



**Universidad Nacional Autónoma de México**

**Facultad de Estudios Superiores Iztacala**

**Clonación, sobreexpresión y purificación de la enzima  
Glucosa-6-Fosfato deshidrogenasa de *Pseudomonas  
aeruginosa* PAO1**

TESIS

Que para obtener el título de Biólogo

PRESENTA:

Kevin Edmundo Acero Navarro

Director: Dr. Roberto Velasco García



Los Reyes Iztacala, Edo. De México, 2015.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **Dedicatoria**

*A mis Padres*

Por haberme guiado en la vida y que con su esfuerzo permitieron que tuviera una buena educación.

*A mi hermana*

Quien me recordó a cada momento que aún no había acabado la tesis.

*A Arely*

Quien me acompañó y apoyó a lo largo del camino. Gracias por dejarme compartir esta etapa de la vida contigo.

*A mis amigos, Jen, Rebeca y Renato*

Quienes me aconsejaron y me hicieron pasar muy buenos momentos.

*A la vida*

Que me ha dado tanto.

## **Agradecimientos**

Agradezco a nuestra máxima casa de estudios la Universidad Nacional Autónoma de México.

A mi asesor, el Dr. Roberto Velasco García, por su paciencia y apoyo que permitieron desarrollarme profesionalmente.

A mis sinodales por sus consejos aportados durante la creación de este proyecto.

El presente trabajo fue financiado por la UNAM, a través del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación y Tecnológica (PAPIIT) de la DGAPA Proyecto IN228811

*“Que no te dé por la ciencia pura o te sucederá lo que al sabio Don Infusorio Bacteriosaval, quien vivió absorto en los microbios hasta que los microbios terminaron por absorberselo a él.”*

Francisco Gabilondo Soler

## Contenido

Índice de figuras .....	3
Índice de tablas .....	3
Lista de abreviaturas .....	4
Resumen .....	5
1. Introducción .....	6
2. Objetivos.....	16
2.1 Objetivo general.....	16
2.2 Objetivos particulares. ....	16
3. Material y métodos. ....	17
3.1 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.....	17
3.2 Purificación de ADN genómico de <i>P. aeruginosa</i> . ....	17
3.3 Amplificación del gen <i>zwf</i> .....	18
3.4 Obtención del plásmido pCAL-n.....	21
3.5 Clonación de <i>zwf</i> en pCAL-n. ....	22
3.6 Transformación bacteriana.....	23
3.7 Sobreexpresión y purificación de la G6PDH.....	24
3.8 Análisis de la proteína.....	26
3.8.1 Medición de la actividad enzimática.....	26
3.8.2 Cuantificación de proteína. ....	26
3.8.3 Determinación de la masa molecular de la subunidad y de la estructura nativa de la G6PDH recombinante. ....	27
3.8.4 Determinación de las propiedades cinéticas de la enzima recombinante purificada. ....	27
3.8.5 Análisis de la secuencia del gen <i>zwf</i> .....	28

4. Resultados.....	29
4.1 Purificación del ADN genómico.....	29
4.2 Amplificación de <i>zwf</i> y purificación de este gen y del plásmido pCAL-n. ....	30
4.3 Clonación de <i>zwf</i> en pCAL-n. ....	32
4.4 Sobreexpresión y purificación de la G6PDH.....	33
4.5 Análisis de la proteína.....	36
4.6 Análisis de la secuencia del gen <i>zwf</i> clonado.....	40
5. Discusión .....	42
6. Conclusiones.....	49
7. Perspectivas .....	50
8. Referencias .....	51

## Índice de figuras

Figura 1. Metabolismo de la Fosfatidilcolina en <i>P. aeruginosa</i> durante la FQ.....	8
Figura 2. Vías de degradación de la glucosa en <i>P. aeruginosa</i> .....	10
Figura 3. Reacción catalizada por la G6PDH relacionada con el proceso de detoxificación de las ERO por medio de NADPH.....	12
Figura 4. Secuencia de nucleótidos del gen <i>zwf</i> de <i>P. aeruginosa</i> PAO1.....	20
Figura 5. Plásmido pCAL-n.....	22
Figura 6. Purificación del ADN genómico de <i>P. aeruginosa</i> .....	29
Figura 7. Amplificación y purificación del gen <i>zwf</i> de <i>P. aeruginosa</i> .....	30
Figura 8. Aislamiento y purificación del Plásmido pCAL-n.....	31
Figura 9. Confirmación por PCR de la inserción del gen <i>zwf</i> en el vector pCAL-n.....	32
Figura 10. Análisis de la purificación de G6PDH utilizando SDS-PAGE.....	34
Figura 11. Perfil de elución de G6PDH desde la cromatografía Q-Sefarosa Fast Flow.....	35
Figura 12. Separación de la G6PDH recombinante por electroforesis no desnaturalizante en gel de poliacrilamida.....	36
Figura 13. Representación de Ferguson.....	37
Figura 14. Curva estándar para la determinación del peso molecular de la G6PDH.....	37
Figura 15. Cinética de la G6PDH.....	39
Figura 16. Secuenciación del plásmido recombinante.....	40
Figura 17. Predicción de la estructura terciaria de la G6PDH recombinante de <i>P. aeruginosa</i> .....	41

## Índice de tablas

Tabla 1. Oligonucleótidos diseñados para amplificar el gen <i>zwf</i> que codifica la síntesis de G6PDH en <i>P. aeruginosa</i> .....	19
Tabla 2. Volúmenes y concentraciones de los diferentes componentes de la mezcla utilizados para realizar la amplificación del gen <i>zwf</i> por el método de PCR.....	21
Tabla 3. Proceso de purificación de la G6PDH.....	35



## **Lista de abreviaturas**

BADH Betaína aldehído deshidrogenasa

BSA Albúmina sérica de bovino

CaCl<sub>2</sub> Cloruro de calcio

CBP Péptido de unión a calmodulina

CFTR Regulador transmembranal de conductancia de la fibrosis quística (Siglas en inglés)

CTAB Bromuro de hexadeciltrimetilamonio

EDTA Ácido etilendiaminotetraacético

ERO Especies reactivas del oxígeno

ERN Especies reactivas del nitrógeno

FC Fosfatidilcolina

FQ Fibrosis quística

G6P Glucosa-6 fosfato

G6PDH Glucosa-6 fosfato deshidrogenasa

HCl Ácido clorhídrico

IPTG Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido

KCl Cloruro de potasio

LB Medio líquido Luria-Bertani

NaCl Cloruro de sodio

MgCl<sub>2</sub> Cloruro de magnesio

NAD<sup>+</sup> Nicotinamida adenín dinucleótido (oxidado)

NADP<sup>+</sup> Nicotinamida adenín dinucleótido fosfato (oxidado)

NADPH Nicotinamida adenín dinucleótido fosfato (reducido)

PCR Reacción en cadena de la polimerasa

SDS Dodecil sulfato de sodio

## Resumen

*Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria Gram negativa, patógena y oportunista que infecta principalmente a individuos inmunodeficientes. Este organismo carece de la enzima 6-fosfofructocinasa, y por ende de la glucólisis clásica, por lo que el metabolismo de diferentes fuentes de carbono, entre ellas la glucosa, lo realiza a través de la vía de Entner-Doudoroff. Dentro de esta vía se encuentra la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), una enzima clave que cataliza la conversión de glucosa-6-fosfato a 6-fosfogluconato, produciendo simultáneamente NADH y NADPH. Al ser esta última coenzima esencial para la actividad de las enzimas que inactivan las especies reactivas de oxígeno, producidas por el hospedero como mecanismo de defensa contra la infección, se considera que G6PDH juega un papel importante en la protección de *P. aeruginosa* contra el estrés oxidativo. Es por ello que la mayoría de las investigaciones sobre esta enzima se relaciona con su papel protector, y en contraparte, pocos son los trabajos en donde se aborda su estructura y función. Una de las causas que podrían limitar estos estudios es la dificultad para obtener cantidades suficientes de la enzima pura. Considerando esto, en la presente investigación se clonó el gen *zwf* que codifica para dicha proteína, en el vector de expresión pCALn, para posteriormente sobreexpresarla en la cepa BL21(DE3)pLysS de *E. coli* y finalmente purificarla. Los principales pasos de esta última fase fueron la solubilización de los agregados que forma la proteína sobreexpresada y su fraccionamiento a través de una resina de intercambio iónico. La cantidad obtenida de enzima pura fue de 18.41 mg por litro de cultivo de la bacteria transformante. Posterior a la purificación se determinaron las masas moleculares de su subunidad y de la enzima nativa, así como algunos de sus parámetros cinéticos aparentes.

## 1. Introducción

*Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria Gram negativa que se desarrolla en el suelo, ambientes pantanosos y hábitats marinos costeros. Es un patógeno oportunista cuya importancia ha aumentado debido a la resistencia obtenida por el uso de antibióticos y desinfectantes (Mena y Gerba, 2009; McCarthy, 2015). Puede manifestarse como infección nosocomial de vías urinarias, meningitis, septicemia, bacteremia, ectima gangrenoso, enterocolitis, infecciones de la piel, etc. (Cabello, 2007). Afecta principalmente a individuos cuyo sistema inmune se encuentra comprometido, tales como víctimas de quemaduras o pacientes en tratamientos de quimioterapia, y notablemente en individuos que presentan fibrosis quística (FQ) (Ma *et al.*, 1998), en quienes es responsable de la mayoría de la mortalidad y morbilidad.

La fibrosis quística es un desorden autosómico recesivo, causado por mutaciones en el gen que codifica para la proteína denominada regulador transmembranal de conductancia de la fibrosis quística (CFTR por sus siglas en inglés). Esta proteína actúa principalmente como canal de cloro, pero también posee múltiples papeles reguladores, como la inhibición del transporte en el canal de sodio epitelial, la regulación de los canales de ATP y del transporte intracelular de vesículas, la inhibición de los canales de cloro activados por calcio, entre otros (O'sullivan y Freedman, 2009). El daño en este gen provoca un decremento en la permeabilidad de aniones de CFTR, afectando la función normal del epitelio de las vías respiratorias, del tracto intestinal, de los ductos del páncreas, glándulas sudoríparas y testículos (Welsh y Fick, 1987; Gadsby *et al.*, 2006). Como resultado de la disminución en la permeabilidad de  $\text{Cl}^-$ , de la pérdida de la inhibición de los canales de sodio epiteliales y de un incremento en la absorción de sodio, el fluido del tracto respiratorio se vuelve anormal y

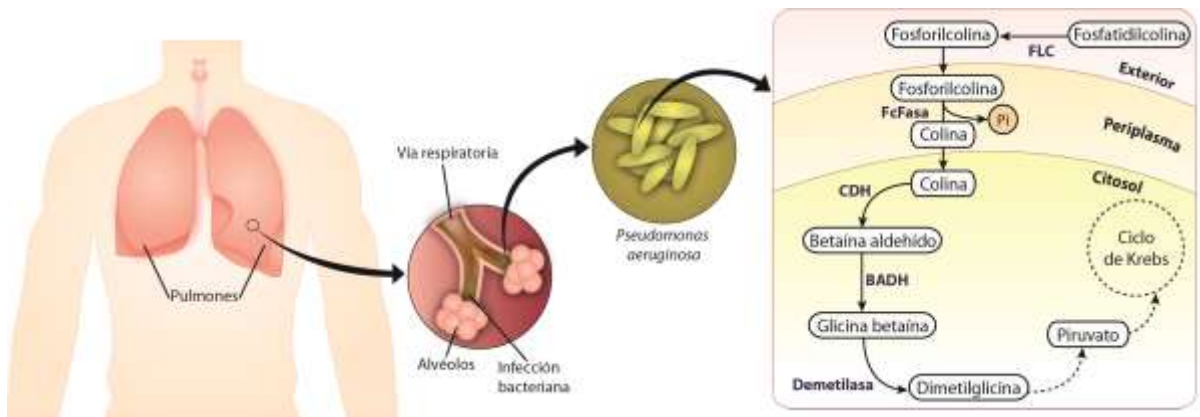
reducido (Welsh y Liedtke, 1986; Davies, 2002; Ciofu *et al.*, 2005). Esto causa un lento despeje de la mucosa y la formación de placas de mucosidad adherentes, lo que obstruye las vías respiratorias y provee un ambiente único para la colonización por microorganismos patógenos, usualmente *P. aeruginosa* o *Staphylococcus aerus* (Terry *et al.*, 1990; Oliver *et al.*, 2000; Cohen y Prince, 2012, Donaldson *et al.*, 2006). Una vez que se establece la infección de *P. aeruginosa*, ésta desplaza a otras bacterias y se convierte en la predominante dentro del pulmón de los pacientes con FQ (Palmer *et al.*, 2005)

Debido a que el defecto genético de la FQ afecta al mecanismo de despeje mucociliar de las bacterias patógenas en las vías respiratorias, incrementando la naturaleza viscosa y deshidratada de la mucosa (Govan *et al.*, 1996), el paciente queda predispuesto a padecer infecciones bronquiales recurrentes; se ha determinado que el 95% de los pacientes con FQ mueren debido a una falla respiratoria (Welsh y Fick, 1987).

Aunque no se conocen los eventos tras la infección de *P. aeruginosa*, se presupone que al igual que en la mayoría de las infecciones bacterianas, los factores clave son la adherencia de la bacteria a las secreciones y células de las vías respiratorias, la resistencia al sistema inmune, así como otros mecanismos que facilitan la prevalencia de este microorganismo en las vías respiratorias de los pacientes con FQ (Davies, 2002).

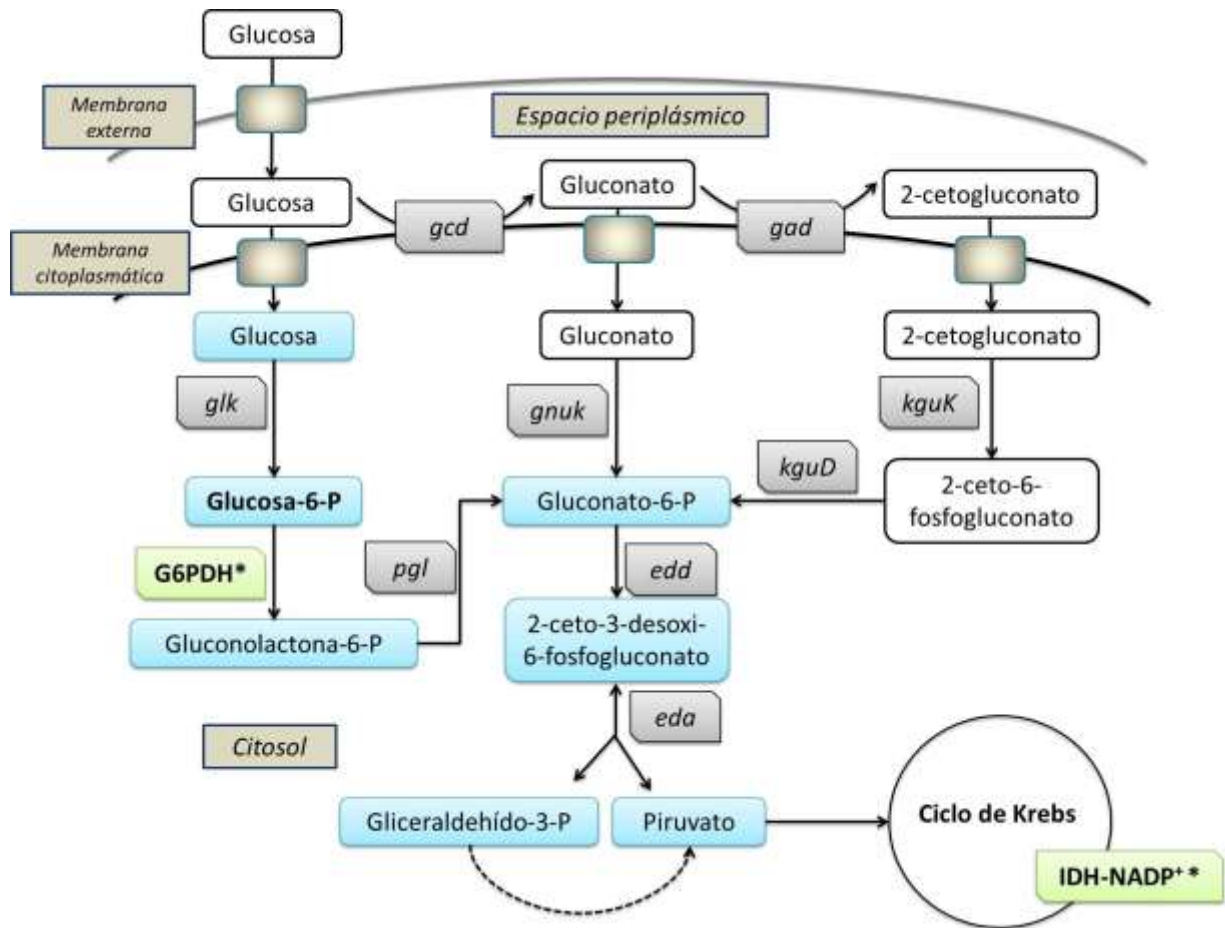
Además de su amplia adaptabilidad a las limitaciones y cambios que presenta el cuerpo humano y de la resistencia hacia los antibióticos, *P. aeruginosa* posee gran capacidad para utilizar una amplia variedad de fuentes de carbono para su desarrollo, como las que encuentra en los pulmones que invade (Oliver *et al.*, 2000). Dentro de las fuentes de carbono que encuentra en estos órganos, podemos mencionar a la fosfatidilcolina (FC), que es el mayor fosfolípido formador de membranas en los eucariontes (Wilderman *et al.*, 2002), pues

constituye el 80% de los fosfolípidos totales que componen al surfactante pulmonar; seguido por el fosfatidilglicerol, con un 11% (Gilfillan *et al.*, 1983). La FC induce genes clave en *P. aeruginosa* para la degradación de la misma (Son *et al.*, 2007), por lo que se le considera como su principal fuente de carbono, misma que le permite realizar procesos metabólicos y producir alginato, un exopolisacárido cuya sobreproducción esta correlacionada con el establecimiento de una infección crónica. Este exopolisacárido contribuye de manera importante en la virulencia de la bacteria, ya que además de neutralizar los radicales del oxígeno, limita la penetración y fagocitosis por parte de los leucocitos y le protege de los antibióticos (Leid *et al.*, 2005; Silo-Suh *et al.*, 2005). En la Fig. 1 se presenta la vía metabólica por la que el carbono proveniente de FC ingresa y es utilizado por la bacteria *P. aeruginosa*. Uno de los productos formados en la degradación de FC es la glicina betaina (GB), cuya síntesis es catalizada por la enzima betaína aldehído deshidrogenasa (BADH). La GB es un osmoprotector que incrementa la habilidad de *P. aeruginosa* a sobrellevar el estrés osmótico presente en el pulmón de los pacientes con FQ.



**Figura 1. Metabolismo de la fosfatidilcolina en *P. aeruginosa* durante la FQ.** FLC: Fosfolipasa, FcFasa: Fosforil colina fosfatasa, CDH: Colina deshidrogenasa, BADH: Betaína aldehído deshidrogenasa. Las líneas punteadas indican una serie de reacciones no mostradas.

Las bacterias de la familia *Pseudomonadaceae*, a la que pertenece *P. aeruginosa*, carecen de mecanismos de fermentación para obtener energía, por lo que su catabolismo de glucosa difiere de aquel de las de la familia *Enterobacteriaceae*, porque sustituyen la glucólisis clásica con la vía principal de Entner-Doudoroff (ED) (Lessie y Neidhart, 1967) (Fig. 2). La vía de ED, descubierta en 1952 en *P. sacharophila* y presente en organismos distribuidos en los dominios archaea, bacteria y eukarya, pertenece, junto con la de Embden-Meyerhoff-Parnas y la de las pentosas fosfato, al grupo de vías glucolíticas (Conway, 1992; Peekhaus y Conway, 1998). En *P. aeruginosa*, esta vía y la de las pentosas fosfatos son las principales involucradas en el catabolismo de la glucosa (Berger *et al.*, 2014). Las especies de *Pseudomonas* pueden convertir la glucosa a gluconato-6 fosfato mediante una vía oxidativa o una fosforilativa, dependiendo de las condiciones fisiológicas en las que se encuentre (Lessie y Phibbs, 1984).



**Figura 2.** Vías de degradación de la glucosa en *P. aeruginosa*. *glk*: glucocinasa; *gcd*: glucosa deshidrogenasa; *gad*: gluconato oxidasa; G6PDH: glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; *pgl*: fosfoglucanolactonasa; *edd*: gluconato-6-fosfato deshidratasa; *eda*: 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato aldolasa; *gnuk*: gluconato cinasa; *kguK*: 2-cetogluconato cinasa; *kguD*: 2-cetogluconato-6-fosfato deshidrogenasa; IDH-NADP<sup>+</sup>: isocitrato deshidrogenasa. \*Enzimas productoras de NADPH. Los cuadros de color azul muestran a las enzimas de la vía de Entner-Doudoroff. La flecha punteada indica una serie de reacciones no mostradas. (Tomado de Marcos-Vilchis, 2014).

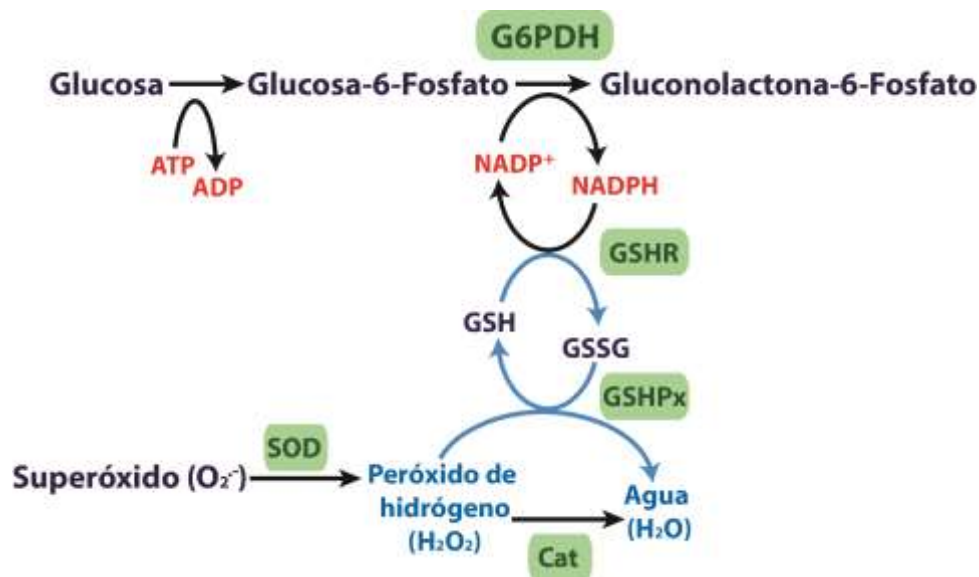
Dentro de esta vía se encuentra la Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH; EC 1.1.1.49), enzima clave en el catabolismo de la glucosa y que utiliza como coenzimas al NAD<sup>+</sup> o al NADP<sup>+</sup> (Lessie y Neidhart, 1967; Hunt y Phibbs, 1983). En *P. aeruginosa* esta enzima es codificada por el gen *zwf*, cuyo producto es una proteína de 490 residuos, que teóricamente forma un homotetrámero con una masa molecular de aproximadamente 220 kDa

(Ma *et al.*, 1998). La G6PDH pertenece a las enzimas reguladoras de la vía del catabolismo de hexosas (regulon *Hex*), junto a la 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato (KDPG) (Collier *et al.*, 1996), por lo que es una enzima constitutiva. Fuentes de carbono como glucosa y glicerol son inductores nutricionales efectivos de la G6PDH y otras enzimas de la vía ED (McCowen *et al.*, 1981);

La importancia de la G6PDH radica en que, además de ser una enzima constitutiva para el metabolismo de hexosas, actúa indirectamente en la protección contra el estrés oxidativo generado por las especies reactivas de oxígeno (ERO), ya que es una enzima clave para el mantenimiento del potencial redox dentro de las células, requerido por algunas enzimas detoxificantes de ERO (Fig. 3) (Singh *et al.*, 2012).

En infecciones crónicas ocurre una respuesta inflamatoria en el pulmón dominada por leucocitos polimorfonucleares que liberan ERO, incrementando el estrés oxidativo sobre la bacteria (Hoffman *et al.*, 2005). Entre las principales ERO se incluyen a las moléculas superóxido, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo (Bowler y Crapo, 2002), y cuando existen infecciones, como las provocadas por *P. aeruginosa*, su síntesis por parte de las células fagocíticas aumenta, relacionándoseles con un incremento en la actividad antibacteriana. (Hasset y Cohen, 1989). El NADPH sintetizado por la G6PDH podría proveer los equivalentes reductores que permiten a la bacteria anular a las ERO (Singh *et al.*, 2012) (Fig. 3). En *P. aeruginosa* se han realizado estudios con mutantes carentes del gen *zwf*, encontrándose que éstas presentaban mayor sensibilidad a un agente generador de superóxido (metil viológeno) (Ma *et al.*, 1998).





**Figura 3. Reacci6n catalizada por la G6PDH relacionada con el proceso de detoxificaci6n de las ERO por medio de NADPH.** GSHR: Glutati6n reductasa, GSHPx: Glutati6n peroxidasa, GSH: Glutati6n reducido, GSSH: Glutati6n oxidado, Cat: Catalasa, SOD: Super6xido dismutasa.

Adem1s de ser importante en el metabolismo del carbono y en la adaptaci6n hacia un estr9s oxidativo, la G6PDH parece proporcionar a la bacteria otro tipo de ventajas de supervivencia dentro del ambiente pulmonar. Como se mencion6 anteriormente, el alginato es un exopolisac1rido que favorece la virulencia de *P. aeruginosa*. Se ha demostrado que el metabolismo en el que participa la G6PDH est1 relacionado con la producci6n de alginato en las cepas mucoides (Silo-Suh *et al.*, 2005), y que la deficiencia de 9sta enzima tiene efectos considerables en la producci6n del exopolisac1rido (Narbad *et al.*, 1988).

Viendo la importancia que tiene la G6PDH para la bacteria *P. aeruginosa*, consideramos que esta enzima parecer1a ser un blanco adecuado para combatir las infecciones provocadas por el microorganismo, a trav9s de mol9culas que afecten su actividad. La b9squeda de este tipo de inhibidores, junto con el conocimiento de las caracter1sticas,

fisicoquímicas, cinéticas, estructurales y funcionales de dicha enzima, será posible únicamente si se cuenta con una estrategia metodológica que permita obtener cantidades considerables de ella. Al respecto, podemos mencionar que la enzima G6PDH ha sido purificada tanto de organismos eucariontes (levadura, cerdo, oveja, humano, vegetales, etc.) como de procariontes (Singh *et al.*, 2012).

Refiriéndonos a organismos procariontes, la G6PDH ha sido purificada mediante diversos métodos. En 1974 Vander Wyk y Lessie purificaron y caracterizaron la G6PDH de *P. multivorans* mediante tres cromatografías de intercambio iónico en columna: Hidroxiapatita, DEAE-celulosa y fosfato-celulosa. En *P. fluorescens* esta enzima también se purificó mediante precipitación con sulfato de amonio (Lessman *et al.*, 1975), y utilizando cromatografías de carboximetil-sephadex e hidroxiapatita. En 1980 Ben-Bassat y Goldberg purificaron la G6PDH de *Pseudomonas C* utilizando una columna de intercambio iónico de dietilaminoetil (DEAE)- celulosa y otra de afinidad en dextran-sefarosa 4B. En 1985 Scopes *et al.*, purificaron, entre otras enzimas, a la G6PDH de la bacteria *Zymomonas mobilis* mediante una cromatografía de ligando-colorante escarlata MX-G en una matriz de sefarosa. En 1990 Reuter *et al.*, purificaron y caracterizaron la G6PDH de *Pseudomonas W6*, a través de una cromatografía de ligando-colorante en azul Cibacron F3G-A Sephadex y Rojo Proción HE-3B-Sefarosa. En 1995, Anderson y Anderson purificaron esta enzima de *Azotobacter vinelandii*, utilizando también una cromatografía de ligando-colorante además de una cromatografía de intercambio iónico. En el 2000 Moritz *et al.*, estudiaron las propiedades cinéticas de la G6PDH de *Corynebacterium glutamicum*, y para esto purificaron la enzima mediante una columna de intercambio iónico Fractogel-EMD DEA y una columna de afinidad 2'5'- ADP-Sefarosa. En el 2007 Sung y Lee purificaron dos isoformas de la G6PDH de la

bacteria *Deinococcus radiophilus* a través de cromatografías de intercambio iónico (DEAE-Celulosa) y de afinidad en 2'5'-ADP-Sefarosa 4B.

Con relación a la G6PDH de la especie *P. aeruginosa*, en 1967 Lessie y Neidhart la purificaron utilizando una columna de DEAE-celulosa para estudiar el control del ATP sobre esta enzima. El rendimiento final obtenido en este estudio fue de 540 µg de proteína pura/L de cultivo inicial de *P. aeruginosa*. Por otra parte, en 1998 Ma *et al.*, purificaron esta G6PDH desde células de *P. aeruginosa* transformadas específicamente para sobreexpresar esta proteína. La metodología utilizada involucró precipitación con sulfato de amonio, diálisis, y tres tipos de cromatografía (intercambio iónico, adsorción y filtración). Sin embargo, a pesar de utilizar células transformadas para sobreexpresar la proteína recombinante, el rendimiento obtenido fue de únicamente 125 µg de enzima pura/L del cultivo inicial.

En este estudio se describe la clonación del gen *zwf* de *P. aeruginosa* y una metodología que permite obtener la enzima G6PDH de esta bacteria con una mayor pureza y un mejor rendimiento que otros métodos reportados (18 mg/L de cultivo). La estrategia metodológica se basa en los métodos de clonación (Velasco-García *et. al.*, 2006) y purificación (Velasco-García *et. al.*, 1999), previamente desarrollados para obtener cantidades considerables de la enzima BADH recombinante de *P. aeruginosa*, y que han permitido investigar la estructura y función de esta molécula. Estos métodos fueron seleccionados por el rendimiento logrado para la BADH (28mg/L de cultivo de la bacteria *E. coli* transformada con el vector pCALbetB (Velasco-García *et. al.*, 2006), y por las similitudes que presenta esta enzima con la G6PDH, en cuanto a su punto isoelectrico (5.25 y 5.60, respectivamente), y en su afinidad por la coenzima NADP<sup>+</sup> ( $K_m$  53 y 83 µM, respectivamente) (Velasco-García *et. al.*, 2000; Ma *et al.*, 1998). En teoría, estas semejanzas permitirían purificar la G6PDH de *P.*

*aeruginosa* con un método que involucra una cromatografía de intercambio iónico y otra de afinidad, como el utilizado para la BADH de la misma bacteria (Velasco-García *et. al.*, 1999).

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo general.

Clonar, sobreexpresar y purificar a homogeneidad la proteína recombinante glucosa-6 fosfato deshidrogenasa (G6PDH) de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.

### 2.2 Objetivos particulares.

- Clonar el gen *zwf* que codifica para la producción de G6PDH.
- Inducir la sobreexpresión de la G6PDH en células competentes de *E. coli* BL21(DE3) pLysS
- Purificar la enzima G6PDH recombinante de *P. aeruginosa* PAO1 a través de una resina de intercambio iónico.
- Conocer algunos parámetros fisicoquímicos y cinéticos básicos de la enzima purificada (peso molecular de la subunidad y de la proteína nativa, estructura cuaternaria, valores de  $K_m$  para sustrato y coenzima,  $V_{max}$  y  $K_{cat}$ ).

### **3. Material y métodos.**

#### **3.1 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.**

La cepa de *P. aeruginosa* utilizada fue PAO1, mientras que de *E. coli* se trabajó con las cepas DH5 $\alpha$  y BL21(DE3)pLysS. Las células empleadas para la purificación de ADN, la obtención del plásmido y la transformación bacteriana fueron crecidas en medio LB (Miller's LB Broth Base, de Invitrogen). Para la sobreexpresión de la G6PDH este medio se preparó con peptona, ya que el medio LB comercial (Invitrogen) promovía por sí mismo la expresión del promotor *lac* presente en el vector de expresión utilizado. Para los medios selectivos utilizados durante la obtención del plásmido, la transformación bacteriana y la sobreexpresión de la G6PDH, el medio LB líquido y las placas de agar-LB, contenían ampicilina en una concentración de 100 $\mu$ g/mL (LBA). La temperatura utilizada para cultivar las bacterias fue de 37°C, con excepción de la utilizada para sobreexpresión de la enzima, que fue de 22°C.

#### **3.2 Purificación de ADN genómico de *P. aeruginosa*.**

Se inocularon 5 mL de medio LB con la bacteria *P. aeruginosa*, dejándola crecer toda la noche en un baño con agitación de 200 rpm, a una temperatura de 37°C. Al día siguiente se centrifugó el cultivo a 3500 rpm durante 10 min, se desechó el sobrenadante y la pastilla se lavó con 1mL de solución TE 50/20 (50 mM Tris HCl, 20 mM EDTA, pH 8.0); esta mezcla se centrifugó durante 3 min a 5000 rpm, se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 450  $\mu$ L de solución TE 50/20. A esta resuspensión se le agregaron 50  $\mu$ L de lisozima (10 mg/mL en TE 50/20), se le incubó a 37°C durante 30 min y posteriormente se le adicionaron 150  $\mu$ L de proteínasa K (20mg/mL de H<sub>2</sub>O) para volverla a incubar durante 15

min a 37°C. Finalmente se agregaron 50 µL de SDS al 10% para incubarla durante 30 min más a 37°C. Posteriormente, se adicionaron 100 µL de NaCl 5M, se agitó vigorosamente con vórtex y se le incubó 5 min a 65°C. Se le agregaron 80 µL de Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB)/NaCl (CTAB al 10% en NaCl 700 mM), se adicionó un volumen de Cloroformo/ Alcohol isoamílico (24:1) y se agitó vigorosamente durante 5 min con vórtex para después centrifugar durante 5 min a 14,000 rpm. Al sobrenadante se le agregaron 500 µL de Fenol/Cloroformo/Alcohol isoamílico (24:24:1) para después centrifugar a 14,000 rpm durante 5 min; este paso se repitió dos veces, recuperando la fase acuosa en cada ocasión. Se agregó nuevamente un volumen de Cloroformo/Alcohol isoamílico (24:1) al último sobrenadante y se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 min. Para precipitar el ADN genómico extraído, se adicionaron a la mezcla 0.6 volúmenes de isopropanol, se incubó durante 10 min a temperatura ambiente, para después centrifugarla durante 15 min a 14,000 rpm. La pastilla se lavó 3 veces con 1 mL de etanol al 70%, centrifugando a 14,000 rpm durante 5 min entre cada lavado. La pastilla se resuspendió en 70 µL de solución TE 10/1 (Tris HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0), agregándole 2 µL de RNAasa e incubándola durante 1 hora a 37 °C. El ADN obtenido fue finalmente almacenado a -20°C. Para verificar la integridad del ADN obtenido se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 0.9 % y también se estimó la concentración mediante espectrofotometría.

### **3.3 Amplificación del gen *zwf*.**

El ADN genómico obtenido fue empleado como templado para la amplificación del gen *zwf* que codifica para la enzima G6PDH en *P. aeruginosa*. La amplificación se realizó por medio de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los oligonucleótidos empleados

fueron diseñados a partir de la secuencia del gen de *P. aeruginosa* (Fig. 4), obtenido de la base de datos en línea del GenBank (Numero de acceso AAG06571.1). El oligonucleótido Forward tenía el sitio de restricción para la enzima *Bgl*III, mientras que el Reverse fue diseñado con el sitio para *Eco*RI. Se diseñó también un oligonucleótido Reverse con un sitio de unión para la enzima de restricción *Nde*I, que fue posteriormente descartado, debido a que los fragmentos digeridos con ésta tenían baja eficiencia de ligación. Estos sitios fueron seleccionados porque mantienen un marco de lectura que no interfiere en la funcionalidad del plásmido, necesaria para cumplir nuestro objetivo (Fig. 5). La PCR se realizó utilizando la enzima Taq Polymerase/high yield buffer, de Jena Bioscience (Alemania), junto con los componentes de la mezcla de amplificación que se mencionan en la Tabla 2. Las condiciones de corrida fueron 40 ciclos de 1 min de desnaturalización a 96°C, 30 s de alineamiento a 65 °C, 2 min de extensión a 72°C y una extensión final de 10 min a 72°C. La reacción se inició agregando la polimerasa en la fase de desnaturalización del primer ciclo. El tamaño del producto de la amplificación, de 1.47 kb, fue corroborado en un gel de agarosa 0.9 %, y el ADN correspondiente fue purificado posteriormente con el kit QIAquick Gel Extraction Kit, siguiendo las instrucciones del fabricante.

<b>Forward</b>	
<i>Bgl</i> III	5'- GA <u>AGATCT</u> ATGCCTGATGTCCGCGTTCTGC-3'
<b>Reverse</b>	
<i>Eco</i> RI	5'- <u>GGAATTCT</u> CAGAAATCGCCAATACCAACTCCTC-3'

**Tabla 1. Oligonucleótidos diseñados para amplificar el gen *zwf* que codifica la síntesis de G6PDH en *P. aeruginosa*.** Los sitios de restricción para las respectivas enzimas (*Bgl*III y *Eco*RI) se encuentran subrayados. El oligonucleótido forward presenta el codón de inicio ATG y la secuencia codificante para siete residuos de G6PDH. Los oligonucleótidos reverse



contiene las secuencias complementarias para un codón de terminación TCA y siete residuos C-terminales.

```
5' ATGCCTGATGTCCGCGTTCTGCCTTGCACGTTAGCGCTGTTCCGGTGCCTGGGCGATCTCGCCTTGCGCAA  
GCTGTTCCCGGCGCTCTACCAACTCGATCGTGAGAACCTGCTGCACCGCGATACCCGCGTCCTGGCCCTGGCCC  
GTGACGAAGGCGCTCCCGCCGAACACCTGGCGACGCTGGAGCAGCGCCTGCGCCTGGCAGTGCCGGCGAAGG  
AGTGGGACGACGTGGTCTGGCAGCGTTTCCGCGAACGCCTCGACTACCTGAGCATGGACTTCTCGACCCGCA  
GGCCTATGTCCGGCTTGC GCGAGGCGGTGGATGACGAACTGCCGCTGGTGCCTACTTCGCCACGCCGGCCTCGG  
TGTTCCGGCGGCATCTGCGAGAACCTCGCCGCCCGGTCTCGCCGAGCGCACCCGGGTGGTGTGGAGAAGCC  
CATCGGTATGACCTGGAGTCGTCCCGCGAGGTCAACGAGGCAGTCGCCCCGTTCTTCCCGGAAAGCCGCATCT  
ACCGGATCGACCATTACCTGGGCAAGGAGACGGTGCAGAACCTGATCGCCCTGCGCTTCGCCAACAGCCTCTT  
CGAGACCCAGTGGAACCAGAACCACATCTCCACGTGGAGATCACCGTGGCCGAGAAGGTCGGCATCGAAGG  
CCGCTGGGGCTACTTCGACCAGGCCGGGCAACTGCGCGACATGGTGCAGAACACCTGCTGCAACTGCTCTGC  
CTGATCGCCATGGATCCGCCAGCGACCTTTCCGGCGGACAGCATTTCGCGACGAGAAGGTCAAGGTCTCCGCG  
CCCTCGAGCCGATTCCCGCAGAACAACCTGGCTTCGCGCGTGGTGCCTGGGCGAGTACACCCCGGTTTCAGCGA  
CGGCAAGGCAGTGCCGGGCTACCTGGAGGAGGAACATGCGAATCGCGACAGCGACGCGGAAACCTTCGTGCG  
CCTGCGCGTGGACATCCGCAACTGGCGCTGGTCCGGCGTGCCGTTCTACCTGCGCACCCGGCAAGCGCATGCCG  
CAGAAGCTGTGCGAGATCGTCATCCACTTCAAGGAGCCCGCCGACTACATCTTCGCTCCCGAGCAGCGTTTCGT  
GATCAGCAACCGGTGATCATCCGCTGCAGCCGGACGAAGGTATCTCCCTGCAAGTGATGACCAAGGACCAG  
GGCCTGGGCAAGGGCATGCAATTGCGTACCGGCCCGCTGCAACTGAGTTTTTCCGAGACCTACCACGCGGCGC  
GGATTCCCGATGCCTACGAGCGTCTGCTGCTGGAGGTCACCCAGGGCAACCAGTACCTGTTTCGTGCGCAAGGA  
CGAGGTGGAGTTCGCTGGAAGTGGTGCAGCAGCTGATCGCTGGCTGGGAACGCCTGAGCGAAGCGCCCAAG  
CCGTATCCGGCGGGGAGTTGGGGGCCGGTGGCCTCGGTGGCCCTGGTGGCCCGCGATGGGAGGAGTTGGTAT  
GGCGATTCTGA 3'
```

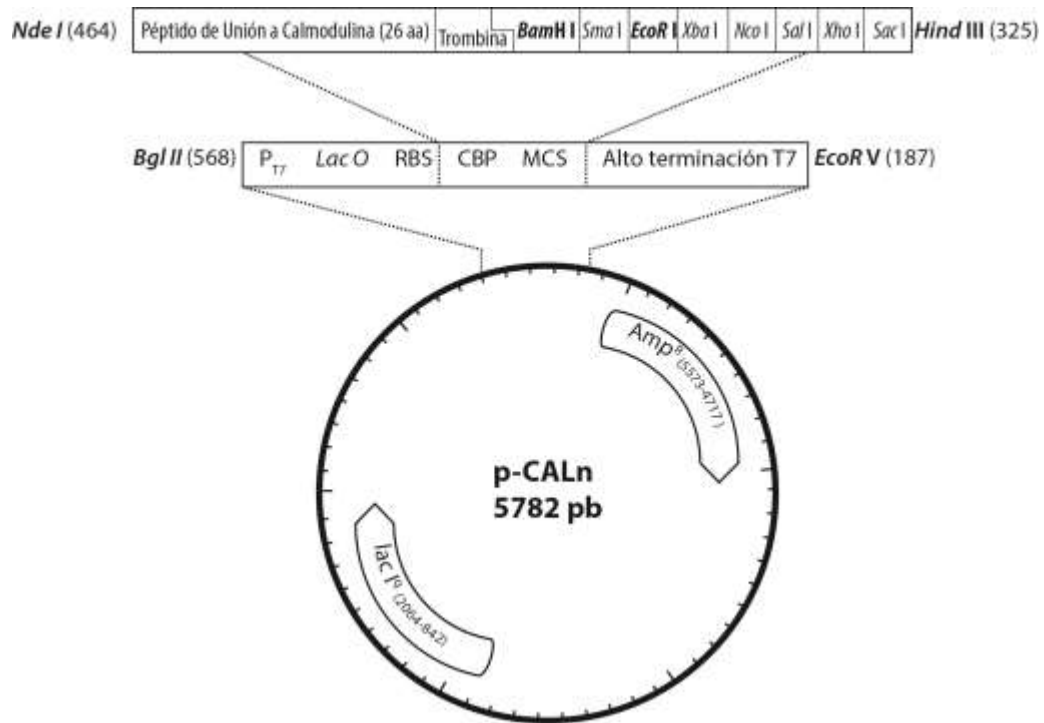
**Figura 4. Secuencia de nucleótidos del gen *zwf* de *P. aeruginosa* PAO1.** Obtenida de la base de datos GenBank (AAG06571.1). Los fragmentos en color fueron utilizados en el diseño de los oligonucleótidos Forward (rojo) y Reverse (azul) mostrados en la Tabla 1.

**Tabla 2. Volúmenes y concentraciones finales de los diferentes componentes utilizados en la mezcla para amplificación del gen *zwf* mediante PCR.**

	Volumen ( $\mu\text{L}$ )	Concentración utilizada
✓ Amortiguador sin Mg 10X	65.0	1X
✓ $\text{MgCl}_2$ 25 mM	19.5	750 $\mu\text{M}$
✓ dNTPs (2.5 mM c/u)	52.0	200 $\mu\text{M}$ c/u
✓ ADN genómico de <i>P. aeruginosa</i> (200 ng/ $\mu\text{L}$ )	26.0	8.0 ng/ $\mu\text{L}$
✓ Oligonucleótido Reverse 10 $\mu\text{M}$	32.5	500 nM
✓ Oligonucleótido Forward 10 $\mu\text{M}$	32.5	500 nM
✓ $\text{H}_2\text{O}$ estéril	416	-
✓ <i>Taq</i> polimerasa (5 U/ $\mu\text{L}$ )	6.5	50 mU/ $\mu\text{L}$

### 3.4 Obtención del plásmido pCAL-n

Para obtener el plásmido pCAL-n (Fig. 5) utilizado para la clonación del gen, se cultivó la cepa DH5 $\alpha$  de *E. coli* transformada previamente con este vector, durante toda la noche en 100 mL de medio selectivo LBA, con una agitación de 200 rpm y una temperatura de 37°C. Este plásmido cuenta con una secuencia (CBP, Fig. 5) que genera un péptido de unión a calmodulina que se expresa junto con la proteína de interés (en este caso la G6PDH) y que podría utilizarse para la futura purificación de ésta. El cultivo se centrifugó a 3,500 rpm durante 10 min y se realizó la purificación del plásmido a partir de la pastilla, utilizando el kit QIAGEN Plasmid Midi, siguiendo las instrucciones del fabricante.



**Figura 5. Plásmido pCAL-n.** La secuencia del gen *zwf* se insertó entre los sitios de corte BamHI y EcoRI (en negritas), dentro del marco de lectura de la secuencia del péptido de unión a calmodulina (CBP) y del sitio de corte para la trombina.

### 3.5 Clonación de *zwf* en pCAL-n.

Una vez purificados el gen *zwf* y el plásmido pCAL-n, el gen fue digerido con las enzimas de restricción *EcoRI* y *BglIII* (New England BioLabs Inc.) y el vector con *EcoRI* y *BamHI* (New England BioLabs Inc.), durante 1 hora a 37°C. Se sabe que la digestión con *BamHI* y *BglIII* producen extremos cohesivos compatibles. Tanto el plásmido como el gen *zwf* fueron purificados con el kit QIAquick PCR Purification Kit de QIAGEN, únicamente el vector fue desfosforilado utilizando Fosfatasa alcalina termosensible (Sigma-Aldrich). La ligación se llevó a cabo durante 12 hrs a 16°C utilizando la enzima T4 ADN ligasa (Invitrogen) en una proporción 1:3 vector/gen.

### 3.6 Transformación bacteriana.

Antes de realizar la transformación se procesaron las cepas de *E. coli* DH5 $\alpha$  y BL21(DE3)pLysS para hacerlas competentes. Para esto se cultivaron las bacterias antes mencionadas durante toda la noche en 30 mL de medio LBA, con agitación de 200 rpm y a una temperatura de 37°C. Cada cultivo se centrifugó a 3,500 rpm durante 10 min, se desechó el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en 7.5 mL de CaCl<sub>2</sub> 100mM frío y mantenidas durante 4 h a una temperatura de 4°C. Las células fueron luego centrifugadas a 3,500 rpm durante 10 min a 4°C; se desechó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 2 mL de CaCl<sub>2</sub> 100 mM y 0.340 mL de glicerol 100% fríos. Las células competentes fueron después almacenadas a -70°C en alícuotas de 200  $\mu$ L.

Para la transformación celular se agregaron 10  $\mu$ L de la mezcla de ligación descrita dos párrafos arriba, a cada alícuota de 200  $\mu$ L de células competentes, para después incubarlas durante 30 min a 4°C; posteriormente se les aplicó un choque térmico de 42 °C durante 1 min e inmediatamente se les transfirió a 4°C durante 2 min, para luego agregarles 500  $\mu$ L de medio LB. Las células fueron después incubadas durante 1 hora en un baño de agitación a 200 rpm a una temperatura de 37°C. Posteriormente se transfirieron 150  $\mu$ L de cada uno de los cultivos celulares a placas de agar LBA para seleccionar las células por su resistencia a ampicilina. De las aproximadamente 60 colonias obtenidas con resistencia al antibiótico para la cepa DH5 $\alpha$ , 10 fueron seleccionadas para extraer su plásmido mediante el kit Roche Plasmid isolation, y confirmar la presencia del inserto dentro del vector. Para esto, el vector aislado fue sometido a una digestión con la enzima *EcoRI* y se determinó su tamaño separándolo a través de una electroforesis en gel de agarosa. Las muestras plasmídicas con un tamaño que correspondía al del plásmido recombinante fueron utilizadas para transformar las células competentes de

*E. coli* BL21(DE3)pLysS. Las células transformadas fueron seleccionadas en placas de agar LBA, posteriormente se seleccionaron colonias que fueron crecidas toda la noche en medio LBA líquido y finalmente se almacenaron a -80 °C en el mismo medio, pero con glicerol al 12%.

### **3.7 Sobreexpresión y purificación de la G6PDH.**

Para realizar la sobreexpresión de la enzima G6PDH recombinante, se creció una colonia de *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformada en 80 mL de medio LBA durante 12 horas, a 37°C y 200 rpm. Posteriormente se inocularon 2400 mL de medio LBA con los 80 mL del cultivo, incubando bajo las mismas condiciones hasta que el cultivo alcanzara una densidad óptica entre 0.6-0.8 Abs, a 600 nm. En ese punto la temperatura se disminuyó a 22 °C y se agregó IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) para obtener una concentración final de 0.1 mM. El cultivo se mantuvo a 22°C durante 24 hrs, con una agitación de 200 rpm. Transcurrido este tiempo se centrifugó el cultivo a 3500 rpm durante 20 min a 4°C; las pastillas se resuspendieron en 230 mL de amortiguador de homogeneización (Tris HCl 50mM pH 7.8, CaCl<sub>2</sub> 2.5 mM), y el resuspendido fue dividido en cuatro partes iguales para sonicar las células con un sonicador Branson a 60 watts durante cuatro intervalos de 30 segundos cada uno, a una temperatura de 4 °C. El volumen total se centrifugó a 8000 rpm durante 40 min a 4°C y las pastillas obtenidas se resuspendieron con 240 mL de amortiguador de solubilización I (Tris HCl 20 mM, EDTA 1 mM, Tritón X-100 0.5%, pH 7.8), manteniendo una agitación a 4°C durante 45 min. La suspensión se centrifugó a 8000 rpm durante una hora a 4°C y el sobrenadante obtenido (≅ 230 mL) se concentró hasta 42 mL en una celda de ultrafiltración Millipore, utilizando una presión de 4.5 kg/cm<sup>3</sup> con gas nitrógeno de alta pureza. El concentrado fue diluido con 200 mL de amortiguador de lavado (Tris HCl 20 mM, EDTA 1

mM, pH 7.8) y vuelto a concentrar hasta 40 mL (este procedimiento se realizó en dos ocasiones). Los 40 mL obtenidos después del doble lavado fueron centrifugados a 3600 rpm durante 15 min a 4°C, y las pastillas resuspendidas con 50 mL de amortiguador de lavado, para volver a centrifugar a 3600 rpm durante 5 min a 4°C; estos lavados se hicieron con la finalidad de diluir el tritón en la muestra. Las últimas pastillas se resuspendieron en 100 mL de amortiguador de solubilización II (fosfatos de potasio 50 mM, EDTA 1mM, KCl 500 mM, CaCl<sub>2</sub> 3.5 mM y glicerol 10 %, pH 7.0), para mantener en suspensión la G6PDH recombinante. Al volumen final se agregaron 200 U de trombina (SIEMENS) (1 IU de trombina/mg de proteína recombinante) para liberar el péptido de unión a calmodulina que se expresó unido a la G6PDH (Fig. 5); la proteólisis se realizó a 22°C durante aproximadamente 32 hrs.

Esta mezcla se aplicó a una columna Fast Flow de Q-Sefarosa (2.7 X 6.5 cm) previamente equilibrada con buffer de fosfatos de potasio 50 mM pH 7.0 y KCl 100 mM. La columna fue lavada con 300 mL del mismo amortiguador, y la enzima eluída con 150 mL de un gradiente de sales de 300 a 500 mM de KCl en el amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.0, a una velocidad de flujo de 0.8 mL/min. La absorbancia del eluído fue monitoreada continuamente por espectrofotometría a una longitud de onda de 280 nm, durante 180 min, lo que permitió detectar las fracciones con mayor concentración de proteína. Estas fracciones fueron probadas para actividad de G6PDH mediante un método que se describe en la siguiente sección. A las fracciones con mayor actividad se les juntó, se les agregó glicerol hasta una concentración final del 10% y se les almacenó en alícuotas a una temperatura de -20°C.

### **3.8 Análisis de la proteína**

#### **3.8.1 Medición de la actividad enzimática.**

Para comprobar la presencia de la G6PDH durante las diferentes fases de la purificación, se determinó su actividad midiendo la velocidad inicial de producción de NADPH por medio de espectrofotometría, a una longitud de onda de 340 nm y en un medio de reacción estándar que contenía Tris/HCl 100 mM (pH 7.8), MgCl<sub>2</sub> 10 mM, NADP<sup>+</sup> 0.6 mM y glucosa-6 fosfato (G6P) 2.5 mM, en un volumen total de 0.5 mL y a una temperatura de 30 °C. La reacción se inició agregando 10 µl de la fracción que en teoría poseía actividad de G6PDH.

#### **3.8.2 Cuantificación de proteína.**

Se realizó la cuantificación de proteína por el método de Bradford (Bradford, 1976), que se basa en un cambio de absorbancia a una longitud de onda de 595 nm debido a la interacción de la proteína con el colorante azul de Coomassie G-250. Para la curva patrón se utilizó albúmina sérica de bovino (BSA) en un intervalo de 0.5 a 20 µg de proteína, en un volumen final de 200 µL. Para determinar la concentración de proteína en las distintas muestras, fracciones o de la misma G6PDH purificada, se diluyeron 10 µL de cada una de ellas en 190 µL de agua. La reacción se inició agregando 1 mL de reactivo de Bradford a cada uno de los tubos con 200 µL de solución patrón o problema. Después de una incubación de 15 minutos a temperatura ambiente se midió su absorbancia a 595 nm, para finalmente interpolar los datos obtenidos en la curva patrón de BSA.

### **3.8.3 Determinación de la masa molecular de la subunidad y de la estructura nativa de la G6PDH recombinante.**

Para la determinación del grado de purificación de la proteína G6PDH y del peso molecular de su subunidad se utilizó el sistema discontinuo y desnaturalizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) descrito por Laemmli (Laemmli, 1970). Las concentraciones de monómeros de acrilamida en los geles separador y concentrador fueron de 9% y 4%, respectivamente. Al final de la separación los geles fueron teñidos con azul de coomassie R-250 (Cornell University, BRC) o con nitrato de plata (Modificado de Morrissey 1981).

Para la determinación del peso molecular de la proteína nativa se utilizó la representación de Ferguson (Ferguson, 1964). Este método se basa en el gráfica semi-logarítmica de la movilidad electroforética de una proteína contra la concentración del gel en el que corre. Para ello se prepararon 8 geles nativos (sin SDS), según el sistema de Laemmli (Laemmli, 1970), en los que la concentración de los monómeros de la poliacrilamida en el gel separador fue de 5 a 12%, mientras que en todos ellos la concentración del gel concentrador era de 4%. El marcador utilizado fue albumina sérica de bovino (BSA), que se presenta como un monómero de 65 kDa y tres diferentes formas de agregación (dímero, tetrámero y hexámero). Los datos se graficaron y se interpolaron para determinar el peso molecular aproximado de la proteína nativa purificada.

### **3.8.4 Determinación de las propiedades cinéticas de la enzima recombinante purificada.**

Se realizó un estudio cinético de la enzima G6PDH purificada bajo condiciones similares a las descritas en la sección “Medición de la actividad enzimática” de este trabajo. La diferencia consistió en que en este caso se realizaron ensayos para determinar las



velocidades iniciales de la enzima en presencia de diferentes concentraciones de NADP<sup>+</sup> (desde 0.1 a 2.0 mM), pero manteniendo constante la del sustrato G6P (2mM); y viceversa, variando la concentración de G6P (desde 0.1 a 2.0 mM), pero manteniendo constante la de la coenzima NADP<sup>+</sup> (1.0 mM). La concentración de la enzima purificada en el medio de reacción fue de 1.7 µg/µL. Los datos obtenidos fueron analizados utilizando regresión no lineal en el programa de estadística y gráficos GraphPad Prism version 5.00, San Diego California USA. Una unidad de enzima se define como la cantidad de proteína que cataliza la formación de 1 µmol de sustrato en un minuto, en las condiciones estándar arriba descritas.

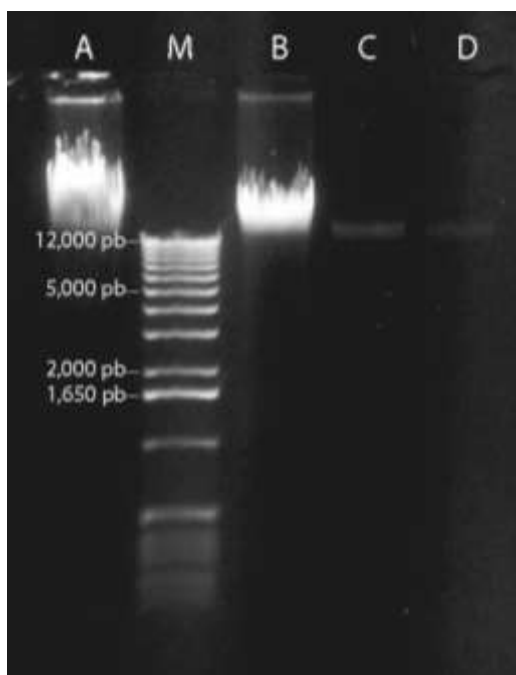
### **3.8.5 Análisis de la secuencia del gen *zwf*.**

Con el fin de confirmar la inserción del gen *zwf* en el plásmico pCAL-n, el vector se purificó con el kit QIAGEN Plasmid Midi y se envió a un servicio de secuenciación en la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) de la FES Iztacala.

## 4. Resultados

### 4.1 Purificación del ADN genómico.

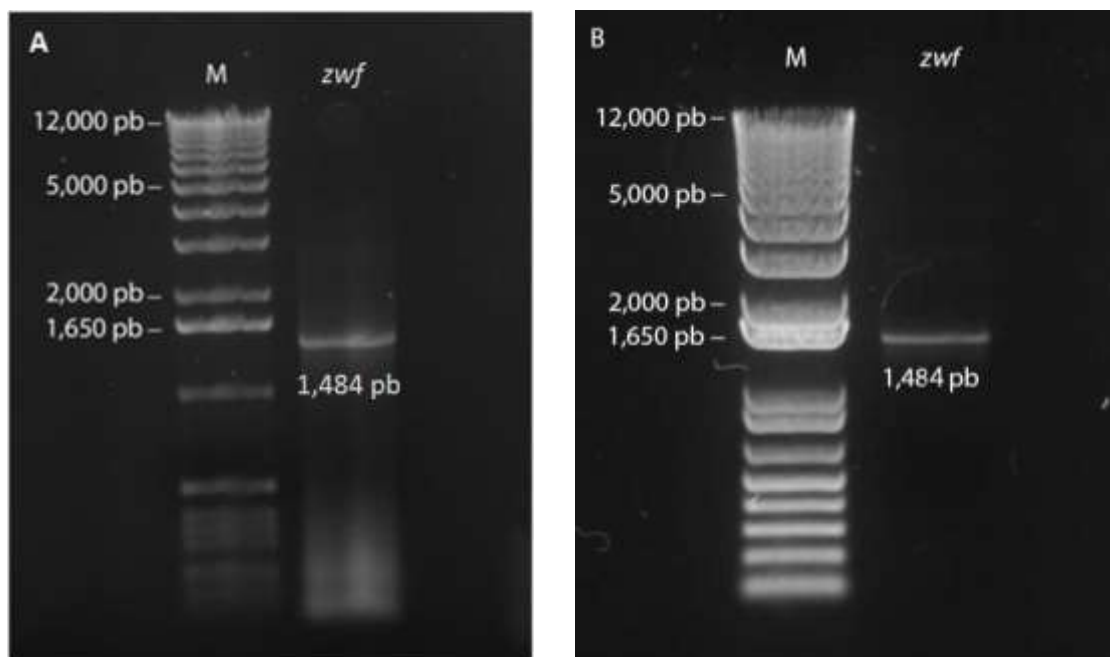
El ADN genómico de *P. aeruginosa* fue obtenido de células crecidas toda la noche en 5 mL de LB, de acuerdo al protocolo descrito por Wilson, 1997. Con este procedimiento las células son lisadas y las proteínas degradadas con proteinasa K, que es una proteasa de amplio espectro. Posteriormente las proteínas, polisacáridos y demás restos celulares se remueven por precipitación selectiva con CTAB, y el ADN de elevado peso molecular se recupera desde el sobrenadante a través de precipitación con isopropanol. El volumen de ADN genómico obtenido fue de 200  $\mu\text{L}$  con una concentración aproximada de 7.7  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , determinada mediante espectrofotometría y corroborada, junto con la pureza de la molécula, en un gel de agarosa (Fig. 6).



**Figura 6. Purificación del ADN genómico de *P. aeruginosa*.** El ADN fue separado por electroforesis en un gel de agarosa al 0.9 %. El volumen aplicado en cada poza fue de 3  $\mu\text{L}$  y la cantidad, de acuerdo al análisis por espectrofotometría, fue de 23.1 (A); 2.3 (B); 0.23 (C); y 0.023  $\mu\text{g}$  de ADN (D). M, marcadores de tamaño (1 kB DNA Ladder, GIBCO BRL).

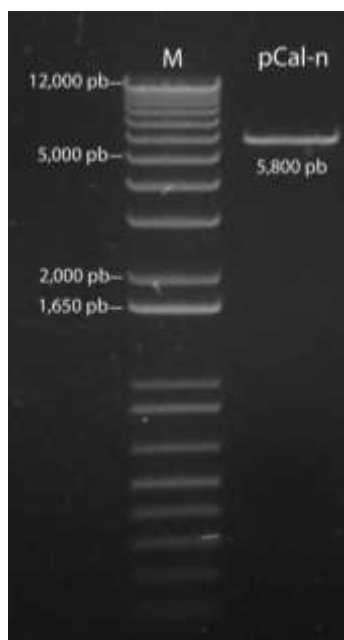
#### 4.2 Amplificación de *zwf* y purificación de este gen y del plásmido pCAL-n.

La amplificación del gen *zwf* se realizó mediante PCR utilizando el ADN genómico extraído de *P. aeruginosa* y los oligonucleótidos diseñados para este fin, y que se presentan en la Tabla 1 de la sección de “Material y Métodos”. En la Fig. 7A se muestra un gel de agarosa en el que se separó, junto con los marcadores de tamaño, el amplificado obtenido durante la PCR. La banda de interés tenía un tamaño similar al esperado, de 1484 pb (1469 del gen *zwf* más 15 de los oligonucleótidos). Lograda la amplificación se procedió a purificar la banda correspondiente utilizando el kit QIAquick Gel Extraction, de QIAGEN, y cuyos resultados se muestran en la Fig. 7B.



**Figura 7. Amplificación y purificación del gen *zwf* de *P. aeruginosa*.** El gen *zwf* amplificado por PCR (A) y purificado (B) fue separado por electroforesis en un gel de agarosa al 0.9 %. M, marcadores de tamaño.

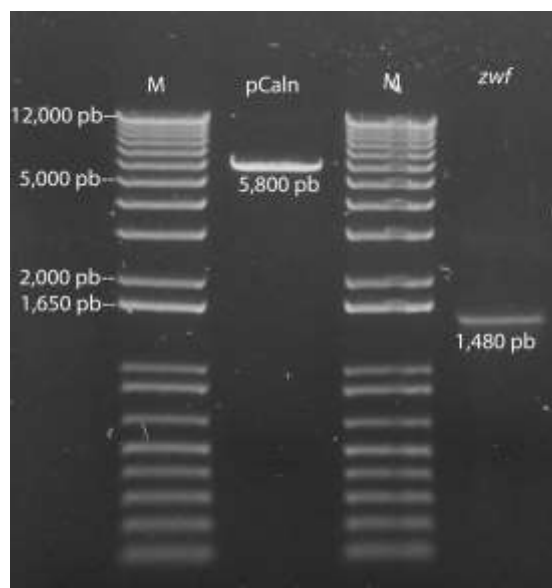
Amplificado y purificado *zwf*, se procedió a obtener y purificar, como se describe en Material y métodos, el plásmido pCAL-n que sería utilizado para la clonar este gen y para sobreexpresar la proteína de interés G6PDH. Entre las características que posee este vector, y que lo hacen apropiado para la sobreexpresión proteica, podemos destacar las siguientes: a) tiene múltiples sitios de restricción; b) posee el promotor y el terminador para la RNA polimerasa T7, que produce altos niveles de transcripción en *E. coli*; c) confiere resistencia hacia ampicilina a la bacteria que lo posee, facilitando la selección de la bacteria transformada; d) permite sobreexpresar la proteína de interés ligada a un péptido de unión a calmodulina, que facilita la purificación al mismo tiempo que éste es removido por acción de la enzima trombina. La Fig. 8 muestra la banda de aproximadamente 5,800 pb correspondiente a pCAL-n purificado.



**Figura 8. Aislamiento y purificación del Plásmido pCAL-n.** pCAL-n fue purificado con el kit QIAGEN Plasmid Midi desde *E. coli* DH5 $\alpha$  y separado por electroforesis en un gel de agarosa al 0.9 %. M, marcadores de tamaño (1 kB DNA Ladder, GIBCO BRL).

### 4.3 Clonación de *zwf* en pCAL-n.

Habiendo purificado el plásmido pCAL-n y el gen *zwf*, primero se digirió a ambos con la enzima *EcoRI*, y posteriormente con *BamHI* y *BglIII* (New England BioLabs Inc.), respectivamente; estas últimas, como ya se mencionó, producen extremos cohesivos compatibles. Se procedió luego a purificarlos y después a ligarlos. Consiguientemente se llevó a cabo la transformación de células de *E. coli* cepa DH5 $\alpha$  con el plásmido recombinante. Se seleccionaron las colonias transformadas por su resistencia a ampicilina y se purificó su plásmido. Para confirmar que el gen *zwf* se encontraba inserto en el vector aislado, se realizó una amplificación por PCR como se describe en la sección "Amplificación del gen *zwf*" de Material y métodos, utilizando el plásmido recién purificado como ADN molde y los oligonucleótidos *EcoRI* y *BglIII* ahí descritos. Como se observa en la Fig. 9, el producto de esta amplificación tuvo el tamaño aproximado de 1480 pb, que corresponde al del gen *zwf*.

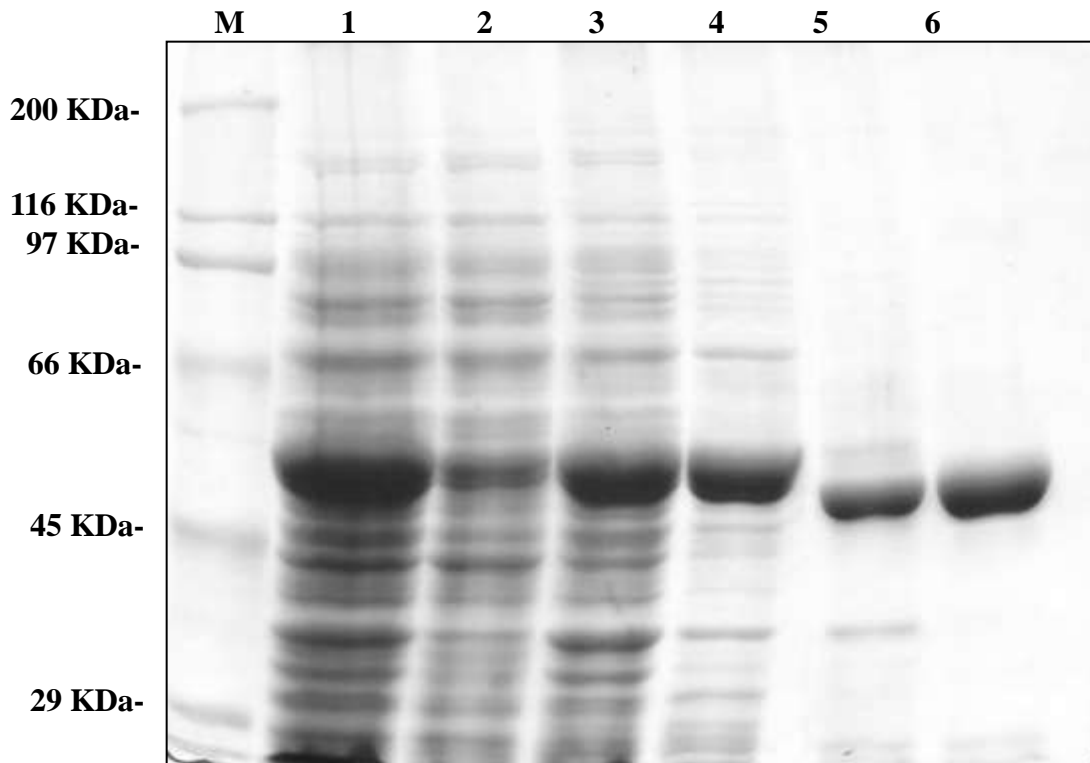


**Figura 9. Confirmación por PCR de la inserción del gen *zwf* en el vector pCAL-n.** El carril 1 muestra el plásmido amplificado por PCR, utilizando como ADN molde el plásmido aislado de la bacteria *E. coli* DH5 $\alpha$  transformada, el segundo carril muestra el gen *zwf* ambos se muestran después de haber sido digeridos con la enzima de restricción *EcoRI*. Se utilizó un gel de agarosa al 0.9 %. M, marcadores de tamaño (1 kb DNA Ladder, GIBCO BRL).

Habiendo confirmado que *zwf* se encontraba inserto en pCAL-n, células de *E. coli* BL21(DE3)pLysS fueron transformadas utilizando el plásmido recombinante. Se utilizó esta cepa debido a sus características que permiten una alta sobreexpresión de proteínas, especialmente si han sido transformadas con vectores que poseen el promotor T7, como pCAL-n, que permiten una acentuada transcripción.

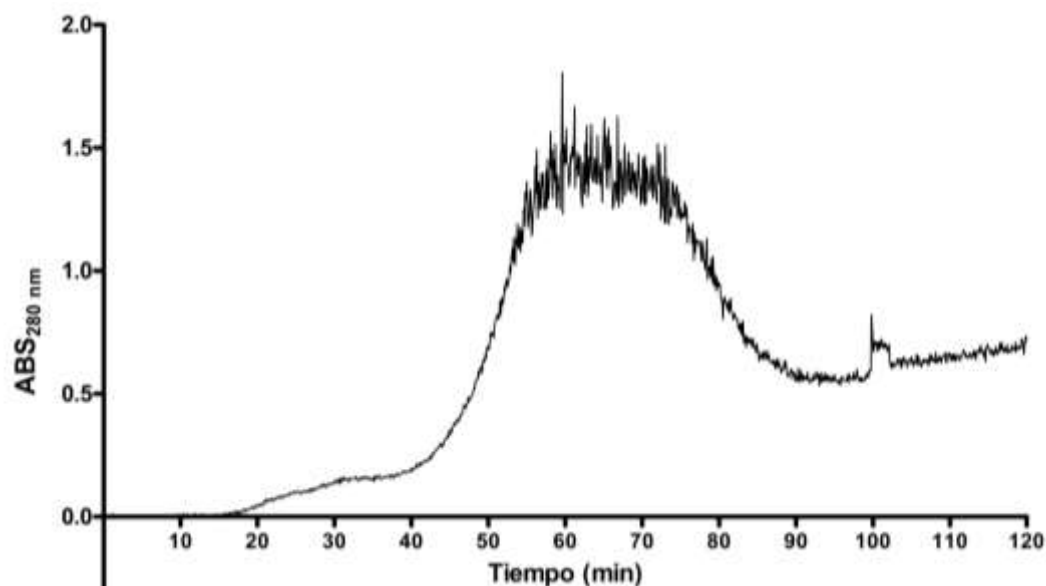
#### **4.4 Sobreexpresión y purificación de la G6PDH.**

Transformada la bacteria *E. coli* BL21(DE3)pLysS, en repetidas ocasiones se intentó sobreexpresar la proteína recombinante a una temperatura de 37 °C, sin obtener una cantidad considerable. La causa de esto parece ser la incapacidad de las células para plegar correctamente las proteínas recombinantes que se sintetizan a alta velocidad y en cantidades no fisiológicas en estas temperaturas (Sorensen and Mortensen 2005), y que se agrava por los bajos niveles de proteasas que caracterizan a la cepa BL21(DE3)pLysS utilizada para la sobreexpresión. El cambio en la expresión a 22 °C y durante un periodo de 24 h rindió mejores resultados, como se muestra en el carril 1 de la Fig. 10, en donde se observa una banda intensa con un peso molecular aproximado de 51 KDa. La proteína recombinante, sin embargo, resultó poco soluble, como lo demuestra su disminución en el sobrenadante obtenido después de centrifugar el extracto crudo (carril 2 de la misma figura). Por esta razón, se realizaron una serie de pasos para solubilizar la proteína recombinante, como se menciona en Material y métodos (carril 3 y 4, Fig. 10).



**Figura 10. Análisis de la purificación de G6PDH utilizando SDS-PAGE.** Extracto crudo (1), sobrenadante del extracto crudo (2), pastilla solubilizada en amortiguador de solubilización I (3), sobrenadante obtenido después de utilizar el amortiguador de solubilización II (4), digerido durante 32 hrs con 200 U de trombina (5) y eluido de la cromatografía de Q-Sefarosa Fast Flow (6). M, proteínas estándares de masa molecular conocida. La concentración del gel separador en el sistema discontinuo utilizado fue de 9%.

Después de la digestión con trombina la proteína recombinante fue unida a una columna de intercambio iónico de Q-Sefarosa Fast Flow, y después eluída con un incremento en la fuerza iónica del medio. Durante la elución de la G6PDH se realizó una medición de la absorbancia a 280 nm de cada una de las fracciones obtenidas, para determinar en cuáles de ellas se encontraba la proteína. Como se observa en la Fig. 11, las fracciones en las que eluyó la mayor concentración de proteína fueron de las del minuto 50 al 80 (cada una de ellas con aproximadamente 1 mL del eluido).



**Figura 11. Perfil de elución de G6PDH desde la cromatografía Q-Sefarosa Fast Flow.** La absorbancia presentada por el eluato de la resina fue monitoreada a una longitud de onda de 280 nm durante 120 min.

La medición de la actividad enzimática mediante espectrofotometría y la cuantificación de proteína mediante el método de Bradford en el extracto crudo, en la fracción solubilizada así como en el eluato de la resina de intercambio iónico, permitieron construir la tabla de purificación que se muestra a continuación.

**Tabla 3. Proceso de purificación de la G6PDH.**

Proceso	Proteína (mg)	Actividad específica (U/mg)	Actividad total (U)	Rendimiento (%)	Veces de purificación (%)
Extracto crudo	1681.53	8.15	14319.03	100	1
Q-Sefarosa	44.2	109.3	4833.06	33.75	12.83

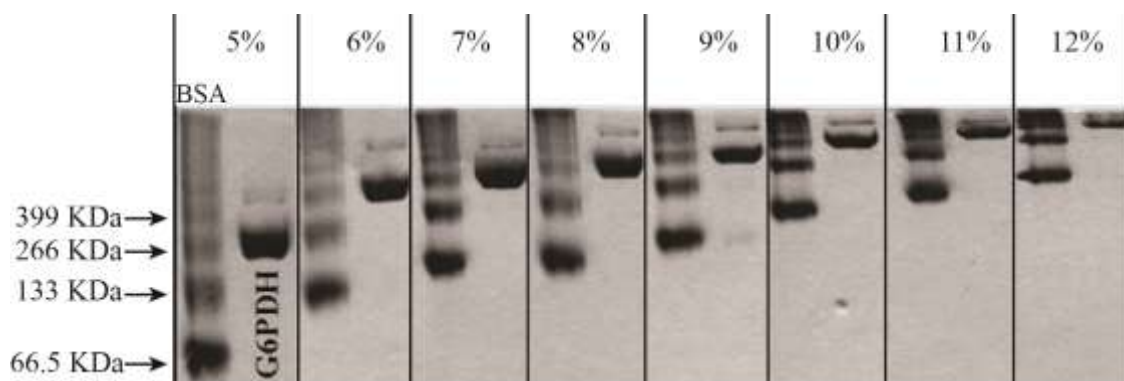
Haciendo una estimación en base a la actividad específica y al contenido de proteína en el sobrenadante del extracto crudo, se encontró que esta proteína constituye aproximadamente el 15% de la proteína soluble total en la bacteria transformante.



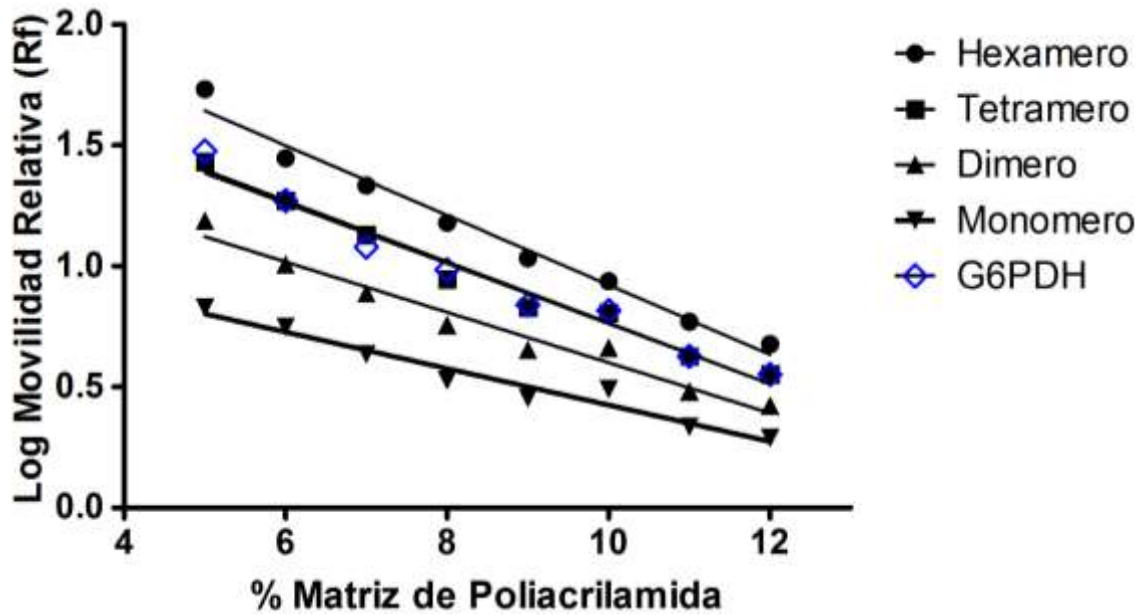
#### 4.5 Análisis de la proteína.

Purificada la proteína, se procedió a determinar su peso molecular aproximado en estado nativo mediante una gráfica de Ferguson (Fig. 13), en la que se grafica de manera semi-logarítmica la movilidad electroforética de una proteína contra la concentración de poliacrilamida de los diferentes geles en los que se separa. Para ello se utilizó como marcador la albúmina sérica de bovino (BSA) en diferentes estados de agregación (Atmeh *et al.*, 2007). La Fig. 12 muestra uno de los ocho geles no desnaturizantes utilizados aquí para la determinación de este parámetro.

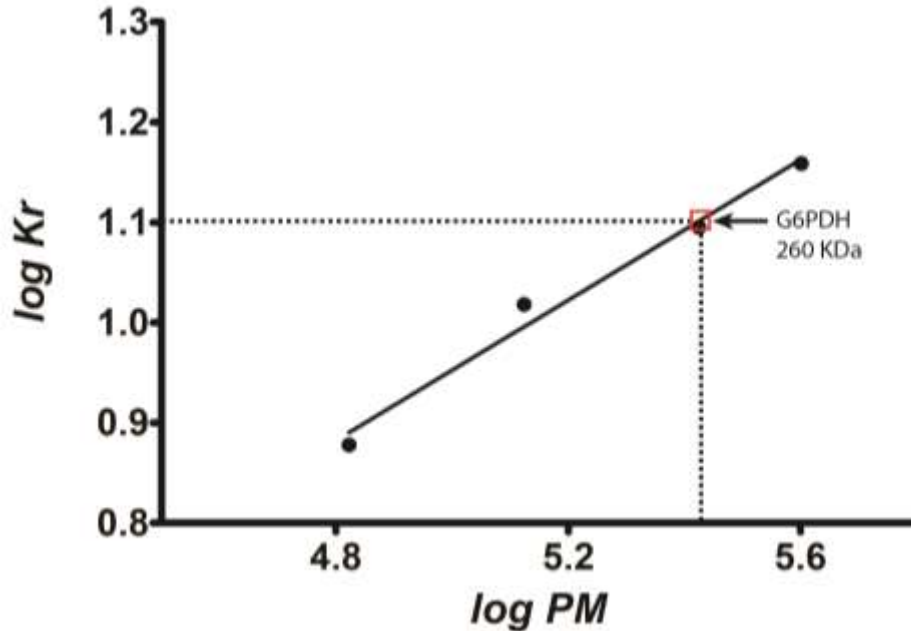
El peso molecular calculado fue de 260 KDa (Fig. 12), que sugiere que la proteína nativa es un tetrámero o un pentámero, de acuerdo al tamaño determinado para la subunidad por SDS-PAGE en el presente trabajo que muestra un peso aproximado de 49 KDa (Fig. 10, Carril 6), y al que teóricamente tendría la proteína que codificaría el gen *zwf* (55,620 Da).



**Figura 12. Separación de la G6PDH recombinante por electroforesis no desnaturizante en gel de poliacrilamida.** En el primer carril se observan las diferentes formas de agregación de la albúmina sérica de bovino (BSA) utilizadas como marcadores: monómero (66.5 KDa), dímero (133 KDa), tetrámero (266 KDa) y hexámero (399 KDa). En el segundo carril se separó la G6PDH recombinante purificada. Se muestran los dos primeros carriles de los geles con diferente concentración de acrilamida (%), alineados para su comparación.

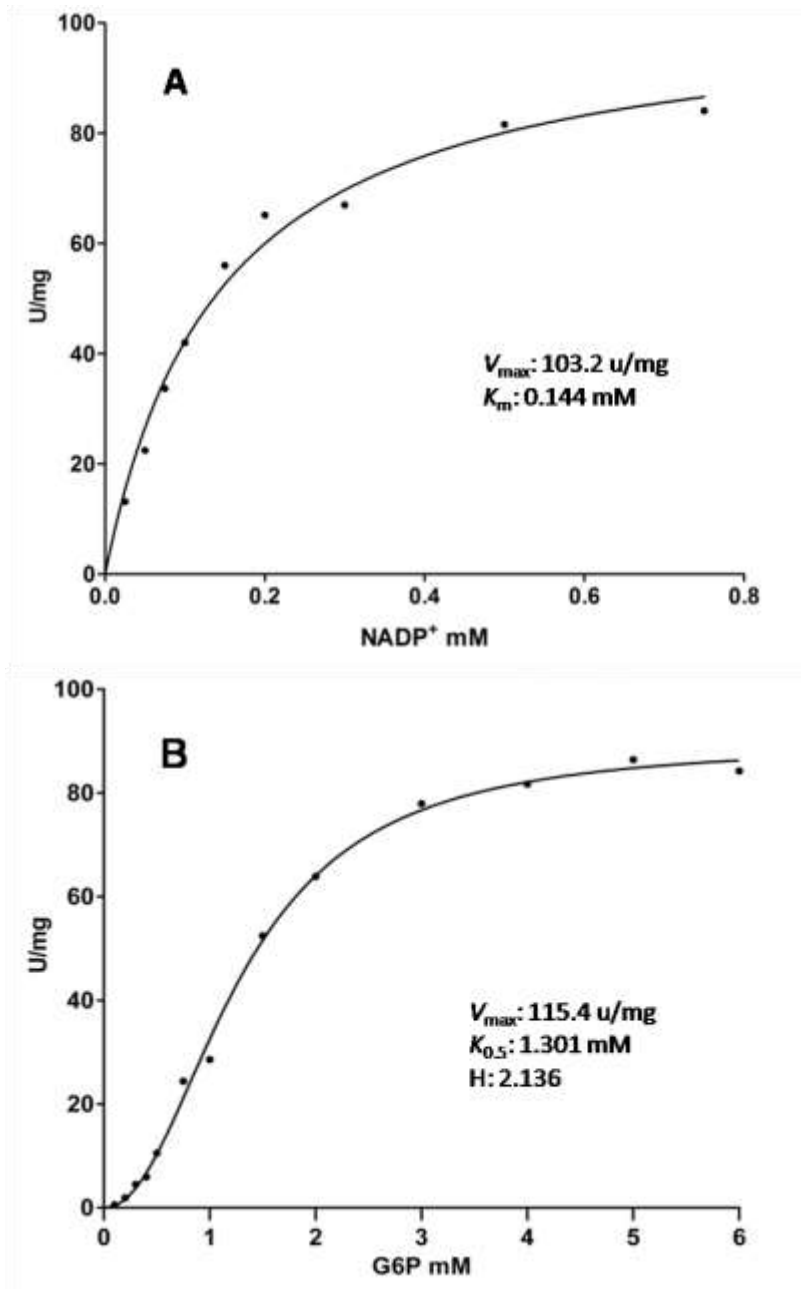


**Figura 13. Representación de Ferguson.** Las proteínas que se mencionan fueron separadas por electroforesis no desnaturalizante en 8 geles de poliacrilamida con diferente concentración de monómeros (5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12%). El gráfico muestra las líneas obtenidas con las movilidades relativas (Rf) que cada proteína presentó en los diferentes geles.



**Figura 14. Curva estandar para la determinación del peso molecular de la G6PDH.** Interpolación de los valores obtenidos mediante la representación de Ferguson (Kr) y el peso molecular (PM) en escala logarítmica. El peso molecular obtenido para la G6PD fue de 260 KDa.

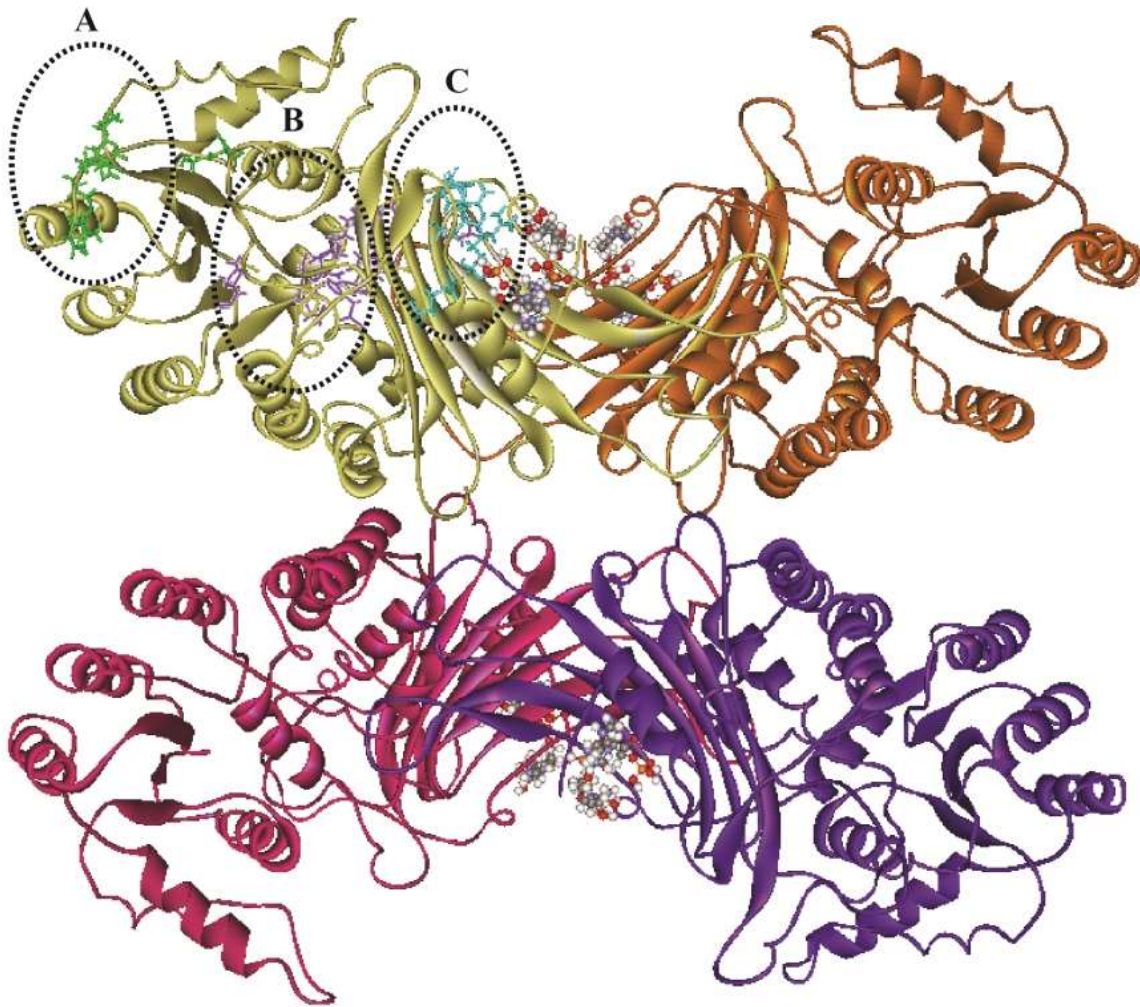
El siguiente objetivo fue determinar los parámetros  $K_m$  y  $V_{max}$  de la G6PDH recombinante, utilizando los sustratos G6P y  $NADP^+$ . Para ello se llevó a cabo un estudio cinético variando la concentración de uno de estos sustratos y manteniendo constantes las concentraciones de la enzima y del otro sustrato. En la Fig. 14A se puede observar un comportamiento hiperbólico cuando el sustrato variable es el  $NADP^+$ ; sin embargo, cuando se tiene una concentración constante de  $NADP^+$  y se varía la de la G6P, la enzima presenta un comportamiento sigmoidal, sugiriendo que la enzima presenta cooperatividad para la unión de esta molécula (Fig. 14B). Los valores de los parámetros cinéticos estimados se presentan en cada uno de los gráficos.



**Figura 15. Cinética de la G6PDH.** A) Se utilizó una concentración 2 mM del sustrato G6P y concentraciones crecientes del cofactor NADP<sup>+</sup> 0.025 a 0.750 mM. B) Se utilizó una concentración 1 mM de NADP<sup>+</sup> y concentraciones crecientes de G6P 0.1 a 6 mM (B). El medio de reacción llevaba además Tris/HCl 400 mM, MgCl<sub>2</sub> 40mM y un pH 8.0 .La concentración de G6PDH recombinante en el medio fue de 1.7 µg/µL.



Con la secuencia obtenida se realizó una predicción de la estructura terciaria de la G6PDH recombinante en el servidor SWISSMODEL (<http://swissmodel.expasy.org>) (Biasini *et al.*, 2014), utilizando como modelo la estructura de la enzima G6PDH de humano (Kotaka *et al.*, 2005), que también es un tetrámero y aparece en el Protein Data Bank con el identificador 2BHL. Las secuencias de estas dos proteínas tienen una identidad y una similitud del 37% y 56% respectivamente.



**Figura 17. Predicción de la estructura terciaria de la G6PDH recombinante de *P. aeruginosa*.** Encerrados en círculos se muestran los sitios de unión a la coenzima NADP<sup>+</sup> (A), a G6P (B) y al NADP<sup>+</sup> estructural (C).

## 5 Discusión

La G6PDH es una enzima fundamental en la vía de ED para el metabolismo de hexosas de la familia *Pseudomonaceae*. Además, como se mencionó en la introducción, esta enzima parece ser importante para la bacteria al participar, de manera indirecta, en el combate al estrés oxidativo, al sintetizar el NADPH que utilizan las enzimas glutatión peroxidasa y la alquil hidroperóxido reductasa (Christman *et al.*, 1985), que se involucran directamente en la detoxificación de ERO. Estos antecedentes sugieren que G6PDH podría ser una enzima esencial para *P. aeruginosa*, por lo que el conocimiento de sus características fisicoquímicas y cinéticas, podrían ayudar a combatir en el futuro las infecciones provocadas por esta bacteria, utilizando esta molécula como blanco de compuestos antipseudomónicos. Para iniciar este tipo de estudios, sin embargo, es necesario contar con la enzima pura y en cantidades suficientes, que fue el objetivo principal de este trabajo.

Por esta razón se purificó la G6PDH para conocer sus parámetros fisicoquímicos y cinéticos, y así contribuir al entendimiento de la resistencia al estrés oxidativo por parte de *P. aeruginosa*.

A partir de la obtención de la primer molécula de ADN recombinante, a principios de la década de los 70's, y cuando a finales de esta década se obtuvieron las primeras proteínas recombinantes, la biología molecular moderna proporcionó una nueva perspectiva a la proteómica, ya que permitió la obtención de grandes cantidades de proteínas, no solo para su uso terapéutico, sino también para su estudio y análisis. Desde entonces se han sobreexpresado, purificado y caracterizado proteínas de cientos de organismos, mediante

diferentes metodologías, aprovechando la capacidad de clonar material genético de otros organismos dentro de bacterias competentes.

Para lograr la sobreexpresión de la G6PDH, en este estudio primero se amplificó el gen *zwf* y se le clonó en el plásmido pCAL-n, para después transformar con este vector las células competentes de *E. coli* BL21(DE3)pLysS. Para la amplificación del gen se diseñaron los oligonucleótidos, mencionados en el apartado de material y métodos; sin embargo, el oligonucleótido forward con sitio de unión para la enzima de restricción *NdeI* fue descartado debido a que los fragmentos digeridos con esta enzima, presentan baja eficiencia en la ligación (Chang, *et al.*, 2005, Gagnon, 2005; Choi, 2006 y Liao, 2009). Aunque las causas de esto no son del todo claras, se sugiere, sin embargo, que esto se debe a que el corte con la enzima genera fragmentos con los cuales la ligasa no puede formar el enlace fosfodiéster entre el hidroxilo 3' y el fosfato 5', del amplificado de ADN y el vector (Choi, 2006; Liao, 2009). En otros estudios se ha aumentado la eficiencia ligando durante más de 22 horas (Chang, *et al.*, 2005); sin embargo, a pesar de que aquí se dejó ligando durante aproximadamente 24 horas, no se observaron clones viables después de la transformación. Debido a esto, se decidió continuar con un oligonucleótido alternativo que poseía un sitio de unión para la enzima *BglII*, la que se utilizó para cortar el gen, una vez que se amplificó y purificó. Para el corte del plásmido pCAL-n, sin embargo, se utilizó la enzima *BamHI*, ya que las secuencias resultantes de la digestión con estas dos enzimas son complementarias (New England BioLabs Inc.), además de que el corte con esta última enzima no interfería con el marco de lectura que interesaba para la expresión de *zwf*. Mediante el uso de estas enzimas de restricción se logró obtener el ADN recombinante, transformar las células y sobreexpresar la proteína de interés.



Como se mencionó anteriormente, se ha purificado la G6PDH de diferentes organismos procariontes (Scopes *et al.*, 1985; Anderson y Anderson, 1995; Moritz *et al.*, 2000; Sung y Lee, 2007), y la mayoría de estas purificaciones se realizaron mediante cromatografía de intercambio iónico. En las especies *multivorans* C y *fluorescens* W6, del género *Pseudomonas*, esto también se logró mediante columnas de intercambio iónico y de afinidad (Vander Wyk y Lessie, 1974; Lessman *et al.*, 1975; Ben-Bassat y Goldberg, 1980, Reuter *et al.*, 1990). En la especie *P. aeruginosa*, además de una purificación realizada en 1967 por Lessie y Neidhart, en 1990 Ma *et al.* purificaron la G6PDH utilizando precipitación con sulfato de amonio, una columna de intercambio iónico DE-52 DEAE (Dietilaminoetil) celulosa, otra de adsorción en hidroxilapatita y una más de filtración molecular (Bio-gel 150). Una de las principales diferencias entre la purificación realizada por Ma *et al.* (1990) y la de este trabajo, es que en el proceso de purificación, se utilizan menos columnas cromatográficas, lo cual representa una ventaja, pues así se disminuyen los procesos de costo y tiempo, además de proporcionar un mayor rendimiento. En 1999, Velasco-García y colaboradores sobreexpresaron y purificaron a la BADH mediante una cromatografía de intercambio iónico, usando una columna con resina Q-Sefarosa Fast Flow, y otra de afinidad, con la resina 2'5'-ADP-Sefarosa. De hecho, fue esta metodología en la que el presente estudio se basó inicialmente, debido a las semejanzas que presentan la BADH y la G6PDH de *P. aeruginosa*, ya que además de ser deshidrogenasas, presentan similitudes en cuanto a punto isoeléctrico y afinidad por el NADP<sup>+</sup>. Previo a la utilización de la columna de Q-Sefarosa Fast Flow, se pasó el primer sobrenadante del extracto celular a través de una columna de 2'5'-ADP-Sefarosa, bajo condiciones similares a las utilizadas en 1999 por Velasco-García y colaboradores; esto con el propósito de comprobar si era posible purificar la G6PDH de *P. aeruginosa* mediante la misma metodología. La resina 2'5'-ADP-Sefarosa presenta ADP, un análogo de NADP<sup>+</sup>, y se

utiliza en la purificación de enzimas deshidrogenasas que utilizan este cofactor. Sin embargo la proteína G6PDH purificada no se unió a la resina, a pesar de utilizar condiciones que podrían propiciar una mayor afinidad de la enzima por el NADP<sup>+</sup> (pH óptimo para su actividad *in vitro*, presencia del sustrato G6P y de Ca<sup>++</sup>, baja fuerza iónica, etc.). Probablemente exista algún impedimento estérico en la estructura de la enzima que dificulta la interacción entre su sitio activo y el cofactor enlazado a la resina. A partir de esto se decidió utilizar únicamente la columna de intercambio iónico Q-Sefarosa Fast Flow, obteniendo resultados positivos.

Se sabe que durante el proceso de sobreexpresión algunas proteínas no se pliegan correctamente, formando agregados que dificultan su posterior purificación. La causa de esto puede ser la acumulación de concentraciones altas de intermediarios de plegamiento o un reconocimiento ineficiente por parte de las chaperonas que las guían durante el proceso (Zhang *et al.*, 2004). Este fenómeno puede ser reducido al cultivar las bacterias a temperaturas bajas (Sørensen y Mortensen, 2005); fue por esta razón que durante la sobreexpresión de la proteína se disminuyó la temperatura de 37 a 22 °C, logrando una mayor actividad de G6PDH en el extracto celular, en comparación a la obtenida a 37 °C. Sin embargo, al avanzar en el proceso de purificación pudo constatarse que a pesar de estar activa, la proteína recombinante formó agregados que precipitaron durante la primera centrifugación a 8,000 rpm. Esta agregación puede deberse, por un lado a la alta cantidad de proteína sobreexpresada, y por otro, a la presencia del péptido de unión a calmodulina (CBP) enlazado a la enzima recombinante, que podría disminuir su solubilidad. En un intento por aprovechar esta precipitación como otro paso de la purificación, los agregados insolubles se trataron con tritón X-100, un detergente aniónico que solubiliza la proteína sin desnaturalizarla.

Previo a pasar la proteína por la columna de intercambio iónico se realizó una ultrafiltración para remover el detergente, volviendo a solubilizarla utilizando KCl 500mM y liberándola después del CBP por proteólisis con trombina (Fig. 10).

Como se muestra en la tabla 3 la enzima fue purificada obteniendo un rendimiento aproximado de 33%, y 44.2 mg. Estos resultados demuestran que la purificación es más eficiente que la realizada por Ma *et al.*, en 1998, en la que obtuvieron 500 µg de proteína pura partiendo de un volumen inicial de 4 litros de medio de cultivo, que contrasta con los 44.2 mg obtenidos en este trabajo, partiendo de un volumen de 2.4 litros de medio de cultivo.

Se ha reportado que la G6PDH de diversos organismos existe como monómero (Kanji *et al.*, 1976; Özer *et al.*, 2002), dímero (Cohen y Rosemeyer, 1969; Kanji *et al.*, 1976; Steinbach *et al.*, 1978; Sundaram *et al.*, 1998; Iyer *et al.*, 2002), tetrámero (Cohen y Rosemeyer, 1969; Niehaus y Dilts, 1984; Scopes *et al.*, 1985; Rangunathan y Levy, 1994; Anderson y Anderson, 1995; Sundaram *et al.*, 1998; Verma *et al.*, 2013) y hexámero (Sundaram *et al.*, 1998); sin embargo, solo las formas de dímero y tetrámeros son activas enzimáticamente (Singh y Srivastava, 2012). Para la enzima del eritrocito humano se ha reportado un peso de 105 a 190 KDa, similar lo reportado por Lessie y Neidhart en 1967. En *Pseudomonas W6* se estimó un peso de 123 ±5 KDa en su forma nativa y de 61 KDa cuando la cadena de polipéptidos fue desnaturalizada (Reuter *et al.*, 1990). En el trabajo realizado en 1967, Lessie y Neidhart determinaron en base a su sedimentación en gradiente de sacarosa el peso molecular de la G6PDH purificada de *P. aeruginosa*, obteniendo un aproximado de 190 KDa.

En este trabajo, se hizo una estimación del peso molecular a partir de la secuencia proteica del gen *zwf*, mediante la herramienta Compute pI/Mw de EXPASY ([http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/)), se obtuvo un peso molecular aproximado de 55.6 para la subunidad. El peso molecular del monómero de G6PDH, determinado mediante una electroforesis de SDS PAGE al 9%, fue de aproximadamente 49 KDa. Sin embargo hay que considerar que durante este tipo de electroforesis el complejo proteína-SDS asume la misma conformación linear la cual varia dependiendo su peso molecular, además en esta técnica se asume que todas las proteínas cuentan con la misma proporción que es 1.2-1.4 SDS/g de proteína. Sin embargo factores como un bajo nivel de SDS al estimado puede disminuir la movilidad de la proteína (Hjelmeland y Chrambach, 1981, Sallantin et al., 1990). Estos factores pueden afectar la estimación de peso molecular, sin embargo esta técnica resulta útil para tener una aproximación al peso verdadero y para supervisar el curso del proceso de purificación, como se observa en la figura 10.

El peso molecular para la G6PDH en estado nativo determinado, mediante el gráfico de Ferguson, fue de  $\approx 260$  KDa. En el caso de la representación de Ferguson se utiliza una matriz de poliacrilamida en diferentes concentraciones, cabe destacar que este método no utiliza SDS para desnaturalizar la proteína el cual modifica la conformación original de la proteína. Se podría decir que el peso determinado mediante esta técnica es más preciso, debido a que se utiliza la interpolación de datos obtenidos en función de diferentes concentraciones de poliacrilamida. En este estudio se utilizaron 10 diferentes concentraciones aumentando el número representativo de datos para una mejor estimación, además de mostrar un peso muy similar al estándar del tetrámero de BSA (266 kDa) lo cual nos lleva a suponer que esta proteína se encuentra en esta forma de agregación. Este resultado es el más parecido a la

predicción mencionada anteriormente donde se muestra un peso de 220 kDa, el cual se basa en el peso molecular de los residuos aminoácidos que presenta la secuencia proteica. El mejor método para confirmar si el peso molecular concuerda con la predicción *in silico* sería una espectrometría de masas, lo cual se podría considerar para futuros estudios de esta proteína.

En los ensayos de cinética de la enzima se observa que al tener una alta concentración constante de G6P (2 mM), con diferentes concentraciones de NADP<sup>+</sup>, la curva se ajusta a la ecuación de Michaelis-Menten; es decir, presenta un comportamiento hiperbólico o “michaeliano”. Los valores que se determinaron mediante esta ecuación fueron una  $K_m$  de 144  $\mu$ M y una  $V_{max}$  de 103.2 u/mg. Este valor de  $K_m$  contrasta con el obtenido en la purificación realizada por Ma *et al.*, en 1998, que fue de 57 $\mu$ M. Desconocemos la razón de esta diferencia, pero en el futuro, un análisis cinético minucioso de la G6PDH recombinante purificada en este trabajo nos permitirá corroborar si estas diferencias son ciertas.

Cuando se utilizó una concentración constante pero saturante de NADP<sup>+</sup> (1mM), y concentraciones crecientes de G6P 0.1 a 6 mM la curva de actividad de la G6PDH presentó un comportamiento sigmoide. Este comportamiento es característico de una interacción cooperativa dentro de la cinética enzimática. Se considera que los sitios activos de una enzima actúan de manera cooperativa cuando la afinidad de unión de un sitio activo es afectado por la ocupación de un ligando en otro sitio activo (Volkenstein y Goldstein, 1965, Copeland, 2002). Los valores que resultaron del análisis de esta gráfica fue una  $K_{0.5}$  de 1.301 mM,  $V_{max}$  de 115.4 u/mg y un coeficiente de Hill ( $h$ ) de 2.136. Cabe mencionar que el coeficiente de Hill describe la cooperatividad de unión de los ligandos, cuando este valor es igual a 1 no existe cooperatividad y la ecuación es idéntica a la de Michaelis-Menten, pero cuando este valor es mayor a 1, como es el caso, la curva es sigmoidea, debido a la cooperatividad. El coeficiente

de Hill es un índice conveniente para medir la cooperatividad, sin embargo no es una medida directa del cambio de energía liberada que debe existir en sistemas cooperativos (Copeland, 2002). La mayoría de los estudios en los que se ha evaluado la actividad enzimática de la G6PDH de diferentes organismos muestran una cinética en hipérbola, sin embargo se han reportado cinéticas sigmoides en cianobacterias (Schaeffer y Stainer, 1978). En *Zymomonas mobilis* se ha reportado un control alostérico de la G6PDH por parte del fosfoenolpiruvato (Scopes, 1997). Se propone que en un futuro se estudie más a fondo esta aparente cooperatividad de la proteína en *P. aeruginosa*, pues de corroborarse esta propiedad, la categoría que actualmente se le da a esta enzima podría modificarse, al considerársele no únicamente como enzima generadora de poder reductor, y por ende importante para la adaptación a condiciones de estrés oxidativo, sino además, un potencial sitio de regulación en el metabolismo de carbohidratos para esta bacteria.

## 6 Conclusiones

- Se clonó el gen *zwf* que codifica para la enzima G6PDH de *P. aeruginosa* y ésta se sobreexpresó a un nivel que constituyó aproximadamente el 15% de la proteína soluble de las células de *E. coli*-transformantes.
- Se estandarizó una metodología que permite purificar hasta 18.41 mg de la enzima G6PDH recombinante por litro de cultivo de la bacteria transformante, utilizando principalmente precipitación con  $\text{CaCl}_2$  y fraccionamiento en columna de intercambio iónico.
- Se corroboraron algunas propiedades de la enzima (masa molecular, estructura cuaternaria, parámetros cinéticos básicos y cooperatividad hacia el sustrato G6P), que

nos permiten decir que la proteína recombinante es muy similar a la purificada desde *P. aeruginosa*.

## **7. Perspectivas**

Finalmente se espera que mediante este método de purificación de la G6PDH de *P. aeruginosa*, que permite un alto rendimiento a través de una metodología rápida se puedan realizar estudios a futuro que profundicen en las propiedades bioquímicas y cinéticas de esta enzima para tener un mejor entendimiento de su participación en la resistencia al estrés oxidativo, así como en la búsqueda de inhibidores de la enzima que en el futuro pudieran utilizarse para inhibir el crecimiento de la bacteria. A su vez, ya conocido el modelo estructural de la proteína se puede estudiar que residuos son de mayor importancia para el funcionamiento de esta enzima y mediante mutagénesis sitio específica se podrían crear variantes de la enzima. Sin embargo el grado de pureza obtenido en este trabajo no es suficiente para generar cristales que puedan ser analizados mediante difracción de rayos-x y así identificar su verdadera estructura tridimensional.

## 8. Referencias

- Anderson, B.M. y Anderson, C.D. 1995. Purification and characterization of *Azotobacter vinelandii* glucose-6-phosphate dehydrogenase: dual coenzyme specificity. *Archives of biochemistry and biophysics* 321: 94-100.
- Atmeh, R.F., Arafa, I.M. y Al-Khateeb, M. 2007. Albumin Aggregates: Hydrodynamic Shape and Physico-Chemical Properties. *Jordan Journal of Chemistry* 2(2): 169-182.
- Ben-Bassat, A. y Goldberg, I. 1980. Purification and Properties of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase ( $\text{NADP}^+/\text{NAD}^+$ ) and 6-Phosphogluconate Dehydrogenase ( $\text{NADP}^+/\text{NAD}^+$ ) from Methanol-Grown *Pseudomonas C.* *Biochimica et Biophysica Acta* 611: 1-10.
- Berger, A., Dohnt, K., Tielen, P., Jahn, D., Becker, J. y Wittman, C. 2014. Robustness and plasticity of metabolic pathway flux among uropathogenic isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLOS one* 9(4): e88368.
- Biasini, M., Bienert, S., Waterhouse, A., Arnold, K., Studer, G., Schmidt, T., Kiefer, F., Gallo Cassarino, T., Bertoni, M., Bordoli, L., y Schwede, T. (2014). SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Research*; 42:252-258.



- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-257.
- Bowler, R.P. y Crapo, J.D. 2002. Oxidative stress in allergic respiratory diseases. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 110(3):349-356.
- Cabello, R. 2007. Pseudomonas. En: *Microbiología y Parasitología Humana*. Editorial Médica Panamericana, pp. 875-876.
- Chang, E., B. Ge, M. Lee, So, M. y W. Wang. 2005. Investigation of the ligation efficiency of NdeI digested fragments. *Journal of Experimental Microbiology and Immunology* 7: 68-72.
- Christman, M.F., Morgan, R.W., Jacobson, F.S. y Ames B.N. 1985. Positive control of a regulon for defenses against oxidative stress and some heat-shock proteins in *Salmonella typhimurium*. *Cell* 3(41): 753-762.
- Choi, C. 2006. Exploring the availability of NdeI cut ends for additional molecular reactions. *Journal of Experimental Microbiology and Immunology* 10: 46-49.
- Ciofu, O., Riis, B., Pressler, T., Enghusen, H.P. y Høiby, N. 2005. Occurrence of Hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis Patients Is Associated with Oxidative Stress Caused by Chronic Lung Inflammation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49(6): 2276-2282.

- Cohen, P. y Rosemeyer, M.A. 1969. Subunit interactions of glucose-6-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes. *European Journal of biochemistry* 8: 8-15.
- Collier, D., Hager, P. y Phibbs, P. 1996. Catabolite repression control in the Pseudomonads. *Research in Microbiology* 147: 551-561.
- Conway, T. 1992. The Entner- Doudoroff pathway: history, physiology and molecular biology. *FEMS Microbiology Reviews* 103: 1-28.
- Copeland, R.A. 2002. Cooperativity in Enzyme Catalysis. *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis*.367-384.
- Cornell University. Proteomics and Mass Spectrometry Facility, B RC. 2013. *Coomassie Blue Staining Protocol*. Disponible en: [http://www.biotech.cornell.edu/sites/default/files/uploads/Documents/Proteomics\\_protocols/Protocol%2005\\_Coomassie.pdf](http://www.biotech.cornell.edu/sites/default/files/uploads/Documents/Proteomics_protocols/Protocol%2005_Coomassie.pdf).
- Davies, J.C. 2002. *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: pathogenesis and persistence. *Pediatric Respiratory Reviews* 3: 128-134.
- Donaldson, S.H., Bennett, W.D., Zeman, K.L, Knowles, M.R., Tarran, R. y Boucher, R.C. 2006. Mucus Clearance and Lung Function in Cystic Fibrosis with Hypertonic Saline. *The New England Journal of Medicine* 354: 241-250.
- Ferguson, K.A. 1964. Starch-gel electrophoresis-application to the classification of pituitary proteins and polypeptides. *Metabolism* 13(10): 985-1002.
- Gadsby, D.C., Vergani, P. y Csanády, L. 2006. The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis. *Nature* 440: 477-483.

- Gagnon, J. 2005. Investigation of the Effect of NdeI on DNA Fragments Destined for Ligation. *Journal of Experimental Microbiology and Immunology* 8: 21-26.
- Gilfillan, A.M., Chu, A.J., Smart, D.A. y Rooney, S.A. 1983. Single plate separation of lung phospholipids including disaturated phosphatidylcholine. *Journal of Lipid Research* 24: 1651-1656.
- Govan, J.R.W. y Deretic, V. 1996. Microbial Pathogenesis in Cystic Fibrosis: Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiological Reviews* 60(3): 539-574.
- GraphPad version 5.00. Disponible en: [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com).
- Hassett, D.J. y Cohen, M.S. 1989. Bacterial adaptation to oxidative stress: implications for pathogenesis and interaction with phagocytic cells. *The FASEB Journal* 3: 2574-2582.
- Hjelmeland, L.M. y Chrambach, A., *Electrophoresis* 1981, 2, 1-11
- Hoboth, C., Hoffman, R., Eichner, A., Henke, C., Schmoldt, S., Imhof, A., Heesemann, J. y Hogardt, M. Dynamics of Adaptive Microevolution of Hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* during Chronic Pulmonary Infection in Patients with Cystic Fibrosis. *Journal of Infectious Diseases* 200: 118-130.
- Hoffman, N., Rasmussen, T.B., Jensen, P.O., Stub, C., Hentzer, M., Molin, S., Ciofu, O., Givskov, M., Johansen, H.K. y Høiby, N. 2005. Novel Mouse Model of Chronic *Pseudomonas aeruginosa* Lung Infection Mimicking Cystic Fibrosis. *Infection and Immunity* 73: 2504-2514.

- Hunt, H.C. y Phibbs Jr., P.V. 1983. Regulation of Alternate Peripheral Pathways of Glucose Catabolism During Aerobic and Anaerobic Growth of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 2(154): 793-802.
- Iyer, R.B., Wang, J. y Bachas, L.G. 2002. Cloning, expression and characterization of the *gsdA* gene encoding thermophilic glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Aquifex aeolicus*. *Extremophiles* 6: 283-289.
- Kanji, M.I., Toews, M.L. y Carper, W.R. 1976. Glucose-6-phosphate dehydrogenase purification and partial characterization. *The journal of biological chemistry* 251(8): 2255-2257.
- Kotaka, M., Gover, S., Vandeputte-Rutten, L., Au, S. W. N., Lam, V. M. S. y Adams, M. J. 2005. Structural studies of glucose-6-phosphate and NADP<sup>+</sup> binding to human glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Acta Crystallographica* 61:495-504.
- Laemmli, U.K. 1970. Most commonly used discontinuous buffer system for SDS electrophoresis. *Nature* 227: 680-685.
- Leid, J.G., Willson, M.E., Shirliff, M.E., Hasset, D.J., Parsek, R.M. y Jeffers A.K. 2005. The Exopolysaccharide Alginate protects *Pseudomonas Aeruginosa* Biofilm Bacteria from IFN- $\gamma$ - Mediated Macrophage Killing. *The Journal of Immunology*. 174:7512-7518.
- Lessie, T. y Neidhardt, F.C. 1967. Adenosine Triphosphate-Linked Control of *Pseudomonas aeruginosa* Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase. *Journal of Bacteriology* 93(4): 1337-1345.

- Lessie T. y Phibbs Jr.P.V. 1984. Alternative pathway of carbohydrate utilization in pseudomonads. *Annual Review of Microbiology* 38: 359-387.
- Lessman, D., Schimimz, K.L. y Kurz, G. 1975. D-Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (Entner-Doudoroff Enzyme) from *Pseudomonas fluorescens*. *European Journal of Biochemistry* 59: 545-559.
- Liao, L. 2009. Investigating Whether NdeI-Cut Ends are Available to Incorporate Deoxynucleotides. *Journal of Experimental Microbiology and Immunology* 13: 100-103.
- Ma, J.-F., Hager, P.W., Howell, M.L., Phibbs, P.V. y Hassett, D.J. 1998. Cloning and Characterization of the *Pseudomonas aeruginosa zwf* Gene Encoding Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase, an Enzyme Important in Resistance to Methyl Viologen (Paraquat). *Journal of Bacteriology* 180(7): 1741-1749.
- Marcos-Vilchis, A.I. 2014. Participación de las enzimas betaina aldehído y glucosa-6-fosfato deshidrogenasas en la tolerancia de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 hacia el estrés oxidativo. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. 74 páginas.
- Mena, K.D. y Gerba, C.P. 2009. Risk assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in water. En: *Reviews of enviromental contamination and toxicology* 201: 71-115.
- McCarthy, K. 2015. *Pseudomonas aeruginosa*: evolution of antimicrobial resistance and implications for therapy. *Seminars in respiratory and critical care medicine* 36: 44-55.

- McCowen, S.M., Phibbs Jr., P.V. y Feary, T.W. 1981. Glycerol Catabolism in Wild-Type and Mutant Strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Current Microbiology* 5: 191-196.
- Morrisey, J.H. 1981. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: A modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Analytical Biochemistry*. 117:307-310.
- Moritz, B., Striegel, K., de Graff, A.A. y Sahm, H. 2000. Kinetic properties of the glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenases from *Corynebacterium glutamicum* and their application for predicting pentose phosphate pathway flux in vivo. *European Journal of Biochemistry* 267, 3442-3452.
- Narbad, A., Russell, N.J. y Gacesa, P. 1988. Radiolabelling patterns in alginate of *Pseudomonas aeruginosa* synthesized from specifically-labelled <sup>14</sup>C-monosaccharide precursors. *Microbios* 54: 171-179.
- New England BioLabs Inc. "Compatible Cohesive Ends and Generation of New Restriction Sites" (n. d.). Extraída el 15/XII/2014 desde <https://www.neb.com/tools-and-resources/selection-charts/compatible-cohesive-ends-and-generation-of-new-restriction-sites>.
- Ng, F.M. y Dawes, E.A. 1973. Chemostat Studies on the Regulation of Glucose Metabolism in *Pseudomonas aeruginosa* by Citrate. *Biochemical Journal* 132: 129-140.
- Niehaus, W.G. y Dilts, R.P. 1984. Purification and characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Aspergillus parasiticus*. *Archives of biochemistry and biophysics* 228: 113-119.

- Oliver, A., Cantón, R., Campo, P., Baquero, F. y Blázquez, J. 2000 High Frequency of Hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis Lung Infection. *Science* 288(5469): 1251-1254.
- O'Sullivan, B.P. y Freedman, S.D. 2009. Cystic fibrosis. *The lancet* 373(9678): 1891-1904.
- Özer, N., Bilgi, C. y Ögus, I.H. 2002. Dog liver glucose-6-phosphate dehydrogenase: purification and kinetic properties. *The international journal of biochemistry and cell biology* 34: 253-262.
- Palmer, K., Mashburn, L., Singh, P. y Whiteley, M. 2005. Cystic Fibrosis Sputum Supports Growth and Cues Key Aspects of *Pseudomonas aeruginosa* Physiology. *Journal of Bacteriology* 187: 5267–5277.
- Peekhaus, N. y Conway, T. 1998. What's for Dinner?: Entner-Doudoroff Metabolism in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 180(14): 3495-3502.
- Ragunathan, S. y Levy, H.R. 1994. Purification and characterization of the NAD-preferring glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Acetobacter hansenii* (*Acetobacter xylinum*). *Archives of biochemistry and biophysics* 310(2): 360-366.
- Reuter, R., Naumann, M., Metz P., Kopperschläger, G. 1990. Purification and Characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Pseudomonas* W6. *Biomedica Biochimica Acta* 47(7): 539-546.
- Sallantin, M., Huet, J., Demarteau, and Pernollet, J., *Electrophoresis* 1990, 11, 34-36
- Schaeffer F. y Stanier R.Y. (1978) Glucose-6-phosphate dehydrogenase of *Anabaena* sp.: Kinetic and molecular properties. *Archives of Microbiology*, 116, 9-19.

- Scopes, R.K., Testolin, V., Stoter, A., Griffiths-Smith, K. y Algar, E.M. 1985. Simultaneous purification and characterization of glucokinase, fructokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Zymomonas mobilis*. *Biochemical Journal* 228(3): 627-634.
- Silo-Suh, Laura, Suh, S.-J., Phibbs, P.V. y Ohman, D.E. 2005. Adaptations of *Pseudomonas aeruginosa* to the Cystic Fibrosis Lung Environment Can Include Deregulation of *zwf*, Encoding Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase. *Journal of Bacteriology* 187(22): 7561-7568.
- Singh, S., Anand, A. y Srivastava, P.K. 2012. Regulation and properties of glucose-6-phosphate dehydrogenase: A review. *International Journal of Plant Physiology and Biochemistry* 4: 1-19.
- Son, M.S., Matthews Jr, W.J., Kang, Y., Nguyen, D.T. y Hoang, T.T. 2007. *In Vivo* Evidence of *Pseudomonas aeruginosa* Nutrient Acquisition and Pathogenesis in the Lungs of Cystic Fibrosis Patients. *Infection and Immunity* 75(11): 5313-5324.
- Sørensen, H.P. y Mortensen, K.K. 2005. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Microbial cell factories* 4: 1.
- Steinbach, R. A., Sahm, H. y Schütte, H. 1978. Purification and Regulation of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase from Obligate Methanol-Utilizing Bacterium *Methylomonas* M15. *European Journal of Biochemistry* 87: 409-415.
- Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin A. L., Mizoguchi S. D., Warrenner P., Hickey M. J., Brinkman F.S. L., Hufnagle W. O., Kowalik D. J., Lagrou M., Garber R. L., Goltry



- L., Tolentino E., Westbrook-Wadman S., Yuan Y., Brody L. L., Coulter S. N., Folger K. R., Kas A., Larbig K., Lim R., Smith K., Spencer D., Wong G. K.-S., Wu Z., Paulsenk I. T., Reizer J., Saier M. H., Hancock R. E. W., Lory S. y M. V. Olson. 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 406: 959-964.
- Sundaram, S., Karakaya, H., Scanlan, D.J. y Mann, N.H. 1998. Multiple oligomeric forms of glucose-6-phosphate dehydrogenase in cyanobacteria and the role of OpcA in the assembly process. *Microbiology* 144: 1549-1556.
- Sung, J.Y., Lee, Y.N. 2007. Isoforms of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase in *Deinococcus radiophilus*. *Journal of Microbiology* 45:318-325.
- Terry, J.M., Piña, S.E. y Mattingly, S.J. 1990. Environmental Conditions Which Influence Mucoid Conversion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Infection And Immunity* 59(2): 471-477.
- Vander Wyk., J.C. y Lessie, T.G. 1974. Purification and Characterization of the *Pseudomonas multivorans* Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Active with Nicotinamide Adenine Dinucleotide. *Journal of Bacteriology* (120)3: 1033-1042.
- Verma, A., Suthar, M.K., Doharey, P.K., Gupta, S., Yadav, S., Chauhan, P.M.S. y Saxena, J.K. 2013. Molecular cloning and characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Brugia malayi*. *Parasitology* 140: 897-906.

- Velasco-García, R. Mujica-Jiménez, C., Mendoza-Hernández, G. y Muñoz-Clares, R.A. 1999. Rapid Purification and Properties of Betaine Aldehyde Dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 181(4): 1292-1300.
- Velasco-García, R., Gonzales-Segura, L. y Muñoz-Clares, R.A. 2000. Steady-state kinetic mechanism of the NADP<sup>+</sup>- and NAD<sup>+</sup>- dependent reactions catalysed by betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry Journal* 352: 675-683.
- Velasco-García, R., Villalobos, M.A., Ramírez Romero, M.A., Mújica-Jiménez, C., Iturriaga, G. y Muñoz-Clares, R.A. 2006. Betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*: cloning, over-expression in *Escherichia coli*, and regulation by choline and salt. *Archives of Microbiology* 185: 14-22.
- Volkenstein, M.V. y Goldstein, B.N. 1965. Allosteric enzyme models and their analysis by the theory of graphs. *Biochimica et Biophysica Acta* 115: 478-485.
- Welsh, M.J. y Fick, R.B. 1987. Cystic Fibrosis. *The Journal of Clinical Investigation* 80(6): 1523-1526.
- Welsh, M.J. y Liedtke, C.M. 1986. Chloride and potassium channels in cystic fibrosis airway epithelia. *Nature* 322: 467-470.
- Wilderman, P.J., Vasil, A.I., Wesley, E.M., Murphy, R.C. y Vasil, M.L. 2002. *Pseudomonas aeruginosa* Synthesizes Phosphatidylcholine by Use of the Phosphatidylcholine Synthase Pathway. *Journal of Bacteriology* 184(17): 4792-4799.

Wilson, K. 1997. Preparation of Genomic DNA from Bacteria. In Current Protocols in Molecular Biology 2.4.1-2.4.5, Supplement 27. Eds. F. M. Ausubel *et al.*; Wiley InterScience.

Zhang, Y .B., Howitt, J., McCorkle, S., Lawrence, P., Springer, K., and Freimuth, P. 2004. Protein aggregation during overexpression limited by peptide extensions with large net negative charge. *Protein Expression and Purification*. 36:207-216.