y 6.16). Por otro lado los valores de K_m de G6P Y $NADP^+$ (56.44 y 12.97) para la mutante A+ (N126D) aumentaron el doble respecto a la enzima silvestre; es decir, disminuyó su afinidad por ambos sustratos. La catálisis de ambas mutantes y para ambos sustratos disminuyó alrededor del 50 %. Lo que indica que en la mutante Durham (K238R) a pesar de que los sustratos se unen con buena afinidad al sitio catalítico, la interconversión hacia los productos es más lenta, en el caso de la N126D, la afinidad y la interconversión a productos se ven igualmente afectados, lo que significa que la mutación afecta de alguna manera el sitio catalítico en ambas mutantes.

Los ensayos de dicroísmo circular (Figura 29) arrojaron que las mutantes Durham (K238R) y A+ (N126D) no presentaron a nivel de estructura secundaria una alteración. Para analizar la estructura terciaria de las mutantes mencionadas, se realizaron ensayos de fluorescencia intrínseca aprovechando las propiedades de fluoróforos de los residuos de triptófano, tirosina y fenilalanina al excitarse por un haz de luz a 280 y 295 nm (particularmente para el triptófano). Las señales de emisión debido a la fluorescencia de estos aminoácidos aromáticos dependen del ambiente inmediato que los rodea (cambios en la exposición al solvente), por lo que es posible evaluar alteraciones en la estructura tridimensional de la proteína por perturbaciones en su patrón de fluorescencia (Pain, 2004). Como se observa en las figura 27 y 28, los resultados arrojados al menos con este ensayo no indican una alteración a nivel de estructura terciaria, sin embargo se observa que para la mutante de clase I cuya mutación se encuentra interaccionando con el fosfato de 2' del $NADP^+$ estructural (Au, 2000), hay un incremento considerable en el espectro de fluorescencia; esto pudiera ser atribuido a la inestabilidad que pudiera estar generando la mutación sobre el $NADP^+$ estructural manifestándose en una mayor emisión de fluorescencia; esto fue reportado por Wang, 2008 donde observo que cuando el $NADP^+$ estructural es eliminado, se observa un incremento en la intensidad de fluorescencia.

El análisis de estabilidad de las mutantes Durham (K238R) y A+ (N126D) por desnaturalización térmica (Figura 28), arrojaron que la mutante A+ (N126D) con una T_m de 56.14 °C es estable respecto a la enzima silvestre que presenta una T_m 54.27 °C, en tanto la Durham (K238R) que presentaba una T_m de 49.89 °C presentaba una disminución de hasta casi 5 grados respecto a la enzima silvestre, un patrón similar se observó con los ensayos de estabilidad por inactivación térmica (Figura 25), ya que la mutante A+ (N126D) es estable con una T_m de 49.44°C respecto a la enzima silvestre (T_m 48.82 °C), en cambio en la mutante Durham (K238R) presenta una T_m de 46.03 °C casi 3 grados por debajo de la enzima silvestre.

Los estudios realizados sirvieron para dilucidar que la enzima G6PD atenúa el estrés REDOX en la célula con una disminución en su actividad enzimática hasta del 50 %, y aun así no presentar manifestaciones clínicas como lo observado en la mutante A+ (N126D). Sin embargo, cuando se encuentra afectada su estabilidad como en el caso de la mutante Durham (K238R) que presentaba una disminución en su actividad hasta el 70 %, puede verse reflejado en manifestaciones clínicas severas que caracterizan a esta enzima de clase I. Esta inestabilidad puede deberse a un mal plegamiento de la mutante, sin embargo los experimentos necesarios para abordar el mecanismo por el cual sucede, no se abordan en este proyecto. También es importante resaltar el hecho de que no se explica como una mutación de clase IV como es la N126D que se localiza en una posición tan alejada de los sitios catalíticos de hasta 35 Å, puede afectar de esta manera la catálisis enzimática, esta pregunta quizá pueda resolverse algún día con ensayos de cristalografía.

7. CONCLUSIÓN

Con base en los datos obtenidos en este trabajo se puede concluir que:

- Se lograron obtener las mutantes A+ (N126D) y Durham (K238R), mediante mutagénesis mediada por PCR.
- Se llevó a cabo la sobreexpresión de proteínas sin la necesidad de adicionar chaperonas.
- Se obtuvo un grado de pureza superior a 90% por un solo paso de cromatografía con la columna de afinidad 2'5'ADP sepharose 4B.
- La mutante A+ (N126D) de clase IV presenta una disminución de hasta del 50% en la catálisis para ambos sustratos respecto de la enzima silvestre, sin embargo es estable lo que podría compensar el que no presente una manifestación clínica.
- La mutante Durham (K238R) de clase I presenta una disminución en la catálisis hasta el 70% para ambos sustratos, así como inestabilidad respecto a la enzima silvestre de la G6PD, lo cual podría relacionarse con las severas manifestaciones clínicas que caracteriza esta mutante.
- Los ensayos de fluorescencia intrínseca, mostraron una mayor fluorescencia para la mutante Durham (K238R) mientras que la A+ permaneció igual, lo que podría apoyar esta inestabilidad a nivel del NADP⁺ estructural de la mutante Durham (K238R).

8. REFERENCIAS

Au, S., Gover, S., Lam, V. y Adams, M. (2000). Human glucose-6-phosphate dehydrogenase: the crystal structure reveals a structural NADP⁺ molecule and provides insights into enzyme deficiency. *Structure* **8**:293-303.

Baneyx, F. (1999). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotech.* **10**:411-421.

Beutler, E. (1994). G6PD Deficiency. *Blood hematology* **84**:3613-3636.

Beutler, E. y Yoshida, A. (1988). Genetic variation of glucose-6-phosphate dehydrogenase: a catalog and future prospects. *Medicine (Baltimore)* **67**:311-34.

Beutler, E. y Vulliamy, T. (2002). Hematologically Important Mutations: Glucose-6-phosphate Dehydrogenase. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* **28**(2):93-103.

Bhadbhade, M. M., Adams, M.J., Flynn, T.G. y Levy, H.R. (1987). Sequence identity between a lysine-containing peptide from *Leuconostoc mesenteroides* glucose 6-phosphate dehydrogenase and an active site peptide from human erythrocyte glucose 6-phosphate dehydrogenase. *FEBS Lett.* **211**:243-246.

Bonilla, J., Sánchez, M. y Chuaire, L. (2007). Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD). Respuesta de los hematíes y otras células humanas a la disminución en su actividad. *Médica Colombia*, **38**:68-75.

Carson, P. E., Flanagan, C. L., Ickes, C. E. y Alving, A. S. (1956). Enzymatic deficiency in primaquine - sensitive erythrocytes. *Science* **124**:484-5.

Colombo, M., Cornejo, V. y Raimann, E. (2005). Errores innatos en el metabolismo. Segunda edición. Editorial Universitaria S. A. Santiago de Chile, pp. 45.

Estrada, M., Gutiérrez A., Palacios, B., Pérez G., Rovira, A. y Vives, J. (1995). Estudio bioquímico y molecular de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en Cuba. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia* **2**:1-5.

Fiorelli, G. y Cappellini, M. D. (2008). Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Lancet* **371**: 64–74

Fiorelli, G., Martinez, F. y Cappellini, M. D. (2000). Chronic non-spherocytic haemolytic disorders associated with glucose-6-phosphate dehydrogenase variants. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol.* **13**:39–55.

Fonseca, D., Mateus, H., Silva, C., Contreras, N. y Restrepo, C. (2005). Deficiencia de glucosa 6-fosfato Deshidrogenasa Aspectos generales de la eritroenzimopatía más frecuente en el mundo. *Acta Med Colomb.* **30**(2):59-64.

Gómez, S., Terrón, J., De la Mora, I., García, I., López, G. Reyes, H. y Oria, J. (20013). Cloning, Expression, Purification and Characterization of His-Tagged Human Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase: A Simplified Method for Protein Yield. *Protein J.* **32**:585–592.

Hirono, A., Kuhl, W., Gelbart, T., Forman, L., Fairbank, V. F. y Beutler, E. (1989). Identification of the binding domain for NADP⁺ of human glucose-6-phosphate dehydrogenase by sequence analysis of mutants. *Proc Natl Acad Sci USA.* **86**:10015–17.

Huang, Y., Choi, M., Ngor, W., Yee D., Sien, V. y Engel, P. (2008). Purification and detailed study of two clinically different human glucose 6-phosphate dehydrogenase variants, G6PD(Plymouth) and G6PD (Mahidol): Evidence for defective protein folding as the basis of disease. *Molecular Genetics and Metabolism* **93**:44-53.

Hui-Ru, L., Qiong-Ling, T., Xing, W., Hong-Jum, L., Dan-Yi, L., Ying-Feng, Y., Shu-Fe, T., Chun-Hua, Z. y Yue-Chun, Zhu. (2011). Enzyme Kinetics and molecular modeling studies of G6PD (Mahidol) associated with acute hemolytic anemia. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics* **48**:316-324.

Kirkman, H.N. y Hendrickson, E. M. (1962). Glucose 6-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes. II. Subactive states of the enzyme from normal persons. *J Biol Chem.* **237**:2371-2376.

Kotaka, M., Gover, S., Vandeputte-Rutten, L., Au, S. N., Lam, V. y Adams, M. (2005). Structural studies of glucose-6-phosphate and NADP⁺ binding to human glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Acta Crys.* **61**: 495-504.

Lisker, R., Ruiz, G. y Loria, A. (1963). Studies on Several Genetic Hematologic Characteristics of the Mexican Population. *Blood hematology* **22**:342.345.

Lisker, R., Perez, R., Sosa, R. y Shein, M. (1976). Aspectos hereditarios y epidemiologicos de la deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa eritrocitica en Mexico. *Gac Med Mex.* **111**:454-458.

Longo, L., Vanegas, O., Patel, L., Rosti, V., Li H. y Waka, J. (2002). Maternally transmitted severe glucose 6 phosphate dehydrogenase deficiency is an embryonic lethal. *EMBO J.* **21**:4229- 4239.

Mason, P. J. y Bautista, J. M. (2007). G6PD deficiency: the genotype-phenotype association. *Blood Rev.* **21**(5): 267-83.

Medina, M.D., Vaca, G., Lope, B., Westwood, B. y Beutler, E. (1997). Molecular genetics of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Mexico. *Blood Cells Mol Dis.* **23**(1):88-94.

Mehta, A. (2000). Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Baillière's Clinical Hematology* **13**:21-38.

Minucci, A., Moradkhani, K., Hwang, M., Zuppi, C., Giardina, B. y Capoluongo, P. (2012). Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) mutations database: Review of the "old" and update of the new mutations. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* **48**:154-165.

Nkhoma, E., Poole, C., Vannappagari, V., Hall, S. y Beutler, E. (2009). The global prevalence of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: A systematic review and meta-analysis. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* **42**:267-278.

Ramírez, J. y Zarante, I. (2009). Deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa: situación actual, su relación con malaria y estrategias para calcular su prevalencia. *Univ. Med. Bogotá* **50**(1):58-76.

Ruwende, C. y Hill, A. (1998). Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and malaria. *J. Mol Med.* **76**:581-588.

Sevki, A. y Mehmet, C. (2012). Purification of rat kidney glucose 6-phosphate dehydrogenase, 6-phosphogluconate dehydrogenase, and glutathione reductase enzymes using 20, 50-ADP Sepharose 4B affinity in a single chromatography step. *Protein Expression and Purification* **81**:1-4.

Thompson, M., McInnes R. y Willard, H. (1996). *Genética en medicina*. Cuarta edición. Editorial Masson, S.A. Barcelona. Pp456-458

Travis, S. F. (1982). Red cell enzymopathies in the newborn II. Inherited deficiencies of red cell enzymes. *Ann. Clin. Lab. Sci.* **12**:163-177.

Vaca, G., Velázquez A. y Cantú, J.M. (1984). Las eritroenzimopatías hereditarias I, Aspectos bioquímicos y genéticos. *Bol. Of. Sanit. Panam*, **97**:225-239.

Vaca, E., Arambula, E. y Esparza, A. (2002). Molecular Heterogeneity of Glucose-6-phosphate Dehydrogenase Deficiency in Mexico: Overall Results of a 7-Year Project. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* **28**(3):436–444.

Vaca, G., Arámbula, E., Monsalvo, A., Medina, C., Nuñez, C. y Sandoval, L. (2003). Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PD) mutations in Mexico: four new G-6-PD variants. *Blood Cells Mol Dis.* **31**:112-120.

Vulliamy, T., Mason, P. y Luzzato, L. (1992). The molecular basis of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Haematology* **8**:138-143.

Wajcman, H. y Galacteros, F. (2004). Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency: a protection against malaria and a risk for hemolytic accidents. *C R Biol.* **327**:711-20.

Wang, X. T. y Engel, P. (2009). Clinical mutants of human glucose 6-phosphate dehydrogenase: Impairment of NADP⁺ binding affects both folding and stability. *Biochimica et Biophysica Acta* **1792**:804–809.

Wang, X. T., Lam, V. M. y Engel, P. C. (2006). Functional properties of two mutants of human glucose 6-phosphate, R393G and R393H, corresponding to the clinical variants G6PD Wisconsin and Nashville. *Biochim Biophys Acta.* **1762**(8):767-74.

Wang, X.T., Chan, T. y Engel, P. (2008). What is the role of the second “structural” NADP⁺-binding site in human glucose 6-phosphate dehydrogenase? *Protein Science* **17**:1403–1411.

WHO Working Group. (1989). Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Bull World Health Organ.* **67**:601-11.

Yuthavong, Y., y Wilairat, P. (1993). Protection against malaria by thalassemia and hemoglobin variants. *Parasitology Today* **9**:241-245.

Zimmerman, S., Ware, R., Forman, R., Westwood, B. y Beutler, E. (1997). Glucose-6phosphate dehydrogenase Durham: A de novo mutation associated chronic hemolytic anemia. The Journal of Pediatrics **131** (2):284-287.

8.1 Referencias electronicas

OriginLab. Data Analysis and Graphing Software, versión 8.5.1. 2011. OriginLab Corporation. <http://www.originlab.com/index.aspx?go=Company/PrivacyPolicy>

Sistema Gráfico Molecular PyMol, versión 1.6. 2013. Schrodinger, LLC. Extraído el 7 de octubre del 201. <http://www.pymol.org/>

The National Center for Biotechnology Information advances science and health by providing access to biomedical and genomic information.GenBank. Extraído el 17 de Septiembre de 2013. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>